

SZAKDOLGOZAT

Maár Enikő

Maár Enikő

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Szőlészeti és Borászati Intézet

Szőlész-borász mérnök alapképzési szak

**KÉKFRANKOS SZŐLŐÜLTETVÉNY VÍRUSFERTŐZÖTTSÉGÉNEK
FELMÉRÉSE**

Belső konzulens: Dr. Deák Tamás

egyetemi docens

Belső konzulens tanszéke: Szőlészeti Tanszék

Készítette: Maár Enikő

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Bevezetés.....	3
2.1. Célkitűzés.....	4
3. Irodalmi áttekintés.....	5
3.1. A Szekszárdi borvidék jellemzése	5
3.2. A Kékfrankos szőlőfajta leírása	5
3.3. A szőlő klónszelekciója	7
3.3.1. A klónszelekció lépései	9
3.4. Vírusok okozta káros hatások a növényekre	11
3.4.1. A vírusok általános jellemzése.....	11
3.4.2. A növényi vírusokról általában	12
3.4.3. Hazánkban előforduló szőlővírusok jellemzése	13
4. Anyag és módszertan.....	18
4.1. A kísérlet megtervezése	18
4.2. A mintagyűjtés helyszíne	18
4.3. Mintagyűjtés.....	19
4.4. RNS kivonás	21
4.5. Gélelektroforézis.....	24
4.6. RNS koncentráció meghatározása spektrofotométerrel	25
4.7. cDNS elkészítése	26
4.8. PCR reakciók	26
5. Eredmények és értékelésük.....	31
5.1. RNS minták	31
5.2. cDNS szintézis	32
5.3. Vírusdiagnosztika	33
6. Következtetések és javaslatok	40
7. Összefoglalás	42
8. Köszönetnyilvánítás	43
9. Irodalomjegyzék	44
10. Ábrák és táblázatok jegyzéke.....	49

2. Bevezetés

Magyarországon az elmúlt 20 évben megfigyelhető az a tendencia, hogy a mennyiségi borfogyasztásról a minőségi borfogyasztásra került át a hangsúly a fogyasztók körében. Ennek a kihívásnak próbálnak több kritérium mellett megfelelni a bortermelők. Ezt a törekvést támogatja a magyar állam és az Európai Unió is, pályázatokat írnak ki a mezőgazdasággal és vidékfejlesztéssel kapcsolatosan, ezekben helyet kapnak a gyümölcsstermesztésre, konkrétan a szőlőtermesztésre vonatkozó projektek is.

A klónszelekció azért fontos ebben az összefüggésben, mert a szőlő nemesítésének ezzel a módszerével meg tudnak felelni a kiemelkedő színvonalú borszőlő termesztésének. Ezen folyamat során a legjobb tulajdonságokkal rendelkező szőlőklónokat keresik és szaporítják, hogy jobb minőségű szőlőt és borokat lehessen előállítani. Ebben a tekintetben a klónszelekció segíthet a borkészítőknek a szőlőfajták termékenysége, ellenálló képessége, ízjegyeinek és más fontos tulajdonságainak javításában.

A Kékfrankos szőlőfajta Magyarországon és más közép-európai országokban is népszerű, és értékes bort lehet készíteni belőle. A klónszelekcióval a Kékfrankos genetikai változatosságának bemutatása és kiválasztása lehetővé teszi a borászok számára, hogy olyan klónokat találjanak, amelyek jobban alkalmazkodnak a Szekszárdi borvidék adottságaihoz, például a talajhoz és az éghajlathoz. Ez hozzájárulhat a terroir sajátosságainak kiemeléséhez és minőségi borok előállításához.

Az ilyen projektek támogatása lehetővé teszi a szőlőtermesztők és borászok számára, hogy továbbfejlesszék a szőlőfajtákat, javítsák a borvidékek termelési hatékonyságát és minőségét. Ezenkívül az ilyen kezdeményezések hozzájárulhatnak a fenntartható mezőgazdaság és vidékfejlesztés előmozdításához, ami fontos a hosszú távú gazdasági és környezeti fenntarthatóság szempontjából.

Ebbe a törekvésbe kapcsolódik be a szakdolgozatom, mivel a klónszelekció egyik alappillére, a vírusmentes szaporítóanyag meglétét támogatom a vizsgálataimmal.

Azért választottam a dolgozatom témájául vírusok jelenlétének megfigyelését, mert elképzeltem, hogy egy ilyen mikroszkopikus nagyságú szervezet, ekkora pusztulást okozzon egy egészséges élőlényben.

2.1. Célkitűzés

Célom az, hogy az általam begyűjtött mintákat minél átfogóbban megvizsgáljam a különböző vírusok jelenlétének, vagy hiányának tekintetében, ezzel hozzájárulva a kiválasztott klónok mélyebb szőlészeti-borászati elemzéséhez. Az esetleges vírushordozó egyedek negatív szelektívával segítjük egy egészséges klónultetvény nagyobb felületre történő létrehozását.

A begyűjtött minták vizsgálatához elsőként ki kellett vonnom a RNS-t, abból készítenem kellett egy cDNS (copy DNS) másolatot, majd a cDNS alapján az egyes vírusokra specifikus primerekkel végzett PCR reakció, illetve az azt követő elektroforézis kép alapján el kellett döntenem, hogy az adott vírussal fertőzöttek-e az egyes tételek.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A Szekszárdi borvidék jellemzése

A Szekszárdi borvidék Magyarország 22 borvidékének egyik déli képviselője. Alapvetően a Szekszárdi-dombságon helyezkedik el. Északról a Mezőföld, keletről az Alföld (Sárgköz), délnyugat felől a Mecsek körüli dombvidék határolja. A borvidék területe 6000 hektár, a ténylegesen szőlővel betelepített terület 2127 hektár. (HNT, 2022)

A Szekszárdi-dombság üledékes kőzetekből épül fel, amelyek a pleisztocén és pliocén korban keletkeztek. Geológiai felépítése egységes, kevésbé változatos. Hiányzik a vastag folyóvízi üledékréteg, és az édesvízi mészkő sem fejlődött ki. A vörösayag takaró sem terjed el ilyen széles területen. A Szekszárdi-dombvidék felszínét vastag lösztakaró borítja, amelynek átlagos vastagsága 20-40 méter. (Ádám, 1964)

Éghajlata szubmediterrán típusú, azaz mérsékelt meleg és nedves. A Duna hatása a téli fagyokat mérsékli, míg a nyarak melegek és naposak. Évi középhőmérséklete: 11°C. A napfényes órák száma: 2050/év. Az éves csapadékmennyiség: 630-680 mm. Az uralkodó szélirány észak-nyugati. (Lőrincz – Zanathy, 2015)

A talaj és a klíma is kedvez a szőlőtermesztésnek, mert a szőlő kedveli a löszös talajt, mivel jó vízelvezető képességgel rendelkezik, ugyanakkor megőrzi a nedvességet is. Ez ideális körülményeket teremt a szőlő számára, mivel a szőlőtőkék számára fontos, hogy ne álljon a víz a gyökereik körül, ugyanakkor legyen elég nedvesség a növekedésükhöz (Ádám, 1964). Az időjárás is kellemes, mert kicsi a fagy veszélye, viszont a sok napsütéses óra még a késői érésű szőlőfajtáknak is előnyös, mert a bogyók maradéktalanul be tudnak érni (Lőrincz - Zanathy, 2015)

Az általam tanulmányozott Kékfrankos, a borvidék vezető szőlőfajtája, 616 hektár termőterülettel képviselteti magát. (HNT, 2022)

3.2. A Kékfrankos szőlőfajta leírása

Mintegy tízezer önállóan értelmezhető szőlőfajtát tartanak nyilván, amelyekből csak töredékmennyiség az, ami valódi kereskedelmi mennyiséggel mérhető bor alapanyaga lesz. A Kárpát-medencében ma termesztett szőlőfajták – nagyjából 140 – elmaradnak ugyan egy-egy

hagyományos bortermelő ország, például Itália fajtaszámától (ami manapság körülbelül ezer körül mozog), ám tekintettel a betelepített szőlőterület nagyságára, ezt mégsem nevezhetjük csekélynek. (Baglyas, 2016)

A ma nálunk termesztésben megtalálható szőlőfajták jó része – a többi európai bortermelő országhoz hasonlóan – a *Vitis vinifera* fajtól eredeztethető. A Kárpát medencében (ami nem véletlenül mutat a termesztett szőlőfajták tekintetében meglehetősen egységes képet, hiszen a medence természetes geográfiai egység) a fellelhető szőlőfajták között nagyobb számban találkozunk a törzsekre lebontott rendszerezés szerinti pontusi fajtákkal, de *occidentalis* és kisebb részben *orientalis* fajták is előfordulnak. Az ezek keresztezéséből származó intraspecifikus keresztezések vagy az interspecifikus hibridek szintén elterjedtek. (Németh, 1967)

A Kékfrankos eredete nem teljesen tisztázott, Németh Márton (1967) osztályozása szerint a *Vitis vinifera* fajon belül a keleti változat csoportba tartozik (*convarietas orientalis*). Legkorábbi említése Ausztriában és Németországban az 1800-as évek közepére tehető, Magyarországon az 1890-es évektől jelenik meg az írott forrásokban, akkor még nem Kékfrankos, hanem Nagyburgundi néven. Manapság is elsősorban a volt Osztrák-Magyar Monarchia területén termesztik (Baglyas, 2016). A mai Magyarországon a legnagyobb területen termesztett szőlőfajta, 7312 hektáron van jelen (HNT, 2022). Ezzel az adattal kijelenthetjük, hogy a világ összes Kékfrankos ültetvényének a fele hazánkban található. Legfontosabb termőterülete a Soproni borvidék, ott az ültetvények több, mint fele Kékfrankos szőlőből áll. Ezt a Szekszárdi borvidék követi a betelepített szőlőtőkék mennyiségével, majd a Kunsági, illetve az Egri borvidék következik, ahol még meghatározó fajta a Kékfrankos. (Baglyas, 2016)

Alaktani leírása Németh Márton (1967) szerint: „Tőkéje erős növekedésű, kevés számú, félmereven álló vesszőkkel, vesszői barnás színűek, hosszú ízközűek, rügyei kicsik, hegyesek, vitorlája barnásvöröses, csupasz, levele nagy sötétzöld, tompa fényű, vastag, bőrszerű szövet jellemzi, sima felületű, alig tagolt, csúcsa kiemelkedő, vállöble keskeny, V alakú. Levélszéle fűrészes, levéllemeze kiterített, a levél fonákja szőrös, erei barnáspirosak. Fürtje középnagy (átlagosan 150g), közepesen tömött. Bogyói kicsik, sötétkékek, gömbölyűek, vastag héjjal rendelkeznek, lédúsak” (1. ábra).

Közép-kései érésű (szeptember közepétől október elejéig érik, de később szüretelik), cukortartalma nem túl magas (átlagosan 17-19 cukorfokú), megbízható, termése nem rothad,



viszonylag fagytűrő, szellős a lombozata, emiatt a gombás betegségek egy részére toleráns. Savas karakterű a belőle készült bor. A talajra és a termőterület fekvésére nem igényes, bár teljesen tápanyag-szegény talajon nem nagyon él meg (pl.: homokos talaj), hosszú metszést igényel, nem kíván túl sok zöldmunkát. Bora jellegzetes, kellemes zamatú, csersavban gazdag, de az érlelési folyamat során savai finomodnak. Nemcsak a kékfrankos borok fő alkotórésze, de vázát képezi a bikavérnek is. (Bényei - Lőrincz, 2005)

1. ábra: A Kékfrankos morfológiája (Forrás: Németh M.:
Ampelográfiai album 1. 1967)

3.3. A szőlő klónszelekciója

A szőlőtermesztésben fontos célunk, hogy az állomány egységes maradjon, a szőlőtőkék zavartalanul növekedjenek anélkül, hogy tőkehiány lépne fel. Emellett szeretnénk biztosítani, hogy a szőlőültetvényekből egyenletesen nagy mennyiségű és jó minőségű szőlőtermés születhessen. Ebben a törekvésünkben a klónok használata fontos eszköz (Hajdu, 2018). A klónok növényegyedek olyan csoportjai, amelyek a szőlőfajták kiválasztott és kiváló minőségű példányai, és azok szaporításának eredményeként jönnek létre. A klónok segítségével képesek vagyunk nemesített szőlőfajták kiválasztott és legjobb példányait reprodukálni, ami hozzájárul a gazdasági hatékonyság és minőség növeléséhez a szőlőtermesztésben (OIV, 2017).

A klónszelekcióban a legjobb eredmények akkor érhetők el, ha egyszerre végezzük a növényvédelmi és genetikai szelekciót, hogy csak olyan klónokat szaporítsunk, amelyek természetes módon mentesek a káros vírusoktól vagy mesterséges technikákkal vírusmentesekké váltak. A szelekció a kiválasztott tőkék genetikai változatosságán alapul. Ennek a sokféleségnek a lehetséges magyarázatai lehetnek: a tőkék poliklonális eredete és a genetikai mutációk felhalmozódása a genotípusaikban. Másrésről a vírusbetegségek hozzájárulnak a szőlőpopulációk fenotipikus változékonyságának növekedéséhez (Mannini, 1998). A klónok tehát a fajtán belüli genetikai változatosságot használják ki, amely növekszik a szőlő életkorával és függ attól, hogy mekkora területen és milyen régóta termesztik (OIV, 2017). A szőlőfajták tőkéi hosszú évekig, sőt évtizedekig is ugyanazon a területen, ugyanabban a szőlőültetvényben, azonos talajon és éghajlati viszonyok között élnek. Tehát a szőlőtőkék helyét nem változtatják meg a termesztés során (Hajdu, 2018). A hosszú távú termesztési körülmények és a terület sajátosságai egyedi jegyeket és karaktereket hozhatnak létre a szőlőnövényekben, amelyek megnyilvánulhatnak például a szőlőszemek ízében, a bogyók méretében, vagy akár a szőlőszüret időpontjában. Ezért fontosak a termőhely sajátosságai a szőlőtermesztésben és a bortermelésben, mivel befolyásolja a végső termék ízét és minőségét. (OIV, 2017)

A különböző külső hatásokra a szőlőtőkéik vagy azok részei (például a rügyek, vesszők és hajtások) képesek reagálni, változások következhetnek be. Kétféle változásról beszélhetünk: modifikációról és mutációról (Hajdu, 2018). A modifikáció átmeneti változás, a mutáció pedig egy állandó módosulás a növényen (Kozma, 1968). Ez utóbbi tulajdonságon alapul a szelekciós nemesítés. A stresszhelyzetekre válaszolva egy-egy fajtán belül negatív vagy pozitív típusok alakulhatnak ki. A szelekciós nemesítés, azaz a fajtanemesítés során a pozitív változatok élveznek előnyt, mivel ezek az egyedek alkalmazkodtak a stresszhatásokhoz és jobb teljesítményt nyújtanak. Ezáltal a nemesítők hozzájárulnak a fajta stressztűrő képességének és hozamának javításához. Megkülönböztetünk negatív és pozitív szelekciót. Mindkét szelekciós folyamat célja a növények kívánt tulajdonságainak javítása és a termelés növelése. A negatív szelekció segít megszabadulni a fertőzött vagy gyengült egyedektől, míg a pozitív szelekció elősegíti a kívánt tulajdonságokkal rendelkező növények szaporítását és elterjedését. Nem minden tőkét érintenek a hatások azonos mértékben, ez valószínűleg a tőkék körül kialakult mikroklíma miatt van így. Ha ezekre a külső hatásokra adott válaszok a szőlőtőkékben vagy

tőkereszekben genetikailag állandósulnak, akkor azok klónértékűvé válnak. Ez azt jelenti, hogy olyan tulajdonságok alakulnak ki, amelyek egyediek és reprodukálhatók, és amelyeket vegetatív szaporítással lehet továbbvinni. Ezek a klónok olyan növényeket eredményezhetnek, amelyek megtartják az eredeti tőke előnyös tulajdonságait, és alkalmazkodnak a környezeti stresszhatásokhoz (Hajdu, 2018). A klón értéke állandó marad, amíg további mutáció nem következik be. A szőlőtőkék klónértéke csak egy bizonyos időszakra érvényes, amikor az új mutációk a körülmények hatására létrejönnek, akkor viszont új kiválasztásra van szükség (Becker, 1990).

A Magyar Népköztársaság Elnöki Tanácsának 23/1959. törvényerejű rendelete pontosan meghatározta, hogy milyen szőlőfajtákat hol, hogyan kell termesztetni. A szaporításhoz pedig csak regisztrált klónokat lehetett felhasználni, amelyek komoly vizsgálatokon és növényegészségügyi ellenőrzésen estek át. Ebben az időszakban a szőlőtermesztés megújítására és mennyiségi növelésére törekedtek főképpen. Így gyakran alkalmazták a tömegszelekciót. Ez azt jelenti, hogy a kiválasztott tőkék közül a pozitívokról begyűjtött szaporítóanyagból készítettek oltványokat, és ebből létesítettek további ültetvényeket.

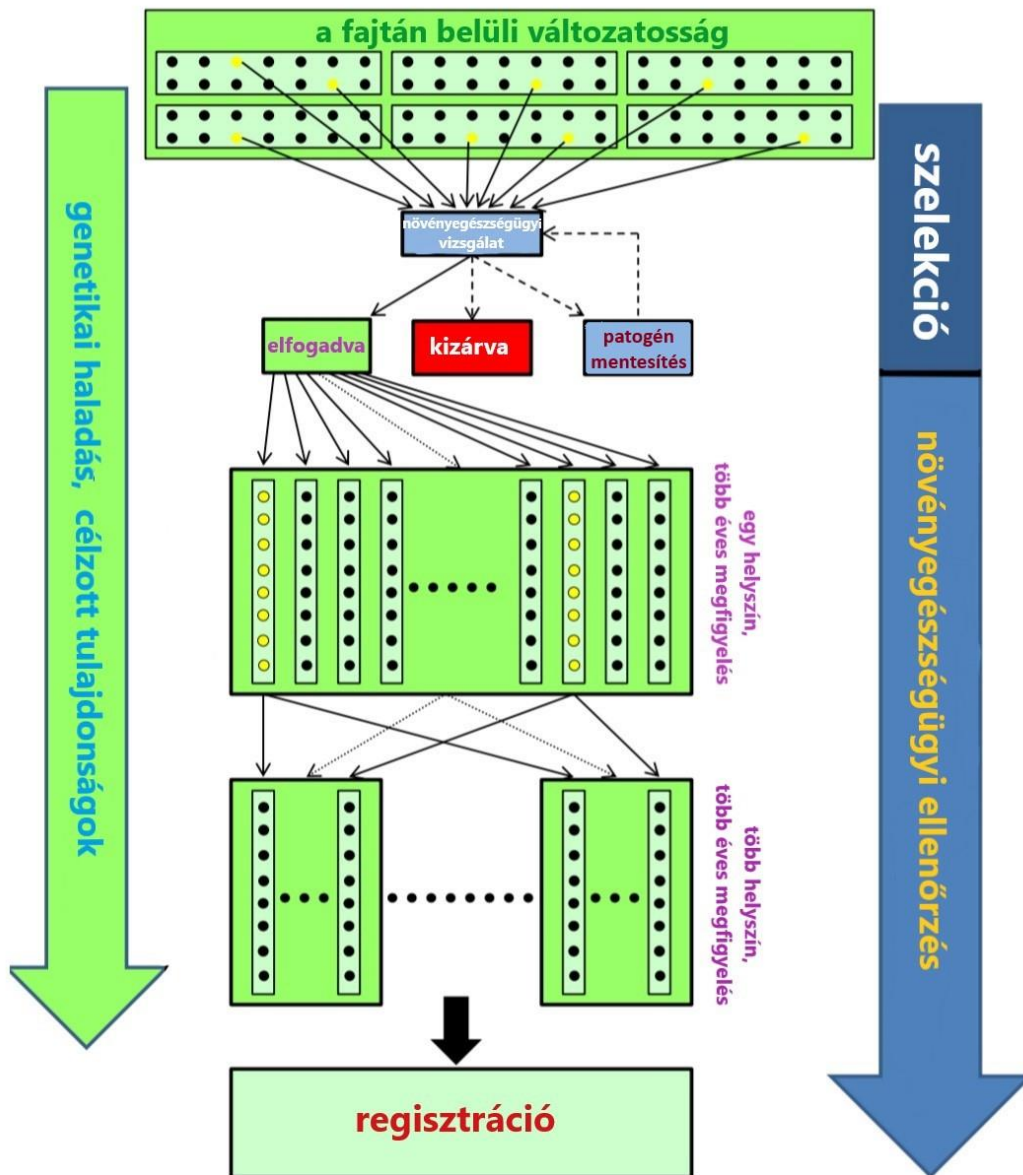
Választott szőlőfajtám, a Kékfrankos esetében a legnagyobb felületen szelektált klónok az Egri Borvidéken találhatóak (Hajdu, 2018).

3.3.1. A klónszelekció lépései

A klónszelekciós nemesítést Franciaországban és Németországban alkalmazták elsőként, és ezek az országok értek el kiemelkedő eredményeket ezzel a módszerrel. Magyarországon a szőlő szelekciós nemesítése az 1960-as évek elején kezdődött és ebben az időben végezték a szelekció egy másik típusát is, az egyedi klónszelekciót, amit ma is használunk a szőlő nemesítésében. Ennek az eljárásnak az alapjait dr. Németh Márton dolgozta ki és alkalmazta a Pécs környékén létesített szőlőültetvényeken. A módszer azért hasznos, mert pontosan lehet követni egy-egy anyatőke nemesítésének folyamatát, viszont hátránya, hogy rendkívül hosszadalmas, 15-25 év. (Hajdu, 2020)

A továbbiakban az Organisation International of Vine and Wine nemzetközi szervezet protokollján mutatom be a szelekció menetét (2.ábra).

A klónszelekció lépései



3. ábra: A klónszelekció lépései (Forrás: OIV 2017 alapján – saját fordítás)

1. A leendő klón kiválasztása: a szőlőültvényeken egészséges anyatőkéket keresünk, amelyeket egy vegetációs időszakban legalább kétszer (július, szeptember) megfigyelünk. Az elsődleges kiválasztást ampelográfiai és fenológiai értékelések alapján végezzük. A másik szempont a kiválasztáshoz a genetikai cél, amelyet el kívánunk érni. Végül megvizsgáljuk, látjuk-e bármilyen betegség nyomát a növényen, ez a vizuális növényegészségügyi ellenőrzés. (OIV, 2017)

2. A kiválasztott klónjelöltek megfigyelése és megőrzése: a kiválasztott egyedek a sikeres növényegészségügyi ellenőrzés után egy olyan kísérleti parcellába (összehasonlító ültetvény) lesznek betelepítve, amelynek talaja vektormentes és homogén, valamint a mikroklimája azonos. A klónok egészségi állapotát, fenológiai jellemzőit, rothadásra való érzékenységét, teljesítőképességét értékeljük klónonként 10-30 tőkével. Legalább három évig gyűjtjük az adatokat. A klónok kiválasztásakor figyelembe kell vennünk a végterméket is (OIV, 2017).

3. Az előző lépést sikeresen végrehajtott jelöltek szaporítása: a legmegfelelőbb teljesítményű tőkéket további megfigyelések céljából szaporítják több helyszínen klónonként 20-30 tőkével. Ez legalább három ismétlésből kell, hogy álljon és újra növényegészségügyi, ampelográfiai, fenológiai vizsgálatokon kell értékelni őket. Ezenkívül a teljesítményértékelést mikrovínifikáció, azaz a klónokból készített borok vizsgálata is alátámasztja. (OIV, 2017)

4. A klón regisztrációja: a célokat sikeresen végrehajtó klónok hivatalos regisztrációját kérvényezhetik az illetékes nemzeti hatóságoknál. A regisztráció után kezdődhet a klónok szaporítása, tényleges termesztése. (OIV, 2017)

A regisztráció Magyarországon már 1966-tól kötelező volt. Csak bevizsgált és minőségi bizonyítvánnyal rendelkező szaporítóanyagot használhattak fel a gazdák a szőlő telepítéséhez. (11/1966. VI.8 FM rendelet) Manapság a Nemzeti Fajtajegyzék. (40/2004. IV.7. FVM rendelet), az Európai Unióban pedig a Közösségi Fajtajegyzék (87/2006. XII.28. FVM) a nyilvántartás alapja.

Összességében Magyarországon rendkívül intenzív munka zajlott az új szőlőfajták és klónok nemesítésével az alacsony terméshozamú, nem kielégítő termésbiztonságú és minőségű fajták leváltására. A hagyományos fajták mellett a nemesített fajták jelentős területtel járulnak a magyar szőlőtermesztés és borászat sikeréhez.

3.4. Vírusok okozta káros hatások a növényekre

3.4.1. A vírusok általános jellemzése

A vírust – a dohánylevél mozaikosodását – 1882-ben Dmitrij Jozifovics Ivanovszkij orosz mikrobiológus mutatta ki először, és ő készített elsőként vírus szűrletet is. A vírus szűrhetőségének módszerét fejlesztette tovább a holland Martinus Beijerinck. A vírus elnevezést ő használta először. (Szerényi, 2011)

A vírus fertőzőképes genetikai információ, latinul mérget jelent. A vírusok önmagukban életjelenségeket nem mutatnak, azaz nem mozognak, nem táplálkoznak, nem szaporodnak, nincs önálló anyagcseréjük. Mindig élősködő életmódot folytatnak. Felépítésük jellegzetes: örökítőanyagból (DNS vagy RNS) és fehérjeburokból (nukleokapszidból) állnak. Nem képesek önálló szaporodásra, élő gazdasejtben szaporíttatják magukat. A vírusok csak elektronmikroszkóppal láthatók: 1-300 nm nagyságúak. (Szerényi, 2011)

A vírusok megbetegítő képességét virulenciának nevezzük. A virulencia attól függ, hogy a vírus képes-e kapcsolatba lépni a gazdasejt sejtmembránjával. Eszerint megkülönböztethetjük a vírusok különböző csoportjait: a növényi sejtekbe hatoló vírusok a fitofágok, az állati sejtekbe bejutók a zoofágok, baktériumokat támadók a bakteriofágok, az embereket fertőzők a parabióták. (Sveicz, 2008)

A vírushatás kialakulása a következőképpen megy végbe: A gazdasejt felszínén megkötődik a vírus, örökítőanyagát bejuttatja a sejtbe, ezzel a fehérjeburok szétesését okozza. Ezután megtermeli a sejt a vírus saját anyagait. A DNS és a fehérje érett, fertőző vírussá áll össze. A vírusok kiszabadulnak a sejtől – ez a sejt szétesésével jár. A vírusok vegetatív vírusként, illetve virionként jelennek meg. A vegetatív vírus gazdasejten belül él és szaporítja magát, a virion gazdasejten kívüli inaktív forma. (Sveicz, 2008)

3.4.2. A növényi vírusokról általában

A növényi vírusok a vírushatás kialakulásának első két lépésében passzívak, ez azt jelenti, hogy a növényi vírusok nem tudnak megkötődni a gazdanövény felszínén, illetve nem tudnak bejutni a sejtfalon, mert a sejtfal cellulózt tartalmaz, azaz, annyira kemény és ellenálló, hogy nem tud behatolni rajta. A bejutáshoz a növény fizikai sérülése (jégeső, rovar általi harapások) vagy valamilyen vektor közvetítő szerepe szükséges. (Dula et al., 2016)

A növényi vírusok többféleképpen terjedhetnek: mechanikai úton, például érintkezéssel, maggal, pollen átvitelével, vagy a vegetatív szaporítás, például: szemzés, oltás, dugványozás során. A vírusok terjedhetnek állatok segítségével is: a szűrő-szívó szájszervű rovarok okozzák a legtöbb vírushatást, a fertőzések 80%-a köthető hozzájuk. (Dula et. al, 2016)

A növényi vírusok általában specifikus gazdanövényekkel rendelkeznek, és nem képesek minden növényt megfertőzni. A vírus bejutása után szaporodik a növényben, így kisebb-

nagyobb mértékben befolyásolja a növény anyagcsere folyamatait. Ennek következtében különböző kísérő tünetek jelenhetnek meg a fertőzött növényen. Módosulhat a gyökérzet, a hajtás, a virág vagy a termés is alakban, színében (például rothadás, száradás, hervadás, állagváltozás, elszíneződés). (Várallyay, 2020)

Növényi vírusok ellen csak megelőzéssel tudunk védekezni. Pontosan be kell azonosítani az adott vírust különböző genetikai tesztekkel (fehérje alapú: ELISA, nukleinsav alapú: PCR). Minden esetben meg kell akadályozni a vírus átvitelét: védekezni kell a vektorok ellen, ha megjelent a tünet egy növényen azt el kell szigetelni a többitől, fertőtleníteni kell az eszközöket és certifikált szaporítóanyaggal kell dolgozni. (Dula et al., 2016)

3.4.3. Hazánkban előforduló szőlővírusok jellemzése

Magyarország területén eddig 16 féle szőlőt károsító vírust azonosítottak, ezeknek körülbelül a felét az 1980-as évek folyamán. A vírusfertőzések azért jelentenek problémát, mert mire szabad szemmel felfedezhetővé válik a szőlő pusztulása, addigra az már általában megállíthatatlan, valamint növényvédelmi módszerekkel csak megelőzni lehet őket, orvosolni már nem. Tehát nagyon oda kell figyelni a talajban élő kártevőkre, a szaporítóanyag minőségére. Érdeemes folyamatosan tesztelni az állományt különböző vírusokra, mert a vírusok ellen csak a megelőzés hatásos. (Dula et al., 2016)

- **Szőlő fertőző leromlása – Grapevine fanleaf virus (GFLV)**

Az egész világon elterjedt szőlőbetegség, amely bármely fajta szőlőt képes megfertőzni. A tünetes egyedeket levél deformáció, a főerek mentén sárga elszíneződés, dupla náduszkok, rövid és rendellenes ízkezők, összenövéses és a levelek erős fogazottsága jellemzik. A betegséget okozó vírusnak két különböző típusát különböztetik meg: a sárga mozaik törzset (GFLV-YM: Grapevine fanleaf virus – yellow mosaic strain), (Hewitt, 1950) és az érmenti szalagosodás törzset (GFLV-VB: Grapevine fanleaf virus – vein banding strain). A sárga mozaik törzsszel fertőzött tőkéken a levéllemez egész felülete elsárgulhat, míg az érmenti szalagosodásnál csak az erek mentén színeződik el a levél. A fertőzött tőkéken romlik a rügydifferenciálódás, és a termés is kevesebb lesz. A fogékonyságtól függően a tőke vagy gyorsan elpusztul, vagy lassan leromlik (Goheen - Hewitt, 1962). Az átvitelt segítik a fonálférgek: *Xiphinema index*, *X. italiae*, illetve a fertőzött szaporítóanyag vagy mag (Demangeat et al., 2010).

- **A szőlő tőkesatnyulás A. betegsége – Arabis mosaic virus (ArMV)**

Sokszor együtt jár a GFLV sárga mozaik törzsének fertőzésével. Éppen ezért a tünetei hasonlóak hozzá: sárgás elszíneződés alakul ki a leveleken, kis számú és rosszul termékenyült fürtök, ebből következően alacsony termés hozam jellemzi. Nagyon széles a gazdanövény köre. Elsősorban vektorokkal terjed: *Xiphinema diversicaudatum*, *Xiphinema coxi*, *Longidorus caespiticola*. (Martelli - Lehoczky, 1968)

- **Paradicsom fekete gyűrűs vírus – Tomato black ring virus (TBRV)**

A vírus nevéből következik az egyik jól látható tünet, amely a frissen fertőzött növények levelén jelenik meg. Fekete gyűrűt formázó foltok találhatóak a levéllemezen, ezenkívül sárga véletlenszerű elszíneződés. Ez a vírus szintén a tőkék satnyulását okozza. Fő terjesztői a vektorok, a *Longidorus attenuatus* fonálféreg. (Lehoczky-Burgyán, 1986)

- **Dohány gyűrűs foltosság vírus – Tobacco ring spot virus (TRSV)**

A TRSV egy nepovírus, ami elsősorban a dohánynövényeket pusztítja. Tünetei: nekrosis gyűrű a leveleken, hajtásvég elgörbülése, ízközök rövidülése, levelek töppedése. A korai növekedési stádiumban fertőzött növények elmaradnak a fejlődésben, és a fagyok után is zöldek maradhatnak (Tolin, 2008). A fertőzést a *Xiphinema americanum* fonálféreg terjeszti, de magról történő átvitele is jelentős (Rupe et al., 2008).

- **Szőlő krómmozaik vírus – Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)**

Közvetlenül a fertőzést követően a szőlő levelei sárgás színűvé válnak. A további fejlődés során világosodnak, fehérebbek lesznek. A levelek asszimmetrikussá deformálódnak, kettős nóduszok, rövidebb ízközök alakulnak ki. A vírust terjesztő vektor nem ismert, de a talajban való terjedését tartják valószínűnek. (Martelli et al., 1965)

- **Szőlő bolgár látens vírus – Grapevine bulgarian latent virus (GBLV)**

A vírus neve onnan ered, hogy Bulgáriában fedezték fel. A látens név arra utal, hogy rejtőzködve, kevés látható tünettel fertőz. A tünetek: gátolt növekedés, megnyúlt vesszők, rosszul termékenyült fürt, kései rügyfakadás. A vektora nem ismert. (Gallitelli et. al, 1983)

- **A szőlő levélsodródása – Grapevine leafroll associated viruses (GLRaV 1-9)**

A GLRaV a legnagyobb gazdasági károkat okozó és legelterjedtebb vírusos szőlőbetegség a világ minden táján. Akár 40% termésvesztést is okozhat. Hazánkban a GLRaV-1 és -3 a leginkább elterjedtek, de fellelhető a 2-es és 7-es típus is. Az első tünetek a felnőtt növényeknél az idősebb leveleken jelennek meg, mindig a hajtások aljáról indulva és felfelé haladva a fiatalabb levelekre terjednek, ami a növekedési szezon végén erőteljesebben jelentkezik, míg az új oltványok fiatal hajtásai általában tünetmentesek vagy a tünetek enyhék lehetnek (Martelli, 2014). A tipikus tünetek közé tartozik a levél pirosodása (kékszőlők esetén) vagy sárgulása (fehérszőlők esetén), megkeményedése, míg az erek zöldek maradnak, és a levélszélek lefelé görbülnek (Little-Rezaian, 2006). A vírus patogén hatásának következményeképp károsodik az enzimműködés, és a sejtekben felhalmozódnak az asszimiláták és emiatt görbül meg a levéllemez. A termés később ér be, cukortartalma csökken, savtartalma növekszik. Néhány GLRaV-2 törzs oltás-inkompatibilitást okoz. Több pajzstetű és takácsatka faj hatékony vektorai a vírusoknak szemi-perzisztens átviteli módon. Azonban GLRaV-2 és -7 esetében nem azonosítottak vektort (Martelli, 2014).

- **Szőlő foltosodás vírus - Grapevine fleck virus (GFkV)**

A GFkV-t már minden szőlőtermelő országból jelentették. Ez a vírus látens fertőzést okoz, és a betegség tüneteit akkor láthatjuk a legjobban, ha a szőlő levelét a fény felé fordítjuk (Dula et al., 2016). Tünetei: az erek tisztulása, levél deformáció és a vegetatív növekedés visszaesése. Fertőzött szaporítóanyaggal és aranka fajokkal terjed. (Martelli, 2014.)

- **Szőlő faszöveti barázdáltsága – Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV), Grapevine virus A, B, C, D, E, F (GVA-GVF)**

Szőlő faszöveti barázdáltsága betegség (GRWD-Grapevine rugose wood disease): A GRWD egy összetett betegség a szőlőültetvények számos termesztési területén. Négy különböző szindróma kapcsolódik a GRWD-hez: a Rupestris faszöveti barázdáltság betegség (GRSPaV), a Kober faszöveti barázdáltság betegség, az LN33 faszöveti barázdáltság betegség és a parakérgűség, amelyek gyakran lappangó vagy enyhe tüneteket okoz a beoltatlan szőlőtőkéken. A kapcsolódó ágensek a Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV; Foveavirus nemzetség) és a Grapevine A, B és D vírusok (Vitivirus nemzetség), mindegyik a Betaflexiviridae családba tartozik. A *V. vinifera* jellegzetes tünetei a növény fás részeinek megváltozásával jellemezhetők, bemélyedés figyelhető meg a kéreg alatt található

területen (ez befolyásolja a víz és a tápanyagok áramlását). A teljes levéllemez elszíneződik, kéregképződés történik az ízközök területén, a beoltás inkompatibilis lesz. Ezenkívül késlelteti a rügy képződést, gyorsítja a szőlőtőkék hanyatlását, és végül a növény halálát okozza. Ellentétben a *V. labrusca* esetében, a friss hajtásokban az ízközök megduzzadása és a szövet hosszanti hasadása figyelhető meg. Bemélyedés látható a fogékony alanyokban, például a Paulsen 1103-ban (*V. berlandieri* x *V. rupestris*). A GRWD vírusokat több takácsatka és pajzstetű hordozza át szemi-perzisztens módon, míg a GRSPaV-nak nincs ismert rovarvektora, és mechanikusan sem vihető át. (Martelli, 2014)

- **Lucerna mozaik vírus, szőlő gyűrűs és vonalas mintázottság betegség – Alfalfa mosaic virus (AMV)**

Igen fertőző betegség. A szőlő lombzatán jelennek meg sárga elszíneződések, amelyek mindenfelé kiterjednek, kivéve a levél ereket. Nyáron kifehérednek a sárga foltok, de az erek továbbra is zöldek maradnak. Ennek a vírusnak a gazdanövényköre elég széles. Azért ennyire fertőző a betegség, mert nemcsak vektorokkal terjed (levéltetvek), hanem mechanikai úton is, illetve maggal, szaporítóanyaggal. (Lehoczky-Beczner., 1980)

- **Szőlő vonalas mintázottság vírus – Grapevine line pattern virus (GLPV)**

Ezt a vírust eddig csak Magyarországon izolálták. A fertőzött tőkéken a leveleken világos „juharfa levél” szerű mintázottságot figyelhetünk meg, ezenkívül pontok és foltok jelennek meg rajtuk. (Lehoczky et al., 1987)

- **Grapevine pinot gris virus (GPGV)**

A világ rendkívül sok országában elterjedt, először 2011-ben Észak-Olaszországban írták le. Tünetei lehetnek: levél deformáció, elszíneződés, ízköz rövidülés, korai tőkeelhalás, termés mennyisége lecsökken és a minősége is romlik (Giampetruzzi et al., 2012). A vírus terjedését elősegítik a szőlőgubacsatkák, illetve a fertőző szaporítóanyag és az oltás (Malagnini et al., 2016). A GPGV vírus rohamosan terjed, a fertőzött szőlő ültetvények háromnegyed része mutat tüneteket, míg a már fertőzött, de tüneteket nem mutató negyed rész is beteg. Amíg a tüneteket mutató növények megfertőztek egészséges szőlőtőkéket, addig a tüneteket nem mutató fertőzött tőkék nem adták át a betegségüket. (Saldarelli et al., 2015)

- **Grapevine Syrah virus 1 (GSyV-1)**

Egy gyorsan terjedő betegségként észlelték a fertőzést Syrah szőlőtőkéken Franciaországban (Renault-Spilmont et al., 2004). A tünetek az idősebb tőkéken jelentkeznek, közéjük tartozik a levelek elszíneződése, elsorvadása, az oltási hely megduzzadása, a fás rész felületi repedései, a vessző elhalása és a tőkék végleges elpusztulása. A tünetek nem elhatárolhatóak más betegségek tüneteitől, kimutatása ezért igen nehéz. (Al Rwahnih, 2009)

Máár Enikő

4. Anyag és módszertan

4.1. A kísérlet megtervezése

A kísérlet célja a Kékfrankos ültetvény kijelölt tőkéknek felmérése vírus fertőzöttségi szempontból. 20 darab tőkét vizsgáltunk, amelyeket korábban már szűrték és amelyek ígéretesnek mutatkoztak a klónszelekció szempontjából.

4.2. A mintagyűjtés helyszíne

A növényi mintákat a szekszárdi Mészáros Pál Borház Kékfrankos ültetvényéből gyűjtöttem, ami a Strázsa-hegyen található (3., 4. ábra). A területen eredetileg Kadarka ültetvény volt, ezt később átoltották Kékfrankosra. 2018-tól 188 darab Kékfrankos változatot választottak ki abból a célból, hogy a termés minőségét, mennyiségét és borászati értékeit növeljék. (Mészáros Pál, szóbeli közlés)

A terület nagysága 3,3257 hektár. Művelés módja középmagas kordon. Sortávolság: 2,5 méter, tőtávolság: 0,8 méter.



4. ábra: A mintavétel helyszíne - Szekszárd (Forrás: saját fotó)



5. ábra: A mintavétel helyszíne – kordon művelés (Forrás: saját fotó)

4.3. Mintagyűjtés

2022. május 16-án megnéztük a szekszárdi ültetvényt, szemrevételeztük a vírusfertőzöttségre utaló tőkéket (7., 8.ábra). 2022. július 29-én mintagyűjtés céljából látogattuk meg a területet, előkészítettünk szárazjeget, hogy konzerválja a mintákat eredeti állapotukban.

A mintavételre azért került sor július végén, mert a tenyészidőszak ezen időpontjában a felső állású leveleken, illetve a hajtáscsúcsban felgyülemlik az RNS. Tőként 3 darab 4 levélkorongot tartalmazó mintát vettünk (6.ábra). Ezeket felirattal ellátott Eppendorf csövekbe helyeztük (5. ábra), amiket rögtön szárazjégre tettünk. Budapestre felérve azonnal betettük őket a -80 °C-os hűtőszekrénybe és mintákat feldolgozásig itt tároltuk. Erre azért volt szükség, mert az RNS nagyon sérülékeny, bomlékony, így minél előbb biztosítani kell az optimális tárolási körülményeket.



6. ábra: A mintavételi 1,5 ml-s cső (Forrás: Terjék Netta Lili fotója)



7. ábra: Mintavétel folyamatban Zsomborral (Forrás: Terjék Netta Lili)



8. ábra: Vírustünetet mutató tőke (11-es tőke) Forrás: saját fotó)



9. ábra: Vírusfertőzöttségre utaló tőke (1-es tőke) (Forrás: saját fotó)

4.4. RNS kivonás

RNS kivonás előkészületek:

- Üzembe helyezzük a jégkészítő készüléket. Ha félig megtelt, belerakjuk a mozsarakat.
- Bekapcsoljuk a hűthető mikrocentrifugát csukott fedővel.
- Felfűjtük a vízfürdőt 65 °C-ra és belehelyezzük az SSTE puffert.
- Áram alá helyezzük a thermoblokkot, hogy felmelegedjen 65 °C-ra.

Felhasznált anyagok:

- RNS kivonó puffer (REB) - 2% CTAB + 2,5% PVP + 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 25 mM EDTA + 2 M NaCl
- β -merkaptoetanol
- CHISAM – 24:1 kloroform : isoamil-alkohol
- 9 M lítium-klorid
- Isopropanol
- 3 M Nátrium-acetát (pH 5,2)
- SSE – 1 M NaCl + 0,5% SDS + 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 1 mM EDTA (pH 8.0)
- Etanol (70%)

Protokoll Gambino (2008) módszere nyomán:

Kivesszük a mintákat a -80 °C-os hűtőszekrényből és odavisszük az elszívó fölkéhez. Kicsomagoljuk a mozsarakat és a nyeleket a sterilitás szabályait betartva.

A mozsárba belepipettázunk 1000 μ l REB-t, és 20 μ l β -merkaptoetanol. A mintát beletesszük a mozsárba és addig dörzsöljük, amíg egy homogén folyadék állagú anyagot nem kapunk, majd beleöntjük a 2 ml-s Eppendorf csőbe.

Betesszük a csöveket a thermoblokkba, 65 °C-on 10 percig maradnak így, közben kézzel kétszer átforgatjuk őket.

Majd kivesszük a csöveket, és egyenként a csövekbe pipettázunk 850 μ l CHISAM-ot, aztán kézzel átforgatjuk őket, miközben odavisszük a centrifugához.

Belehelyezzük a csöveket a hűthető mikrocentrifugába (Hermle Labortechnik GmbH, Németország), mindig azonos egységnyi távolságra egymástól, ügyelve arra is, hogy az Eppendorf csövek fülei kifelé álljanak. Majd beállítjuk a gépen, hogy 10 percig, 4 °C-on, 11000 Fordulat/perces fordulatszámmon működjön, elindítjuk.

Ha lejárt a centrifuga, átvisszük a mintákat az elszívó fölkéhez. Ha megnézzük a mintákat, láthatjuk, hogy a centrifugálás hatására két fázisúak lettek. Beállítjuk a pipettát 700 μ l-re és a felső áttetszőbb fázist leszívjuk óvatosan, hogy a pipettahegy ne érjen bele az alsó sűrűbb zöld fázisba. A leszívott anyagot egy új csőbe tesszük. Belepipettázunk 700 μ l CHISAM-ot. Kézi átforgatás után pedig megint betesszük a centrifugába és 10 percig, 4 °C-on, 11000 fordulat/perces fordulatszámmon centrifugáljuk.

Ahogy véget ér a program, átvisszük a mintákat újra az elszívó fülkéhez. Beállítunk a pipettán 500 µl-et és a felső áttetsző fázist óvatosan leszívjuk, és áttesszük egy új 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. Ezután belepipettázunk 250 µl lítium-kloridot. A csöveket 30 percig jégre tesszük.

Az inkubálás letelte után a mintákat betesszük a centrifugába, 20 percre, 4°C-on, 21000 fordulat/perces fordulatszámra.

Ha lejárt a program, a csöveket kivesszük egy szoros kémcsőtartóba és egy határozott mozdulattal leöntjük a tartalmukat. Ezután szűrőpapírra tesszük szájjal lefelé, hogy minél kevesebb LiCl maradjon a csövekben. Ezután a pelletre pipettázunk 500 µl SSE-t. A mintákat fél percig vortexeljük, ezzel segítve a pellet feloldását, majd hozzájuk mérünk 500 µl CHISAM-ot, összeforgatjuk és betesszük őket a centrifugába 10 percre, 4 °C-on, 11000 fordulat/percre.

Amint lejárt a program, leszívunk óvatosan a felső, áttetszőbb oldatból 400 µl-et és beletesszük egy új mikrocentrifuga csőbe. Ezután belepipettázunk 40 µl Nátrium-acetátot és 280 µl isopropanolt. Megforgatjuk a mintákat kézzel, és beletesszük a centrifugába 10 percre, 4 °C-on, percenkénti 11000-es fordulatszámra.

Ha lejárt a centrifuga, megint beletesszük a csöveket a szorító kémcsőtartóba, és leöntjük a felülúszót. Ezt követően belepipettázunk a csövekbe óvatosan, az oldalán leeresztve 500 µl 70%-os etanolt. (Ha túl gyorsan, közvetlenül rápipettázuk, úgy kicsaphatja a mintákat, ezért kell szétfolyatva). Beletesszük a centrifugába 10 percre, 4 °C-on, 11000 fordulat/perces fordulatszámra.

Ha végzett a program, megint a szorító kémcsőtartóba tesszük a csöveket és leöntjük róluk a felülúszót. Ezután berakjuk őket a Mini spin asztali centrifugába (Eppendorf, D) 7000 fordulat/perces fordulatra felpörgetve, hogy biztos minden maradék csepp leüljön a cső aljára. A pipettát beállítjuk 50µl-re, a mikrocentrifuga cső aljáról minden folyadékot leszívunk. A 65 °C-ra beállított thermoblokkban nyitott fedéllel 5 perc alatt beszárítjuk a pelletet, hogy kipárologjon, ha még mindig maradt benne folyadék.

Ha lejárt az 5 perc, kivesszük őket és beléjük pipettázunk 50 µl Lonza vizet, úgy, hogy közben egy kicsit lifteztetjük a pipettában. Ezután jégre helyezzük a mintákat.

4.5. Gélelektroforézis

Felhasznált eszközök a gélelektroforézis készülékhez (Cleaver scientific GmBH, Egyesült Királyság):

- 1 db gélelektroforézis kád
- 1 db gélöntő sablon
- 2 db gumi záróelem
- 1 db fésű
- 1 db kis főzőpohár
- Etídium-bromid
- 1× TBE
- 2% agaróz gél 1×TBE pufferben

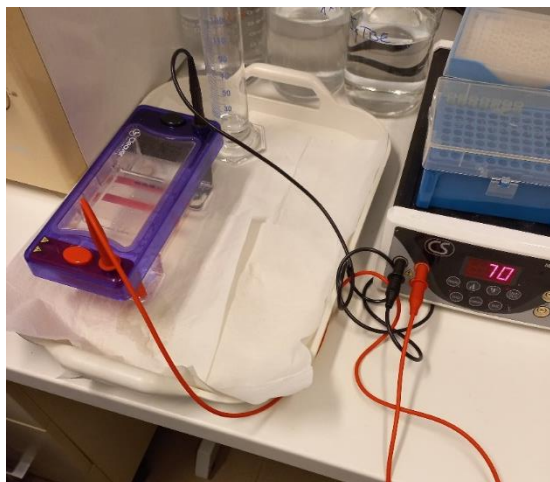
Elmosunk minden hozzávalót bő mosogatószerben, majd mindegyiket alaposan átöblítjük még desztillált vízzel is. Eltöröljük szárazra és összeállítjuk a gélöntő sablont, amibe majd meg fogjuk önteni a gél.

1,2%-os TBE agarózt betesszük a mikróba meglazított kupakkal, felforraljuk, meglötyköljük, és ha homogén már, akkor kimérünk a gél méretének megfelelő mennyiségű gél a főzőpohárba. Belepipettázunk 4 µl etídium-bromidot, elkeverjük és beleöntjük a gélöntő sablonba. Várunk ~35-40 percet amíg a gél szobahőmérsékletre hűl és megszilárdul. Utána nagyon óvatosan leszedjük róla a gumi záróelemeket, és kivesszük a fésűt vigyázva, hogy el ne szakadjon a gél.

Beletesszük a gél a kádba, felöntjük 1× TBE-vel addig, hogy ellepje a folyadék a gél. Ettől a ponttól külön kezeljük az RNS és DNS mintákat.

RNS: Kivesszük a mélyhűtőből az FDE festéket, és egy új cső kupakjába belepipettázunk 2 µl festéket, illetve a mintánkból is 2 µl-et. Ezután betesszük az asztali centrifugába 10 másodpercre, hogy összekeveredjenek és leülepedjen a cső aljába a folyadék. Aztán thermoblokkban denaturáljuk az RNS-t 65°C-on 5 percig, és utána 5 percig jégen lehűtjük a mintát.

Ezután ezt a mintánként 4 μ l-et belepipettázzuk óvatosan a gél zsebeibe és elindítjuk a gélelektroforézist (9.ábra).



10. ábra: Gélelektroforézis készülék működés közben
(Forrás: saját fotó)

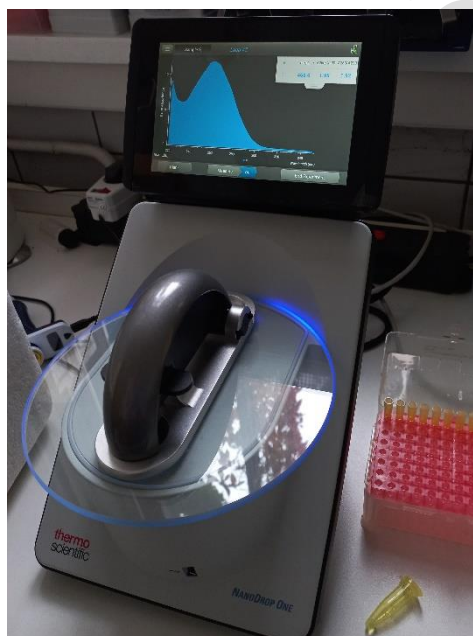
DNS: Az LB festékből és 4 μ l-t pipettázunk a PCR-cső oldalába. Majd beállítjuk a pipettát 10 μ l-re és lifteztetve összekeverjük a mintát a futtató festékkel, majd a mintát óvatosan belepipettázzuk a gél zsebébe. Indíthatjuk az elektroforézist.

4.6. RNS koncentráció meghatározása spektrofotométerrel

NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, USA) készüléket használunk ellenőrzésképpen, ami megmutatja az RNS koncentrációját 1 csepp (2 μ l) mintából. Ez egy cél-spektrofotométer, amelyet nukleinsavak (DNS és RNS) és fehérjék koncentrációjának gyors és pontos meghatározására használnak (10.ábra).

Bekapcsoljuk a gépet, majd követjük az utasításokat, amiket a kijelzőjén látunk.

2 μ l (RNS mentes) desztillált vizet helyezünk a szenzorra, lecsukjuk és megvárjuk, hogy kiírja a 0 μ l koncentrációt. Ezzel meghatározzuk az elnyelési alapvonalat.



11. ábra: NanoDrop One készülék működés közben (Forrás: saját fotó)

Ezután megtisztítjuk egy tiszta vattával a felületet, és rápipettázunk a szenzorra 2 μ l RNS mintát. Lecsukjuk a tetejét és várjuk, hogy kiírja a koncentrációt. Ezután újra letöröljük és végigcsináljuk a következő mintákkal.

Ha befejeztük a koncentrációk mérését, akkor megint rápipettázunk 2 μ l desztillált vizet a szenzorra, majd lecsukjuk a tetejét és megvárjuk, hogy 0 μ l – t írjon ki. Ezután letöröljük és elmentjük a munkánkat az adatbázisába.

4.7. cDNS elkészítése

cDNS (copy DNS) - Ezt a lépést azért végezzük, mert PCR-t csak DNS-ről lehet készíteni, RNS-ről nem. Ez a mennyiségű mix 4 darab mintára elegendő, ~10% ráhagyással.

1. táblázat: cDNS reakció összetétele 20 µl-s reakcióra számolva a gyártó utasításai szerint (Forrás: saját táblázat Thermo Fisher Scientific High -Capacity cDNA Reverse Transcription Kit alapján)

Anyag	Reakcióösszetéte	Master mix
	I 20 µl	(4,5 minta) 90 µl
10x RT puffer	2 µl	9 µl
25x dNTP (100mM)	0,8 µl	3,6 µl
10x RT random primer	2 µl	9 µl
RT enzim	1 µl	4,5 µl
Lonza víz	4,2 µl	18,9 µl

Először összeállítjuk ezt a mixet (1. táblázat), majd egy 0,5 ml-es PCR csőbe belepipettázunk a mixből 10µl-t, és az RNS mintából is 10 µl-t kicsit lifteztetve azt. Ezután berakjuk a PCR készülékbe az "rt" programra: 25 °C-on 10 percig, 37°C-on 2 óráig, 85°C-on 5 percig, 4°C-on tartva a végén.

4.8. PCR reakciók

A cDNS szintézis sikerességét PEPS háztartás génre tervezet primerekkel teszteltük PCR reakcióban (Oláh et al., 2017).

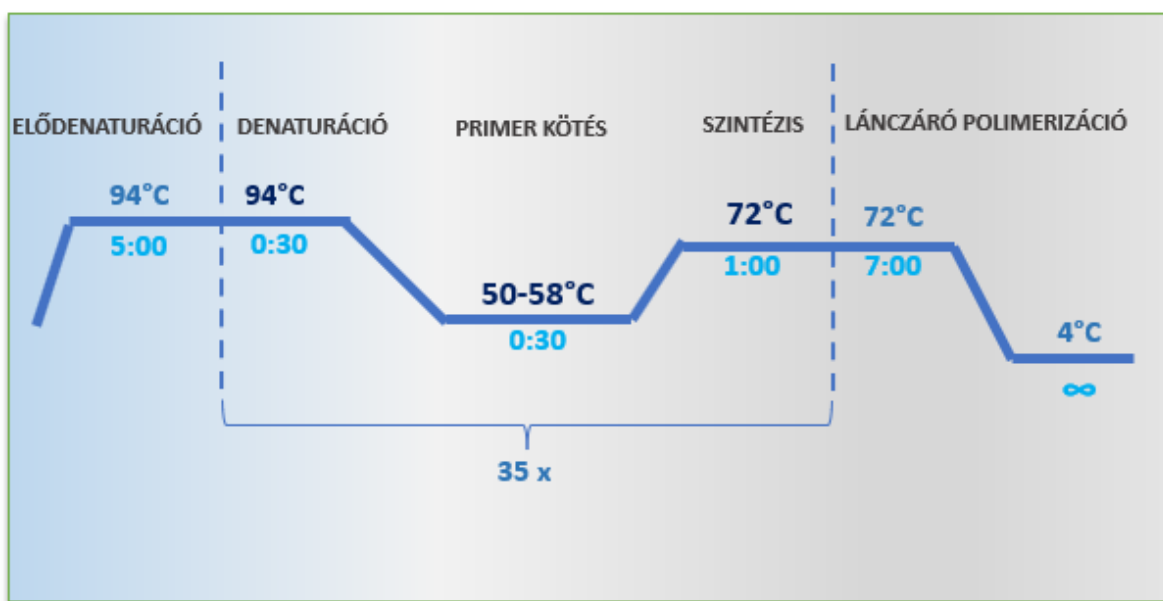
PCR (polimerase chain reaction) - polimeráz láncreakció: DNS-t szaporít fel, lehetővé teszi a DNS szakaszok sokszorozását. Arra szolgál, hogy lássuk alkalmas-e a cDNS, mert a víruskimutatáshoz arra lesz szükség.

2. táblázat: PCR reakció összetétele 20ml-es reakcióra számolva (Forrás: saját szerkesztés Green – Sambrook (2012) alapján)

Anyag	Törzsoldat cc.	Cél cc.	100 µl Mastermix (5 minta)	200 µl
10x RT puffer	10x	1x	10 µl	20 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	8 µl	16 µl
dNTP	10 mM	0,2 mM	2 µl	4 µl
primer F	25 µM	0,5 µM	2 µl	4 µl
primer R	25 µM	0,5 µM	2 µl	4 µl
Taq polimeráz	1 Unit/µl	1 U / rxn	5 µl	10 µl
DNS templát		1 µl - rxn	5 µl	-
3 DW			66 µl	132 µl

Ez alapján elkészítjük a mixet (2. táblázat), és belepipetázunk mindegyik 0,5 ml PCR csőbe 19 µl-t. A már elkészült cDNS mintánkból pedig 1 µl-t hozzá pipetázunk.

Ezután betesszük a PCR készülékbe: „peps2” programra: 94°C-on 5 perc, 94°C-on 30 másodperc, 50 °C-on 30 másodperc, 72 °C 90 másodperc (és ezt az utolsó három lépést megismétli 35x), 72°C-on 7 percig, 4°C-on tartva a végén.



12. ábra: PCR készülék működési hőmérsékletei vírusdiagnosztikai szempontból: Elődenaturáció 94°C-on 5 perc, - 35x-ös ismétlésben 3 lépés: denaturáció 94°C-on 30 másodperc, primer kötés 50 °C-on 30 másodperc, szintézis 72 °C 90 másodperc -, lánczáró polimerizáció 72°C-on 7 percre, végén 4°C-on tartva (Forrás: saját készítésű, a készülék kijelzője alapján)

Ezután végezhetjük a gélelektroforézist.

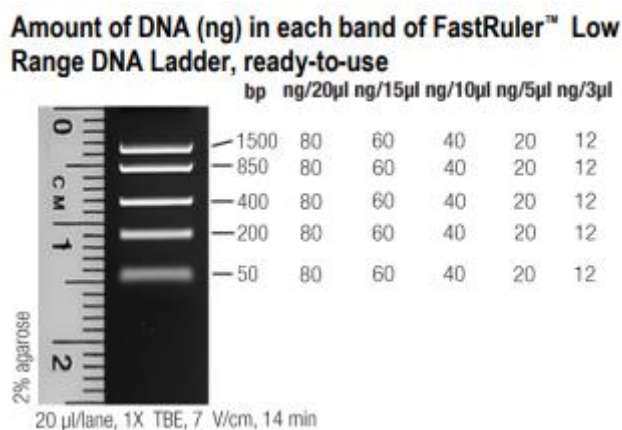
PCR a vírusmintákhoz:

3. táblázat: A PCR reakció összetétele 20 µl-es reakcióra számolva (Forrás: saját szerkesztésű táblázat Oláh et al., (2012) alapján)

Anyag	Törzsoldat cc.	Cél cc.	100 µl	450 µl
Puffer	10x	1x	10 µl	45 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	8 µl	36 µl
dNTP	10 mM	0,2 mM	2 µl	9 µl
vírus Primer F	10 µM	0,2 µM	2 µl	9 µl
vírus Primer R	10 µM	0,2 µM	2 µl	9 µl
Taq	1 U / µl	1 unit / rxn	5 µl	22,5 µl
cDNS	-	0,5 µl / rxn	2,5 µl	-
Lonza víz	-	-	68,5µl	308,25 µl

A mixből (3. táblázat) 19,5 µl-t belepipettázunk 0,5 ml-es PCR csőbe, majd hozzápipettázunk 0,5 µl-t a cDNS mintánkból. Aztán betesszük a vírusprimer megfelelő hőmérsékletére

előkészített programra a PCR készülékbe. Utána gélelektroforézisen láthatjuk, mely minták lettek pozitívak az adott vírusra. A futtatáshoz a LR (Low Range) DNS létrát használtam (14. ábra) Az egyes vírusokra specifikus PCR primereket a 4. táblázat tartalmazza.



13. ábra: Fast Ruler Low Range DNS létra értékei (Forrás: Thermo Fisher Scientific)

A víruskimutatáshoz a Thermo Fisher Scientific Fast Ruler Low Range DNS létráját használtam. Ezt a terméket kifejezetten a kettős szálú DNS gyors méretmeghatározására és közelítő mennyiségi meghatározására tervezték nagy áteresztőképességű gélekben, valamint hagyományos agaróz gélekben. A bp a DNS fragmensek hosszát jelenti, amely alapján beazonosítható a a PCR termék hozzávetőleges hossza és így ellenőrizhető, hogy az adott vírusra specifikus primerpár a megfelelő hosszúságú PCR terméket szaporította-e fel.

4. táblázat: A PCR reakció összetétele 20ml-es reakcióra viszonyítva (Forrás: saját szerkesztésű táblázat)

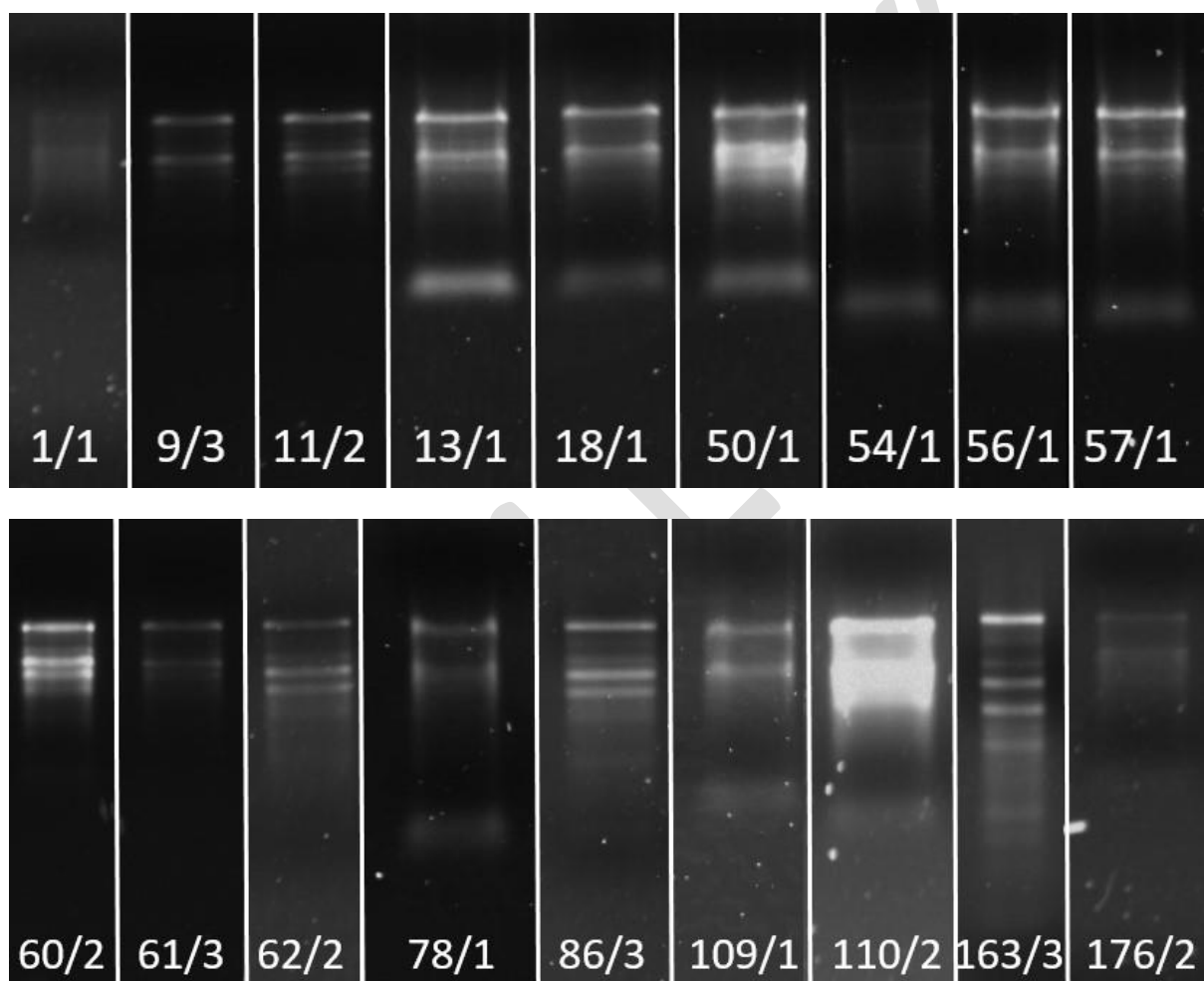
Vírus	Primer	Szekvencia	Annealing hőmérséklet	Hosszúság (bp)	Referencia
GPGV	GPG-6609F	GAGATCAACAGTCAGGAGAG	56°C	430	(Glasa et al., 2014)
	GPG-7020R	GACTTCTGGTGCCTTATCAC			
GLRaV-1	LR1CPF1	CTAGCGTTATATCTCAAAATGA	50°C	502	(Engel et al., 2010)
	LR1CPR1	CCCATCACTTCAGCACATAA			
GLRaV-2	GLRaV-2 F	GGTGATAACCGACGCCTCTA	55°C	543	(Gambino et al., 2006)
	GLRaV-2 R	CCTAGCTGACGCAGATTGCT			

GLRaV-3	LC1/F	CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT	55°C	546	(Osman et al., 2006)
	LC1/R	GTTGTCCCGGGTACCAGATAT			
GFkV	GFk V1/F	GGTCCTCGGCCCAGTGAAAAAGTA	58°C	344	Osman et al., 2008)
	GFk C1/R	GGCCAGGTTGTAGTCGGTGTGTC			
GCMV	GCMV 5'3140	CATGGTCTAGCCACTAGGAG	55°C	691	(Brandt et al., 1995)
	GCMV 3'3831	GTAGTGGCACACATGATGGC			
GFLV	GFLV CP 433V	GAAGTGGCAAGCTGTCGTAGAAC	58°C	480	(Osman et al., 2006)
	GFLV CP 912C	GCTCATGTCTCTCTGACTTTGACC			
ArMV	ArMV F	TGACAACATGGTATGAAGCACA	55°C	402	(Gambino et al., 2006)
	ArMV R	TATAGGGCCTTTCATCACGAAT			
RSPaV	SPV	AGCTGGGATTATAAGGGAGGT	55°C	331	(Lima et al., 2006)
	SPC	CCAGCCGTTCCACCACTAAT			
TBRV	Nepo b 5*	ATGTGYGCHACYACWGGHATGCA	50°C	485	(Digiario et al., 2007)
	TBRV sp-a (3)	ATGACACTCTAGAAGAAAGTTG			
TRSV	TRSV SP-S 5	CAGTGAGGATGCACGCCCC	50°C	190	(Digiario et al., 2007)
	Nepo- A a3	GGHDTBCAKTMYSAARRARTGG			

5. Eredmények és értékelésük

5.1. RNS minták

Az RNS kivonás eredményességét agaróz gélelektroforézissel és spektrofotométerrel ellenőriztem. A gélelektroforézis alapján azt tudtam eldönteni, hogy a kivonás során az RNS nem bomlott-e le. A gélen látható diszkrét csíkok az RNS populáció legnagyobb arányban jelen lévő elemeit (pl. rRNS) mutatják. A gélfotó alapján 20 darab tőke közül 18 darab tőkének lett alkalmas az RNS-e a további vizsgálatokra (12. ábra).



14. ábra: RNS minták képei gélelektroforézis fotón: a minták erőssége a mennyiségre, a sávok diszkrét volta a minőségre utal (Forrás: saját eredmény)

A gélelektroforézis mellett NanoDrop One készülékkel megmértem az RNS kivonatok koncentrációját (5. táblázat). A 260 nm-en mért abszorbancia alapján meghatározott nukleinsav koncentráció mellett fontos minőségi mutatók a 260 nm-en és 280 nm-en mért abszorbancia aránya, amelynek határérték alatti értéke a kivonat túlzott fehérje szennyezettségére utal, valamint a 260 nm-en és 230 nm-en mér elnyelés aránya, ami pedig a

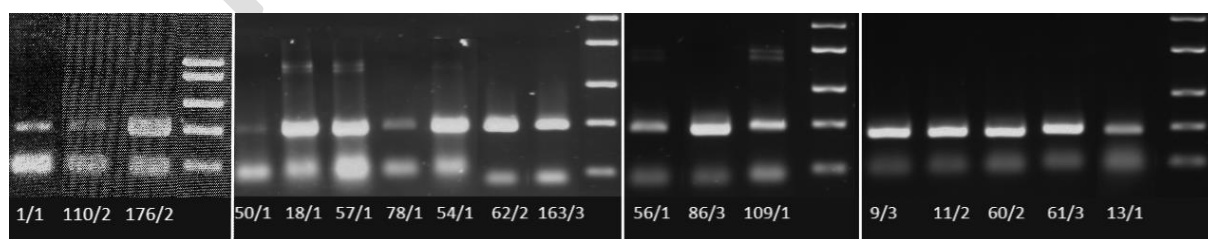
kivonat polifenol szennyezettségére utal. Annak ellenére, hogy bizonyos esetekben az értékek kifejezetten alacsonynak mutatkoztak (pl. 78/1 minta), a cDNS szintézis és az ellenőrző PCR sikeresnek bizonyult (13. ábra).

5. táblázat: NanoDrop One készülékkel mért koncentrációk az RNS mintákról. A 260/280 és 260/230 nm-en mért elnyelési arányát mutató oszlopok fejlécében megadott arány az ideális tartományt mutatja. (Forrás: saját eredmények)

Minta száma	Nukleinsav koncentrációja	A 260/280 (1,8-2,05)	A 260/230 (2-2,6)
1/1	25,9	1,96	2,32
9/3	106,0	2,00	2,40
11/2	96,7	2,03	2,37
13/1	204,3	1,92	1,74
18/1	886,9	1,89	1,66
50/1	1095,8	2,00	1,60
54/1	1917,8	1,94	2,00
56/1	606,6	1,67	0,61
57/1	111,5	1,80	1,35
60/2	107,4	2,02	2,54
61/3	54,8	1,99	2,55
62/2	51,8	1,94	2,19
78/1	373,3	1,63	0,46
86/3	102,8	1,78	2,44
109/1	132,9	1,42	0,49
110/2	225,1	2,03	2,38
163/3	118,0	2,02	2,09
176/2	34,8	1,81	1,98

5.2. cDNS szintézis

Az RNS kivonást követően cDNS szintézist végeztem, hogy azon a vírusok kimutatásához szükséges PCR reakciót elvégezhessem. A cDNS szintézis sikerességét PEPS primerekkel (Oláh et al.,2017) ellenőriztem. A sikeres PCR-t a gélen a várt mérettartományban megjelenő sávok mutatják (13. ábra).

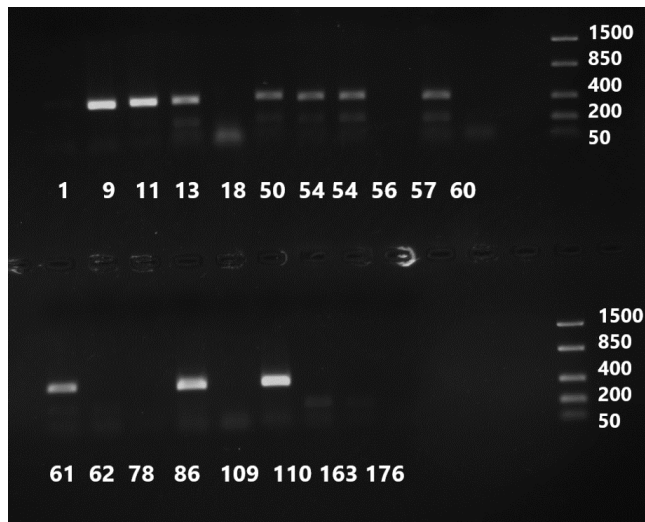


15. ábra: cDNS minták ellenőrzése PEPS primerekkel végzett PCR-rel. Méretmarker: ThermoFisher Low Range (Forrás: saját eredmény)

5.3. Vírusdiagnosztika

Grapevine pinot gris virus (GPGV)

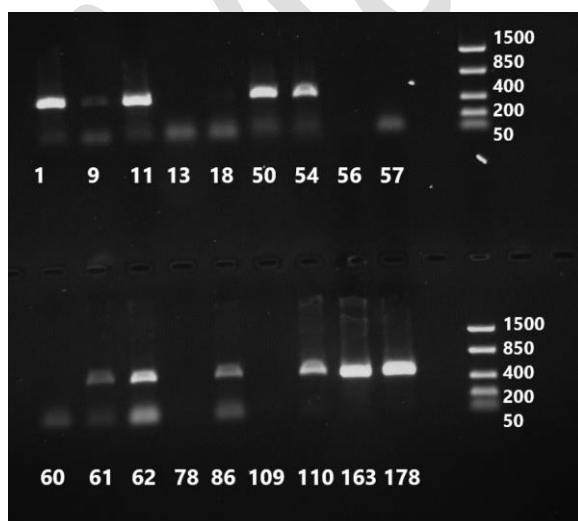
A Grapevine pinot gris vírus viszonylag sok tőkében megtalálható (15. ábra). A 9/3-as, 11/2-es, 13/1-es, 50/1-es, 54/1-es, 57/1-es, 61/3-as, 86/3-as, 110/2-es mintákban lett pozitív a vizsgálat eredménye körülbelül a várható 430 bp hosszúságnál. A vizsgált tőkék több, mint a felében megfigyelhető volt.



16. ábra: GPGV fertőzöttség a 18 mintában. (Az 54-es minta duplikálva lett véletlenül.) A várt PCR termék hossza 430 bp (Forrás: saját eredmény)

Grapevine leafroll associated virus 1 (GLRaV-1)

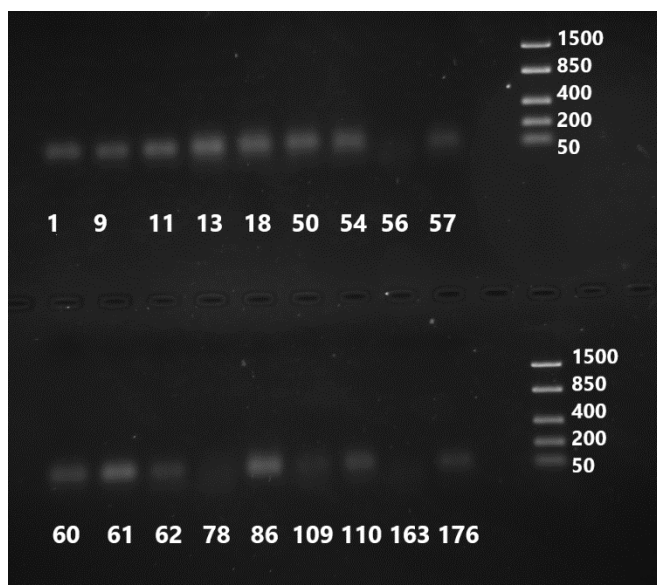
A 16. ábrán látható, hogy a Grapevine leafroll associated virus 1 megtalálható az 1/1-es, 9-3-as, 11/2-es, 50/1-es, 54/1-es, 61/3-as, 62/2-es, 86/3-as, 110/2-es, 163/3-as, 176/2-es mintákban körülbelül 502 bp értéknél.



17. ábra: GLRaV-1 fertőzöttség a 18 mintában -502 bp hosszon. (Forrás: saját)

Grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV-2)

Ahogy a 17. ábrán is látható a Grapevine leafroll associated virus 2 egy mintára sem adott pozitív eredményt. Egyik tőkénk sem fertőzött ezzel a vírussal.



18. ábra: GLRaV-2 fertőzöttség a 18 mintában – 543 bp hosszán (Forrás: saját)

Grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3)

A 18. ábrán látható, hogy a Grapevine leafroll associated virus 3 mindössze 2 darab minta esetében adott pozitív reakciót, az 1/1-es és 86/3-as tőkén megközelítőleg 546 bp hosszúságon.



19. ábra: GLRaV-3 fertőzöttség a 18 mintában - 546 bp hosszán (Forrás: saját)

Grapevine fleck virus (GFkV)

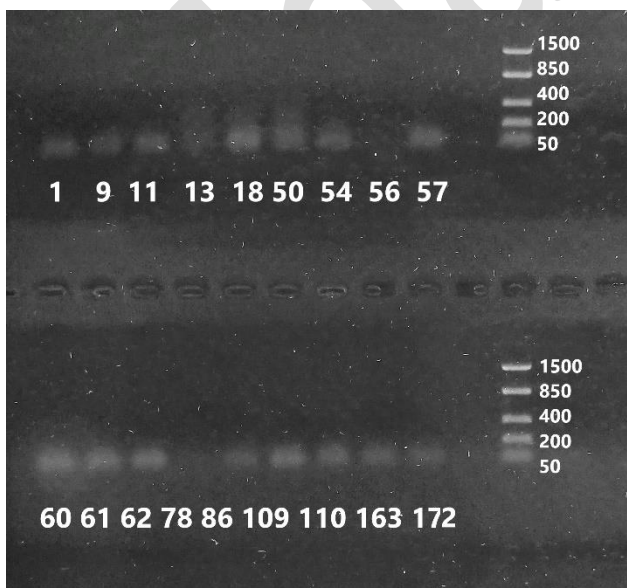
Ahogy a 19. ábrán is látható a Grapevine fleck vírust ugyancsak 2 esetben mutattam ki a vizsgált mintákon, az 1/1-es és az 54/1-es egyedeknél a körülbelüli 344 bp hosszúságon.



20. ábra: GFkV fertőzöttség a 18 mintában - 344 bp hossz (Forrás: saját)

Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)

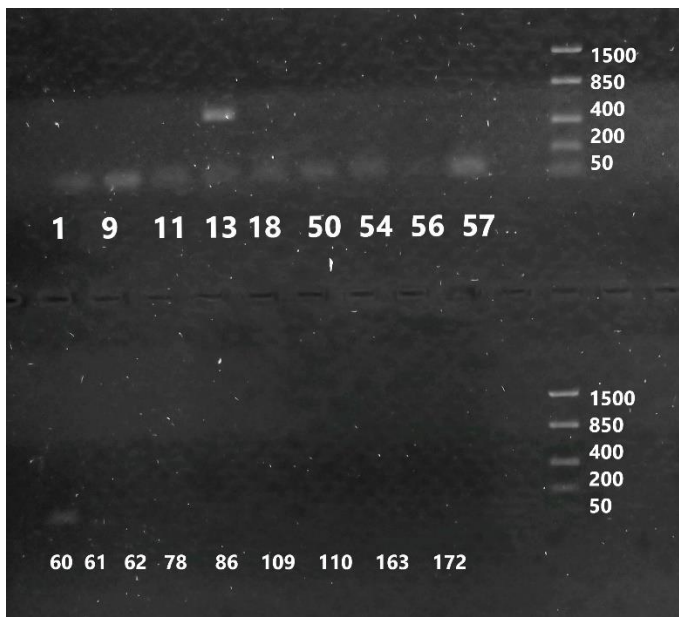
A Grapevine chrome mosaic vírusra nem találtam egyáltalán pozitív reakciót. A 20. ábrán jól látható, hogy a 691 bp tartományban nem jelenik meg semmilyen jel.



21. ábra: GCMV fertőzöttség a 18 mintában 691 bp hossz (Forrás: saját)

Grapevine fanleaf virus (GFLV)

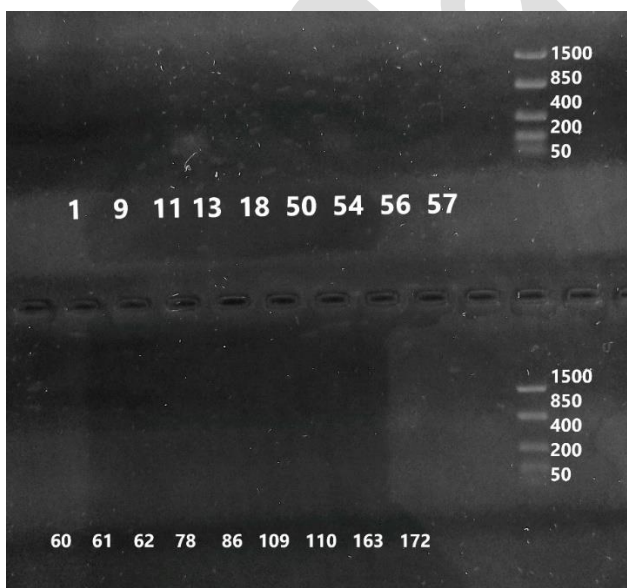
A 21. ábrán látható, hogy a Grapevine fanleaf virus a 13/1-es mintára mutat eredményt a becsült 480 bp tartományánál.



22. ábra: GFLV fertőzöttség a 18 mintában - 480 bp hosszon (Forrás: saját)

Arabis mosaics virus (ArMV)

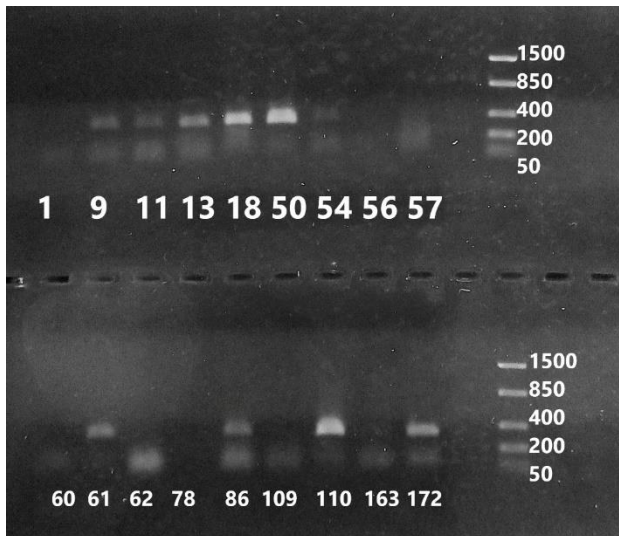
Az 22. ábrán jól látható, hogy az Arabis mosaics vírus nem jelent meg a vizsgált mintákban 402 bp tartományban.



23. ábra: ArMV fertőzöttség a 18 mintában - 402 bp hosszon (Forrás: saját)

Rupestris stem pitting virus (RSPaV)

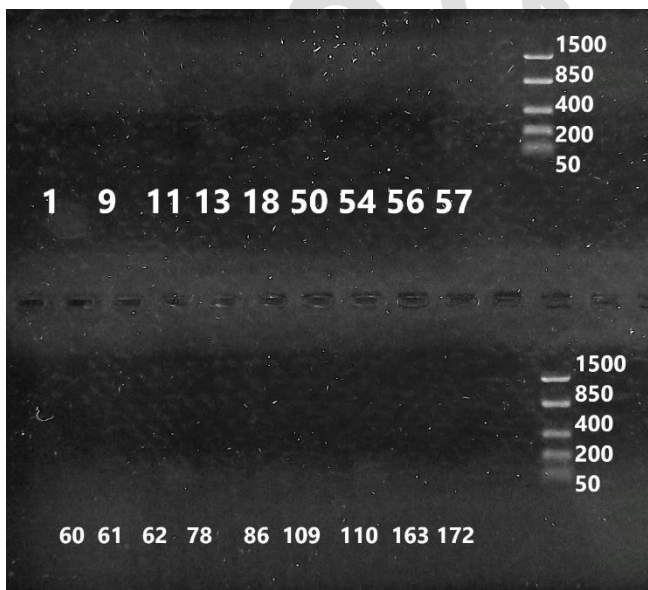
A 23. ábrán a Rupestris stem pitting vírus szemmel láthatóan több tőkén is megjelent, a 9/3-as, 11/2-es, 13/1-es, 18/1-es, 54/1-es, 61/3-as, 86/3-as, 110/2-es, 176/2-es mintákban a várható 331 bp érték környékén.



24. ábra: RSPaV fertőzöttség a 18 mintában – 331 bp hosszban (Forrás: saját)

Tomato black ring virus (TBRV)

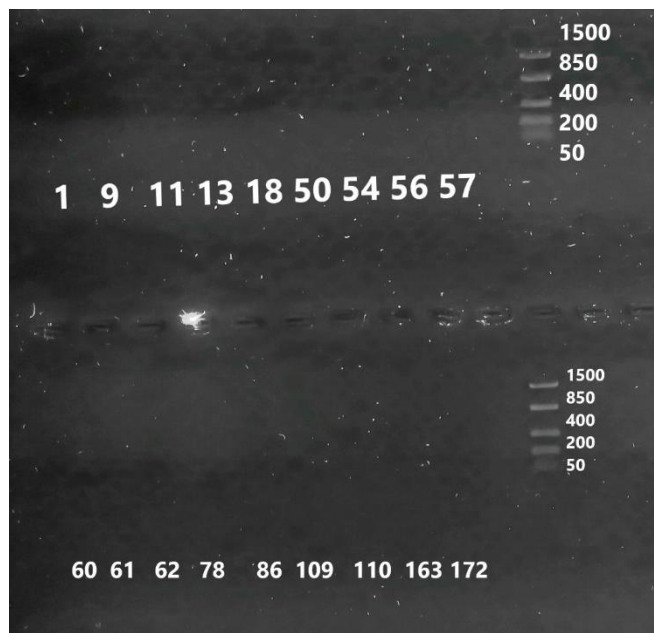
A 24. ábrán látszik, hogy a Tomato black ring vírus az általam vizsgált mintákban nem igazolódott a 485 bp hosszúságú tartományban.



25. ábra: TBRV fertőzöttség a 18 mintában - 485 bp hosszban (Forrás: saját)

Tobacco ring spot virus (TRSV)

A Tobacco ringspot vírus szintén nem ábrázolódik a várható 190 bp értéknél, ahogy a 25. ábrán is látható.



26. ábra: TRSV fertőzöttség a 18 mintában - 190 bp hossz (Forrás: saját)

Készítettem egy összesítő táblázatot, amely azt mutatja, hogy milyen vírusokat tudtam igazolni az általam vizsgált mintákban (6. táblázat).

6. táblázat: Vírusok jelenléte a mintákban (Forrás: saját)

Minta neve	GVPG	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GFKV	GCMV	GFLV	ArMV	RSPaV	TBRV	TRSV
1/1	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
9/3	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
11/2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
13/1	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
18/1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
50/1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
54/1	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
56/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57/1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61/3	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
62/2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86/3	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
109/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110/2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

163/3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
176/2	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

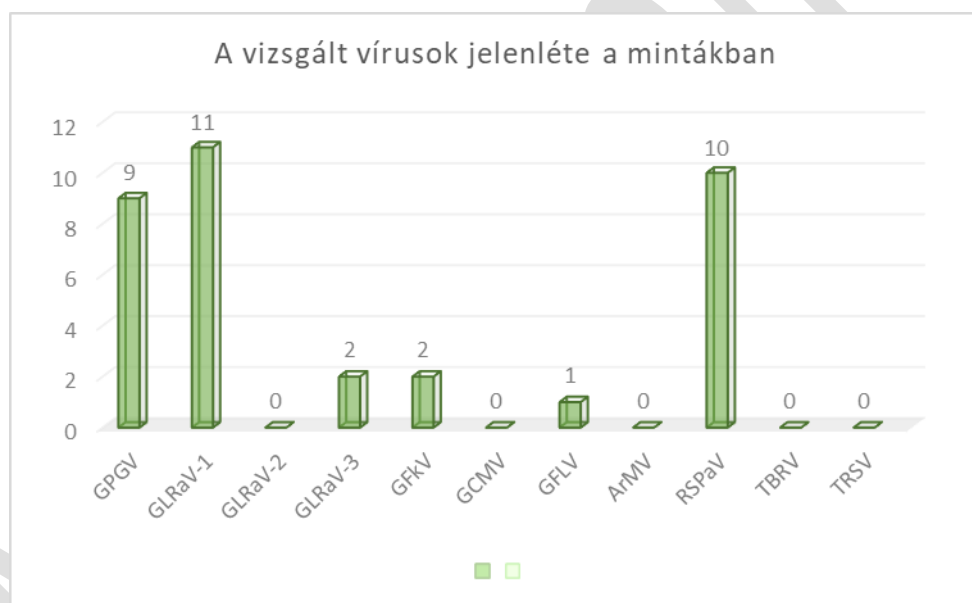
Máár Enikő

6. Következtetések és javaslatok

18 darab mintát vizsgáltam 11 vírus meglétének szempontjából. A vizsgálataim eredménye arra mutat, hogy a vizsgált ültetvényen leginkább a GPGV, GLRaV-1, RSPaV vírusok vannak jelen (26. ábra). Vizsgált tőkéim ígéretes klónjelöltek, ezért fontos, hogy ne mutakozzon náluk betegség.

5 vírust nem találtam egyik mintámban sem, de ezeknek a vírusoknak (GLRaV-2, GCMV, ArMV, TBRV, TRSV) a jelenléte a magyarországi szőlőültetvényeken ritkább előfordulású (Cseh et al., 2012).

A GLRaV-3, GFkV, GFLV vírusok egy vagy két mintában szerepeltek, azonban bármelyikük jelenléte kizárja a klónjelöltet a certifikációs folyamatból. Ezenkívül a GLRaV-1, GFkV, ArMV megléte alapján elutasítják a jelölt regisztrálását és szaporítását (87/2006 XII. 28. FVM rendelet).

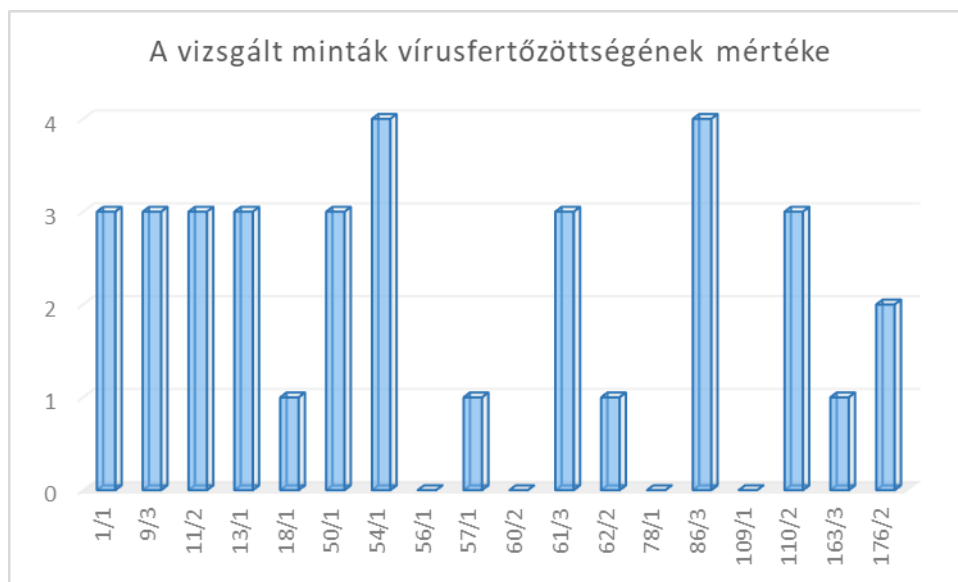


27. ábra: A vizsgált vírusok mennyisége a mintáimban (Forrás: saját)

A legnagyobb mértékben a GLRaV-1 vírus mutatkozott, mintegy 11 tőkét megbetegítve. A GLRaV-1 hazánkban az egyik leginkább elterjedt betegség a szőlőültetvényeken (Cseh et al., 2012). A sorban követi őt az RSPaV vírus 10, és a GPGV vírus 9 fertőzött mintával.

A 18 mintából összesen 4-ben nem mutattam ki vírust, ezek a 56/1-es, 60/2-es, 78/1-es, 109/1-es. Ezek a tőkék továbbra is jó eséllyel pályáznak a certifikációra. 4 mintában 1, 1 mintában 2 vírus jelenléte mutatkozott. A többi mintában 3 vagy 4 vírust izoláltam. A legfertőzöttebb tőkéim az 54/1-es és a 86/3-as. Az aggasztó viszont az ebben a folyamatban,

hogy a GLRaV-1 vírus nemcsak a több vírussal fertőzött tőkék esetében jelentkezett, hanem az egy kórokozót tartalmazó minták felében is megjelent. Ez pedig azt jelenti, hogy a kevesebb vírussal fertőzött tőke, akár rosszabb eséllyel indulhat a klónná válás folyamatában, mint a több vírussal fertőzött.



28. ábra: A vizsgált minták vírusfertőzöttségének a mértéke (Forrás: saját)

A víruskimutatási vizsgálatoknál a negatív kontrollok mellett szükség van pozitív kontrollra is, mert anélkül nem igazolható biztosan egy-egy vírus jelenléte. Ezek a pozitív ellenőrzések hiányoznak a vizsgálataimból, mert nem álltak rendelkezésre, ezért nem lehet 100%-ig biztosra venni, hogy helyesek az eredmények. Mindenesetre további növényegészségügyi vizsgálatok szükségesek.

A rendszeres ellenőrzés a fajtagyűjtemények készleteinek ellenőrzésével hozzájárulhatna a szaporítóanyagok helyes diagnózisainak felállításához, illetve a szőlőültetvények egészségének megőrzéséhez. (Czotter et al., 2018)

7. Összefoglalás

A dolgozatomban célja a szekszárdi Kékfrankos gyűjtemény vírusfertőzöttségének felmérése volt.

A minták kigyűjtése után vírus tesztelést végeztem PCR módszerrel. Munkám során a következő lépéseket végeztem el:

- RNS kivonása a mintákból,
- RNS kivonás ellenőrzése gélelektroforézissel,
- cDNS készítése az RNS mintákról,
- cDNS-ről PCR termék készítése,
- cDNS ellenőrzése gélelektroforézissel,
- vírusfertőzöttség meghatározása PCR technikával,
- gélelektroforézis a vírusok jelenlétéről.

Ezeket a lépéseket követően megkaptam az eredményeket, arról, hogy milyen szintű a fertőzöttsége a kutatott ültetvényeknek. A 18 darab mintából 4-ben nem mutattam ki egyet sem az általam tesztelt vírusokból. 5 mintában 1 vagy 2 vírust mutattam ki, a minták felében viszont 3 vagy 4 vírus is megjelent.

A legnagyobb mértékben a GLRaV-1 vírus mutatható ki, amely aggasztó, mert ennek a vírusnak a jelenléte nem engedi a klónjelölt certifikációját.

Az ültetvény vizsgált tőkéi mentesek az ArMV, GLRaV-2, TBRV, TRSV vírusoktól.

További vizsgálatok szükségesek, hogy teljes mértékben megbizonyosodjunk bizonyos tőkék fertőzöttségéről, valamint a negatív eredmények megbízhatóságáról.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Mészáros Borháznak, hogy lehetőséget biztosított az ültetvényén a kutatáshoz.

Ezúton szeretném megköszönni a rengeteg időt, és tanítást témavezetőmnek, Dr. Deák Tamásnak, aki megtanított minden laboratóriumi módszerre.

Köszönettel tartozom Taranyi Dóra Ágnesnek, aki laboratóriumi munkájával hozzásegített ennek a dolgozatnak az elkészültéhez.

Csoporttársaimnak Mester Zsombornak, Valkó Benedeknek is köszönöm a segítséget a minták begyűjtésében és Terjék Netta Lilinek a fotókat is.

Végül pedig köszönöm a családomnak a támogatást és a bölcs gondolatokat.

9. Irodalomjegyzék

- 1959. évi 23. törvényerejű rendelet a szőlő-, gyümölcs- és borgazdálkodásról
- 11/1966. (VI. 8.) FM rendelet egyes növényi szaporítóanyagokról minőségi bizonyítvány kötelező kiállításáról
- 40/2004. (IV. 7.) FVM rendelet a növényfajták állami elismeréséről
- 87/2006. (XII. 28.) FVM rendelet a szőlő szaporítóanyagok előállításáról, minősítéséről és forgalomba hozataláról
- Ádám L. (1964) A Szekszárdi-dombvidék kialakulása és morfológiája; Budapest Akadémiai Kiadó, p.7., 11.
- Al Rwahneh, M.; Daubert, S.; Golino, D.; Rowhani, A. (2009) Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. New York, Virology n.2. p.395-401.
- Baglyas F. (2016) Szőlőtermesztés jegyzet. Kecskemét, Neumann János Egyetem p.182-191.
- Becker H. (1990) A szőlő klónszelekciója a Német Szövetségi Köztársaságban összehasonlítva a többi országgal. Kecskemét, Szőlőtermesztés és Borászat 12. p. 7-10.
- Bényei F., Lőrincz A. (2005) Borszőlőfajták, csemegeszőlő-fajták és alanyok. Budapest, Mezőgazda Kiadó, p.157-174.
- Brandt S. and Himmler G. (1995) Detection of nepoviruses in ligneous grapevine material by using IC/PCR, Vitis, 34(2), pp. 127–128.
- Czotter N., Molnar J., Szabó E., Demian E., Kontra L., Baksa I., Szittyá Gy., Kocsis L., Deák T., Bisztray Gy., Tusnady G., Burgyan J. and Varallyay É. (2018) 'NGS of virus-derived small RNAs as a diagnostic method used to determine viromes of Hungarian Vineyards', Frontiers in Microbiology, 9(FEB), pp. 3;5-8. doi:10.3389/fmicb.2018.00122.
- Cseh, E., Daragó, Á., Takács A. P. and Gáborjányi R. (2012) Survey on the occurrence of the grapevine viruses in Hungary. Journal of Center European Agriculture 2012 13(1) p. 44-57. doi: 10.5513/JCEA01/13.1.1013

- Demangeat, G.; Komar, V.; Van-Ghelder, C.; Voisin, R.; Lemaire, O.; Esmenjaud, D.; Fuchs, M. (2010) Transmission competency of single female *Xiphinema* index lines for Grapevine fanleaf virus. Saint Paul, Phytopathology, n.4, p.384-389,
- Digiaro M., Elbeaino T., Martelli G. P. (2007) Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting nepoviruses of subgroups A, B and C, Journal of Virological Methods, 141(1), pp. 34–40.
- Dula B., Lázár J., Kölber M. (2016) A szőlő növényvédelme II. Betegségek Növényvédelem folyóirat, 77 (52) 5. szám. p.235-241.
- Engel E. A., Escobar P. F., Rojas L. A., Rivera P. A., Fiore N., Valenzuela P. (2010) A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses, Journal of Virological Methods, 163(2), pp. 445–451.
- Gallitelli D., V. Savino and O.A. De Sequeira (1983)Phytopathologia Mediterranea: Properties of a distinctive strain of Grapevine Bulgarian latent virus Firenze, Firenze University Press n. 1/2, pp. 27-32.
- Gambino G. and Gribaudo, I. (2006) Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control, Phytopathology, 96(11), pp. 1223–1229.
- Gambino G., Perrone I., Gribaudo I. (2008) A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants, Phytochemical Analysis, 19(6), pp. 520–525.
- Giampetruzzi, A.; Roumi, V.; Roberto, R.; Malossini, U.; Yoshikawa, N.; La Notte, P.; Terlizzi, F.; Credi, R.; Saldarelli, P. (2012) A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in cv Pinot gris. Amsterdam, Virus Research v.163, n.1, p.262-268.
- Glasa M., Predajňa L., Komínek P., Nagyová A., Candresse T., Olmos A. (2014) Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines, Archives of Virology, 159(8), pp. 2103–2107.
- Goheen, A. C., Hewitt, W. B. (1962) Vein banding, a new virus disease of grapevines. Am. J. Enol. Vitic., 13 (29): p.73-77.

- Green M., Sambrook J. (2012) Molecular Cloning : A laboratory manual – fourth edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Hajdu E. (2018) Értéknövelő szelekció és fajtafenntartás, Agroforum
<https://agroforum.hu/szakcikkek/szolo-bor-szakcikkek/erteknovelo-szelekcio-es-fajtafenntartas/>
- Hajdu, E., Korać, N., Cindrić, P., Ivanišević, D., Medić, M. (2011) The importance of clonal selection of grapevine and the role of selected clones in production of healthy propagating stocks. International Journal of Horticultural Science, Vol.17 No.3.
- Hewitt, W.B. (1950) Fanleaf, another vine disease found in California. Bull. Calif. Dep. Agric, 39. p.62-63.
- hnt.hu: Borszőlővel beültetett terület Szekszárdi Borvidék 2022.07.31.
<https://www.hnt.hu/wp-content/uploads/2022/09/Borszolovel-beultetett-terulet-Szekszardi-borvidek-20220731.pdf>
- Kozma Pál (1968): A szőlő termékenységének biológiai tényezői, Agrártudományi közlemények 27. száma
- Lehoczky, J., Boscia, D., Martelli, G.P., Burgyan, J., Castellano, M.A., Beczner, L., Farkas, G. (1987) Occurrence of line pattern a hitherto unknown virus disease of grapevine in Hungary. Kertgazdaság, 19. p.61–79
- Lehoczky, J., Beczner, L. (1980) Szőlőbetegség a lucerna mozaik vírus fertőzésétől L. Kertgazdaság, 2. p.59-66.
- Lehoczky J., Burgyán, J. (1986) A paradicsom fekete gyűrűs foltosság vírus előfordulása szőlőben Magyarországon. Kertgazdaság, 18(4) p.47-57
- Lima, M. F., Alkowni R., Uyemoto J. K., Golino D., Osman F., Rowhani A. (2006) Molecular analysis of a California strain of Rupestris stem pitting-associated virus isolated from declining Syrah grapevines, Archives of Virology, 151(9), pp. 1889–1894.
- Little A., Rezaian, M. A. (2006) Improved detection of grapevine leafroll-associated virus 1 by magnetic capture hybridisation RT- PCR on a conserved region of viral RNA. Archives of Virology, New York, v. 151. p. 753-761.
- Lőrincz A. – Zanathy G. III. 7 fejezet: Magyarország borvidékei p. 261-307- Lőrincz A., Nagy Sz. L., Zanathy G., (2015) Szőlőtermesztés – negyedik átdolgozott kiadás, Media-Works Hungary Zrt., Budapest

- Malagnini V.; De Lillo E.; Saldarelli P.; Beber R.; Duso C.; Raiola A.; Zanotelli L.; Valenzano, D.; Giampetruzzi, A.; Morelli, M.; Ratti, C.; Causin, R.; Gualandri, V. (2016) Transmission of grapevine Pinot gris virus by *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) to grapevine. *Archives of Virology*, New York, v.161, p.2595-2599.
- Manini F. (1998) VII. International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding Clonal Selection in Grapevine: Interactions Between Genetic And Sanitary Strategies To Improve Propagation Material
- Martelli, G. P (2014) Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. Bari, *Journal of Plant Pathology*, v.96, n.1, p.1-136, 2014. Suppl.
- Martelli G.P., Lehoczy J., Quacquarelli A. (1965) Host range and properties of a virus associated with Hungarian grapevines showing macroscopic symptoms of fanleaf and yellow mosaic. In *Proceedings international conference on virus and vector on perennial hosts, with special reference to Vitis*, Davis, USA, p.389–401.
- Martelli G.P., Lehoczy J. (1968) Isolation of Arabis mosaic virus from Hungarian grapevines. *Phytopathology Mediterraneum*, 7 p.129-133.
- Nagy R. (2014) Talajtani tényezők 'Terrior'-okra gyakorolt hatásainak vizsgálata az Egri Borvidéken. Debrecen, p.27.
- NÉBIH: Nemzeti fajtajegyzék, 2022.
- Németh M. (1967) *Ampelográfiai album*. Budapest, Mezőgazdasági kiadó
- Oláh R., Deák T., Turcsán M., Szénási M., Bordé Á., Szegedi E. (2017) Use of an intron containing grapevine gene as internal control for validation of cDNA synthesis in virus detection by RT-PCR, *European Journal of Plant Pathology*, DOI 10.1007/s10658-017-1218-5
- Osman F. and Rowhani A. (2006) Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan), *Journal of Virological Methods*, 133(2), pp. 130–136.
- Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A. (2008) Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan RT-PCR in detection of grapevine viruses, *Journal of Virological Methods*, 149(2), pp. 292–299

- Renault-Spilmont A.S., Grenan S., Boursiquot J.M. (2004) Le deperissement de la Syrah, compte rendu de la reunion du group du travail Prog. Agric. Vitic., 121 (2004), p. 327-341
- Résolution OIV-VITI 564A-2017 <https://www.oiv.int/public/medias/5404/oiv-viti-564a-2017-fr.pdf>
- Rupe J., Luttrell R. G. (2008) : Soybeans chemistry, production, processing, and utilization - 4 - Effect of Pests and Diseases on Soybean Quality
<https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-64-6.50001-9>
- P. Saldarelli, A. Giampetruzzi, M. Morelli, U. Malossini, C. Pirollo, P. Bianchedi, and V. Gualandri (2015) Genetic Variability of Grapevine Pinot gris virus and Its Association with Grapevine Leaf Mottling and Deformation
- Sveiczter Á. (2008) Mikrobiológia előjegyzet. Budapest, Műegyetem
- Szerényi G. (2011), Biológia érettségizőknek I. Szeged, Mozaik kiadó,
- Tolin S.A. (2008) Enciclopedia of Virology (third edition) – Tobacco viruses
<https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00575-6>
- Várallyay É. (2020) Növényeket fertőző vírusok diagnosztikája, gazdanövényre gyakorolt hatásának vizsgálata és felhasználása a molekuláris biológiában, Gödöllő

10.Ábrák és táblázatok jegyzéke

1. ábra: A Kékfrankos morfológiája (Forrás: Németh M.: Ampelográfiai album 1. 1967)	7
1. ábra: A Kékfrankos morfológiája (Forrás: Németh M.: Ampelográfiai album 1. 1967)	7
2. ábra: A klónszelekció lépései (Forrás: OIV 2017 alapján – saját fordítás)	10
3. ábra: A mintavétel helyszíne - Szekszárd (Forrás: saját fotó).....	19
4. ábra: A mintavétel helyszíne – kordon művelés (Forrás: saját fotó).....	19
5. ábra: A mintavételi 1,5 ml-s cső (Forrás: Terjék Netta Lili fotója).....	20
6. ábra: Mintavétel folyamatban Zsomborral (Forrás: Terjék Netta Lili).....	20
7. ábra: Vírustünetet mutató tőke (11-es tőke) Forrás: saját fotó) 8. ábra: Vírusfertőzöttségre utaló tőke (1-es).....	21
9. ábra: Gélelektroforézis készülék működés közben (Forrás: saját fotó)	25
10. ábra: NanoDrop One készülék működés közben (Forrás: saját fotó).....	25
11. ábra: PCR készülék működési hőmérsékletei vírusdiagnosztikai szempontból: Elődenaturáció 94°C-on 5 perc, - 35x-ös ismétlésben 3 lépés: denaturáció 94°C-on 30 másodperc, primer kötés 50 °C-on 30 másodperc, szintézis 72 °C 90 másodperc -, lánczáró polimerizáció 72°C-on 7 percig, végén 4°C-on tartva (Forrás: saját készítésű, a készülék kijelzője alapján)	28
14. ábra: Fast Ruler Low Range DNS létra értékei (Forrás: Thermo Fisher Scientific)	29
12. ábra: RNS minták képei gélelektroforézis fotón: a minták erőssége a mennyiségre, a sávok diszkrét volta a minőségre utal (Forrás: saját eredmény).....	31
13. ábra: cDNS minták ellenőrzése PEPS primerekkel végzett PCR-rel. Méretmarker: ThermoFisher Low Range (Forrás: saját eredmény)	32
15. ábra: GPGV fertőzöttség a 18 mintában. (Az 54-es minta duplikálva lett véletlenül.) A várt PCR termék hossza 430 bp (Forrás: saját eredmény)	33
16. ábra: GLRaV-1 fertőzöttség a 18 mintában -502 bp hossz. (Forrás: saját).....	33
17. ábra: GLRaV-2 fertőzöttség a 18 mintában – 543 bp hossz. (Forrás: saját)	34
18. ábra: GLRaV-3 fertőzöttség a 18 mintában - 546 bp hossz. (Forrás: saját).....	34
19. ábra: GFkV fertőzöttség a 18 mintában - 344 bp hossz. (Forrás: saját).....	35
20. ábra: GCMV fertőzöttség a 18 mintában 691 bp hossz. (Forrás: saját)	35
21. ábra: GFLV fertőzöttség a 18 mintában - 480 bp hossz. (Forrás: saját)	36
22. ábra: ArMV fertőzöttség a 18 mintában - 402 bp hossz. (Forrás: saját)	36
23. ábra: RSPaV fertőzöttség a 18 mintában – 331 bp hossz. (Forrás: saját)	37
24. ábra: TBRV fertőzöttség a 18 mintában - 485 bp hossz. (Forrás: saját).....	37
25. ábra: TRSV fertőzöttség a 18 mintában - 190 bp hossz. (Forrás: saját)	38
26. ábra: A vizsgált vírusok mennyisége a mintáimban (Forrás: saját).....	40
27. ábra: A vizsgált minták vírusfertőzöttségének a mértéke (Forrás: saját).....	41

1. táblázat: cDNS reakció összetétele 20 µl-s reakcióra számolva a gyártó utasításai szerint (Forrás: saját táblázat Thermo Fisher Scientific High -Capacity cDNA Reverse Transcription Kit alapján)	26
2. táblázat: PCR reakció összetétele 20ml-es reakcióra számolva (Forrás: saját szerkesztés Green – Sambrook (2012) alapján)	27

3. táblázat: A PCR reakció összetétele 20 µl-es reakcióra számolva (Forrás: saját szerkesztésű táblázat Oláh et al., (2012) alapján)	28
4. táblázat: A PCR reakció összetétele 20ml-es reakcióra viszonyítva (Forrás: saját szerkesztésű táblázat).....	29
5. táblázat: NanoDrop One készülékkel mért koncentrációk az RNS mintákról. A 260/280 és 260/230 nm-en mért elnyelési arányát mutató oszlopok fejlécében megadott arány az ideális tartományt mutatja. (Forrás: saját eredmények)	32
6. táblázat: Vírusok jelenléte a mintákban (Forrás: saját)	38

Maár Enikő

NYILATKOZAT

Szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Maár Enikő
A Hallgató Neptun kódja: PBIXSS
A dolgozat címe: Kékfrankos szőlőültetvény vírusfertőzöttségének felmérése
A megjelenés éve: 2023
A konzulens intézetének neve: Szőlészeti és Borászati Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Szőlészeti Tanszék

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

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

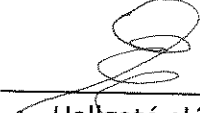
A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori 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: Budapest, 2023. év november hó 5nap



Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Maár Enikő (hallgató Neptun azonosítója: PBIXSS) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Budapest, 2023 év November hó 5 nap



Deák Tamás
belső konzulens