

# DIPLOMADOLGOZAT

Csillag István

2025



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**

**Szent István Campus**

**Növényvédelmi Intézet**

**Növényorvos mesterképzési szak**

**Védett növények és inváziós gyomok viromjának vizsgálata a  
bodoglári Tartós szegfű tanösvényen**

<b>Belső konzulens:</b>	Dr. Dorner Zita Egyetemi docens
<b>Belső konzulens intézete/tanszéke:</b>	<b>NVI Integrált Növényvédelmi Tanszék</b>
<b>Belső konzulens:</b>	Nagyné Dr. Galbács Zsuzsanna Tudományos munkatárs
<b>Belső konzulens intézete/tanszéke:</b>	<b>NVI Genomikai kutatócsoport</b>
<b>Készítette:</b>	<b>Csillag István (RKIGXM)</b>

**Szent István Campus**

**2025**

# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések .....	3
2. Irodalmi áttekintés .....	5
2.1. Tartós szegfű ( <i>Dianthus diutinus</i> Kit.) .....	5
2.1.1. A tartós szegfű ( <i>Dianthus diutinus</i> ) jellemzése .....	5
2.1.2. A tartós szegfű morfológiája .....	5
2.1.3. A tartós szegfű elterjedése .....	6
2.2. Selyemkóró ( <i>Asclepias syriaca</i> L.) .....	7
2.2.1. A selyemkóró ( <i>Asclepias syriaca</i> ) taxonómiája .....	7
2.2.2. A selyemkóró morfológiája .....	7
2.2.3. A selyemkóró származása és elterjedése .....	8
2.3. Betyárkóró ( <i>Conyza canadensis</i> L.) .....	9
2.3.1. A betyárkóró ( <i>Conyza canadensis</i> ) taxonómiája .....	9
2.3.2. A betyárkóró morfológiája .....	9
2.3.3. A betyárkóró származása és elterjedése .....	9
2.4. A szegfűfélék képviselőinek selyemkóróval és/vagy betyárkóróval megegyező vírusai .....	10
2.4.1. Uborka mozaik vírus ( <i>Cucumber mosaic virus - CMV</i> ) .....	10
2.4.2. Paradicsom bronzfoltosság vírus ( <i>Tomato spotted wilt virus - TSWV</i> ) .....	12
2.4.3. Arabis mozaik vírus ( <i>Arabis mosaic virus - ArMV</i> ) .....	12
.....	13
2.4.4. Szőlő pinot gris vírus ( <i>Grapevine Pino gris virus - GPGV</i> ) .....	13
2.5. A nagy áteresztőképességű szekvenálás a vírusdiagnosztikában .....	14
3. Anyag és módszer .....	15
3.1. A minták felvételezése .....	15
3.2. Totál nukleinsav kivonás .....	16
3.3. A poolok elkészítése .....	17
3.4. DNáz kezelés .....	18
3.5. Bioinformatikai elemzések .....	19
3.6. cDNS szintézis .....	20
3.7. Aktin teszt .....	21
3.8. A bodoglári RNS minták kezelése .....	21
3.9. Primer tervezés .....	22
3.10. Gradiens PCR .....	24
3.11. PCR termék tisztítása .....	25

3.12. Ligálás .....	25
3.13. Plazmid tisztítás baktériumtenyészetből .....	26
3.14. Sanger szekvenálás .....	26
4. Eredmények és értékelésük .....	28
4.1. A minták totál nukleinsav tisztítása és HTS-re való előkészítése .....	28
4.2. A HTS adatainak bioinformatikai elemzése .....	29
4.3. A HTS-sel azonosított vírusok jelenlétének visszaigazolása RT-PCR-rel .....	30
4.3.1. cDNS szintézis készítése az RNS poolokból és minőségük ellenőrzése .....	30
4.3.2 a DvV2-re tervezett primerek használatához szükséges optimális anellálási hőmérséklet meghatározása .....	31
4.3.3. A minták RT-PCR tesztje a DvV2 jelenlétére .....	32
4.3.4. A DvV2 PCR-ben sokszorozott darabjainak klónozása .....	33
4.4. A selyemkóróban és a tartós szegfűben azonosított DvV2 szekvenciák filogenetikai elemzése .....	33
5. Következtetések és javaslatok .....	35
6. Összefoglalás .....	36
7. Köszönetnyilvánítás .....	37
8. Irodalomjegyzék .....	38

# 1. Bevezetés és célkitűzések

A szántóföldi növénytermesztésben és a természetes élőhelyeken az egyik legjelentősebb szerepet a gyomnövények töltik be a károsítók közül. Jelenlétükkel kiszorítják a hazai flórában előforduló őshonos fajokat, csökkentik a terméshozamot, valamint kórokozó vírusok számára szolgálnak gazdanövényként. A gyomokban replikálódó vírusok szerepe jelentős, hiszen terjedésüket különböző vektorok teszik lehetővé, így az élőhelyen a gyomnövény környezetében előforduló növényfajok is veszélyeztetettek.

A vektorfajok populációjának növekedésében szintén nagy szerepet játszanak a gyomnövények, hiszen táplálékforrássul szolgálnak és lehetőséget biztosítanak számukra, hogy áttelepüljenek természetbe, illetve vadon élő növényeinkre. A vírusrezervoár fajok tanulmányozása hozzá segít bennünket ahhoz, hogy mélyebb ismereteket szerezzünk a növénykórokozó vírusok terjedésének hátteréről (Wisler & Norris, 2005). Az özönnövények nagyszámú megjelenése szintén elősegíti az új vírusok, variánsok és vektorok megjelenését és terjedését (Najberek et al. 2022). Számos növényvirologiai kutatás vizsgálta már a gyomnövényekben előforduló vírusok összességét, és napjainkban egyre több tanulmány foglalkozik ezen kórokozók terjedésének feltárásával is. A virológia ezen területe azonban továbbra is olyan kutatási irány, amelyben a jövőben még jelentős ismeretbővítésre van szükség (Ma et al. 2020).

A kutatásom három különböző növényfaj vizsgálatára terjed ki, melyek közül kettő egy Észak-Amerikából származó inváziós gyomnövény, amelyek nem csak a termesztés területén vannak jelen és okoznak károkat, hanem a természetes élőhelyeken is egyaránt. Az első faj a selyemkóró (*Asclepias syriaca*) egy évelő gyomfaj, amely nagyon jól tűri a szárazságot így kifejezetten gyorsan terjed homoktalajokon, de felbukkanása szántóföldeken, gyümölcsösökben és szőlő ültetvényekben is igen gyakori. A második faj a betyárkóró (*Conyza canadensis*) egy egyéves gyomnövény, amelynek előfordulása szintén sokrétű, hiszen gyakran megjelenik a kapás kultúrákban, gyümölcs és szőlőültetvényekben, valamint a termesztés területén kívülre eső nyílt homoki gyepekben is. A harmadik faj egy igen ritka fokozottan védett növény a tartós szegfű (*Dianthus diutinus*), amelynek eddigi ismereteink szerint világ állománya Magyarországon él és hazánkban belül is csak a Duna-Tisza közti homokpusztagyepekről vannak előfordulási adatai és a fentebb említett két növényfaj jelenlétével és terjeszkedésével átalakítják élőhelyének flóráját, amellyel veszélyeztetik a szegfűfaj fennmaradását. A kutatás során a három növényfaj egyedeinek begyűjtését egy

helyszínen, de három különböző pontról végeztem el, abból a célból, hogy viromjaikat meghatározzam és azonosítsam esetleges vírusrezervoár szerepüket. A fő célkitűzésem a selyemkóró, betyárkóró és tartós szegfű növények viromjainak feltérképezése nagy áteresztő képességű szekvenálással, majd az eredmények elemzése, visszaigazolása és összesítése.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Tartós szegfű (*Dianthus diutinus* Kit.)

#### 2.1.1. A tartós szegfű (*Dianthus diutinus*) jellemzése

A tartós szegfű (*Dianthus diutinus*) egy évelő kétszikű faj, amely a szegfűalkatúak (*Caryophyllidae*) alosztályába, a szegfűvirágúak (*Caryophyllales*) rendjébe és a szegfűfélék (*Caryophyllaceae*) családjába tartozik. Első tudományos leírója a magyar botanika egyik kimagasló alakja Kitaibel Pál volt. A magyar botanikus az egyik Alföldi útja alkalmával találkozott először a fajjal a Pótharaszti pusztán, ami a mai Csévharaszt területéhez tartozik (Vidéki et al. 2005). Miután a növényt leírták vitatottá vált a faji elkülönülése egy másik déloroszországi fajjal a *Dianthus polymorphus* (M.Bieb.)-al szemben, hiszen hasonló morfológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. A téves nézeteket Neilreich (1860) cikke is alátámasztotta. Degen (1895) viszont bebizonyította, hogy a két faj különálló, mivel a csészék alakja és a szirmok kopaszsága egyértelműen elkülöníti egymástól a két rokonfajt (Degen 1895). A szegfűfaj 1977 óta szerepel az IUCN vöröslistáján, valamint 1982-ben védetté, később 1993-ban fokozottan védetté nyilvánították. Ritkasága és endemikus státusza, valamint az erre indokoltta védetté nyilvánítását, hogy akkor még nem voltak ismertek az elterjedési helyei és veszélyeztető tényezői. Mivel a célzott felkutatása sem vezetett eredményre, a fokozott védettség alá helyezése indokoltnak bizonyult (Vidéki et al. 2005). Azóta feltárták a fajra leselkedő veszélyeztető tényezőket, amelyek közül az egyik legjelentősebb a fennmaradását veszélyeztető idegenhonos növényfajok megjelenése, különösen a selyemkóró (*Asclepias syriaca*) és a betyárkóró (*Conyza canadensis*). Ezen inváziós növényfajok terjeszkedésükkel és allelopatikus hatásukkal képesek kiszorítani a természetes élőhelyek növényzetét, többek között a fokozottan védett tartós szegfűt is (Bankovics & Mile 2011).

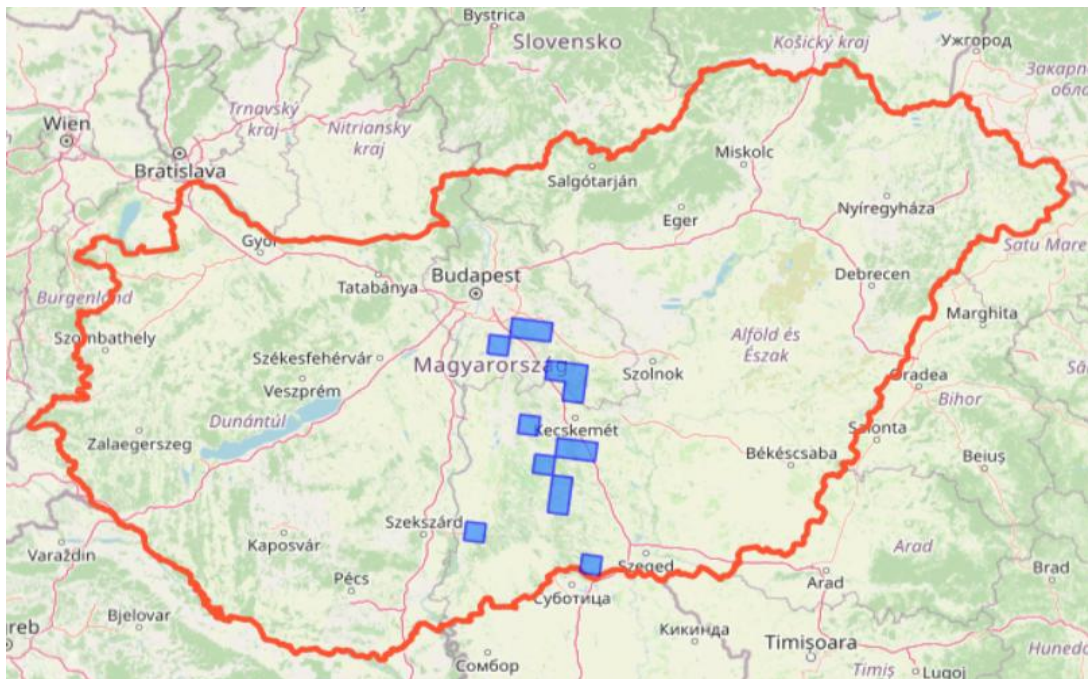
#### 2.1.2. A tartós szegfű morfológiája

A tartós szegfű egy közepes méretű 20-60 cm-es növényfaj. Hemikryptophyta, azaz egy olyan évelő növény, amelynek áttelelő szervei kicsivel a talajfelszíne fölött találhatóak. A növény teljes felületét hamvasszürke viaszbevonat borítja. A szálas tőlevelek előfordul, hogy tőlevélrózsát (rozettát) alkotnak. A száron átellenesen álló szálas levelek 2-5 cm hosszúak, 2-5 mm szélesek, ép szélűek, csúcsuk kihegyezett és tövükön levélhüvellyé összenőttek. Virágzata tömött bogernyő, amelyben a virágok csomókban vagy egyes estekben egyesével ülnek. A rózsaszín szirmoknak csak a kiszélesedő lemeze tartalmaz színyt, a csészével eltakart részeket nem tartalmaz klorofilt. Termése fogakkal nyíló tok. Alaktani tulajdonságait tekintve

hasonlít a magyar szegfűre (*Dianthus ponederae* A. Kern), de abban különbözik, hogy színe kevésbé szürke, illetve virágzat sokvirágú, amin kisebb virágok találhatóak, mint a tartós szegfű esetében (Vidéki et al. 2005; [http1](#); Király 2009).

### 2.1.3. A tartós szegfű elterjedése

A faj elterjedésével kapcsolatban korábban több olyan teória is született, amelyek szerint Szerbiában, Besszarábiában, Ukrajnában, Romániában és a volt Szovjetunióban is előfordul, de ezeket a nézeteket megcáfolták, ezért, mivel azóta sem találtak újabb egyedet az országhatáron kívül, így csak Magyarországra terjed ki elterjedése azon belül is Duna-Tisza közére. A szegfűfaj herbáriumi, valamint irodalmi kutatásai során az derült ki, hogy kis híján 30 lelőhelyen fordult elő, de mára ez 10 kisebb-nagyobb sűrűségű állományra redukálódott. A faj a lelőhelyei a következők: Bodoglár, Harkakötöny, Ásotthalom, Nemesnádudvar, Bócsa, Jakabszállás, Nagykőrös, Pusztavacs, Csévharaszt, Ócsa. Továbbá ismeretes még egy állomány, amely mesterséges áttelepítés után alakult ki Fülöpháza mellett a nemzeti parki törzsterületen, de ezt megelőzően a faj természetes előfordulása nem volt ismert azon a lelőhelyen. A tartós szegfű elterjedését az 1. ábra szemlélteti (Vidéki et al. 2005).



1. ábra: A tartós szegfű elterjedése Magyarországon ([http1](#))

## 2.2. Selyemkóró (*Asclepias syriaca* L.)

### 2.2.1. A selyemkóró (*Asclepias syriaca*) taxonómiája

A selyemkóró (*Asclepias syriaca*) a meténgfélék családjába (*Apocynaceae*) és a selyemkórórfélék alcsaládjába (*Asclepiadoideae*) tartozik. Az alcsalád körülbelül 2700 fajt tudhat magáénak és ebből 140 faj tartozik az *Asclepias* nemzetségbe, amelynek túlnyomó része trópusi elterjedésű. Hazánkban viszont az *Asclepias* nemzetség tagjai közül csak a selyemkóró van jelen. Linné és kortársai tévedésből azt hitték, hogy a faj Szíriából származik, ezért szerepel a tudományos nevében a „syriaca” elnevezés. A selyemkórónak számos elnevezése létezik, amelyek közül az egyik legelterjedtebb a vaddohány, hiszen morfológiáját illetően fellelhető néhány hasonlóság egy hazánkban is termesztett növényvel a dohányjal (*Nicotinia tabacum*). Angol neve a „common milkweed”, amely arra utal, hogy tejnedvtartalma igen magas, továbbá hozzáfűzendő, hogy enyhén mérgező is (Bagi 2004; Bagi 2008).

### 2.2.2. A selyemkóró morfológiája

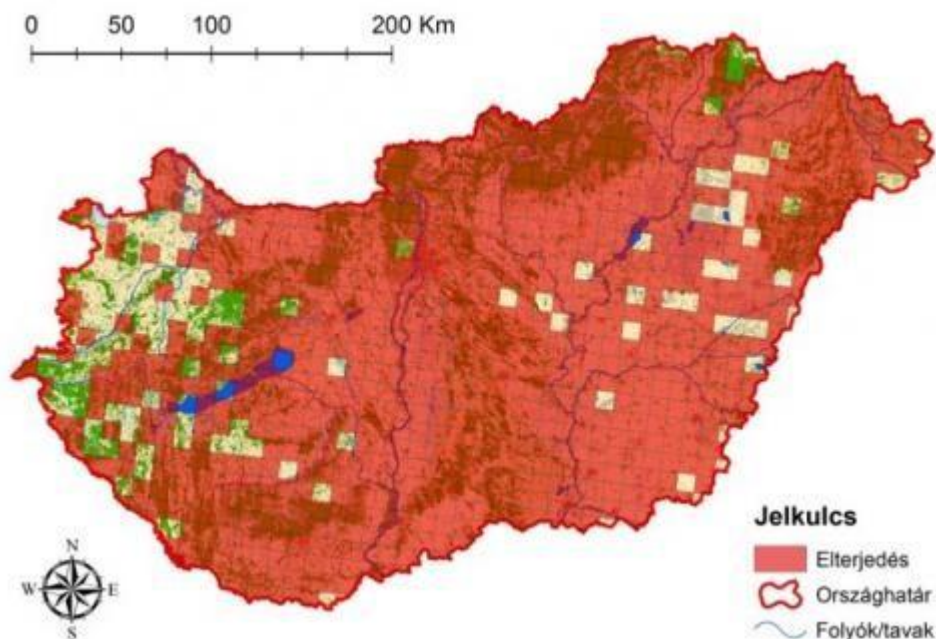
A selyemkóró egy olyan évelő növény, amelynek áttelelő szervei jóval a talaj felszíne alatt találhatóak, röviden geophyta. Erőteljes növekedésű és akár 50-150 cm magasra is megnőhet. A vastag gyökértarackok a talaj felszíne alatt általában 10-40 cm mélyen futnak, de esetenként 1-1,2 méter mélyre is képesek lehatolni. A levelek átellenesek, rövid nyelűek, hosszúkás-tojásdad/széles lándzsás alakúak, 10-25 cm hosszúak, 5-9 cm szélesek és épszélűek. A virágzata tömött, virágai illatosak, öttagúak, színük a fehértől a rózsaszínen át a vörösig változhat. A termése enyhén szarv alakú, tojásdad-hengeres, 2-3 cm széles, 8-15 cm hosszú, hasi varraton felnyíló tűszőszerű tok. A termés felülete molyhos, lágytüskés. A tokban található lapos magvak 7×5 mm-esek (2. ábra), szőrüstökűek ezért a szél segítségével igen messzire képesek eljutni. A magok három évig őrzik meg csírázókéességüket (Bagi 1999; Király 2009).



2. ábra: A termésben található magok (Kriska 2020)

### 2.2.3. A selyemkóró származása és elterjedése

A selyemkóró egy Észak-Amerikából származó inváziós gyomnövény, amely megjelenhet a természetés területén, illetve a természetes élőhelyeken is egyaránt (Bagi 2004). Gyakori továbbá, hogy megjelenik útszéleken, mezőkön, valamint legelőkön (http2). A gyomnövény 1629-ben bekerült Európába majd pedig 1736-37-ben Pococke adatai alapján vélhetően már hazánkban is jelen volt (Bagi 2004). A faj elterjedését nagyban elősegítette, hogy 1870 és 1950 között intenzíven természetették Magyarországon (http3). Mindez annak köszönhető, hogy széleskörű hasznosíthatóságot tulajdonítottak neki például mézélő és dísnövényként is ültették, illetve a textilipar számára is hasznosnak számított (Király 2009). Mindezek után természetésével felhagytak, mivel a növény nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, ennek ellenére a mai napig hasznosítják a rendkívül jó mézélő adottságainak köszönhetően. Termesztésének felhagyása után elvadult és szétterjedő invazív állományai nagymértékű károkat okoztak. Az egész országban elterjedt faj (3. ábra), de leggyakrabban az Alföldön találkozhatunk vele (http3). Homoktalajokon különösen gyorsan terjed és jól tűri a szárazságot. Természetes élőhelyek közül a nyílt homokpusztagyepéken rendkívül gyakori. A természetés területét illetően előfordul szántóföldeken, valamint nagy részben van jelen gyümölcsösökben, szőlősökben és az erdészeti területeken egyaránt (Bagi 2004).



3. ábra: A selyemkóró elterjedése Magyarországon (http3)

## **2.3. Betyárkóró (*Conyza canadensis* L.)**

### **2.3.1. A betyárkóró (*Conyza canadensis*) taxonómiája**

A betyárkóró (*Conyza canadensis*) a fészekvirágzatúak (*Asteraceae*) családjába tartozó növényfaj. Mintegy ötven faj tartozik a *Conyza* nemzetséghez, amelynek képviselői az újvilági trópikusokon őshonosak. Európában mindössze két faj fordul elő ebből a nemzetségből, amelyek közül mindkettő behurcolt és meghonosodott. Hazánkban a *Conyza canadensis* az egyetlen „képviselője” a nemzetségnek. Angol neve: „Canadian fleabane” (Pál 2012). Európában már évszázadok óta jelen van, de mivel elterjedési területe egyre növekedett ezért már világszerte előforduló növény. Ruderális gyomtársulásokban, útszéleken, szántóföldeken és legelőkön is előfordulhat néhol akár tömegesen is (http4; Király 2009).

### **2.3.2. A betyárkóró morfológiája**

A betyárkóró egy egyéves, azaz therophyta faj, amelynek az átvészelő szerve maga a mag. Az ősszel csírázó 10-180 cm magas egyedek vegetatív (rozettás) alakban is képesek áttelelni. Levelei ritkán szőrösek, lándzsásak, ép szélűek vagy ritkán fogasak. A levelek 1-10 cm hosszúak és 1 cm szélesek, de ritkán előfordulhat, hogy szélesebbek. A szára hengeres és felálló, valamint a növény egész felülete érdes vagy szőrözött. Sokfészkű buga virágzattal rendelkezik, amelyen a csöves virágok sárgásfehér színűek. Kaszat termése 1-2 mm hosszú, amelynek felülete ritkán fehéres szőrökkel borított vagy kopasz, alakja pedig lapos és hosszúkás. A bóbitájának mérete a termés hosszánál jóval nagyobb közel háromszorosa. Egyes szerzők arról számoltak be, hogy az európai állományok között nagymértékű a morfológiai változatosság. (Weaver 2001; Pál 2012; Király2009).

### **2.3.3. A betyárkóró származása és elterjedése**

A betyárkórónak Észak-Amerika az őshazája, ahol ruderális területeken, valamint zavart gyepekben találhatóak őshonos állományai. Európába a feltételezések szerint egy kitömött madár tollán jutott be. A kontinensen az első említés a növényről 1655-ből Dél-Franciaországból származik. Gyors terjedése miatt 250 év alatt ellepte egész Európát a 19. századra pedig már mind az öt világrészen megtalálható volt, tehát kozmopolita fajjává vált. Hazánkba az 1750-es évek környékén került be és pár évtized múlva már a gyakori gyomfajok közé volt sorolható. A 18. század végére az egész országot lefedte elterjedési térképe, ami lehetővé tette, hogy napjainkra kialakult az ábrán látható állapot (4. ábra). Előfordulását tekintve elég sokrétű faj, mivel művelt területeinken is megtalálható főleg kapásokban,

legelőkön, illetve gyümölcs és szőlőültetvényekben egyaránt. Továbbá a természetes homokos textúrájú élőhelyeket is előnyben részesíti, ilyenek például a nyílt homokpusztagyepek. Mindezek mellett gyakran megtalálható erdőkben, folyómedrekben, valamint utak és vasúti töltések mentén. A klímaváltozás miatti hosszú nyári aszályok gyakorisága előreláthatólag kedvezni fog a faj további terjedésének, mert igen jó szárazságtűrő képességgel rendelkezik (http4; Pál 2012).



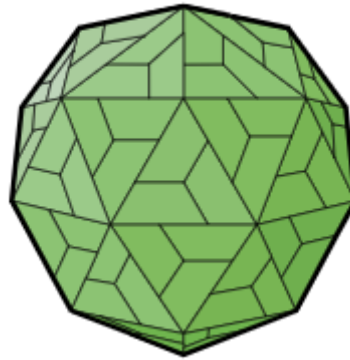
4. ábra: A betyárkóró elterjedési területe Magyarországon (Pál 2012).

## 2.4. A szegfűfélék képviselőinek selyemkóróval és/vagy betyárkóróval megegyező vírusai

### 2.4.1. Uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus - CMV*)

Az uborka mozaik vírus (*Cucumovirus CMV*) a *Cucumovirus* nemzetségbe és a *Bromoviridae* családjába tartozik. Egy világszerte elterjedt vírus, amely elsősorban a trópusi és a mérsékelt éghajlati övezetekben érzi jól magát. A CMV egy polifág vírus, amely több, mint 1200 növényfajt képes megfertőzni, köztük egy és kétszikűeket is egyaránt. A fertőzés után kialakuló tünetek változók lehetnek a gazdanövény és a vírustörzs függvényében. A növényeken megjelenhetnek mozaikos foltok, valamint klorózis, nekrozis és fejlődési rendellenesség is. A vírus levéltetvekkel terjed elsősorban, még hozzá nem perzisztens módon. A CMV virionja 28-30 nm átmérőjű és 180 kapszid alegységből áll (Mochizuki & Ohki 2012). Alakja az 5. ábrán látható ikozaéder (Moyle et al. 2018). Az uborka mozaik vírus képes megfertőzni a selyemkórót

(Salamon et al. 1989), illetve a szegfűfélék közül a buglyos fátyolvirágot (*Gypsophila paniculata* L.), a kerti habszegfűt (*Silene armeria* L.), a csillaghúr (*Stellaria*) nemzetségbe tartozó fajok egyes képviselőit köztük a tyúkhúrt (*Stellaria media* L.), a török szegfűt (*Dianthus barbatus* L.) és a kerti szegfűt (*Dianthus caryophyllus* L.) is (Sastry et al. 2019).



**5. ábra:** Ikozaéder (http5)

#### **2.4.1.1. Az uborka mozaik vírus (CMV) genomszerveződése**

Az uborka mozaik vírus genomja három RNS szegmensből tevődik össze, amelyek változó hosszúságúak. Az RNS1 3,382, az RNS2 3,050 és az RNS3 2,218 nukleotid hosszú. A 3 RNS szegmens mindössze 5 különböző fehérjét kódol, amelyek a 6. ábrán láthatóak. A monocisztronos RNS1 molekula egyetlen fehérjét határoz meg, méghozzá az 1a fehérjét. Ezzel ellentétben az RNS2 és az RNS3 már két gént kódolnak. Ezek az RNS2 esetén 2a és 2b, az RNS3 esetében pedig a 3a és 3b fehérjék. A vírus replikációhoz feltétlenül szükséges az 1a és a 2a gének jelenléte, hiszen ezek együtt alkotnak egy replikációs komplexet. A 2b fehérje részt vesz a vírusciklus legtöbb lépésében és képes megzavarni a gazdaszervezet alapvető védekezési mechanizmusait. Az ábrán a mozgási fehérjét MP (movement protein) rövidítés jelöli, ez pedig nem más, mint a 3a fehérje, ami a vírus egyik sejtről másik sejtre való terjedését teszi lehetővé. A 3b gén a köpenyfehérje (CP) kialakulásáért felelős. A megfertőzött növény szöveteiből lehetséges kimutatni a vírus összes ismert fehérjéjét (Jacquemond 2012; Moyle et al. 2018).



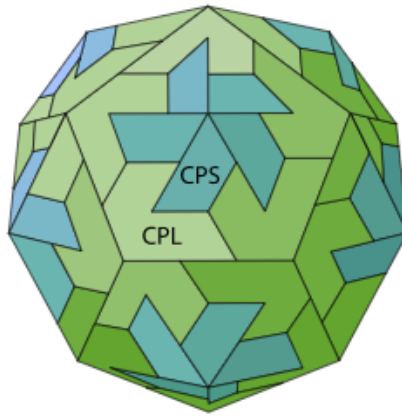
6. ábra: A CMV genomszerveződése (http6)

#### 2.4.2. Paradicsom bronzfoltosság vírus (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV)

A paradicsom bronzfoltosság vírus (*Orthotospovirus tomatomaculae*) a *Tospoviridae* családba és az *Orthotospovirus* nemzetségbe tartozó vírus. Hajtásban és szabadföldön is megjelenhetnek. Tripszekkel (*Thysanoptera*) perzisztensen képesek terjedni, amelyek közül a nyugati virágtripesz (*Frankliniella occidentalis*) emelhető ki, amelynek több, mint 1000 gazdanövénye létezik. Továbbá mechanikailag is átvihető a vírus. A TSWV tünetei azzal kezdődnek, hogy először sárgás (bronz színű) foltok jelennek meg a fiatal leveleken, majd pedig később kis sötét barna foltok keletkeznek (De Oliveira et al. 2018; http7; Sastry et al. 2019). A TSWV genomja három nagy, közepes és kicsi szegmensből áll. A virionokat a foszfolipid membrán borítja, gömb alakúak és átmérőjük 80-120 nm (Kamran et al. 2024). A paradicsom bronzfoltosság vírus képes megfertőzni a betyárkórót (Grieco et al. 2000), valamint a szegfűfélék családjából az egynyári fátyolvirágot (*Gypsophilla elegans* M. Bieb.), a mezei csibehúrt (*Spergula arvensis* L.) és a tyúkhúrt (Sastry et al. 2019).

#### 2.4.3. Arabis mozaik vírus (*Arabis mosaic virus* - ArMV)

Az arabis mozaik vírus (*Nepovirus arabis*) a *Secoviridae* családba azon belül a *Comovirinae* alcsaládba és a *Nepovirus* nemzetségbe tartozó vírus. Számos növényt képes megfertőzni. Tünetei között szerepelnek a mozaikos foltok, a felpöndörödött/csavarodott lombozat, illetve a növekedés visszamaradása. A vírust tífónálféreg (Xiphinema spp.) terjesztik nem perzisztens módon. A vírus genomja két egyszálú RNS-ből áll (Gao et al. 2016; http8). Virionja 28-30 nm átmérőjű és alakja a 7. ábrán látható ikozaéder (http9). Az arabis mozaik vírus megtudja fertőzni a selyemkórót (Bellardi & Rubies-Autonell 1999), a kakukkszegfű (*Lychnis*) nemzetségbe tartozó fajok egyes képviselőit, a kerti szegfűt és a török szegfűt is (Sastry et al. 2019).



7. ábra: Az arabisz mozaik vírus virionképe (http9)

#### 2.4.4. Szőlő pinot gris vírus (*Grapevine Pino gris virus* - GPGV)

A GPGV-t (*Trichovirus pinovitis*) először 2003-ban, az észak-olaszországi Trentino borvidéken azonosították egy Pinot gris ültetvényben, innen ered a neve is. Későbbi vizsgálatok azonban más szőlőfajtákban is kimutatták. A GPGV a Betaflexiviridae családba tartozó Trichovirus nemzetség egyik alapfaja (Saldarelli et al. 2017; Tarquini et al. 2019). Egyszálú RNS-genommal rendelkezik, amely 7275 nukleotid hosszúságú (Fajardo et al. 2017). A vírus terjedése többek között a szőlő gubacsatkája (*Colomerus vitis*) által, illetve fertőzött szaporítóanyaggal is megtörténhet (Bertazzon et al. 2016). Lágyszárú növények közül például a *Silene latifolia subsp. alba* és a *Chenopodium album* is szolgálhatnak rezervoárként (Fajardo et al. 2017).

Molekuláris vizsgálatok alapján legközelebbi rokona a Grapevine berry inner necrosis virus (GINV), amely szintén a Trichovirus nemzetség tagja, és elsőként Japánban írták le. Azóta több európai és ázsiai országban is azonosították, többek között Szlovákiában, Szlovéniában, Franciaországban, Csehországban, Görögországban és Koreában (Bertazzon et al. 2016). A kórokozó pontos szerepe azonban még nem teljesen tisztázott, mivel számos törzse ismert, és a különböző szőlőfajták érzékenysége jelentősen eltérhet (Fajardo et al. 2017).

A GPGV a Tymovirales rendbe azon belül Betaflexiviridae családba és a Trichovirus nemzetségbe tartozik. Viszonylag újonnan azonosított kórokozó, amely a szőlő (*Vitis vinifera*) különböző tünetegyütteseinek felelős, többek között a klorotikus foltok, a növekedési visszamaradás, a levélalak torzulások, valamint a termés mennyiségi és minőségi romlásának kialakulásáért. A vegetáció kezdetén a fertőzött tőkék jól felismerhető tüneteket mutatnak, azonban a nyár folyamán ezek fokozatosan elhalványulnak, és a betegség rejtve marad a leveleken. A GPGV képes arra, hogy megfertőzze a selyemkórót és a szegfűfélék családjából a

fehér mécsvirágot (*Silene latifolia subsp. alba* Poir.) (Demian et al. 2022; Sastry et al. 2019; Karki et al. 2025).

## **2.5. A nagy áteresztőképességű szekvenálás a vírusdiagnosztikában**

A vírusdiagnosztikai technológiák fejlődése különösen a nagy áteresztőképességű szekvenálási eljárások (High Throughput Sequencing - HTS) megjelenése új távlatokat nyitott a molekuláris genetikai kutatásokban. A HTS a korábbiaknál lényegesen érzékenyebb módszert kínál a növényi vírusok kimutatására. Korábban a PCR-alapú és szerológiai eljárások voltak a leggyakrabban alkalmazott diagnosztikai módszerek, mivel ezek megbízhatóak, könnyen használhatók és költséghatékonyak. Ezért ezek a technikák ma is alapvető szerepet játszanak a vírusok azonosításában. Saját kutatásomban ezeket a hagyományos módszereket a HTS-ből származó eredmények megerősítésére alkalmaztam.

A HTS legnagyobb előnye, hogy míg a szerológiai vizsgálatokhoz specifikus antitestekre, a PCR-hez pedig a célzott kórokozó szekvenciájának ismeretére van szükség a primerek megtervezéséhez, addig a HTS esetében nincs szükség előzetes információra. Ez a technika képes feltárni a mintában jelen lévő valamennyi vírust és viroidot, vagyis a gazdanövény teljes viromját. A módszer lehetővé teszi teljes genomok szekvenálását anélkül, hogy specifikus primereket vagy antitesteket kellene alkalmazni, így nemcsak ismert, hanem korábban nem azonosított vírusok és viroidok kimutatására is alkalmas.

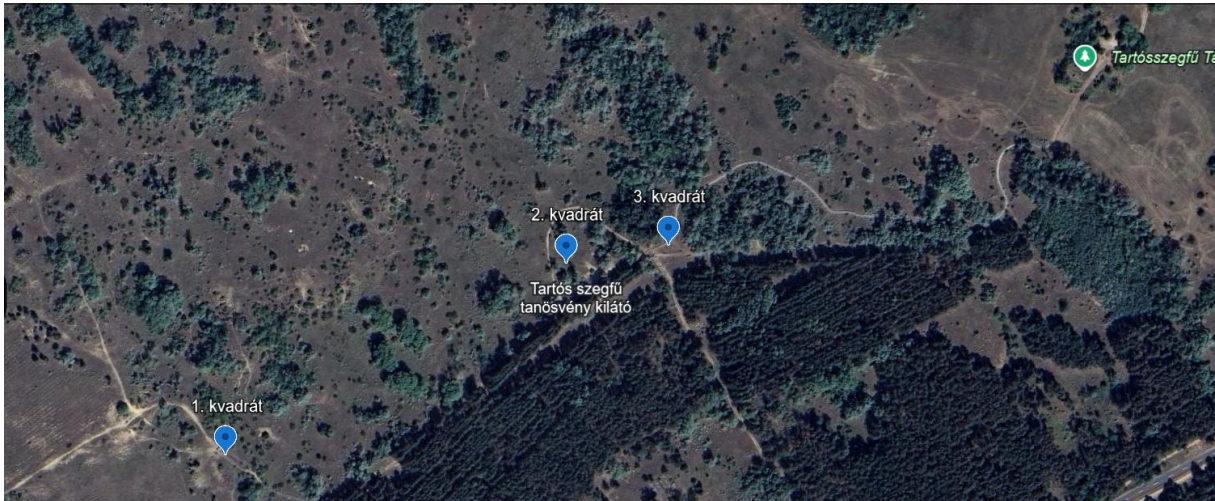
Az utóbbi években a HTS széles körű használata nagymértékben felgyorsította az új vírusok és viroidok azonosítását, valamint genetikai szekvenciáik meghatározását. Fontos azonban megjegyezni, hogy ez az eljárás csupán a kórokozók genetikai információját szolgáltatja, ezért a patogének jelentőségének, gazdanövényeinek, tüneteinek és biológiai sajátosságainak feltárásához további virológiai kutatások szükségesek.

A HTS különböző platformokon alkalmazható, közülük az Illumina rendszer a legelterjedtebb. Ezzel a módszerrel egy időben akár több százmillió nukleotidszekvencia is meghatározható, azonban az adatok feldolgozása és értelmezése elengedhetetlenül bioinformatikai elemzéseket igényel. A kapott eredményeket minden esetben célszerű más, független diagnosztikai módszerekkel például szerológiai tesztekkel vagy RT-PCR-rel megerősíteni (Lebas et al. 2022; (Massart et al. 2017).

## 3. Anyag és módszer

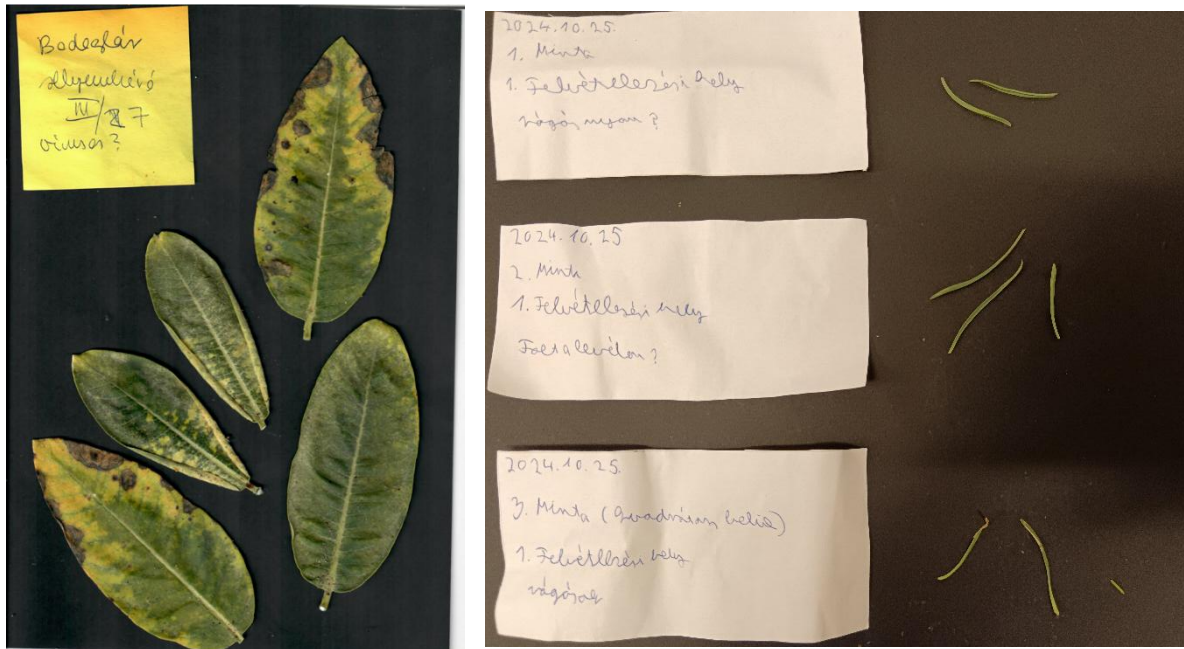
### 3.1. A minták felvételezése

A vizsgált mintáim begyűjtését a bodoglári Tartós szegfű tanösvényen kiépített pallósor mentén, illetve a Kiskunsági Nemzeti Park Igazgatóság vagyonkezelésében lévő gyepterületen végeztük (8. ábra).



**8. ábra:** A felvételezési helyek és kvadrátok elhelyezkedése a Tartós szegfű tanösvényen (http10, Google Earth).

A minták begyűjtésének időpontja két különböző napon történt, valamint a kvadrátok cönológiai viszonyainak meghatározására is egy másik időpontban került sor. Az első mintagyűjtési akciónk 2024.07.10-én történt, amely során a selyemkóró és betyárkóró egyedek begyűjtését végeztük el a 8. ábrán látható helyjelzőkkel megjelölt területekről. Több mintán is észleltünk vírusos betegségekre utaló jeleket (9. ábra). A második mintagyűjtési alkalom helyszíne szintén a 8. ábrán megjelölt helyeken történt 2024.10.25-én, de ezúttal a fokozottan védett tartós szegfű egyedek leveleinek begyűjtésére került sor (10. ábra). Az őszi begyűjtés azért volt indokolt, mivel ilyenkor a növény túlélésért fejleszti így készülve a telelésre és ebben az állapotban kevesebb stressz éri a mintavétel során. A mintákat begyűjtés után  $-70^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztva tároltuk.



**9-10. ábra:** A selyemkóró tünetes levelei (bal oldalt), A tartós szegfű begyűjtött levelei (jobb oldalt). (Saját képek)

A jelölt kvadrátokban növényfelvételezést is végeztem 2024.08.27-én, mindezt annak érdekében, hogy kiderítsem vannak-e további fajok, amelyek zavaró tényezők mind a termesztés területén mind pedig természetes élőhelyeken. A növényfelvételezés adatfeldolgozását a következőképpen végeztem: a 2\*2-es kvadrátok kijelölése után meghatároztam a bennük elhelyezkedő minden egyes fajt, majd százalékosan megbecsültem azok borítási értékeit.

### 3.2. Totál nukleinsav kivonás

A begyűjtött növényi mintákat  $-70\text{ °C}$ -on tároltam a későbbi vírusdiagnosztikai vizsgálatokhoz. Az elemzés első lépéseként a teljes nukleinsav kivonását végeztem el, amelynek során a növényben található összes RNS és DNS beleértve a gazdanövény és a benne jelenlévő vírusok nukleinsavait is izolálásra került. A tisztítás lényege, hogy a gyűjtött mintákból a nukleinsav kivonás után nem csak a gazdanövények nukleinsavait vonjuk ki, hanem az azokban jelenlévő vírusok RNS-ét és DNS-ét is.

A folyamat során annak érdekében, hogy a nukleinsavak ne induljanak bomlásnak végig jégen dolgoztam. Első lépésként a steril dörzsmozsarakat, amelyeket szintén jégen kellett hűteni, valamint az Eppendorf csöveket készítettem elő. A csövekbe egyenként  $600\text{ }\mu\text{l}$  fenolt mértem

ki, majd pedig előre elkészítettem a kivonó puffert. A puffer 10 mintára nézve 7 ml steril vizet, 1 ml 10xEB-t és 2 ml 10%-os SDS-t tartalmaz. A  $-70^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztott növénymintákat a bomlás elkerülése végett folyékony nitrogénbe helyeztem és a hűtött mozsarakban egyenként gyorsan eldörzsöltem őket. Ezek után 650  $\mu\text{l}$  kivonó puffert mértem rá, homogenizáltam és a dörzsmozsárból a fenolt tartalmazó Eppendorf csövekbe öntöttem. A mintákat a vortexelés után centrifugáltam 5 percig 15000 rpm-en és  $20^{\circ}\text{C}$ -on. Mindeközben előkészítettem az új Eppendorf csöveket, amelyekbe 300  $\mu\text{l}$  fenolt és 300  $\mu\text{l}$  kloroform: izoamilalkoholt mértem és a centrifugálás után keletkezett felső fázist a keverékre pipetáztam, figyelve, hogy a két fázis határán elhelyezkedő interfázis (fehérjék) ne kerüljön bele. Ismét vortexeltem és 5 percig 15000 rpm-en  $20^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltam. Szintén új csövekbe 600  $\mu\text{l}$  vizes fázissal megegyező térfogatú kloroform: izoamilalkoholt mértem és ismét a centrifugálás után létrejött felülúszó fázist rápipetáztam. Újra vortexeltem és centrifugáltam, közben pedig újabb csövekbe kimértem 20  $\mu\text{l}$  4M-os Na-acetátot, továbbá 1 ml 96%-os etanolt (EtOH). A felső fázist ismét hozzáadtam a keverékhez és pár perc jégen tartás után kézzel forgatva kevergettem a nukleinsavak kicsapódásának érdekében. Ezután 30 percig 15000 rpm-en és  $4^{\circ}\text{C}$ -on a centrifugába helyeztem. A centrifugálás végeztével az alkoholt leöntöttem és a csövekbe ismét 1 ml etanolt tettem, de ezúttal 70%-osat. 3 percig 15000 rpm-en  $20^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltam, majd az alkoholt leöntöttem és a csövekben keletkezett csapadékot beszárítottam a maradék alkohol eltávolításának érdekében. A mintákat a szárítás után 30  $\mu\text{l}$  steril vízben visszaoldottam, vortexeltem és jégen tartottam. A totál nukleinsav kivonás sikerességének ellenőrző futtatása előtt azonban szükséges volt elkészítenem egy EtBr-t tartalmazó 1,2%-os agaróz gélt, valamint az FDE-vel megfestett mintákat. A gélelektroforézishez 2  $\mu\text{l}$  mintából, 3  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ -ból és 5  $\mu\text{l}$  FDE-ből álló keveréket készítettem ezt  $65^{\circ}\text{C}$ -on 5 percig denaturáltam és végül TBE pufferben történő elválasztással 115 V-on elvégeztem a futtatást. Végül az UV megvilágítás után kapott gélképen ellenőriztem a kivonás eredményességét.

### **3.3. A poolok elkészítése**

A további vizsgálatok megkönnyítése érdekében a tisztított nukleinsav mintákból keverékeket (ún. poolokat) állítottam össze. Elsőként olyan poolokat készítettem, amelyek egy egyedhez tartozó levelekből kinyert nukleinsavakból álltak. A mintákat felvételi helyszínenként és fajonként egyedi azonosítóval láttam el, amely az 1. táblázat első oszlopában látható. A tisztítás során saját feliratot kaptak a minták, mindez az RNS oszlopban figyelhető meg. A

helyszínenként és fajonként kialakított poolok is egyedi azonosítót kaptak. A kialakított keverékekből pedig egy az összes mintavételi helyszínt és mintázott növényt reprezentáló pool készült, amely az összes mintában lévő nukleinsav keveréke. A poolok összeméréséhez szükséges mennyiségek kiszámításához tudnom kellett a minták koncentrációs értékét, amelyet egy NanoDrop spektrofotométerrel határoztam meg.

Minta sorszáma	RNS	pool név	pool
BoBI/1	CSI1/1	Zs770/1	Zs770/6
BoBI/2	CSI1/2		
BoBI/3	CSI1/3		
BoBI/4	CSI1/4		
BoBI/5	CSI1/5		
BoSII/1	CSI1/6	Zs770/2	
BoSII/2	CSI4/1		
BoSII/4	CSI3/11		
BoSII/5	CSI4/4		
BoBIII/1	CSI2/6	Zs770/3	
BoBIII/2	CSI2/7		
BoBIII/3	CSI2/8		
BoBIII/4	CSI2/9		
BoBIII/5	CSI2/10		
BoSIII/7	CSI3/2	Zs770/4	
BoSIII/8	CSI4/6		
BoSIII/9	CSI3/4		
BoSZI/1	CSI2/11	Zs770/5	
BoSZI/2	CSI2/12		
BoSZI/3	CSI4/8		
BoSZIII/2	CSI3/8		
BoSZIII/3	CSI3/9		

**1. táblázat:** Az elkészített poolok táblázata.

### 3.4. DNáz kezelés

A bioinformatikai elemzések megelőző lépéseként a poolokat DNázal kezeltem, mivel a szekvenáláshoz kizárólag a mintákban lévő RNS-re volt szükség. A kezelés lépései a következőképp zajlottak: Az kezelendő RNS pool térfogata 23 µl volt, amely 12,5 µg RNS-t tartalmazott, amihez hozzáadtam 5 µl 10x NEB DNáz puffert, 15 µl NEB DNáz-t, 1 µl Ribolock-ot (RNáz inhibitor) és 6 µl MQ-t és így végtérfogatban 50 µl-t kaptam. Ezután 37°C-

on 30 percig inkubáltam a mintákat. Az idő lejártá után hozzáadtam 150  $\mu$ l MQ-t és 200  $\mu$ l fenol kloroformot, majd vortexeltem és a centrifugába helyeztem 5 percre. A centrifugából kivett csövekben kialakult fázisok közül a legfelsőt új csőbe pipettáztam, hozzáadtam 22  $\mu$ l 4M-os Na-acetátot és 500  $\mu$ l EtOH-t és kézzel forgatva kevertem. A keverés után a 4°C-os centrifugába helyeztem a mintákat 30 percre. A folyadék leöntése után 1 ml 70%-os EtOH-al mostam a csöveket és 5 percig a centrifugába helyeztem őket. Az 5 perc után leöntöttem az alkoholt és a csöveket papírtörölkőre fejjel lefelé állítva szárítottam. Ismét centrifugáltam és óvatosan a pipetta hegyével leszívtam a maradék alkoholt a cső aljából. A továbbiakban 8 percig nyitott tetővel szárítottam és visszaoldottam 25  $\mu$ l MQ-ban. Ezután gélelektroforézissel futattam és utolsó lépésként egy NanoDrop spektrofotométer segítségével elvégeztem a minta koncentrációmérését és minőségellenőrzését, amely során OD 260/280 és OD 260/230 arányt mértem meg, melynek a nukleinsav minták minőségi mutatói. Az OD260/280 érték a fenol, protein, vagy egyéb, olyan szennyeződés jelenlétére utalhat, amelyek 280 nm-en abszorbeálódnak. RNS esetén a 2.0 érték tekinthető teljes tisztaságú nukleinsavnak. Az OD 260/230 arány valamilyen partikuláris szennyeződés jelenlétére utalhat: RNS esetén az 1.8-2.2 érték utal a megfelelő tisztaságra.

### **3.5. Bioinformatikai elemzések**

A DNáz kezeléssel előkészített poolok alkalmasak voltak az Illumina platformon történő szekvenálásra. Az elküldött keverékek mind a növények és mind a vírusok RNS-eit tartalmazzák, így a szekvenálás után megtudjuk határozni a mintában jelen lévő valamennyi, a mintában jelen lévő virális kórokozót. A szekvenciaadatok bioinformatikai feldolgozását és analizését a CLC Genomics Workbench 20.0.4 verziójával végeztem el. A szekvenciaadatok letöltése után, az elemzési folyamat első lépéseként a szekvenciák minőségi paramétereit ellenőriztem. A kapott read-eket (olvasatok) trimmeltem és átfedő régiói alapján kontigokat hoztam létre. Ezeket a kontigokat az NCBI referenciagenom-adatbázisához hasonlítottam, amely alapján listát kaptam azokról a vírusokról, amelyek jelen lehetnek a mintában. A vírusokhoz tartozó E-value értékek azt mutatták meg, milyen valószínűséggel fordulnak elő. Az eredményeket az E-value alapján sorba rendeztem, és azokat a vírusokat vizsgáltam tovább, amelyek E-value értéke 0 volt, vagyis a legnagyobb bizonyossággal jelen voltak a vizsgált mintában.

### 3.6. cDNS szintézis

Az RNS-vírusok PCR-alapú vizsgálata csak akkor lehetséges, ha a vírusgenomot előzetesen komplementer DNS-sé (cDNS) átírjuk. Ennek oka, hogy a PCR-reakcióban alkalmazott enzim, a DNS-függő DNS-polimeráz kizárólag DNS templátról képes nukleinsav-szintézist végrehajtani, míg RNS templátot nem tud hasznosítani. Ennek megfelelően a cDNS-szintézis folyamán a kiindulási RNS-templátból a reverz transzkriptáz enzim közreműködésével képződik a komplementer DNS. A szintézis során a Revert Aid kit-el (Thermo Fisher Scientific) dolgoztam. A folyamat során végig jégen tartottam az RNS-eket és ügyeltem azok tisztán tartására, hiszen a laboratóriumban jelen lehetnek az RNase enzimek, amelyek képesek lebontani azokat.

A legelső lépés a cDNS szintézis Revert Aid kit-el való elkészítése során az RNS templátok kiolvasztása. A kiolvadt RNS templátokból 3,5 µl-t mértem össze, ezután hozzáadtam még 0,5 µl random hexamer primert és 2 µl MQ-t (steril víz). A kimérés után a mintákat rövid ideig centrifugáltam és 65°C-on 5 percig denaturáltam figyelve arra, hogy az eppendorf csövek megfelelően le legyenek zárva, hiszen az inkubálás közben könnyen elpárologhatnak. Az 5 perc elteltével a csöveket egyből jégre tettem.

Mindezt követően összeállítottam egy mixet, amit a 6 mintámhoz igazítva nyolcszoros mennyiséggel készítettem annak érdekében, hogy hibázás esetén még maradjon is. A következő pontok mutatják be a nyolcszoros mennyiségű mix összetételét:

- 16 µl 5x puffer
- 8 µl 10mMdNTP
- 4 µl RiboLock RNase inhibitor
- 4 µl Revert Aid

Az elkészült mixből csövenként 4 µl-t mértem a mintáimhoz így végtérfogatban csövenként 10 µl volt összemérve. Az előre beállított PCR készülék a 2. táblázat szerint szolgáltatja a megfelelő hőmérsékletet:

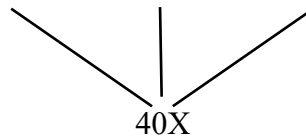
25 °C	42 °C	45 °C	70 °C
10 perc	60 perc	10 perc	10 perc

**2. táblázat:** PCR készülék beállításai.

### 3.7. Aktin teszt

A szintézis lefutása után a cDNS minőségét volt szükséges leellenőriznem, amelyet egy aktin teszt segítségével végeztem el. Ehhez szükségem volt 0,5 µl templátra és egy előre összeállított mixre. A nyolcszoros mennyiségű mix a következő összetevőket tartalmazta: 76 µl MQ, 24 µl 5xPhire puffer, 6 µl Vvactin forward primer, 6 µl Vvactin reverse primer, 2,4 µl dNTP, 1,6 µl Phire enzim. A templátokhoz 14,5 µl mixet adtam hozzá és így végtérfogatban mintánként 15 µl-el dolgoztam tovább. A következő lépés a reakció elvégzéséhez szükséges PCR készülék beállítása volt, amely az alábbiakban (3. táblázat) látható:

98 °C	98 °C	55 °C	72 °C	72 °C
30 másodperc	10 másodperc	10 másodperc	20 másodperc	1 perc



**3. táblázat:** PCR készülék beállítása az aktin teszthez.

A PCR reakció sikerességét 1,2%-os agaróz gélen történő futtatással ellenőriztem.

### 3.8. A bodoglári RNS minták kezelése

A totál nukleinsav kivonás során észleltem, hogy egyes minták állaga sűrű volt és színanyagot tartalmazott, amit a tisztítás folyamán nem sikerült eltávolítani. Emiatt trizolos kezelést kellett elvégezni a mintákon. A trizolos tisztítás alkalmas arra, hogy eltüntessük azokat a színanyagokat, amelyek gátolják a PCR reakciót. A kezelést a következőképpen végeztem el: első lépésként 20 µl RNS mintához pipettával hozzáadtam 200 µl trizolt és 40 µl kloroformot. A mintákat ezek után vortexeltem és a centrifugába helyeztem 4 °C-on 10 percig. A 10 perc letelte után kivettem a mintákat és az eppendorf csövekben jól láthatóan 3 fázis keletkezett. A 3 fázisból a legfelsőre volt szükségem ezért azt óvatosan a többi fázis érintése nélkül új csőbe pipettáztam. Továbbá az új csőbe pipettázott felülúszóhoz hozzáadtam 100 µl izopropanolt, majd ezt ugyancsak a centrifugába helyeztem 4 °C-on 10 percre. A centrifugából kivett csövekben ezek után láthatóvá vált a kicsapódott nukleinsav. A csőben lévő alkoholt (izopropanol) leöntöttem és a csövet Speed Vac készülékben szárítottam, hogy az alkoholt eltávolítsam. A száraz csöveket mindezek után 20 µl MQ-ban visszaoldottuk. Utolsó lépésként a gélelektroforézishez keveréket készítettem, amely 3 µl FDE-ből, 2 µl MQ-ból és 3 µl RNS-

ből állt. A 65°C-on 10 percig denaturáltam a keveréket és a trizolos kezelés sikerességnek ellenőrzését 1,2%-os agaróz gélen történő futtatással végeztem.

### 3.9. Primer tervezés

A következő lépés a vírus specifikus primerek tervezése volt. Először a bionformatikai elemzések során kapott olvasatokat használtam fel a kontigok építéséhez. A kontigokat az NCBI adatbázisban megtalálható referenciagenomhoz illesztettem, hogy mindezek után megfelelő primereket tudjak tervezni a kapott vírusok visszaigazolásához. A tervezést a Geneious Prime program segítségével végeztem. A primerek tervezése során figyelembe kellett vennem, hogy a kontig és a referenciagenom szekvenciája nagyfokú hasonlóságot, illetve azonosságot mutasson. Miután a program megtervezte a primer kombinációkat az átválogatás következett a megfelelő átírás és kötődés érdekében, amelyhez különböző szempontokat vettem figyelembe. Az első szempont, hogy a primer 21-24 nukleotid hosszúságú legyen, a második, hogy 3 ismétlődés ne legyen benne és az utolsó szempont a C-al vagy G-al való kezdődés és végződés. A 4. táblázat megmutatja a kapott vírusok primer tervezés utáni eredményeit összefoglalva, továbbá a 11-15. ábrán látható a referenciagenomon való elhelyezkedésük, valamint a méret tartományuk.

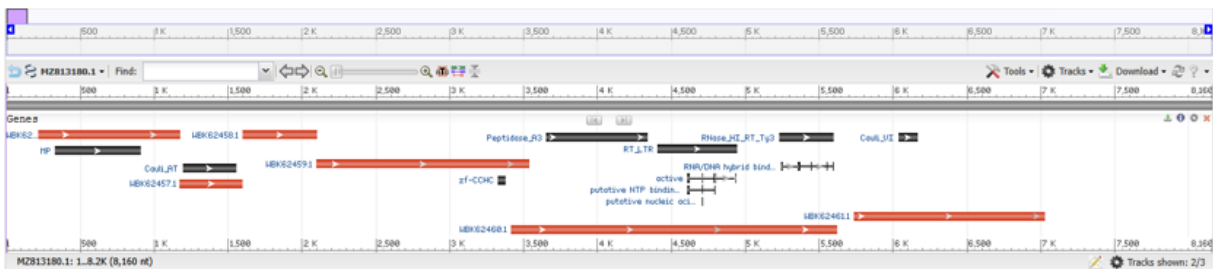
Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	Position on the reference genome	Product size	Genome used as a reference
TuaPV1_2608F	CGCTGGTGCTCAGACAGATT	2607-2626	1601	MN296516
TuaPV1_4209R	GTTCTGCTGCATGACCTACGG	4209-4189		
DvV2_4357F	GTCAAACCAATGCAATATACG	4357-4380	784	MZ813180
DvV2_5141R	GAGTCCAGGTCCATTGGACTT	5141-5121		
LBVaVRNA1_3847F	GGAAGCCAGAAGAGAACCCTGAT	3789-3811	1293	NC_011558.1
LBVaVRNA1_5140R	CTTCATTGCTCTGTCCATAGTC	5052-5069		
PVA_4517F	CATTATGAATGGAAGTAATG	4517-4537	2173	MZ826138.1
PVA_6690R	TTACCTTGATAGTGCTGTCGG	6667-6647		
TBRV_4996F	CCAGAAGACAGCAATGCAATC	4996-5016	930	OQ513467.
TBRV_5926R	GAGTTGATCCCGGTGATCATG	5884-5867		

4. táblázat: A kapott primerek szemléltetése.



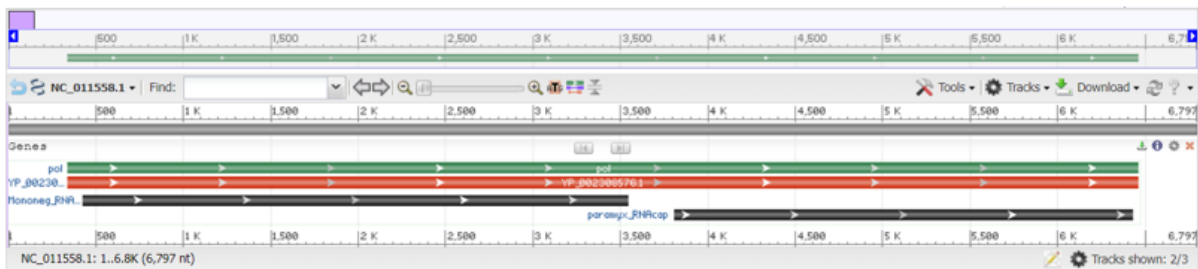
TuaPV1\_2608F → 1601 bp ← TuaPV1\_4209R

11. ábra: TuaPV1 primer elhelyezkedése a referenciagenom.



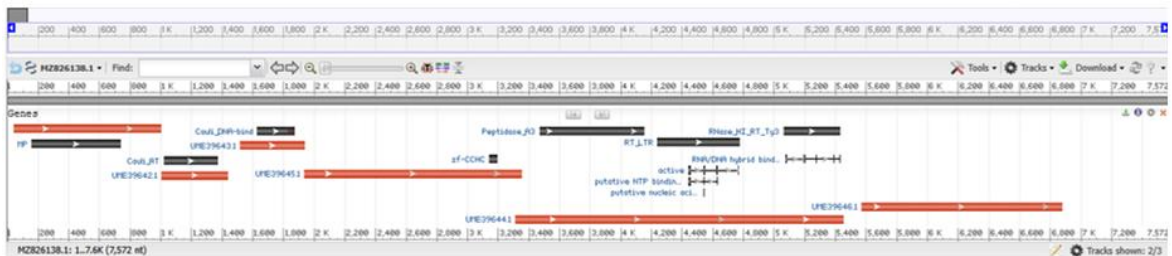
DvV2\_4357F → 784 bp ← DvV2\_5141R

12. ábra: DvV2 primer elhelyezkedése a referenciagenom.



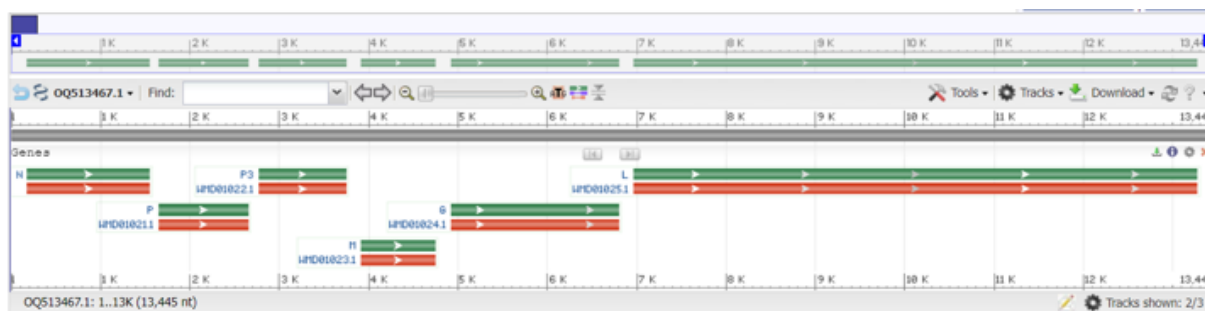
LBVaVRNA1\_3847F → 1293 bp ← LBVaVRNA1\_5140R

13. ábra: LBVaVRNA1 primer elhelyezkedése a referenciagenom.



PVA\_4517F → PVA\_6690R ←

14. ábra: PVA primer elhelyezkedése a referenciagenom.



TBNRV2\_4996F → ← TBNRV2\_5926R  
930 bp

15. ábra: TBNRV2 primer elhelyezkedése a referenciagenomon.

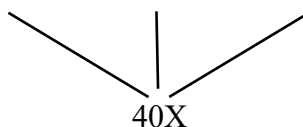
### 3.10. Gradiens PCR

A gradiens PCR a primer tervezést követő lépés volt, hiszen a primerek működését optimalizálni kellett. A folyamat során lamináris fülkében dolgoztam szűrős steril pipettahegyeket használva a szennyeződések elkerülése végett. A reakció során a Q5 enzimet használtam. Első lépésként egy mixet állítottam össze, amely a következőket tartalmazta:

- 33 µl MQ
- 10 µl 5xQ5 puffer
- 1 µl 10mMdNTP
- 1 µl Q5 enzim (2000 U/ml)

Az így összeállított mixhez hozzáadtam 2,5-2,5 µl forward és reverz primert, így végtérfogatban 50 µl-t kaptam. Ezt követően 49 µl mixhez 1 µl templátot adtam, szétmértem 5 új csőbe, majd elhelyeztem a különböző annealálási hőmérsékletre (58°C, 60,5°C, 62,5°C, 64,5°C, 66°C) beállított PCR készülékbe, amelynek időintervallumait a gyártó által előírt javaslatok alapján választottam meg (5. táblázat). A PCR sikerességének ellenőrzését 1,2%-os agaróz gélen végeztem.

98°C	98°C	58-66°C	72°C	72°C
30 másodperc	30 másodperc	30 másodperc	2 perc	2 perc



5. táblázat: A készülék beállításai a Gradiens PCR-hez.

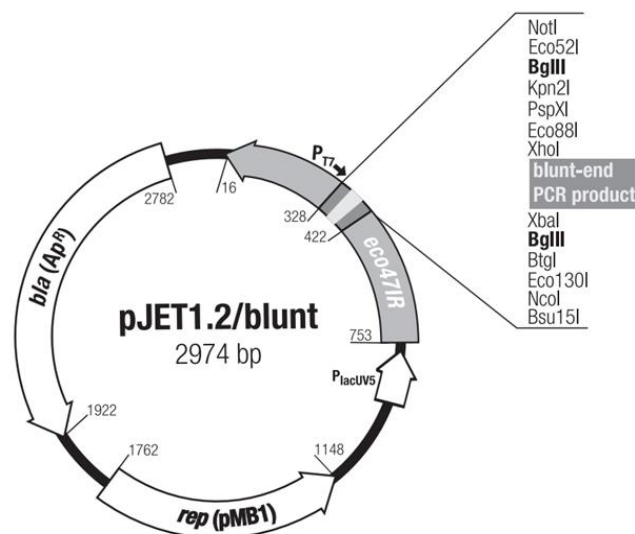
### 3.11. PCR termék tisztítása

A gradiens PCR során történő optimalizálásból kiderült, hogy a vírus PCR amplifikációja során a 60,5°C legmegfelelőbb annealási hőmérséklet így a továbbiakban ezen a hőfokon dolgoztam tovább. A pozitív eredményű gradiens PCR mintákat a gélből történő tisztításához az elektroforézis után UV fényes megvilágítás és steril szike segítségével vágtam ki a gélből. Továbbá ugyanezt a folyamatot a korábban poolokkal elvégzett pozitív eredményű PCR termékeivel is elvégeztem. A DNS gélből való tisztítása során a NucleoSpin Gel and PCR Clean up Kit (Macherey and Nage) használatával dolgoztam. A gyártó utasításai szerint a mintákat 25 µl elúciós pufferben oldottam vissza. A tisztítás eredményességének visszaigazolásához 3 µl mintát és 3 µl DNS festéket használtam fel az 1,2%-os agaróz gélen történő futtatáshoz.

### 3.12. Ligálás

A tisztított PCR mintákat pJET1.2/blunt vektorba klónoztam (16. ábra) és mindezt Thermo Scientific CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztem el. A ligálás reakciójához szükséges mixet a következőkből állítottam össze:

- 10 µl 2x reaction puffer
- 2 µl MQ
- 1 µl pJET
- 1 µl ligáz



16. ábra: A pJET1.2/blunt vektor architektúrája.

A kész reakcióelegyből 7 µl-t a mintából pedig 3 µl-t mértem össze, amelyet 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezután megkezdtem a transzformálási folyamatokat, amelynek első lépése az 5 µl ligátum hozzáadása volt a 100 µl DH5α kompetens baktériumsejthez. Az így kapott elegyet 20 percig jégre helyeztem, majd 30 másodpercig 42°C-os vízfürdőben tartottam hősokkolás gyanánt. A következő lépésben 0,5 ml SOC táptalajt adtam a mintához, majd pedig rázó termosztátba helyeztem 37°C-on 40 percig. Az idő letelte után az LBamp táptalajon történő szélesztés következett, amelyet követően egy éjszakára 37°C-on inkubáltam a mintáimat. A táptalajon felnőtt baktérium kolóniákat folyékony LB Amp táptalajra oltottam fogpiszkálóval, majd egy éjszakán át 37°C-n inkubáltam. A plazmid tisztítást a folyékony tápközegben felnőtt baktérium kultúrákból végeztem el.

### **3.13. Plazmid tisztítás baktériumtenyészetből**

A plazmidok tisztítási folyamatát a baktériumtenyészetekből a NucleoSpin Plasmid Kit (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával és a hozzá tartozó utasítások alapján végeztem el. A tisztítást követően visszaoldottam a plazmidokat 50 µl elúciós pufferben. A plazmidok ligálásának eredményességét restriktációs enzimek használatával (emésztésével) ellenőriztem le. A reakcióhoz a következő elemeket felhasználva egy 6-szoros mennyiségű mixet készítettem:

- 2 µl 10x Tango Puffer
- 0,4 µl XbaI enzim
- 0,2 µl XhoI enzim
- 5,4 µl MQ

A keverék elkészültét követően kimértem belőle 7 µl-t és egy új csőbe hozzáadtam 3 µl tisztított plazmidhoz. Ezt követően 30 percig 37°C-os vízfürdőbe helyeztem a mintákat. Az emésztés eredményét 1,2%-os agaróz gélen futtatva ellenőriztem.

### **3.14. Sanger szekvenálás**

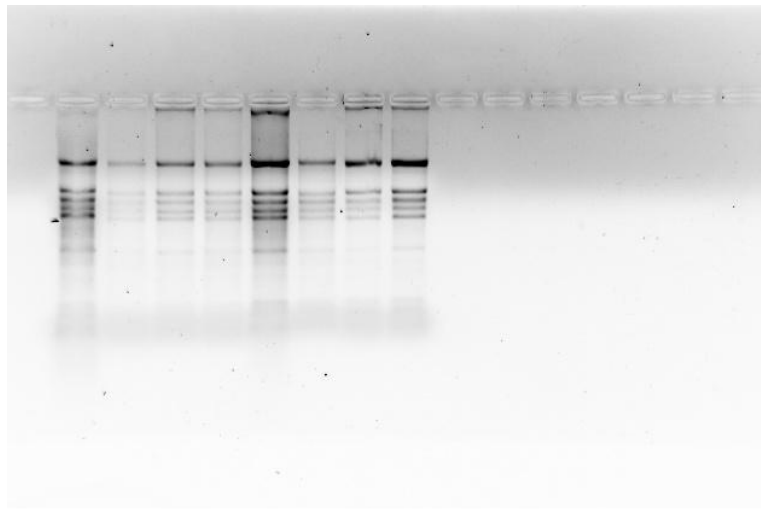
A minták szekvencia meghatározása Sanger szekvenálással történt, amelyet a BIOMI Kft. végzett. A mintáim szekvenálása mindkét irányból (forward és reverz) el lett végezve. A következő lépésben a Chromas 2.6.6. programot használtam az eredményül kapott szekvenciáim minőségének ellenőrzésére. A forward és reverz szekvenciákat összeillesztve

megkaptam a klónozott PCR termék teljes szekvenciáját. A szekvenálást legfeljebb 800-900 bázispár méretig végezték a forward és reverz primerek. A filogenetikai elemzés elkészítéséhez az NCBI adatbázisában található szekvenciákhoz hasonlítottam az általam szekvenált vírusdarab szekvenciáját. A filogenetikai fát a Genious Prime programmal készítettem el. Egy másik, az általam azonosított vírussal rokonságban álló vírust választottam kulcsoportnak. A filogenetikai fa készítéséhez maximum likelihood módszert alkalmaztam, 1000 bootstrap beállítással.

## 4. Eredmények és értékelésük

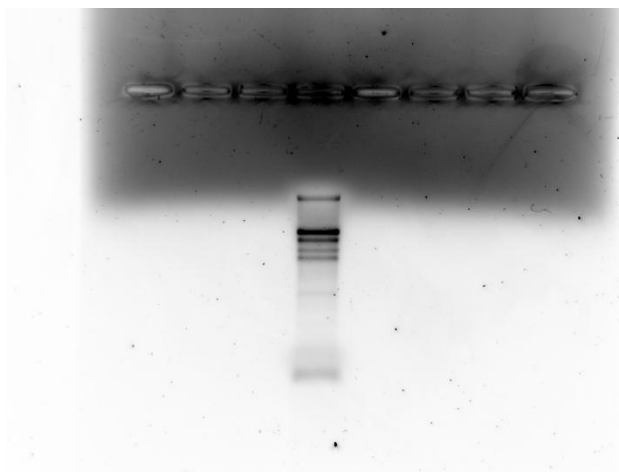
### 4.1. A minták totál nukleinsav tisztítása és HTS-re való előkészítése

A bodoglári Tartós szegfű tanösvényen történt mintagyűjtést követően a totál nukleinsav tisztítás volt a kutatás első fontos lépése, amelyet az anyag és módszer részben leírtak szerint végeztem. A mintákat 1,2%-os agaróz gélen futtattam meg és ellenőriztem a kivonás eredményességét. A magas minta szám miatt több részre bontva végeztem el azok tisztítását. A gélelektroforézis alapján a nukleinsav tisztítás minden minta esetében sikeres volt (17. ábra). A NanoDrop spektrofotométerrel megmértem a minták koncentrációját, amely ahhoz volt szükséges, hogy a kapott értékek alapján ki tudjam számolni a poolok összeméréséhez kellő mennyiségeket.



**17. ábra:** A bodoglári minták totál nukleinsav kivonása után kapott gélkép.

A nukleinsav kivonás után a mintavételi területenként elkészített poolokat DNáz-al kezeltem, hogy előkészítsem az Illumina platformon történő szekvenáláshoz. A DNáz kezelt minta minőségét 1,2%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem (18. ábra).



**18. ábra:** A bodoglári mintákból készített poolok DNáz kezelés utáni ellenőrzése.

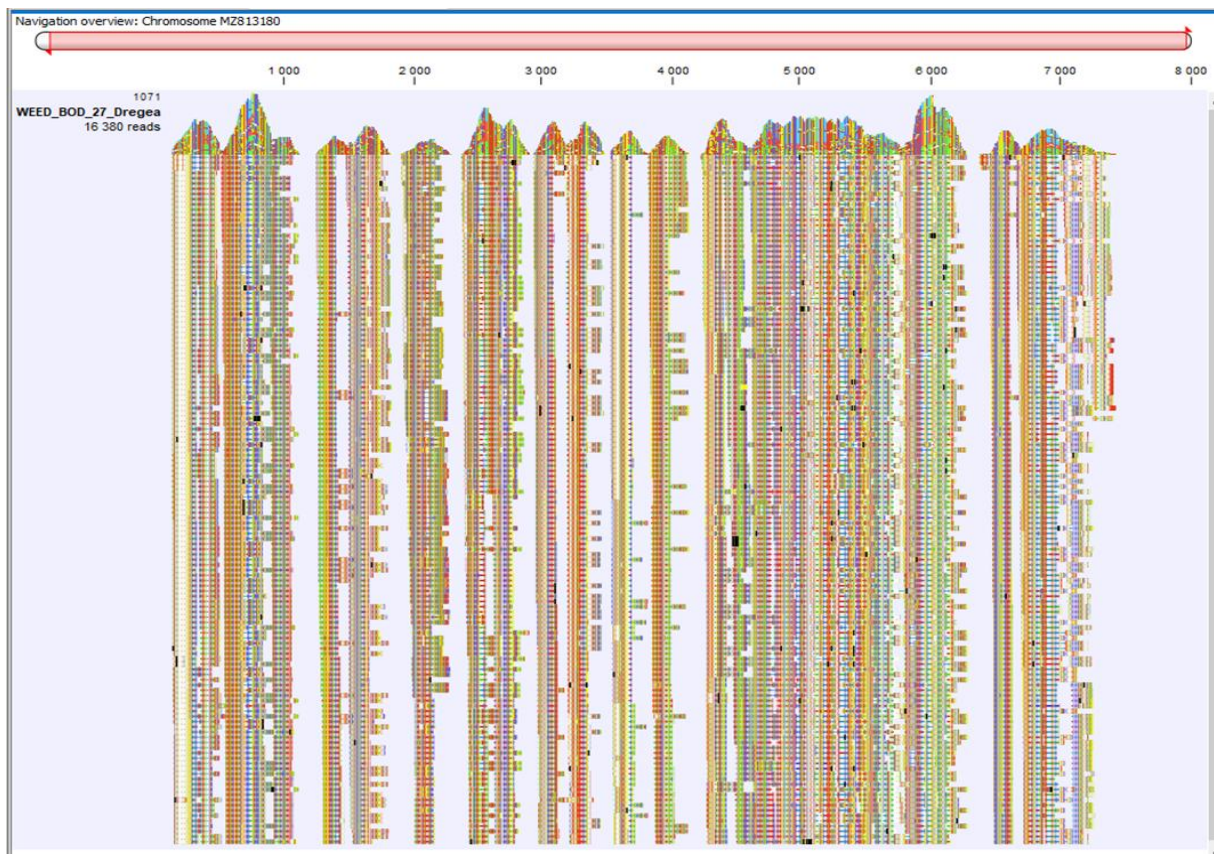
#### 4.2. A HTS adatainak bioinformatikai elemzése

A nagy áteresztőképességű szekvenálás 24,9 millió olvasatot (read) eredményezett, melyeket fastq formátumban kaptam meg. A readok száma trimmelést követően 24,7 millióra csökkent. A kapott olvasatokból kontigokat hoztam létre, amelyeket hozzárendeltem az NCBI adatbázisában található referenciagenomokhoz és eredményül egy vírustalálati listát kaptam. Az elemzések során kapott 0 E-value értékkel rendelkező vírusok a 6. táblázatban láthatóak a kontigok és az olvasatok számával, valamint a virális lefedettséggel együtt.

Library	vírus	TBNRV2	LBvAV_RNA1	DW2	TuaPV1	PVA	MsAV1
Virus hit RNAseq	number of contigs	11	2	1	1	1	1
	number of mapped reads	377	265	16380	5886	17942	293
	coverage of the viral genome (%)	72,2	18,6	81,3	100	88,4	16,5

**6. táblázat:** A bioinformatikai elemzések eredményül kapott vírusok

A további vizsgálatok során a Dregea volubilis vírus 2 (DvV2) vírus visszaigazolásával dolgoztam tovább. A vírusra kapott szekvenciákat hozzáillesztettem az NCBI adatbázisából letöltött referenciagenomjaihoz és így az adott vírusgenom lefedettségét kaptam meg (19. ábra). A 19. ábrán megjelenített eredményeket a CLC Genomics Workbench program segítségével készítettem el.



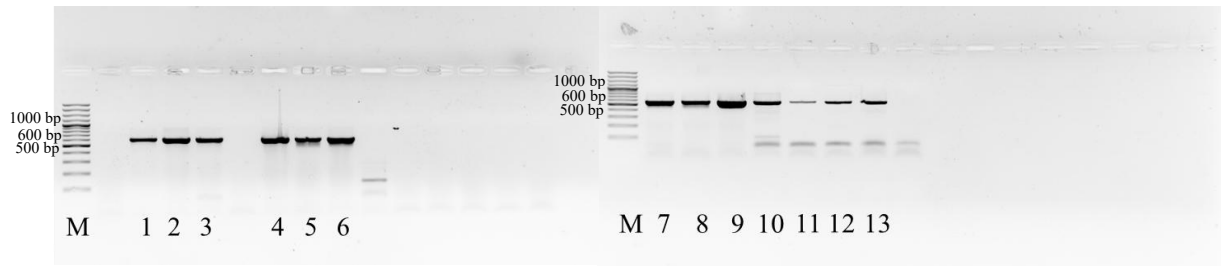
**19. ábra:** A DvV2 lefedettsége az RNA seq szekvenálással kapott olvasatokkal.

### 4.3. A HTS-sel azonosított vírusok jelenlétének visszaigazolása RT-PCR-rel

#### 4.3.1. cDNS szintézis készítése az RNS poolokból és minőségük ellenőrzése

A bionformatikai eredmények visszaigazolását RT-PCR-el végeztem, amelyhez a tisztított totál nukleinsavból cDNS-t kellett szintetizálnom, amelyet az anyag és módszer fejezetben leírtak szerint végeztem el. A cDNS minőségének ellenőrzésére aktin tesztet végeztem. A cDNS szintézist két különböző aktin primerpárral végeztem, attól függően, hogy a tisztított nukleinsav milyen gazdanövényből származott. Azoknál a mintáknál, ahol az aktin teszt egyik primer kombinációval sem működött, azoknál a tisztított nukleinsav trizolos kezelését végeztem el, az anyag és módszer fejezetben leírtak szerint, majd a kezelt mintákból újra cDNS-t szintetizáltam, majd ennek eredményességét aktin tesztel ellenőriztem. Az aktin tesztek minden minta

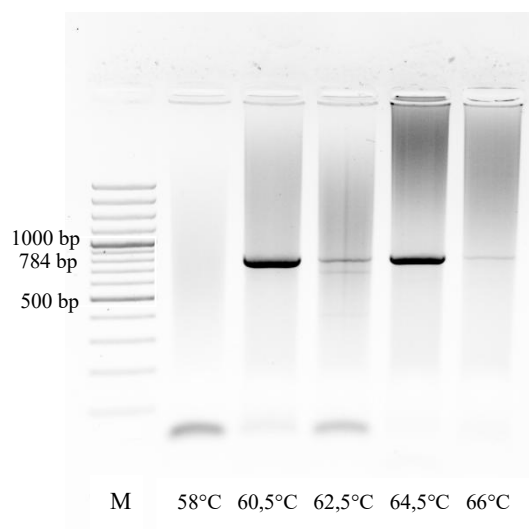
esetében eredményesek voltak, így a megfelelő minőségű és koncentrációjú cDNS-ek alkalmasak voltak a HTS-el kapott vírustalálatok visszaigazolására (20. ábra).



**20. ábra:** A bodoglári mintákból szintetizált cDNS-ek aktin tesztjei.

#### 4.3.2 a DvV2-re tervezett primerek használatához szükséges optimális anellálási hőmérséklet meghatározása

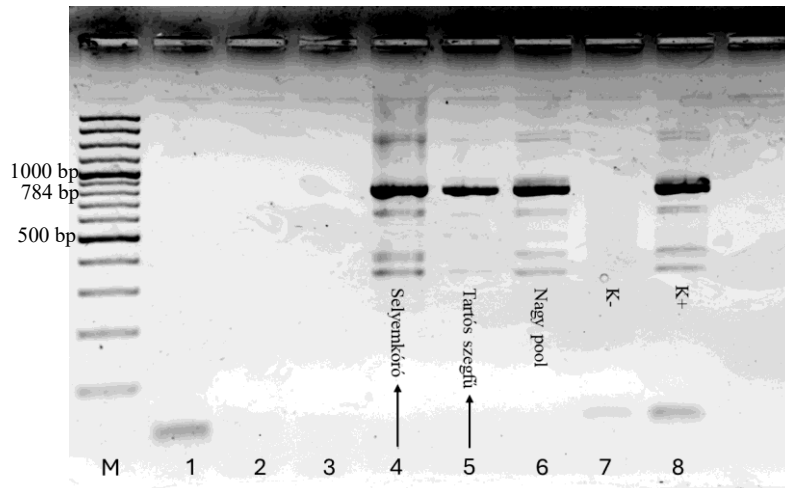
A DvV2 visszaigazolásához a korábban elkészített összes mintát reprezentáló poolból (lásd 3.3. fejezet) szintetizált cDNS-t szekvenálás után használtam fel az RT-PCR-hez. A továbbiakban egy gradiens PCR-t végeztem el a korábban tervezett DvV2 primerekkel. A vírus RNS jelenlétének vizsgálata során kiderült, hogy a különböző hőfokok közül (58°C, 60,5°C, 62,5°C, 64,5°C, 66°C) 60,5°C-on, valamint 64,5°C-on kaptam PCR terméket a megfelelő mérettartományban (21. ábra). Mindezt követően 60,5°C-os anellálási hőmérsékletet állítottam be a további PCR reakció során, mivel ezen a hőfokon kaptam megfelelő, 784 bp méretű PCR terméket (21. ábra).



**21. ábra:** A DvV2-re tervezett primerek gradiens PCR reakciójának eredménye.

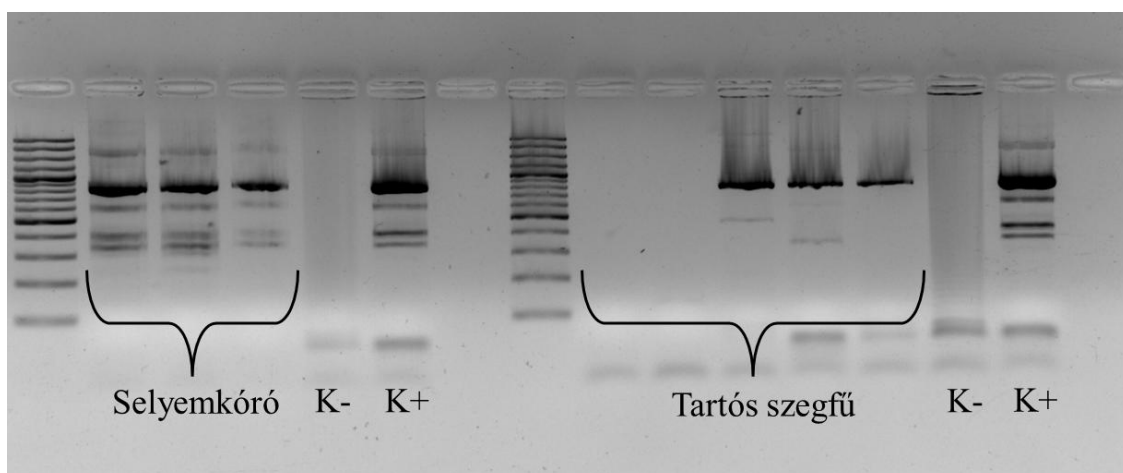
### 4.3.3. A minták RT-PCR tesztje a DvV2 jelenlétére

A megfelelő annealási hőmérséklet meghatározása után az általam tervezett DvV2 primer párral az összes növényt reprezentáló poolok vírusesztyjtét végeztem el. A kapott gélképen (22. ábra) látható, hogy a selyemkóró és a tartósszegfű növényegyedeket reprezentáló poolokban visszaigazoltam a vírus jelenlétét.



**22. ábra:** A DvV2 primer párral készült PCR eredménye a bodoglári poolokból.

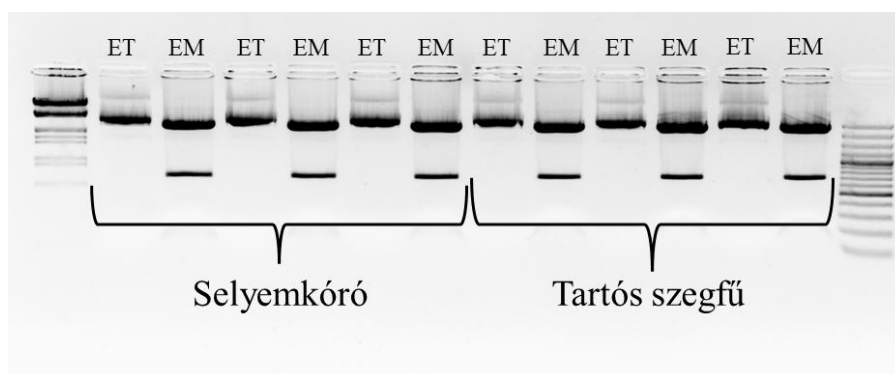
A következő lépésben a két pozitív pool összes begyűjtött növényegyedének vírusesztyjtét végeztem el az általam tervezett primerpárral, annak pontos meghatározására, hogy hány növényegyedben mutatható ki a vírus jelenléte. A selyemkóró egyedek között 3 növényből 3, a tartós szegfű egyedek közül pedig 5 egyedből 3 bizonyult pozitívnak (23. ábra).



**23. ábra:** Az egyedekre lebontott DvV2 primer párral végzett PCR teszt eredménye.

#### 4.3.4. A DvV2 PCR-ben sokszorozott darabjainak klónozása

A DvV2 specifikus PCR termékeket a 3.11. és a 3.12. fejezetekben leírtak szerint gélből tisztítottam, valamint klónoztam. A klónozás eredményességének ellenőrzésére a tisztított plazmidokat restrikciós enzimekkel emésztettem. Erre a célra az XbaI és XhoI enzimeket használtam fel a pJET konstrukció emésztéséhez. Ezek után emésztett (EM) és emésztetlen (ET) termékeket agaróz gélen választottam el. Az 24. ábrán látható gélfotó azt mutatja, hogy a restrikciós emésztés eredményes volt, így megfelelő volt arra, hogy elvégezhető legyen a Sanger szekvenálás, amelyet a Biomi Kft. végezt el.

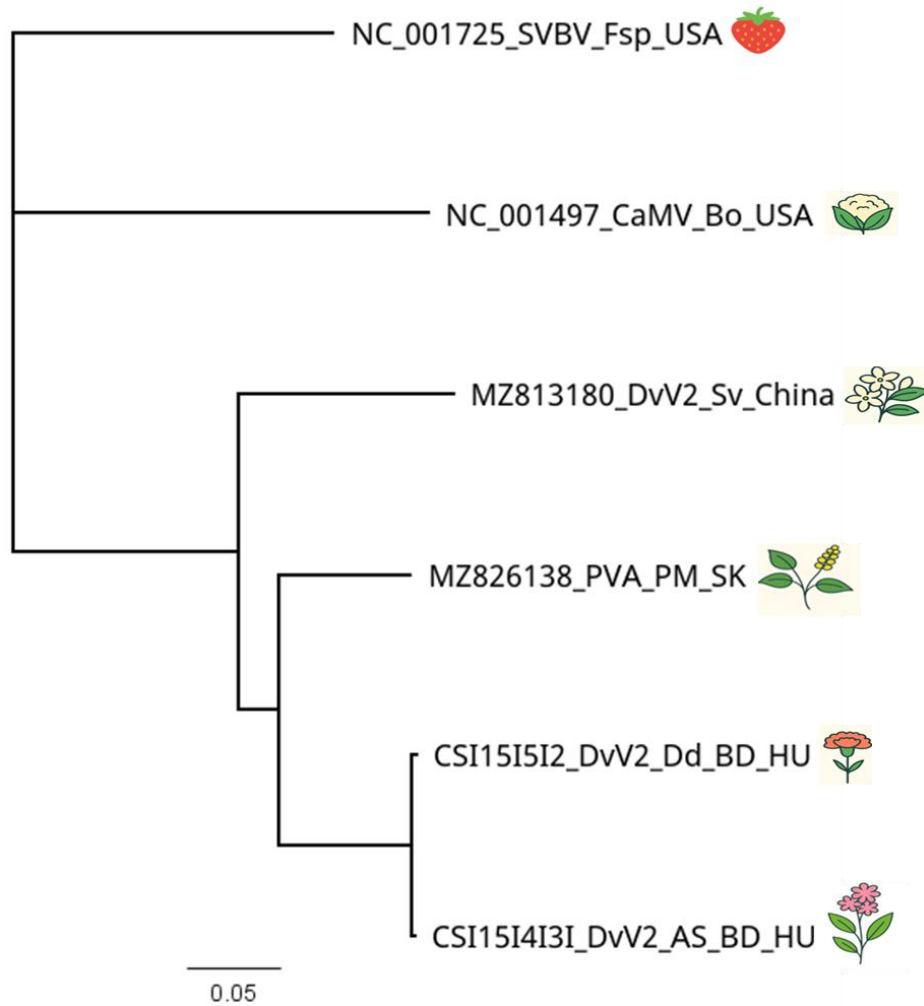


24. ábra: A DvV2 ligálásának ellenőrzése restrikciós emésztéssel a selyemkóró és a tartós szegfű minták esetén.

#### 4.4. A selyemkóróban és a tartós szegfűben azonosított DvV2 szekvenciák filogenetikai elemzése

A filogenetikai elemzéseket a sikeres PCR termékek tisztítása, klónozása után a tisztított plazmidokból a BIOMI Kft. által elvégzett Sanger szekvenálást követően végeztem el. Az elemzések eredményének ábrázolására filogenetikai fát készítettem (25. ábra). A filogenetikai fa elkészítéséhez az NCBI adatbázisába feltöltött DvV2 referencia szekvenciát használtam. Az NCBI GenBankban viszonylag kevés DvV2 szekvencia áll rendelkezésre. Az összehasonlíthatóság érdekében választottam egy olyan vírust kulcsoportként, amely közeli rokona a DvV2-nek, ez pedig nem más, mint a Pueraria vírus A (PVA). Az elkészült filogenetikai fa alapján elmondható, hogy a kapott vírus szekvenciák közelebbi rokonságon állnak a PVA vírus szekvenciáival, de rokon ágon szerepel a DvV2 vírussal, mivel a két vírus genomja közötti hasonlóság 80% fölötti. A selyemkóróban és a tartós szegfűben a vírus ugyanazon variánsát azonosítottuk. Ezen eredményünk arra utal, hogy a selyemkóró a DvV2

vírusrezervoárja lehet. Annak eldöntésére, hogy ez a vírus jelent-e veszélyt a tartós szegfű esetében még további vizsgálatok szükségesek.



**25. ábra:** Filogenetikai fa a DvV2 leszármazási viszonyainak feltárásáról.

## 5. Következtetések és javaslatok

A diplomamunka célja a Magyarországon élő növényfajok vírusrezervoár szerepének új szemszögből történő vizsgálata volt. Habár a növények vírusrezervoár szerepe nem tekinthető teljesen feltárt területnek, a modern laboratóriumi eszközök (mint amilyenek a virom feltárását is lehetővé teszik) biztosították a háttérrel annak megismerésére, hogy milyen vírusok vannak jelen a hazánkban megtalálható inváziós gyomnövényekben, valamint egy fokozottan védett növényfajban.

A kutatás három növényre fókuszált: az inváziós selyemkóróra, a betyárkóróra és a kizárólag a Duna-Tisza közti homokpusztagyepéken előforduló, fokozottan védett tartós szegfűre. A selyemkóró és a betyárkóró jelenléte a tartós szegfű élőhelyén, valamint a művelt területeken is potenciális veszélyt jelent mind a kultúrnövényekre, mind az őshonos flórára nézve, különösen a feltételezett vírushordozó szerepük miatt.

A szakirodalmi áttekintés során felmerült több olyan vírus is, amely potenciálisan közös lehet az inváziós gyomfajokban és a tartós szegfűben, ezek közül azonban a kutatás során egyiket sem sikerült kimutatni.

Ezzel szemben Magyarországon elsőként írtuk le a *Caulimoviridae* családba tartozó *Dregea volubilis* vírus 2-t (DvV2), melyet az NCBI adatbázisa szerint először Kínában írtak le 2021-ben a selyemkóróból, valamint a tartós szegfűből. Figyelemre méltó, hogy utóbbi növény viromját eddig még senki nem vizsgálta, így a DvV2 az első ismert vírusa.

A filogenetikai elemzések meglepő eredményeket hoztak: a selyemkóróból és a tartós szegfűből izolált DvV2 szekvenciák közelebbi hasonlóságot mutattak egy rokon vírus, a *Pueraria virus A* (PVA) Dél-Koreában (szintén 2021-ben) leírt szekvenciáival, mint a Kínában izolált eredeti DvV2 szekvenciákkal. Mivel a HTS adatok bioinformatikai elemzése során a PVA-ra is kaptunk találatot, ez felveti a kérdést, hogy vajon valójában két különböző vírusról, vagy csupán egyről van-e szó.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy az invazív gyomnövények fontos szereppel bírhatnak a növénypatogén vírusok terjedésében és fennmaradásában. A kutatás megerősíti a közönséges selyemkóró vírusrezervoár szerepét, továbbá feltárja a fokozottan védett tartós szegfű eddig ismeretlen viromját. Ezen invazív növények és a természetvédelmi oltalom alatt álló növények viromjának további vizsgálata elengedhetetlen a környezetünkben előforduló vírusok dinamikájának és az őshonos flórára jelentett potenciális veszélyének megértéséhez.

## 6. Összefoglalás

Az Észak-Amerikából származó selyemkóró (*Asclepias syriaca*) és betyárkóró (*Conyza canadensis*) hazánkban is inváziós gyomnövényként számontartott fajok, amelyek agresszívan terjednek a mezőgazdasági területeken, valamint a természetes és féltermészetes élőhelyeken egyaránt. Elterjedésük révén nemcsak a kultúrnövények terméshozamát veszélyezteti, hanem jelenlétükkel kiszoríthatják az őshonos flóra fajait is. Különösen elterjedtek a Duna-Tisza közti nyílt homokpusztagyepeken, ami a fokozottan védett tartós szegfű (*Dianthus diutinus*) és sok más védett növényfaj élőhelye. Az inváziós gyomnövények számos növényi vírus számára szolgálnak gazdanövényül és egyben tápnövényei különböző rovar vektoroknak, melyek közvetítésével a vírusok átterjedhetnek a kultúr-, illetve az őshonos növényekre is. Jelenleg a növényvédelemben nincs olyan módszer, amellyel a növénypatogén vírusok ellen a fertőzést követően védekezni tudnánk, ezért különösen fontos az inváziós gyomnövények viromjainak felmérése a virális kórokozók terjedésének megakadályozása érdekében folytatott kutatások eredményességéhez. A nagy áteresztőképességű szekvenálási technológiák (HTS) megjelenése új lehetőséget kínál a gyomnövényekben és őshonos növényfajokban előforduló vírusok jelenlétének és diverzitásának átfogó feltárására.

A kutatásomban a bodoglári Tartós szegfű tanösvényen előforduló selyemkóró, betyárkóró és az itt élő tartós szegfű viromjának vizsgálatát végeztem el HTS-el, hogy felmérjük annak lehetőségét, hogy a gyomnövények vírusrezervoárként jelenthetnek-e veszélyt a védett növényfajainkra. A mintagyűjtés a Bodoglárhoz tartozó tanösvény több pontján zajlott, olyan helyszíneken, ahol a három vizsgált növényfaj egymás közelében fordult elő. HTS módszerként RNS szekvenálást használtunk, a mintákból tisztított nukleinsavak felhasználásával. A szekvencia adatok bioinformatikai elemzését a CLC Genomics Workbench program segítségével hajtottam végre. Az elemzések során kimutatott DvV2 vírus jelenlétét a selyemkóróban és a tartós szegfűben RT-PCR-rel igazoltam. A PCR-rel kapott termékeket klónoztam, majd nukleotid sorrendjüket Sanger-szekvenálással határoztuk meg. A selyemkóróban és a tartós szegfűben a vírus ugyanazon variánsát azonosítottuk. Ezen eredményünk arra utal, hogy a selyemkóró a DvV2 vírusrezervoárja lehet. Továbbá a filogenetikai elemzések során kiderült, hogy az izolált szekvenciák a PVA vírus szekvenciához közelebb állnak, mint a DvV2 szekvenciákhoz, így szükséges lehet a két vírus esetleges egyezőségének vizsgálata. Azonban annak eldöntésére, hogy ez a vírus jelent-e veszélyt a tartós szegfű esetében még további vizsgálatok szükségesek.

## 7. Köszönetnyilvánítás

A diplomadolgozatom elkészülését szeretném megköszönni konzulensemnek Nagyné Dr. Galbács Zsuzsannának, aki a teljes laboratóriumi kutatásom idején támogatott és segítő kezet nyújtott bármikor, amikor szükségem volt rá. Továbbá köszönöm a Genomikai kutatócsoport vezetőjének Dr. Várallyay Évának, aki odaadó munkájával többek között a mintagyűjtéssel, a bioinformatikai elemzések megtanításával, illetve a kutatómunka vezetésével nagyban hozzájárult a dolgozat elkészüléséhez. A kutatásom megvalósításához az anyagi forrást az NKFIH K146087 projekt és a MATE KKCS program nyújtotta. Szeretném megköszönni másik konzulensemnek Dr. Dorner Zitának is, aki biztosította számomra a gyomismereti háttérrel és szintén segítséget nyújtott a mintagyűjtés során. Köszönöm Poldán Erzsébetnek, aki megtanította a totál nukleinsav tisztítás szakszerű elvégzését és Péri Lillának a laboratóriumi feladatok elvégzése során nyújtott segítségéért. A mintagyűjtés sikerességét továbbá Dr. Szénási Ágnes a rovarfajismereti háttér biztosításával, valamint Somogyi István és Pálfi Márk természetvédelmi örök növény és területismereti tudásukkal gazdagították, így ezúton szeretném nekik is megköszönni a segítségüket. Nem utolsó sorban nagy köszönettel tartozom szüleimnek, akik biztosították számomra az eljutást a kutatás mintavételi helyszínére.

## 8. Irodalomjegyzék

- Bagi I. (1999). *A selyemkóró (Asclepias syriaca L.) Egy invazív faj biológiája, a védekezés lehetőségei*. Kitaibelia. 4(2), pp. 289–295.
- Bagi I. (2004). Selyemkóró In: Mihály B., Botta-Dukát Z. (szerk.): *Biológiai Inváziók Magyarországon Özönnövények*. TermészetBÚVÁR Alapítvány Kiadó. Budapest, pp. 319 – 336.
- Bagi I. (2008). *Common milkweed (Asclepias syriaca L.)*. In: *The Most Important Invasive Plants in Hungary Institute of Ecology and Botany, Hungarian Academy of Sciences*. pp. 151–159
- Bankovics A., & Mile O. (2011). *A pannon bennszülött tartós szegfű védelme*. Kiskunsági Nemzeti Park Igazgatóság. Kecskemét. Forrás: <https://adoc.pub/a-pannon-bennszl-tartos-szegf-vedelme.html> (Letöltés dátuma: 2024.12.08.)
- Bellardi, M. G. & Rubies-Autonell, C.. (1999). *Occurrence of arabis mosaic nepovirus (ArMV) on Asclepias syriaca L.* *Phytopathologia Mediterranea* pp. 40–42.
- Bertazzon, N. , Filippin, L., Forte, V., & Angelini, E. (2016). *Grapevine Pinot gris virus seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy*. *Archives of virology* pp. 711–714.
- De Oliveira, A. S., Boiteux, L. S., Kormelink, R., & Resende, R. O. (2018). *The Sw-5 gene cluster: Tomato breeding and research toward orthospovirus disease control*. *Frontiers in Plant Science*. 1055.
- Degen Á. (1895). *Hazánk homokpusztáinak egy bennszülött szegfüve (Dianthus diutinus Kit.) – Természettud. Közl. Pótfüzetek 32: 24–27*. [H. n.]
- Demian, E. , Jaksa-Czotter, N., & Varallyay, E.. (2022). *Grapevine pinot gris virus is present in different non-vitis hosts*. *Plants* 11(14), 1830.
- Fajardo, T. V. M. , Eiras, M., & Nickel, O. (2017). *First report of Grapevine Pinot gris virus infecting grapevine in Brazil*. *Australasian Plant Disease Notes* 12(1), 45.
- Gao, F. , Lin, W., Shen, J., & Liao, F.. (2016). *Genetic diversity and molecular evolution of arabis mosaic virus based on the CP gene sequence*. *Archives of virology* 161, 1047–1051.

- Grieco, P. D. , Conte, D., Munno, I., Nuzzaci, M., & Stradis, A. D. (2000). *Tomato spotted wilt virus (TSWV) on weeds and wild plants in Metapontino* pp. 43–46.
- Jacquemond, M. (2012). *Cucumber Mosaic Virus* pp. 439–504. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00013-0>
- Kamran, A. , Li, Y., Zhang, W., Jiao, Y., Farooq, T., Wang, Y., ... & Yang, J. (2024). *Insights into the genetic variability and evolutionary dynamics of tomato spotted wilt orthotospovirus in China. BMC genomics.* 25(1), 40.
- Karki, D. , Musetti, R., & Meng, B. (2025). *Comparative analyses of three grapevine Pinot gris virus cDNA clones reveal insights into the pathological properties of different phylogroups. Virology* 603, 110360
- Király G. (2009). *Új magyar fűvészkönyv. Magyarország hajtásos növényei. Jósvafő.* 616 pp.
- Kriska, G. (2020). *Biológia érettségire felkészítő - Fotoszintetizáló szervezetek I. Akadémiai Kiadó.* <https://doi.org/10.1556/9789634544463>
- Lebas, B. , Adams, I., Al Rwahnih, M., Baeyen, S., Bilodeau, G. J., Blouin, A. G., & 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(2). 394–418.
- Ma, Y., Marais, A., Lefebvre, M., Faure, C., & Candresse, T. (2020). *Metagenomic analysis of virome cross-talk between cultivated Solanum lycopersicum and wild Solanum nigrum. Virology,* 540, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.11.009>
- Massart, S. , Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnikar, M., & Wetzels, T. (2017). *A framework for the evaluation of biosecurity, commercial, regulatory, and scientific impacts of plant viruses and viroids identified by NGS technologies. Frontiers in microbiology.* 8, 45.
- Mochizuki, T., & Ohki, S. T. (2012). *Cucumber mosaic virus : viral genes as virulence determinants. Molecular Plant Pathology,* 13(3), 217–225. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00749.x>
- Moyle, R., Pretorius, L.-S., Shuey, L. S., Nowak, E., & Schenk, P. M. (2018). *Analysis of the Complete Genome Sequence of Cucumber mosaic virus Strain K. Genome Announcements,* 6(7). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00053-18>

- Najberek, K., Olszańska, A., Tokarska-Guzik, B., Mazurska, K., Dajdok, Z., & Solarz, W. (2022). *Invasive alien species as reservoirs for pathogens. Ecological Indicators, 139*, 108879. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108879>
- Neilreich. (1860). – *Verh. zool.-bot. Ges.* 10: 101–104.
- Pál R. in Csiszár Á. (2012) (szerk.): *Inváziós növényfajok Magyarországon*. Nyugat-magyarországi Egyetem Kiadó. Sopron. pp. 231–236.
- Salamon, P., Horvath, J., Mamula, D., Juretić, N., & Hunyadi, K. (1989): *Asclepias syriaca L. (common milkweed), a new natural host of cucumber mosaic virus in Hungary and Yugoslavia.* 363-373.
- Saldarelli, P., Gualandri, V., Malossini, U., és Glasa, M. (2017): *Grapevine Pinot gris virus. Springer International Publishing AG 2017 351. B. Meng et al. (eds.), Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management.*, pp. 351-363.
- Sastry, K. S., Mandal, B., Hammond, J., Scott, S. W., & Briddon, R. W. (2019): *Encyclopedia of plant viruses and viroids*. New Delhi: Springer India. 2936 pp.
- Tarquini, G., Zaina, G., Ermacora, P., De Amicis, F., Franco-Orozco, B., Loi, N., Martini, M., Bianchi, G. L., Pagliari, L., Firrao, G., Paoli, E.,D., Musetti, R. (2019): *Agroinoculation of Grapevine Pinot Gris Virus in tobacco and grapevine provides insights on viral pathogenesis.* Plos one, 14 (3): e0214010.
- Vidéki R., Máté A., Kovács É., Mile O., Sipos F., Koczka K., Geng I. (2005): *KvVM Természetvédelmi Hivatal Fajmegőrzési tervek: Tartós szegfű (Dianthus diutinus)* 29 pp.  
 Forrás:  
[https://termeszetvedelem.hu/\\_user/downloads/fajmegorzesi%20tervek/Dyanthus.pdf](https://termeszetvedelem.hu/_user/downloads/fajmegorzesi%20tervek/Dyanthus.pdf)  
 (Letöltés dátuma: 2024.12.07.)
- Weaver, Susan E. (2001): *The biology of Canadian weeds. 115. Conyza canadensis. Canadian Journal of Plant Science*, 81 (4), pp. 867-875.
- Wisler, G. C., & Norris, R. F. (2005). Interactions between weeds and cultivated *plants as related to management of plant pathogens. Weed Science*, 53(6), 914–917.  
<https://doi.org/10.1614/WS-04-051R.1>

## Internetes források:

http1: Védett fajok. <https://termeszetvedelem.hu/talalati-oldal/?type=vedett-fajok&id=671> (Letöltés dátuma: 2024.12.08.). Kun András in Farkas Sándor (szerk.) (1999): Magyarország védett növényei. Mezőgazda Kiadó, Budapest.; Király G. (2009) (szerk.): Új magyar fűvészkönyv. Magyarország hajtásos növényei. Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság, Jósvalő. 616 pp.

http2: Asclepias syriaca. [https://www.fs.usda.gov/wildflowers/plant-of-the-week/asclepias\\_syriaca.shtml](https://www.fs.usda.gov/wildflowers/plant-of-the-week/asclepias_syriaca.shtml) (Letöltés dátuma: 2024.11.08.)

http3: Inváziós fajok. <http://www.invaziosfajok.hu/hu/invazios-fajok/126> (Letöltés dátuma: 2024.11.08.)

http4: Betyárkóró. <https://kwizda.hu/betyarkoro~d14957> (Letöltés dátuma: 2024.12.06.)

http5: Bromoviridae. <https://viralzone.expasy.org/31> (Letöltés dátuma: 2024.12.10.)

http6: Cucumovirus. <https://viralzone.expasy.org/135> (letöltés dátuma: 2025.06.21.)

http7: Resistance-breaking-strains-tswv-tomato. <https://www.vegetables.bayer.com/hu/hu-hu/resources/growing-tips/agronomic-spotlights/resistance-breaking-strains-tswv-tomato.html> (Letöltés dátuma: 2024.12.10.)

http8: Arabis Mosaic Virus. [https://extension.usu.edu/planthealth/ipm/notes\\_ag/hemp-arabis-mosaic-virus](https://extension.usu.edu/planthealth/ipm/notes_ag/hemp-arabis-mosaic-virus) (Letöltés dátuma: 2024.12.10.)

http9: Comovirinae. <https://viralzone.expasy.org/728> (Letöltés dátuma: 2025.06.21.)

http10: GoogleEarth

<https://earth.google.com/web/@46.53631288,19.58300746,118.48165452a,1000.29901859d,30y,0h,0t,0r/data=CgRCAggBMikKJwolCiExaHdsMTJib3Z5WkkyZi1LM0RKNFhFZlhsTmFMV2VuOUsgAToDCgEwQgIIAEoICI6p75kCEAE?authuser=0> (Letöltés dátuma: 2025.10.13.)

## NYILATKOZAT

### a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Csillag István

A Hallgató Neptun kódja: RKIGXM

A dolgozat címe: Védett növények és inváziós gyomok viromjának vizsgálata a bodoglári Tartós szegfű tanösvényen

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.

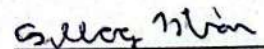
Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemitulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

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, 2025.10.31.



Hallgató aláírása

## NYILATKOZAT

Csillag István (RKIGXM) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom<sup>1</sup>.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem<sup>\*2</sup>

Kelt: Gödöllő, 2025. október 27.



belső konzulens

---

<sup>1</sup> A megfelelő aláhúzendó.

<sup>2</sup> A megfelelő aláhúzendó.

## NYILATKOZAT

Csillag István (RKIGXM) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom<sup>1</sup>.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem\*<sup>2</sup>

Kelt: Gödöllő, 2025.10.31.

*Nagyai Dr. János Zsuzsanna*  
belső konzulens

## Hallgatók, doktoranduszok nyilatkozata mesterséges intelligencia (MI) alkalmazásáról

### 1. Általános adatok

Hallgató neve:	Csillag István
Neptun-kódja:	RKIGXM
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: TDK
Tantárgy neve/kódja*:	Diplomadolgozat
A munka címe:	Védett növények és inváziós gyomok viromjának vizsgálata a bodoglári Tartós szegfű tanösvényen

\* 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 korrektúra, 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)
Egy ábra kiegészítése ikonokkal.	ChatGPT	A selyemkóróban és a tartós szegfűben azonosított DvV2 szekvenciák filogenetikai elemzése rész.

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

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. október hó 27. nap

.....  
Csillag Mária

Hallgató aláírása

.....  
Dankó

Konzulens/Témavezető aláírása

.....  
Magye' Galbós Zsuzsanna

Konzulens/Témavezető aláírása