

DIPLOMADOLGOZAT

Péri Lilla Dorottya

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Növényvédelmi Intézet

Növényorvos mesterképzési szak

A selyemkóró vírusrezervoár szerepe

Belső konzulensek: Dr. Várallyay Éva

Tudományos tanácsadó

Nagyné Dr. Galbács
Zsuzsanna

Tudományos munkatárs

**Belső konzulensek
intézete/tanszéke:**

**Növénykórtani Tanszék,
Genomikai Kutatócsoport**

Készítette:

Péri Lilla Dorottya

Budapest

2024

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés és célkitűzések	4
2	Irodalmi áttekintés	5
2.1	A közönséges selyemkóró (<i>Asclepias syriaca</i>)	5
2.1.1	A selyemkóró elterjedése	6
2.1.2	A gyomszabályozás lehetőségei	6
2.1.3	A selyemkóró károsítói, lehetséges rezervoár szerepe	7
2.2	Az uborka mozaik vírus (CMV).....	7
2.2.1	A CMV elterjedése	8
2.2.2	A CMV genomszerveződése	9
2.2.3	CMV által okozott tünetek	10
2.3	Jingmenvírusok	10
2.3.1	Wuhan aphid virus 2 (WHAV2).....	12
2.4	A nagy átteresztőképességű szekvenálás a vírusdiagnosztikában.....	13
3	Anyag és módszertan	15
3.1	A vizsgált minták.....	15
3.2	Totál nukleinsav tisztítás	16
3.3	Poolok készítése	17
3.4	A HTS bioinformatikai elemzése	18
3.5	CMV kimutatása szerológiai gyorsteszt segítségével	19
3.6	cDNS szintézis	19
3.6.1	cDNS szintézis Thermo Scientific Maxima H Minus Reverse Transcriptase kit-tel 19	
3.6.2	cDNS szintézis Thermo Scientific Revert Aid Reverse Transcriptase kit-tel	20
3.7	Aktin teszt	21
3.8	Primerek tervezése	21
3.9	Gradiens PCR, RT-PCR.....	23

3.9.1	Gradiens PCR Q5 enzimmel	24
3.9.2	Gradiens PCR TaKaRa enzimmel	24
3.10	PCR termék tisztítása	25
3.11	Klónozás.....	25
3.12	Plazmid tisztítása a baktériumtenyészetből.....	26
3.13	Sanger szekvenálás és a szekvenciák elemzése	27
4	Eredmények	28
4.1	Totál nukleinsav tisztítás	28
4.2	Bioinformatikai elemzések.....	29
4.3	cDNS szintézis	31
4.4	CMV visszaigazolása	31
4.4.1	Lateral flow szerológiai gyorseszteszt	31
4.4.2	RT-PCR.....	32
4.4.3	Klónozás és restrikciós emésztés	34
4.4.4	Filogenetikai elemzések	35
4.5	WHAV-2 visszaigazolása	36
4.5.1	Filogenetikai elemzések	37
5	Következtetések és javaslatok.....	39
6	Összefoglalás	41
7	Irodalomjegyzék	42
8	Rövidítések jegyzéke	47
9	Köszönetnyilvánítás	48
10	Ábrák és táblázatok jegyzéke.....	49
11	Nyilatkozatok.....	51

1 Bevezetés és célkitűzések

Gyomnövények minden mezőgazdaságilag művelt területen, vagy annak közelében megjelenhetnek és kárt okozhatnak. Közvetlen kártételük mellett gondot okozhatnak növénypatogének és kártevők alternatív gazdáiként is. A rezervoár szerep leginkább a növénypatogén vírusok esetében kiemelt, ezek a kórokozók akár tünetek okozása nélkül fennmaradhatnak a gyomnövényeken. Így a rezervoár növények vírusok fennmaradásában, terjedésében és megjelenésében betöltött szerepe gyakran alábecsült, vizsgálata sok esetben háttérbe szorul. A gyomnövények fertőzési kiindulópontokká válhatnak, melyekről a vírusok átterjedhetnek a kultúrnövényekre is (Power & Mitchell, 2004; Wisler & Norris, 2005a). Ebben nagy szerepe lehet különböző vírusvektor rovarfajoknak, melyek felszaporodásában ugyancsak nagy jelentősége lehet a gyomnövényeknek. A vírusrezervoárok vizsgálata nagyban hozzájárulhat a kultúrnövények vírusfertőzöttségének mélyebb megértéséhez és a növénypatogén vírusok terjedésének feltárásához (Wisler & Norris, 2005b). Az egyre nagyobb számban megjelenő inváziós gyomnövények (özönnövények) különösen nagy szereppel bírhatnak vektorok, valamint új vírusok, variánsok megjelenésében és elterjedésében (Najberek et al., 2022). A növényvirologiai kutatások eddig leginkább a kultúrnövényekből gyűjtött minták vizsgálatára koncentráltak. Mostanra egyre több kutatás irányul a gyomnövények virális kórokozók fennmaradásában és terjedésében betöltött szerepének feltárására, azonban ez még egy mélyebb megismerésre váró terület (Ma et al., 2020).

Kutatásom középpontjában egy Magyarországon egyre nagyobb mértékben elterjedt invazív gyomnövény, a selyemkóró vírusrezervoár szerepének vizsgálata áll. Ennek vizsgálata mindeddig kevésbé kutatott terület, ám jelentősége a hordozott kórokozók potenciális, környezetre, így akár kultúrnövényekre gyakorolt hatása miatt nem elhanyagolható. Kutatásom során két helyszínről, egy szőlő és egy meggy ültetvényről gyűjtött selyemkóró minták vizsgálatára koncentráltam. Elsődleges célom a selyemkóró növények viromjának meghatározása nagy áteresztőképességű szekvenálás segítségével, majd az így kapott eredmények független módszerekkel történő elemzése és visszaigazolása volt.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A közönséges selyemkóró (*Asclepias syriaca*)

A selyemkóró rendszertanilag az Apocynaceae családba, azon belül az Asclepiadoideae alcsaládba tartozik. Magyarországon ennek az alcsaládnak őshonosan csak két faja, a közönséges méreggyilok (*Vincetoxicum hirundinaria*) és a magyar méreggyilok (*Vincetoxicum pannonicum*) található meg. Az *Asclepias* nemzetségbe összesen 140 faj tartozik, melyek közül jelenleg csak az *Asclepias syriaca* gyomnövényt találkozzhatunk hazánkban (Bagi, 2008; Berki & Csecserits, 2021).

A selyemkóró 80-150 cm magasra megnövő évelő, lágyszárú növény. Levelei lándzsa alakúak, ép szélűek, átellenesen helyezkednek el. A virágai kétivarúak, öttagúak, fehéres vagy vöröses színűek, jellegzetes bogernyő virágzatot alkotnak. Tüszőtermése hengeres, enyhén szarv alakúan görbült, felszíne molyhos. A magjai lapítottak, hosszú repítőszőrrel rendelkeznek, mely elősegíti a szél általi terjedését (1. ábra). A gyökerei általában 10-40cm mélyen vízszintesen futnak, azonban akár több, mint 3m mélyre is lenyúlhatnak a talajban, melynek köszönhetően hatékonyan képes vizet és tápanyagokat elvonni más növények elől. Rizómaszerűen megvastagodott tarackgyökerei segítségével hatékonyan szaporodik vegetatív úton is (Bagi, 2008; Sárkány et al., 2008).

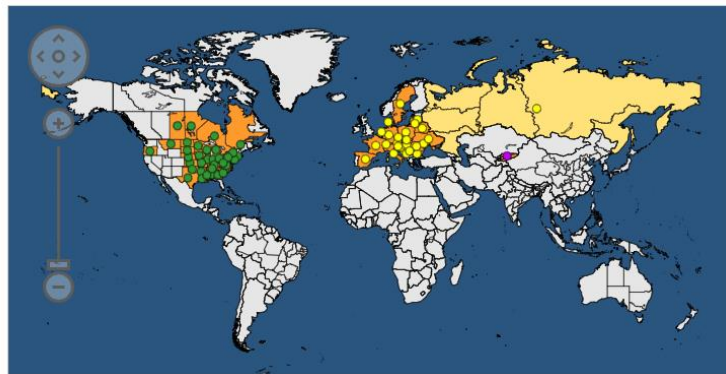
Gyors növekedésének, vegetatív szaporodásának és nagyfokú alkalmazkodóképességének köszönhetően veszélyes invazív fajnak tekinthető. 2017 óta szerepel az Európai Unió számára veszélyt jelentő idegenhonos inváziós fajok jegyzékében (<http1>).



1. ábra: A selyemkóró termése és magjai (Grób Borbála felvétele).

2.1.1 A selyemkóró elterjedése

A selyemkóró Észak-Amerika keleti részén őshonos, jelenleg megtalálható Ázsiában és Európában is (2. ábra). Európai spontán terjeszkedése valószínűleg a Mediterráneumból indulhatott, feltehetően a 17.század első felében. Magyarországi elterjedéséről az 1730-as évekből származik az első adat (Rózsa & Nagy, 1997). A magyarországi tömeges elterjedését nagyban megalapozta az 1970-es és 1980-as években kezdődő szántóföldi intenzív termesztése. Ekkor mezőgazdasági felhasználásának nagy jövőt jósoltak. Alkalmasnak tartották többek között selyem helyettesítésére, szigetelési célokra, valamint felhasználása kaucsuk alapanyagként is számításba jött. Ezeknek az elvárásoknak végül nem felelt meg, így a növény termesztésével felhagytak, a megmaradt állományok pedig inváziós centrumokká váltak. Jelenleg a felhasználása csak a virágkötészetre és a méhészetre korlátozódik, invazív gyomnövényként pedig rengeteg kárt okoz. Leginkább a laza, degradált, tápanyagban gazdag talajokon fordul elő, jól tűri a szárazságot és könnyen alkalmazkodik a különböző klimatikus és edafikus tényezőkhöz (Bagi, 2008). Nem csak a művelt területeken jelenthet gondot, könnyen kolonizálhat természetes vegetációkat is, így terjedése természetvédelmi szempontból is figyelmet érdemel (Bakacsy & Bagi, 2020; Berki & Csecserits, 2021).



2. ábra: A selyemkóró elterjedése (<http2>)

2.1.2 A gyomszabályozás lehetőségei

A selyemkóró gyomszabályozása kifejezetten nehéz. A mechanikai módszerek alkalmazása (kaszálás, legeltetés, tövek kihúzása, tárcsázás) önmagában nem elég hatékony, sokszor még a kolonizációját is segíti (Bagi, 1999; Bakacsy & Bagi, 2020). Biológiai védekezési módszerek kifejlesztésére, erre alkalmas fajok vizsgálatára ugyan már vannak kutatások, azonban az eredményes biológiai gyomszabályozás kidolgozása még várat magára (Tóth, 2017). A kémiai

védekezés legtöbbször glifozát hatóanyaggal történik. A herbicides kezeléseket a fiatal csíranövény ellen vagy a bimbózás és virágzás közötti időszakokra kell időzíteni. Az egyszeri kémiai védekezés csak rövidtávon bizonyul hatásosnak, a terület hosszútávú gyommentesítéséhez ismételni kell a kezeléseket. Hatékony gyomszabályozás kémiai és mechanikai módszerek együttes alkalmazásával elérhető, azonban ez nagyon költséges. A költséghatékony és eredményes gyomszabályozási módszer kidolgozása még várat magára (Bagi, 1999; Bakacsy & Bagi, 2020; Csecserits et al., 2020).

2.1.3 A selyemkóró károsítói, lehetséges rezervoár szerepe

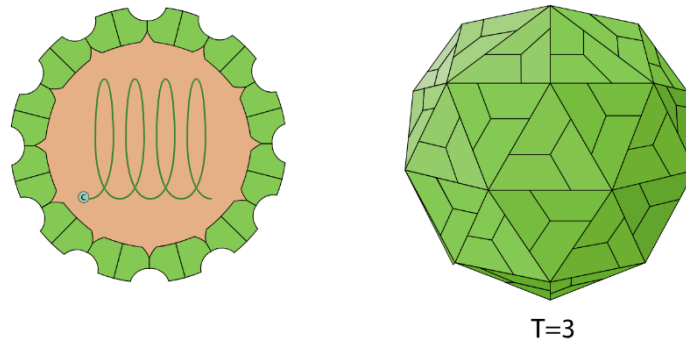
A selyemkórónak több kártevője és kórokozója is ismert, alternatív gazdanövényként szerepe lehet több károsító megjelenésében, terjedésében és fennmaradásában. A selyemkóró szőrözöttségének, nagy levélszilárdságának és tejnedv termelésének köszönhetően a kártevők kevésbé kedvelik. Európában gyakran megfigyelhető rajta két levéltetű faj, az uborka levéltetű (*Aphis gossypii*) és az oleander levéltetű (*Aphis nerii*) (Bagi, 1999; Berki & Csecserits, 2021). Az oleander levéltetű ismert CMV vektor, így nagy jelentősége lehet a selyemkóró vírusrezervoár szerepének kialakításában is. A nyugati virgátripsz (*Frankliniella occidentalis*), mely fontos vektora a paradicsom foltos hervadását okozó TSWV-nek, gyakran fogyasztja ezt a gyomnövényt (Bagi, 1999). További kártevői közé tartozik a vörösfolto bodobács (*Spilosthetus equestris*) és a vadpaprika bodobács (*Tropidothorax leucopterus*) (Berki & Csecserits, 2021). A selyemkórót több növénypatogén gomba is képes megtámadni. Többek között lisztharmat-, alternária -, botrítisz -, cercospóra- és a fuzárium-fajok is képesek megfertőzni (Bagi, 1999).

Virális kórokozók közül eddig a CMV, a tobacco mosaic virus (TMV), az alfalfa mosaic virus (AMV), az arabis mosaic virus (ArMV) és a grapevine pinot gris virus (GPGV) került kimutatásra selyemkóró mintákból (Bagi, 1999; Bellardi & Rubies-Autonell, 1999; Demian et al., 2022; Kazinczi et al., 2002; Salamon, 1986; Salamon et al., 1989). További selyemkórót fertőző vírusok még nem ismertek az irodalomban, így ennek az invazív gyomnövénynek a vírusrezervoárként betöltött szerepe és ezzel okozott kártétele még mélyebb megismerésre vár.

2.2 Az uborka mozaik vírus (CMV)

Az uborka mozaik vírus a Bromoviridae család tagja, a Cucumovirus nemzetség névadó kórokozója. Virionja 28-30 nm átmérőjű, csonkolt csúcsú ikozaéder alakú (3. ábra). Genetikai állományát 3 pozitív szimpla szálú RNS alkotja (Mochizuki & Ohki, 2012). Első leírására 1916-

ban került sor, azóta számtalan kutatás tárgyát képezte ez a kórokozó (Doolittle, 1916; Jagger, 1916). Gazdasági szempontból az egyik legmeghatározóbb növényi vírusként tartják számon, jelentőségét tovább növeli, hogy gazdanövényköre rendkívül széles. 100 családba tartozó, több mint 1000 növényfajt, köztük egyszikűeket és kétszikűeket, lágyszárúakat és fásszárúakat egyaránt képes fertőzni (Jacquemond, 2012). A széles gazdanövénykört a genom változékonysága és mutációkkal szembeni toleranciája teszi lehetővé. Számos kultúrnövény veszélyes kórokozója, a legnagyobb kárt zöldség- és dísnövény-termesztésben okozza. Világszerte elterjedt, különösen a mérsékelt és a trópusi klímán jellemző (Jacquemond, 2012; Mochizuki & Ohki, 2012).



3. ábra: Az uborka mozaik vírus felépítése (http3)

2.2.1 A CMV elterjedése

A CMV-t sikeresen terjesztik levéltetű fajok nem perzisztens módon. Több, mint 75 levéltetűfaj lehet vektora, ezek közül különösen nagy szerepe van a zöld őszibarack levéltetűnek (*Myzus persicae*) és az uborka levéltetűnek (*Aphis gossypii*) (Mochizuki & Ohki, 2012). Terjedése ezen kívül történhet maggal, élősködő növények segítségével, valamint mechanikai úton is. A maggal való terjedés pontos folyamata, a vírus magon belüli elhelyezkedése még nem minden gazdanövény esetében ismert (Jacquemond, 2012; Palukaitis et al., 1992). CMV fertőzhet gyomnövényeket is, melyeken akár tünetek okozása nélkül, látens is fennmaradhat. Ezek a vad fajok fertőzési forrásként szolgálhatnak. Több gyomnövény képes maggal is terjeszteni a vírust, nagy szerepük lehet a kórokozó egész évben való fennmaradásában, valamint a levéltetű vektorok felszaporodásához és elterjedéséhez is hozzájárulhatnak. A gyomnövények CMV rezervoár szerepe még kevésbé kutatott terület, nem minden növényfaj esetében ismert, azonban

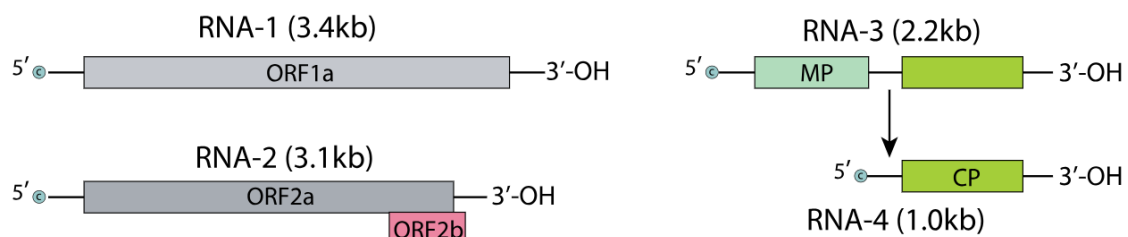
elmondható, hogy a CMV elleni védekezés egyik jelentős pontja a megfelelő gyomszabályozás (Jacquemond, 2012).

2.2.2 A CMV genomszerveződése

A CMV örökítő anyagát felépítő 3 egyszálú, pozitív orientációjú RNS molekula mind külön vírusrészecskébe csomagolt. Az RNS szálak hossza különböző: az RNS1 3,3, az RNS2 3,0 és az RNS3 2,2 kb méretű (Mochizuki & Ohki, 2012).

A 3 RNS szál összesen 5 fehérjét kódol (4. ábra). Az RNS1 monocisztronikus, az 1a fehérjét határozza meg. Az RNS2 és az RNS3 bicisztronikus, az RNS2 a 2a és 2b, az RNS3 a 3a és 3b géneket kódolja. A transláció a 2b és 3b gének esetében az általuk meghatározott szubgenomi RNS4 és RNS4A molekulákról történik. Az 1a (helikáz és metiltranszferáz domén) és 2a (RdRp domén) fehérjék replikáz komplexet alkotnak, a vírus sikeres replikációja csak mindkét fehérje jelenléte esetén megy végbe. A 2b fehérje pedig a növényi géncsendesítési rendszerét képes gátolni. A 3a mozgási fehérjeként (movement protein, MP) főleg a vírus sejtről sejtre történő terjedésében játszik szerepet, a 3b pedig a köpenyfehérje kialakításáért felel. Az egyes gének translációjának mértéke eltérő, legnagyobb mennyiségben a 3b (köpenyfehérje) kerül kifejeződésre, ezt követi az 1a és a 2a (replikációs komplex), míg a 3a fehérjéről keletkezik a legkisebb mennyiség. A vírus által fertőzött növény szövetekből mind az 5 fehérje kimutatható (Jacquemond, 2012; Moyle et al., 2018).

Az RNS-ekkel együtt gyakran előfordulnak 332-405 nukleotid hosszú szatellit RNS molekulák is. Ezek a lineáris RNS molekulák nem képesek önálló replikációra és enkapszidációra, terjedésükhöz a CMV fehérjéit használják fel. Ezek a szatellit RNS-ek nagyban befolyásolhatják a CMV által okozott tünetek súlyosságát (Kouadio et al., 2013).



4. ábra: Az uborka mozaik vírus genomszerveződése (http3)

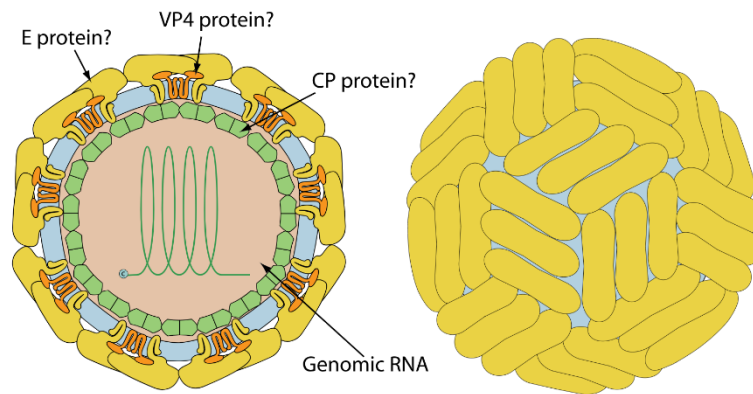
Szerológiai, patológiai és szekvenciabeli hasonlóságok alapján különböző CMV törzseket különíthetünk el. Ezek a törzsek alapvetően 2 alcsoportba sorolhatóak (I, II). Az I. alcsoportba tartozó törzsek hőmérsékleti optimuma magasabb, míg a II. alcsoportba tartozó izolátumoké alacsonyabb. Az I. alcsoportot az RNS3 5' végén található nem átíródó régió alapján további két alcsoportba lehet osztani (IA és IB). Az IA és IB alcsoportba tartozó törzsek általában virulensebbek, mint a II alcsoport tagjai. Az IA alcsoport valószínűleg Ázsiából származhat és innen terjedhetett el a többi kontinensen is. Az IB és a II törzsei világszerte megtalálhatóak (Mochizuki & Ohki, 2012; Roossinck et al., 1999).

2.2.3 CMV által okozott tünetek

A tünetek kialakulásában mindegyik fent bemutatott virális fehérjének szerepe lehet. A legáltalánosabb tünet a szisztemikus mozaikfoltosság, melynek súlyossága nagyban függ a gazdanövénytől és a fertőző CMV törzstől is. A fertőzött növények levelein ezen kívül okozhat nekrotikus foltokat és deformációt is (Mochizuki & Ohki, 2012). Paradicsom esetén jellegzetes tünet a páfránylevelűség, a levelek keskenyedése. Nem csak a leveleken, hanem a terméseken és a virágokon is képes tüneteket okozni. A tünetek kialakulását és súlyosságát nagyban befolyásolhatja más vírusok jelenléte is. Ismert, hogy Potyvírusok és CMV együttes jelenléte súlyos tüneteket okozhat (Jacquemond, 2012).

2.3 Jingmenvírusok

A Jingmenvírusok egy újonnan létrehozott, jelenleg még bizonytalan besorolású taxon, melybe kb. 30-35nm átmérőjű, burokkal rendelkező, pozitív egyszálú RNS vírusok tartoznak (5. ábra). Ezek a kórokozók közeli rokonságban állnak a Flaviviridae családba sorolható vírusokkal, ezért az irodalom gyakran „flavi-like” vírusokként hivatkozik rájuk (Colmant, Charrel, et al., 2022a). Az International Committee on Taxonomy of Viruses adatbázisában ([http4](http://www.ictv.global/)) a Flaviviridae családban találhatóak meg, mint még besorolásra váró hasonló vírusok.



5. ábra: A Jíngmenvírusok feltételezett felépítése (http4).

A Flaviviridae családba több humán- és állat-egészségügyi kockázatot jelentő vírus tartozik, pl.: Sárgaláz vírus, Dengue vírus, Nyugat nílusi vírus, Zika vírus. A Jíngmenvírusok flavivírusoktól való elkülönítését az eltérő genomszerkezetük indokolja. A flavivírusok genomja 11 kb méretű és egyszatú, míg a Jíngmenvírusoknak hasonló méretű, azonban 4-5 szegmensből álló genommal rendelkeznek. Az első és a harmadik szegmensben egy-egy nyitott leolvasási keret (ORF) található, melyek nem strukturális fehérjéket kódolnak (NSP1 és NSP2). Ezek homológok a flavivírusok NS2b-NS3 komplexével (RNS függő RNS polimeráz (RdRp) és metiltransferáz domén) és az NS5 fehérjével (szerin proteáz és helikáz domén), melyeknek a vírus replikációjában van szerepe. A második és a negyedik szegmensek 2-2 strukturális fehérjét kódolnak (VP1 és VP4, VP2 és VP3), melyek a burok, a kapszid és membránfehérjék felépítésében vesznek részt, ezek evolúciós eredete még ismeretlen (Gao et al., 2020; Kobayashi et al., 2021; Temmam et al., 2019).

A szegmentált és a nem-szegmentált genomú RNS vírusok általában taxonómiaiilag különböző családokba sorolhatóak be. A több szegmensből álló genomszerkezet valószínűleg egymástól függetlenül többször alakulhatott ki az evolúció során. Az osztott genomszerkezettel rendelkező Jíngmenvírusok és az egyszatú genomú flavivírusok közötti evolúciós kapcsolat új kutatásoknak adhat alapot a szegmentált genomszerkezetű vírusok kialakulásával, leszármazási viszonyaival kapcsolatban. (Lucía-Sanz & Manrubia, 2017; Qin et al., 2014)

A Jíngmemvírusok névadó kórokozója és egyben típusfaja a Jíngmen tick vírus (JMTV), melyet 2014-ben írtak le. Először egy, a Kínában található Jíngmen városból gyűjtött *Rhipicephalus*

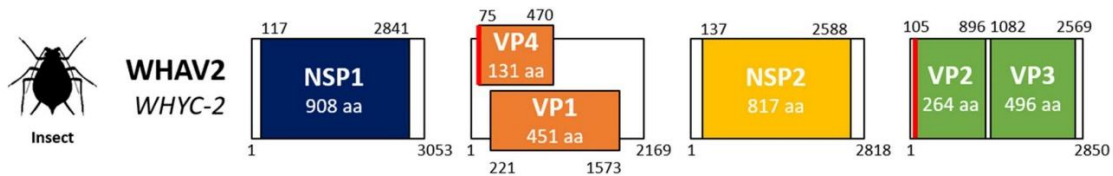
microplus kullancs fajból mutatták ki(Qin et al., 2014). 2014-től kezdve egyre bővül a Jingmenvírusok közé sorolható fajok száma, ami leginkább a HTS módszerét alkalmazó kutatásoknak köszönhető. Évről évre egyre több faj kerül leírásra, illetve a gazdafajok, melyekből kimutatták őket, és azok származási helyei is egyre változatosabbá válnak (Kobayashi et al., 2021). Jelenleg az Antarktisz kivételével minden kontinensről kimutattak ide sorolható vírusokat(Colmant, Furlong, et al., 2022).

A legtöbb Jingmenvírusnak állati gazdafajai ismertek. Az eddig leírt gazdafajok csoportja igen változatos, találhatóak köztük ízeltlábúak (pl.: kullancs, szúnyog, levéltetű stb.) és emlősök (pl.: denevérek, szarvasmarhák, majmok, ember) is egyaránt. A vírusok ezen csoportjára egyre nagyobb figyelem irányul, melynek legfőbb oka, hogy gazdafajai között jelentős számban találhatóak olyanok, melyek az ember közelségében élnek, így az ide tartozó vírusok potenciális humán egészségügyi kockázatot hordoznak magukban. A fokozódó tudományos érdeklődés ellenére e vírusok túlnyomó többsége részletes kutatási program tárgyát nem képezte, így jelenleg a legtöbb információnk erről a vírus csoportról metagenomikai kutatásokból származik, ezért pontos biológiájuk, gazdafajaik, vektoraik még nem tisztázottak(Colmant, Charrel, et al., 2022b). Állati gazdafajokon kívül néhány esetben kimutattak Jingmenvírusként besorolt kórokozókat növényi és gomba mintákból is(Gaafar & Ziebell, 2020a).

2.3.1 Wuhan aphid virus 2 (WHAV2)

A Wuhan aphid virus 2 rendszertanilag egy, a Jingmenvírusok közé sorolt ssRNS (+), 4 szegmensű genommal rendelkező kórokozó. Először *Hyalopterus pruni* és *Aulacorthum magnoliae* levéltetű fajokból írták le a kínai Wuhan városában, 2013-ban(Gaafar & Ziebell, 2020b; Shi et al., 2016). 2020-ban Franciaországban zöldborsó (*Pisum sativum*) mintákból mutatták ki, ekkor fedezték fel először növényi gazdafajból, ez jelentette a vírus első Európai észlelését(Colmant, Furlong, et al., 2022; Gaafar & Ziebell, 2020b). Gaafar és Ziebell tanulmánya alapján a vírust 2012-ben Németországban és 2013-ban Ausztriában gyűjtött zöldborsó mintákból is kimutatták, azonban ezen eredmények publikálására még nem került sor. A levéltetűből és a zöldborsóból meghatározott WHAV2 szekvenciák nagy hasonlóságot mutatnak, ami további kérdéseket vet fel a vírus kapcsolatáról a növényi és állati gazdákkal/vektorokkal/rezervoárokkal kapcsolatban (Colmant, Furlong, et al., 2022). A vírus eddig HTS szekvenálást alkalmazó kutatások során került kimutatásra, részletesebb vizsgálatáról még nincs adat az irodalomban, így a jelentőségéről, gazdafajairól, rezervoárjairól, biológiájáról és az általa okozott tünetekről nagyon kevés információ áll

rendelkezésünkre. Az NCBI adatbázisába eddig csupán szegmensenként 3 szekvencia került feltöltésre. A WHAV2 genomszerveződése a Jingmenvírusoknál ismertetetett szerkezetet követi (6. ábra). Az első és a harmadik szegmens nem strukturális fehérjéket kódol (NSP1 és NSP2), míg a második és a negyedik szegmens strukturális fehérjék kódolásáért felelős (VP1, VP2, VP3, VP4)(Colmant, Charrel, et al., 2022a).



6. ábra: A WHAV2 genomszerkezete(Colmant, Charrel, et al., 2022a).

2.4 A nagy áteresztőképességű szekvenálás a vírusdiagnosztikában

A vírusdiagnosztikai módszerek fejlődése, többek között a nagy áteresztőképességű szekvenálási technikák (High Throughput Sequencing – HTS) megjelenése, új lehetőségeket nyitott meg a molekuláris genetikai vizsgálatok területén. A HTS az eddigiéknél érzékenyebb módszer a növényi vírusok kimutatására. A vírusdiagnosztikában eddig a PCR-alapú és a szerológiai tesztek számítottak a legelterjedtebb vizsgálati módszereknek, melyek megbízhatóságuknak, egyszerű használatuknak és kedvező árúknak köszönhetően jelenleg is fontos módszertani alapját képezik a kutatásoknak. Ezeket a független módszereket az általam végzett kutatás során a HTS-el kapott eredmények visszaigazolására használtam.

Az HTS előnye a fent említett módszerekkel szemben abban rejlik, hogy míg a szerológiai tesztekhez specifikus ellenanyagokra van szükségünk az adott kórokozó kimutatására, a PCR során pedig ismernünk kell az adott patogén szekvenciájának legalább egy részét, hogy primereket tervezhessünk, addig a HTS használatához nincs szükség semmilyen előzetes információra. Képes meghatározni a mintában lévő összes vírust és viroidot, vagyis a gazdaszervezet viromját. Alkalmos a teljes genomok megszekvenálására specifikus primerek vagy antitestek nélkül. Ennek köszönhetően nem csak célzottan, már ismert kórokozók kimutatására, hanem akár eddig ismeretlen vírusok/viroidok azonosítására is alkalmas. Az utóbbi években a HTS használatának köszönhetően nagymértékben felgyorsult az új vírusok/viroidok leírása, szekvenciáinak meghatározása. A módszer csupán a kórokozók szekvenciájáról ad információt, így a patogének jelentősége, az őket hordozó gazdaszervezetek,

az általuk esetlegesen okozott tünetek és pontos biológiájuk további virológiai vizsgálatokkal állapítható meg.

A HTS több platformon is elvégezhető, ezek közül a legnépszerűbb az Illumina platform. A módszerrel egy időben akár több száz millió nukleinsav sorrendjének a meghatározása is lehetséges, az eredmények értékeléséhez azonban bioinformatikai elemzésekre van szükség. A HTS során kapott eredményeket minden esetben érdemes független módszerekkel visszaigazolni (pl.: szerológiai tesztek, RT-PCR) (Lebas et al., 2022; Massart et al., 2017).

3 Anyag és módszertan

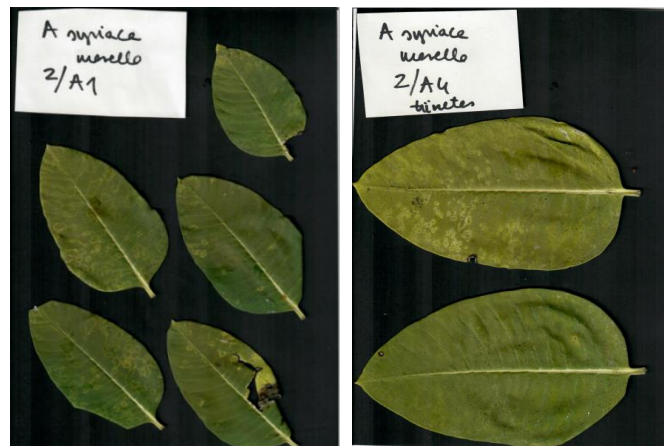
3.1 A vizsgált minták

A vizsgálatokhoz felhasznált selyemkóró mintákat egy kecskeméti szőlősből és egy Csopakon található meggy ültetvényből gyűjtötte be a Genomikai kutatócsoport (7. ábra).



7. ábra: A mintavételi helyszíneken készített képek. Bal oldalon a kecskeméti, jobb oldalt pedig a csopaki terület látható.

A kecskeméti helyszínen két időpontban, 2022. július 15-én 3 egyedből (egyedenként 2 levél) és 2022. szeptember 8-án 5 egyedből (egyedenként 2 levél) kerültek begyűjtésre a minták. A csopaki mintavétel két helyszínen történt. Az 1. helyszínen 3 egyedről (egyedenként 2-3 levél), míg a 2. helyszínen 4 egyedről (egyedenként 2-3 levél) történt mintavétel. A csopaki és a kecskeméti minták közül több is vírusos megbetegedésre utaló tüneteket mutatott (8. ábra). A begyűjtött mintákat -70 °C -on tároltuk.



8. ábra: Vírusos megbetegedésre utaló tüneteket mutató minták

3.2 Totál nukleinsav tisztítás

A begyűjtött, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt növényi minták vírusdiagnosztikai vizsgálatának első lépése a totál nukleinsav tisztítás, mely során a növényben található összes RNS és DNS, így a gazdanövény és a benne található vírusok nukleinsavai is kivonásra kerülnek. A nukleinsavak bomlásának megelőzése érdekében végig jégen dolgoztam.

A fagyasztott mintákat folyékony nitrogénbe tettem, majd a levelekből kb. 200g-ot lehűtött dörzsmozsárba helyeztem és szárazon eldörzsöltem. A további homogenizáláshoz mintánként 0,7 ml steril vizet, 0,1 ml 10xEB-t és 0,2 ml 10% SDS-t tartalmazó kivonó puffert adtam. A kivonó pufferrel eldörzsölt mintát $600\mu\text{l}$ fenolt tartalmazó eppendorf csőbe mértem, majd vortexelés után 5 percig 15000rpm-en centrifugáltam. Új eppendorf csőbe $300\mu\text{l}$ fenolt és $300\mu\text{l}$ kloroform:izoamilalkoholt mértem, majd a centrifugálás során elvált felülúszót is hozzápipettáztam. A mintát vortexelés után ismét 5 percig 15000 rpm-en centrifugáltam. A vizes fázist $600\mu\text{l}$ kloroform:izoamilalkoholt tartalmazó eppendorf csőbe mértem és vortexelés után 5 percig 15000rpm-en centrifugáltam. A felülúszóhoz $20\mu\text{l}$ 4M-os Na-acetátot, valamint 1ml 96%-os EtOH-t adtam és pár percig jégen inkubáltam. A mintákat az eppendorf csövek forgatásával kevertem, utána 20 percig 15000rpm-en, 4°C -on centrifugáltam. A centrifugálás után az alkoholt leöntöttem és a mintához 1ml 70%-os EtOH-t mértem. 3 perc 15000 rpm-en történő centrifugálás után az alkoholt leöntöttem, a csöveket pedig 10 percig 65°C -on szárítottam. A szárított mintákat $30\mu\text{l}$ desztillált vízben visszaoldottam és a továbbiakban -20°C -on tároltam.

A totál nukleinsav tisztítás sikerességét gélelektroforézissel ellenőriztem. 2 µl mintát FDE-vel megfestve 65°C -on 5 percig denaturáltam, majd 1,2%-os agaróz gélen 115V-on futtattam. A gélképeket UV fény alatt vizsgáltam.

3.3 Poolok készítése

A későbbi vizsgálatok elvégzéséhez a tisztított nukleinsavakból keverékeket, poolokat hoztam létre. Először egyed poolokat készítettem az egy egyedhez tartozó levelekből származó nukleinsavakból. Mivel a csopaki mintavétel több helyszínről, a kecskeméti mintavétel pedig több időpontban történt, ezért ennek megfelelően hoztam létre a helyszín és időpont poolokat. A csopaki minták esetében helyszínenként külön, valamint egy, az egész csopaki mintát reprezentáló terület poolt hoztam létre (1. táblázat). A kecskeméti mintákból a gyűjtés időpontja szerint két poolt, valamint az egész kecskeméti mintát reprezentáló terület poolt alakítottam ki (2. táblázat). A totál nukleinsav tisztítás után a minták koncentrációját NanoDrop spektrofotométer segítségével mértem meg, majd ez alapján számoltam ki a poolok összeméréséhez szükséges mennyiségeket.

1. táblázat: A csopaki területen gyűjtött mintákból tisztított nukleinsavak poolozása.

Csopak				
1. helyszín	1. minta	1. egyed pool	1.helyszín pool	Terület pool
	2. minta			
	3. minta			
	4. minta	2. egyed pool		
	5. minta			
	6. minta	3. egyed pool		
	7. minta			
2. helyszín	8. minta	4. egyed pool (tünetes)	2.helyszín pool	
	9. minta			
	10. minta	5. egyed pool		
	11. minta			
	12. minta			
	13. minta	6. egyed pool		
	14. minta			
	15. minta	7. egyed pool (tünetes)		
	16. minta			
	17. minta			

2. táblázat: A kecskeméti területen gyűjtött mintákból tisztított nukleinsavak poolozása.

Kecskemét				
1. Időpont	1. minta	1. egyed pool	1. Időpont pool	Terület pool
	2. minta			
	3. minta	2. egyed pool		
	4. minta			
	5. minta	3. egyed pool		
	6. minta			
2. Időpont	7. minta	4. egyed pool	2. Időpont pool	
	8. minta	5. egyed pool		
	9. minta			
	10. minta			
	11. minta	6. egyed pool		
	12. minta			
	13. minta	7. egyed pool (tünetes)		
	14. minta			
	15. minta			
	16. minta			

3.4 A HTS bioinformatikai elemzése

A terület poolokat DNázos kezeléssel készítettem elő az Illumina platformon történő szekvenálásra. A szekvenálásra küldött minták tartalmazzák valamennyi szervezet, így mind a növényi, mind a virális kórokozók RNS-ét, a HTS eredménye pedig lehetővé teszi ezek kimutatását. A kapott szekvenciák elemzését a CLC Genomics Workbench (Qiagen) program segítségével végeztem el. Elsőként ellenőriztem a kapott szekvenciák minőségét, majd trimmeltem az olvasatokat (readeket). A trimmelt olvasatok átfedő szakaszai alapján hosszabb szekvenciákat, úgynevezett kontigokat hoztam létre. A kontigokat az NCBI referenciagenom adatbázisához illesztettem, melynek eredményeképpen egy listát kaptam a mintában potenciálisan előforduló virális kórokozókról, valamint ezek valószínűségéről, melyet az E-value jelez. A kapott eredményeket a hozzájuk tartozó E-value alapján rendeztem, majd a további vizsgálatokat a legvalószínűbb, vagyis 0 E-value értékkel rendelkező kórokozókkal folytattam. Ezen vírusok kontigjaiból konszenzus szekvenciákat hoztam létre, melyeket külön az adott vírus, NCBI adatbázisból letöltött referenciagenomjához illesztettem. A bioinformatikai elemzések által kimutatott vírustalálatokat független módszerekkel igazoltam vissza (szerológiai gyorsteszt, RT-PCR).

3.5 CMV kimutatása szerológiai gyorsteszt segítségével

A kecskeméti és csopaki mintákon egyed szinten ellenőriztem a CMV jelenlétét egy szerológiai gyorsteszt, a LOEWE FAST-Stick Lateral Flow Kit alkalmazásával.

A teszthez -70 °C-on tárolt selyemkóró leveleket használtam. A fagyott levelekből 1-1,5 cm² nagyságú részt eltávolítottam és a kit által biztosított zárható műanyag tasakba helyeztem, majd homogenizáltam. A homogenizált mintához a kit-hez mellékelt műanyag pipettával hozzáadtam a puffert és elkevertem a növényi mintával, majd egy pipettányi mennyiséget egy eppendorf csőbe mértem. A tesztcsíkot a rajta látható jelzésig behelyeztem a mintát és puffert tartalmazó eppendorf csőbe, majd 5 perc elteltével értékeltem a teszt eredményét. A tesztcsíkon minden esetben meg kell jelennie egy kontroll vonal, pozitív eredmény esetén, pedig megjelenik egy teszt vonal. Az eredmény csak akkor értékelhető, ha a kontroll vonal megjelenik.

3.6 cDNS szintézis

Az általam is vizsgált RNS vírusok PCR-rel való kimutatásához első lépésben komplementer DNS-t (cDNS-t) kell szintetizálni. Ennek oka, hogy a PCR során működő enzim, a DNS függő DNS polimeráz csak DNS templáton tud dolgozni. A cDNS szintézis során az RNS templátról reverz transzkriptáz enzim segítségével készül a cDNS.

A cDNS szintézishez a Thermo Scientific Revert Aid Reverse Transcriptase és a Thermo Scientific Maxima H Minus Reverse Transcriptase kiteket használtam. A revert aid reverz transzkriptáz rövidebb szakaszok cDNS szintézisére alkalmas RNS templátról (13 kb), míg a Maxima H Minus reverz transzkriptáz a hosszabb szakaszokat is képes megbízhatóan átírni (20 kb méretig). A szintézis során különös figyelmet kell fordítani az RNS sértetlenségére, ezért végig jégen dolgoztam.

3.6.1 cDNS szintézis Thermo Scientific Maxima H Minus Reverse Transcriptase kit-tel

Első lépésként kiolvastottam az RNS templátként használt mintákat, majd 0,5ml-es eppendorf csőbe összemértem 3 µl RNS templátot 1 µl random hexamer primert és 9,5 µl MQ-t. A minták centrifugálása után 65 °C-on 5 percig inkubáltam, majd jégen tartottam őket.

A kit által előírt protokollt követve az előzőleg inkubált, majd jégen tartott mintákhoz egyenként a következőket mértem össze:

- 1 μ l dNTP
- 4 μ l 5x puffer
- 0,5 μ l RiboLoch RNase Inhibitor
- 1 μ l Macima H Minus Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)

A reakcióhoz szükséges optimális hőmérsékleteket az alábbiak szerint beállított PCR készülék biztosította:

20 °C	50 °C	65 °C	85 °C
10 perc	30 perc	10 perc	5 perc

3.6.2 cDNS szintézis Thermo Scientific Revert Aid Reverse Transcriptase kit-tel

Az előzőekhez hasonlóan első lépésként kiolvastottam az RNS templátokat, majd 0,5ml-es eppendorf csőbe összemértem 1 μ l RNS templátot 0,25 μ l random hexamer primert és 1,75 μ l MQ-t. A minták centrifugálása után 65 °C-on 5 percig inkubáltam, majd jégen tartottam őket.

A kit által előírt protokollt követve az előzőleg inkubált, majd jégen tartott mintákhoz egyenként a következőket mértem össze:

- 0,5 μ l dNTP
- 1 μ l 5x puffer
- 0,25 μ l RiboLock RNase Inhibitor
- 0,25 μ l Revert Aid Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)

A reakcióhoz szükséges optimális hőmérsékleteket az alábbiak szerint beállított PCR készülék biztosította:

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

3.7 Aktin teszt

A cDNS szintézis során amplifikált cDNS minőségét aktin teszttel ellenőriztem. 0,5 µl cDNS templáthoz mintánként a következőket mértem hozzá: 9,5 µl MQ, 3 µl 5xPhire puffer, 0,75 µl Vvactin, 0,75 µl Vvactin, 0,3 µl dNTP, 0,2 µl Phire Hot Start Polymerase.

A PCR reakció a következő beállításokon zajlott:

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

40X

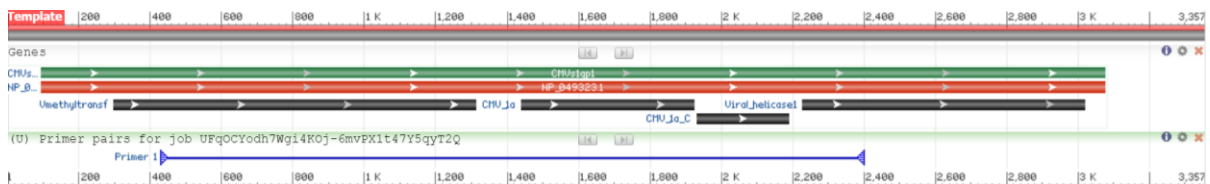
A teszt ellenőrzésére 1,2%-os agaróz gélen 6 µl mintát futtattam.

3.8 Primerek tervezése

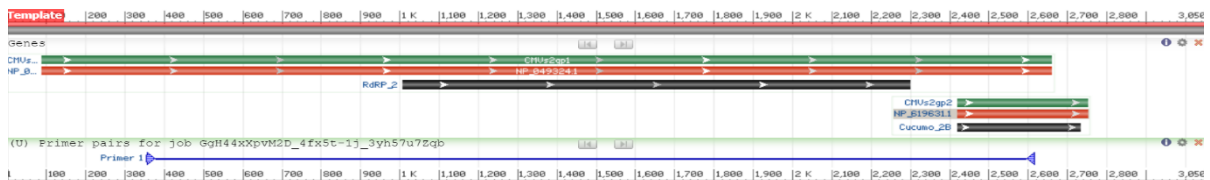
A bioinformatikai elemzések során a kapott olvasatokból épített kontigokat az NCBI adatbázison található referencia genomhoz illesztve (BLAST) primereket terveztem a CMV és a WHAV2 PCR-rel való visszaigazolásához. A primerek tervezését a Genius Prime programban végeztem el. A program lehetséges primer kombinációkat tervezett, melyek szelektálásakor a megfelelő kötődés és pontos átírás érdekében a következő szempontokat vettem figyelembe: 21-24 nt hosszúság, C vagy G nukleotid végződés és az egymás melletti háromszoros nukleotid ismétlődések elkerülése. A csopaki minták esetén a CMV kimutatásához a kutatócsoport már korábban megtervezett primereit használtam. A tervezett primerek szekvenciái a 3. táblázatban láthatóak, a 9-15. ábra pedig szemlélteti a referenciagenomon való elhelyezkedésüket és az amplifikált termékek méretét.

3. Táblázat A felhasznált primerek. Zölddel jelölve láthatóak az általam tervezett primerek.

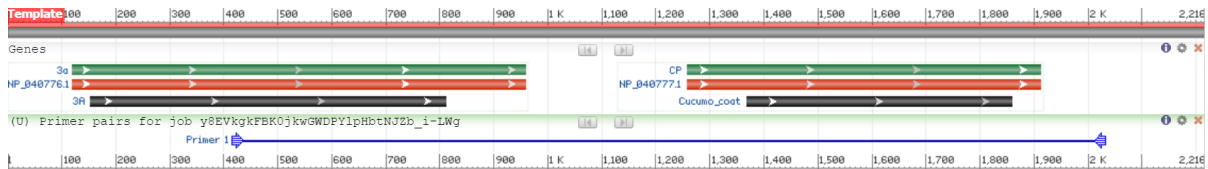
Vírus	Primer elnevezése	Primer Szekvencia (5'-3')	Pozíciója a referenciagenomon	Referenciagenom	Termék mérete
CMV	CMVRNA1_429F	TCGGAGGAAGTTGGGTCACAC	429-449	NC_002034	1942 bp
	CMVRNA1_2401R	GACAGAATCGGCTGTTCTGAAC	2401-2381		
	CMVRNA2_356F	TGATGATGAGCTCCTTGTCGC	356-376	NC_002035	2260 bp
	CMVRNA2_2616R	TGTCAGTTCGGAACCATCCAC	2616-2596		
	CMVRNA3_416F	TTCCACTGATGCTGAAGGGTC	416-436	NC_001440	1616 bp
	CMVRNA3_2032R	AGCTGGATGGACAACCCGTTC	2032-2012		
	CMV_RNA1_720F	GGACGATGATGTTTCGACGGTGC	720-741	NC_002034	1845 bp
	CMV_RNA1_2565R	GTGGAACGAAGCGTCACGAGAGG	2565-2543		
	CMV_RNA2_178F	GTGAACAACGCGAAGATGCTG	178-198	NC_002035	1827 bp
	CMV_RNA2_2005R	GGTTCATCACCTTAGCTTCC	2005-1985		
	CMV_RNA3_207F	GATGCCATCAAGAAGATGGCTAC	207-229	NC_001440	1831 bp
	CMV_RNA3_2038R	GCCGTAAGCTGGATGGACAACC	2038-2017		
WHAV2	WHAV2seg1_771F	ATCACCTATGGTACAGAAGTC	771-791	NC_028382	1391 bp
	WHAV2seg1_2162R	GCTGTGTGTTCTGCCGACATG	2162-2142		
	WHAV2seg2_692F	TGCTCTGAACAAGTGAGCAGC	692-712	NC_028386	1196 bp
	WHAV2seg2_1888R	GAGGAGTGTAGTAAGGAATCG	1888-1868		
	WHAV2seg3_411F	CAGGAATTGTTGGATGACCGG	411-431	NC_028383	1951 bp
	WHAV2seg3_2362R	GTAAAGTCTTCTGACGTCATC	2362-2342		
	WHAV2seg4_11F	TAATTGTGTTGTGGATTATAC	11-31	NC_028387	2493 bp
	WHAV2seg4_2504R	CACGAAGACTCTCTGTTATAG	2504-2484		



9. ábra: A CMV RNS1-re tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.



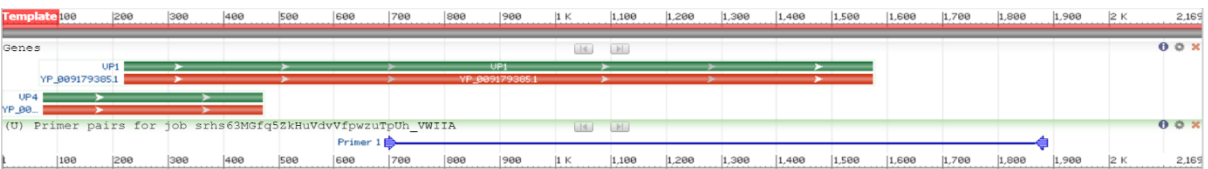
10. ábra: A CMV RNS2-re tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.



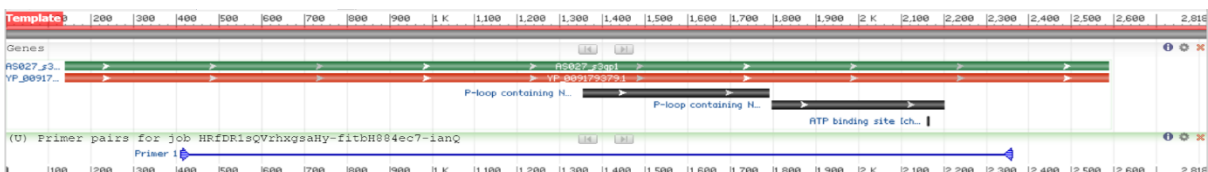
11. ábra: A CMV RNS3-ra tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.



12. ábra: A WHAV2 szegmens 1-re tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.



13. ábra: A WHAV2 szegmens 2-re tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.



14. ábra: A WHAV2 szegmens 3-ra tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.



15. ábra: A WHAV2 szegmens 4-re tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.

3.9 Gradiens PCR, RT-PCR

Az általam tervezett primerek működésének optimalizálását gradiens PCR segítségével végeztem el. A kontamináció elkerülése érdekében lamináris fülkében, steril, szűrős pipettahegyekkel dolgoztam. Az RT-PCR validálásához Q5 Hot Start DNS polimeráz (New England Biolabs) és TaKaRa Ex Premier DNS polimeráz (TaKaRa) enzimeket is használtam.

3.9.1 Gradiens PCR Q5 enzimmel

Először egy reakcióelegyet készítettem, mely 2 µl mintára vonatkoztatva a következőket tartalmazta:

- 31 µl MQ
- 20 µl 5xQ5 puffer
- 2 µl 10mMdNTP
- 2 µl Q5 enzim (2000 U/ml)

A reakcióelegyhez 2 µl mintát, 2,5 µl forward primert és 2,5 µl reverz primert adtam. Az 50 µl végtérfogatú elegyet 5 csőbe mértem szét, majd ezeket különböző annellálási hőfokokra (58°C, 60,5°C, 62,5°C, 64,5°C, 66°C) állított PCR készülékbe helyeztem. A PCR reakció során alkalmazott időintervallumokat a gyártó javaslata alapján választottam meg.

40X				
98 °C	98 °C	58-66 °C	72°C	72 °C
30 másodperc	30 másodperc	30 másodperc	7 perc	10 perc

3.9.2 Gradiens PCR TaKaRa enzimmel

Mintánként 50 µl végtérfogatú reakcióelegyet mértem össze, mely a következőket tartalmazta:

- 19 µl MQ
- 2,5 µl forward primer
- 2,5 µl reverz primer
- 1 µl cDNS templát
- 25 µl Takara Ex Premier DNS polimeráz

Az 50 µl végtérfogatú elegyet 5 csőbe mértem szét, majd ezeket különböző annellálási hőfokokra (55°C, 57°C, 61,2°C, 64°C, 66°C) állított PCR készülékbe helyeztem. A PCR reakció során alkalmazott időintervallumokat a gyártó javaslata alapján választottam meg.

98 °C	98 °C	55-66 °C	68°C	68 °C
1 perc	10 másodperc	15 másodperc	3 perc	4 perc

40X

A gradiens PCR során meghatározott optimális annealási hőmérséklettel PCR reakciót végeztem, mintánként 15 µl végtérfogatban.

A PCR eredményeinek értékelésére 1,2% -os agaróz gélen, 130V-on futtattam. A gélelektroforézishez a Q5 enzimrel végzett reakció esetén a mintákat DNS festékkel festettem meg, míg a TaKaRa Ex Premier DNS polimeráz kit tartalmazza a festéket is, így azokat a mintákat külön festés nélkül futtattam meg.

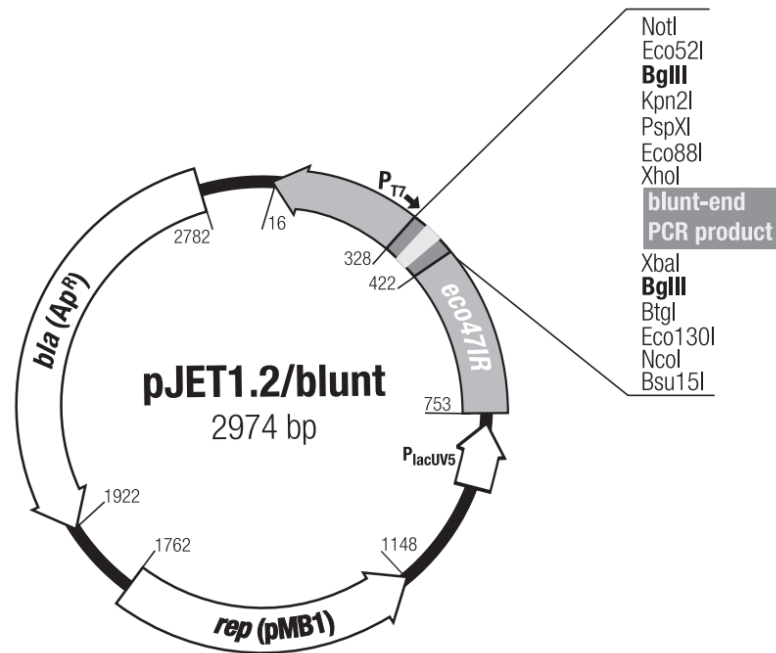
3.10 PCR termék tisztítása

A PCR során pozitív eredményt mutató minták gélből való tisztításához a kapott PCR-termékeket steril szikével UV fény alatt kivágtam. A termékek visszaizolálását NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztem el, a gyártó utasításait követve. A tisztítás során a kit kidolgozott protokollját követtem, majd 25 µl elúciós pufferben oldottam vissza a mintákat. A tisztítás sikerességének ellenőrzésére a mintákból 5 µl-t 3 µl DNS festék hozzáadásával 1,2%-os agaróz gélen futtattam meg.

3.11 Klónozás

A gélből tisztított PCR termékeket Thermo Scientific CloneJet PCR Cloning Kit segítségével PJET1.2/blunt vektorba klónoztam (16. ábra). A ligáláshoz a reakcióelegy a következőket tartalmazta:

- 3 µl tisztított PCR termék
- 1 µl MQ
- 5 µl 2X puffer
- 0,5 µl pJET 1.2 blunt vektor
- 0,5 µl ligáz enzim



16. ábra: pJET vektor felépítése

A reakcióelegyet szobahőmérsékleten inkubáltam 10 percig, majd DH5 α kompetens baktériumsejtekbe transzformáltam.

A transzformálás során 5 μ l ligátumot adtam 200 μ l kompetens sejthez. A kapott szuszpenziót 20 percig jégen tartottam, majd 42 $^{\circ}$ C -os vízfürdőben 30 másodpercig hősokkoltam, utána újra jégre tettem. A mintákhoz 500 μ l SOC táptalajt adtam, majd 37 $^{\circ}$ C -os rázó termosztátba helyeztem 40 percig. A kapott szuszpenzióból 200 μ l-t ampicillint tartalmazó LB táptalajon szélesztettem és egy éjszakán át 37 $^{\circ}$ C -on inkubáltam. A táptalajon csak azok a baktérium képesek felnőni, melyek tartalmazzák az inzerttel ligálódott vektort, hiszen az inzert beépülése megakadályozza a vektorban található letális gén expresszióját.

A táptalajon felnőtt telepek közül 4-et folyékony ampicillin tartalmú LB táptalajra oltottam le, majd 37 $^{\circ}$ C -os rázó termosztátba helyeztem.

3.12 Plazmid tisztítása a baktériumtenyészetből

A baktériumtenyészetből a plazmidok tisztítását NucleoSpin Plasmid Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztem el, a gyártó utasításait követve. A tisztított plazmidokat 50 μ l elúciós puffer-ben oldottam vissza. A ligálás sikerességét a plazmidok restriktációs enzimekkel való emésztésével ellenőriztem. Az emésztéshez a következő reakcióelegyet mértem össze:

- 2 µl 10x Tango Puffer
- 0,4 µl XbI enzim
- 0,2 µl XHoI enzim
- 3,4 µl MQ

A reakcióelegyhez 4 µl plazmidot mértem, majd 37 °C -os vízfürdőben 30 percig inkubáltam. Az emésztés sikerességét gélelektroforézissel ellenőriztem, melyhez 1,2%-os agaróz gélt használtam.

3.13 Sanger szekvenálás és a szekvenciák elemzése

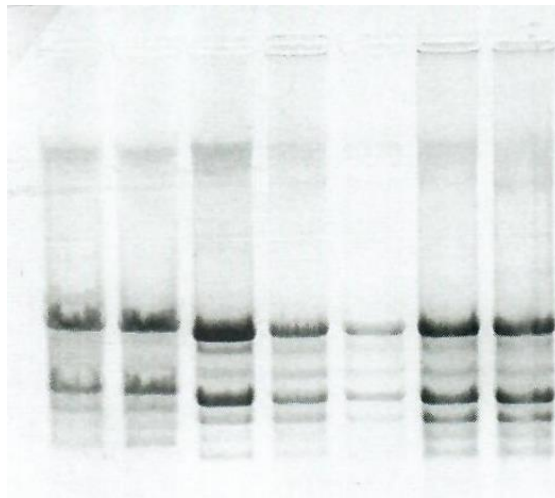
A minták szekvenciáinak meghatározása Sanger szekvenálással történt, melyet a BIOMI Kft. végzett el. A minták szekvenálása forward és reverz irányból is megtörtént. A kapott szekvenciák minőségének ellenőrzésére Chromas 2.6.6 programot használtam. A forward és a reverz szekvenciák összeillesztését az NCBI adatbázis segítségével végeztem el. A forward és reverz primerek is maximum 800-900 bp méretig végezték el a szekvenálást. Amennyiben az insert mérete nagyobb volt, mint amit a két irányból sikerült megszekvenálni, akkor a köztes szakaszok szekvenálásához új primerek tervezésére volt szükség.

Az összeillesztett szekvenciákat az NCBI adatbázisában található szekvenciákkal hasonlítottam össze, majd a Genius Prime program segítségével filogenetikai fát készítettem. Kulcsoportnak egy, az adott vírussal közeli rokonságban álló vírus szekvenciáját választottam. A filogenetikai fa készítéséhez maximum likelihood módszert alkalmaztam, 1000 bootstrap beállítással.

4 Eredmények

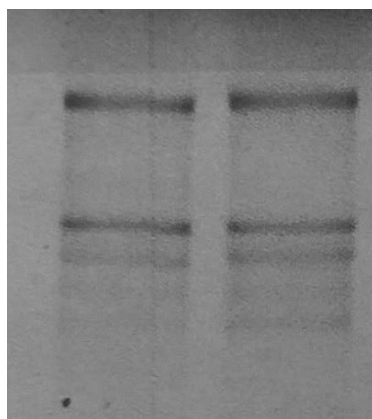
4.1 Totál nukleinsav tisztítás

Kutatásom első lépéseként a kecskeméti és a csopaki helyszínről gyűjtött mintákból totál nukleinsavat tisztítottam. 1,2%-os agaróz gélen futtatva megfelelő minőségű és tisztaságú totál nukleinsavat izoláltam. A nukleinsav tisztítás a gélelektroforézis alapján minden minta esetében sikeres volt (17. ábra). A minták koncentrációját NanoDrop spektrofotométer segítségével mértem meg, majd ez alapján számoltam ki a poolok összeméréséhez szükséges mennyiségeket.



17. ábra: A csopaki minták totál nukleinsav tisztításának ellenőrzése gélelektroforézis segítségével.

A totál nukleinsav tisztítást követően a mintavételi területeket reprezentáló poolokat DNázos kezeléssel készítettem elő az Illumina platformon történő szekvenálásra, mely 1,2%-os agaróz gélen futtatva, a gélkép alapján mindkét poolnál sikeres volt (18. ábra).



18. ábra: A kecskeméti (bal oldal) és a csopaki (jobb oldal) terület poolok DNázos kezelése a gélek alapján sikeres volt.

4.2 Bioinformatikai elemzések

Az RNS HTS eredményeként a csopaki könyvtárban 22,7 millió olvasatot kaptam eredményül, ez a szám a trimmelés után 22,3 millióra csökkent. A kecskeméti könyvtárban 16,8 millió olvasatot kaptam, melyek száma trimmelés után 16,4 millió 16.87.824 volt. Az olvasatokból létrehozott kontigokat az NCBI adatbázisában található referenciagenomokhoz illesztettem, mely eredményeként egy vírustalálati listát generáltam. Az 4. táblázatban láthatóak a 0 E-value értékkel eredményül kapott vírusok. Ezen vírusok mindegyikére sikerült legalább 1 kontigot építeni.

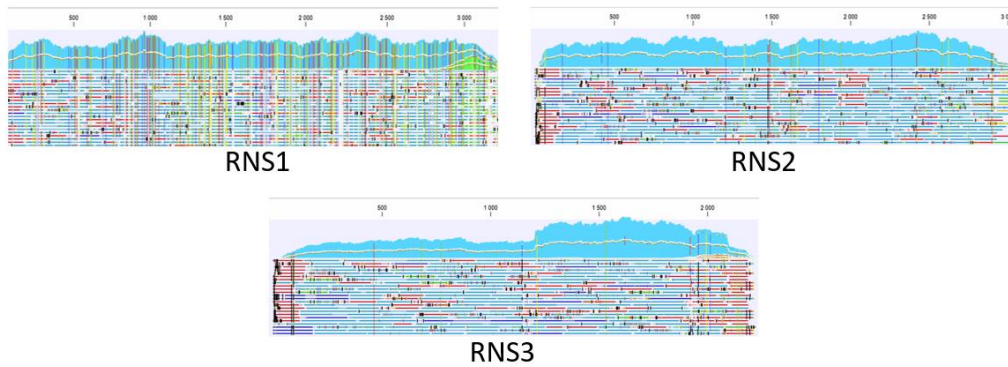
4. táblázat: AZ RNS HTS bioinformatikai elemzése során kapott vírusok (E-value=0).

RNAseq		CMV	CMV	CMV	WHAV2	WHAV2	WHAV2	WHAV2
		RNA1	RNA2	RNA3	seg1	seg2	seg3	seg4
Kecskemét	kontigok száma	6	4	11	-	-	-	-
	virális lefedettség (%)	100	100	100	-	-	-	-
Csopak	kontigok száma	1	2	2	1	1	1	4
	virális lefedettség (%)	97,392	81,54	97,756	99,8	98,25	99,86	88,66

A továbbiakban a kecskeméti terület mintáiban a CMV, a csopaki terület mintáiban pedig a CMV és a WHAV2 visszaigazolását végeztem el. Ezen vírusokra találatul kapott szekvenciákat közvetlenül az NCBI adatbázisból letöltött referenciagenomokhoz illesztettem, melynek

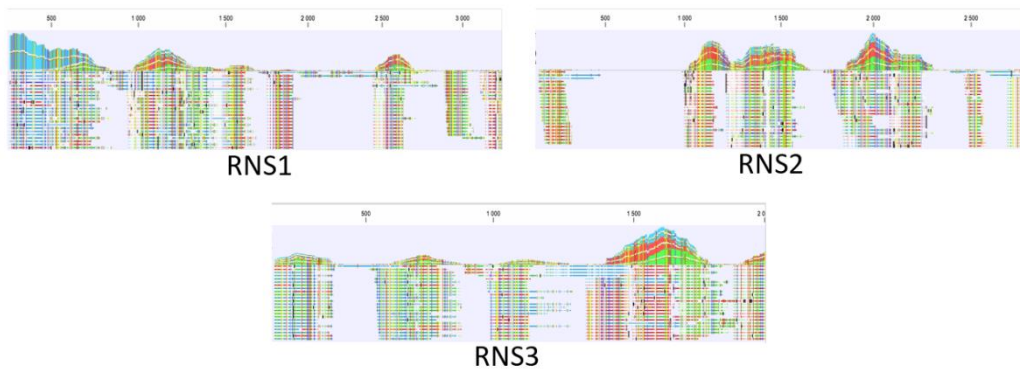
eredményeként megkaptam az adott vírusgenom lefedettségét (19-21. ábra). A vizsgált vírusok virális lefedettsége mind 80% felett volt.

CMV



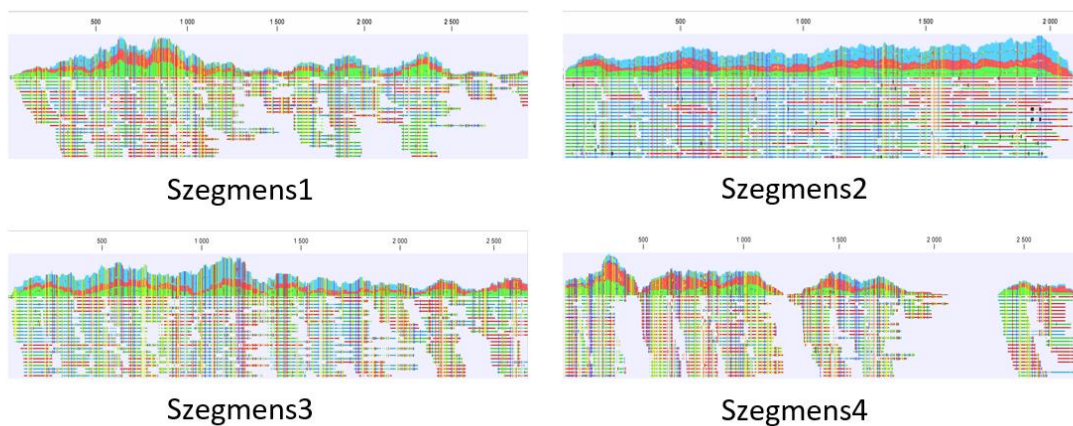
19. ábra: A CMV RNS1-3 lefedettsége a kecskeméti könyvtár eredményei alapján.

CMV



21. ábra: A CMV RNS1-3 lefedettsége a csopaki könyvtár eredményei alapján.

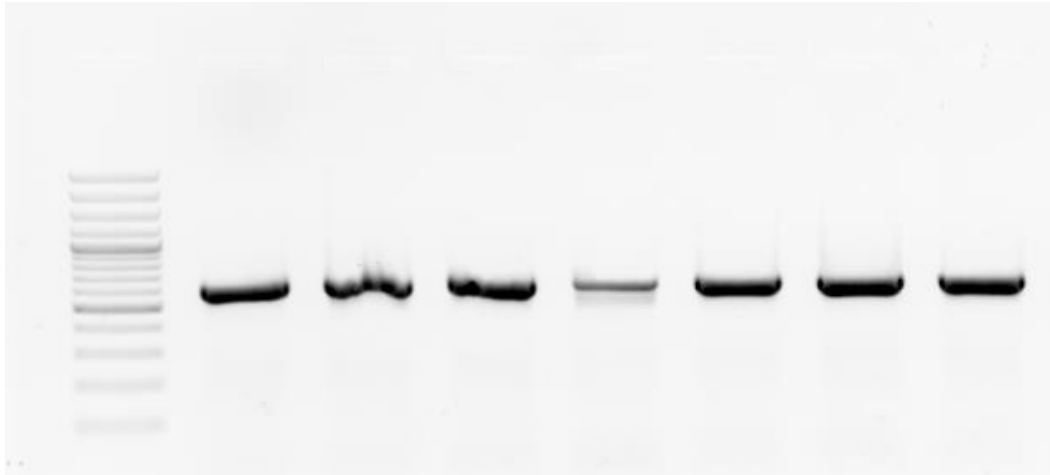
WHAV2



20. ábra: A WHAV2 szegmens 1-4 lefedettsége a csopaki könyvtár eredményei alapján.

4.3 cDNS szintézis

A bioinformatikai eredmények RT-PCR-el való visszaigazolásához a tisztított nukleinsavakból cDNS szintézisre volt szükség. A cDNS minőségének ellenőrzésére a 3.7 fejezetben leírtak alapján aktin tesztet végeztem. A teszt alapján a cDNS szintézis sikeres volt, minden esetben megfelelőminőségű terméket kaptam (22. ábra).



22. ábra: A kecskeméti mintákból szintetizált cDNS aktin tesztje.

4.4 CMV visszaigazolása

A CMV visszaigazolását két független módszer segítségével végeztem el. Az egyes selyemkóró egyedek vírusfertőzöttségét Lateral flow szerológiai gyorstesztel állapítottam meg. A terület poolokból szintetizált cDNS felhasználásával pedig RT-PCR segítségével végeztem el a vírus jelenlétének validálását.

4.4.1 Lateral flow szerológiai gyorsteszt

A lateral flow szerológiai gyorstesztet a csopaki és a kecskeméti területről származó 7-7 selyemkóró egyeden végeztem el az RNS izolálásához is használt fagyasztott növényi anyagokból. A teszt során minden esetben megjelent a tesztcsíkon a kontroll vonal (23. ábra), így az eredmények értékelhetőek voltak. A teszt alapján a kecskeméti területről mind a 7 egyedet, a csopaki területről pedig a 7 egyedből 5-öt találtam fertőzöttnek (5. táblázat). A csopaki mintavételi területen mindkét vírusos megbetegedésre utaló tüneteket mutató egyed fertőzöttnek bizonyult. A maradék 3 egyed tünetmentessége ellenére bizonyult fertőzöttnek. A csopaki terület 1. helyszínéről gyűjtött minták közül 2, a 2. helyszínről gyűjtött minták közül pedig 3 bizonyult CMV-vel fertőzöttnek.



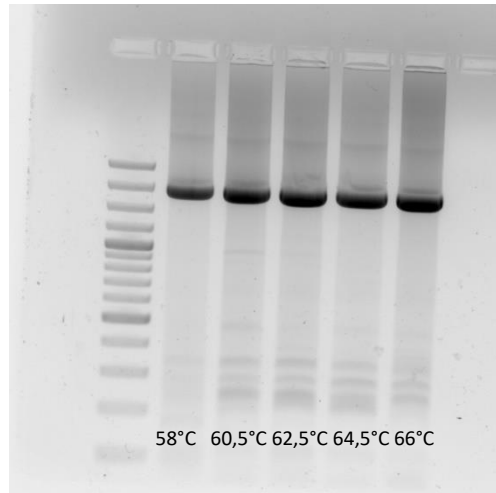
23. ábra: Pozitív lateral flow teszt. A tesztcsíkon jól látható a kontroll vonal és alatt a pozitív eredményt mutató teszt vonal is.

5. táblázat: A kecskeméti és a csopaki területről gyűjtött selyemkóró egyedeken végzett lateral flow szerológiai gyorsteszt eredményei. A gyorsteszt alapján a pirossal jelölt egyedek bizonyultak fertőzöttnek.

Kecskemét		Csopak	
1. időpont	1. egyed	1. helyszín	1. egyed
	2. egyed		2. egyed
	3. egyed		3. egyed
2. időpont	4. egyed	2. helyszín	4. egyed (tünetes)
	5. egyed		5. egyed
	6. egyed		6. egyed
	7. egyed (tünetes)		7. egyed (tünetes)

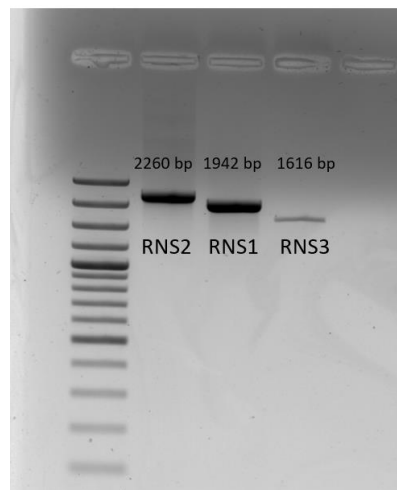
4.4.2 RT-PCR

RT-PCR segítségével a kecskeméti és a csopaki területet reprezentáló poolokból sikeresen visszaigazoltam a CMV mindhárom RNS-ének jelenlétét. A kecskeméti terület esetén új primerek tervezésére volt szükség, melyek optimális annellálási hőmérsékletének megállapítására gradiens PCR-t végeztem. Az RNS1 és az RNS2 minden vizsgált hőfokon (58-66 °C) (24. ábra), míg az RNS3 csak 66 °C-on adott pozitív eredményt. Ennek alapján a továbbiakban 66 °C -os annellálási hőmérséklet beállításával végeztem el a PCR reakciókat.



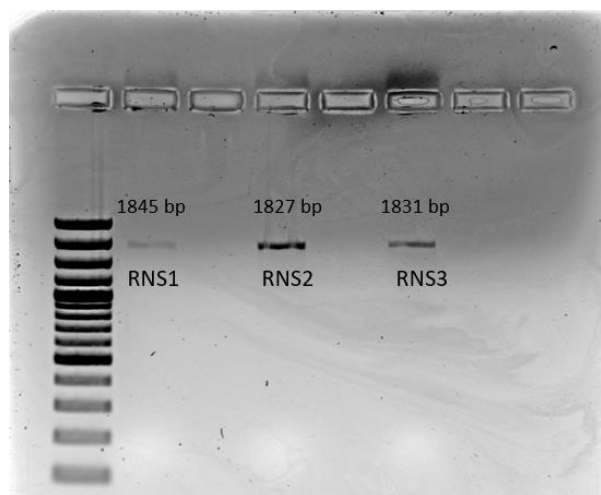
24. ábra: A tervezett primerek annellálási hőmérsékletének meghatározása a kecskeméti pool, CMV RNS1 esetében.

A CMV kecskeméti területéről való kimutatására tervezett primerek annellálási hőmérsékletének optimalizálása után az RT-PCR segítségével amplifikált termékek mérete az RNS1 esetében 1942 bp, az RNS2 esetében 2260 bp, az RNS3-nál pedig 1616 bp volt (25. ábra).



25. ábra: A CMV RNS1, RNS2 és RNS3 visszaigazolása a kecskeméti területéről RT-PCR-el.

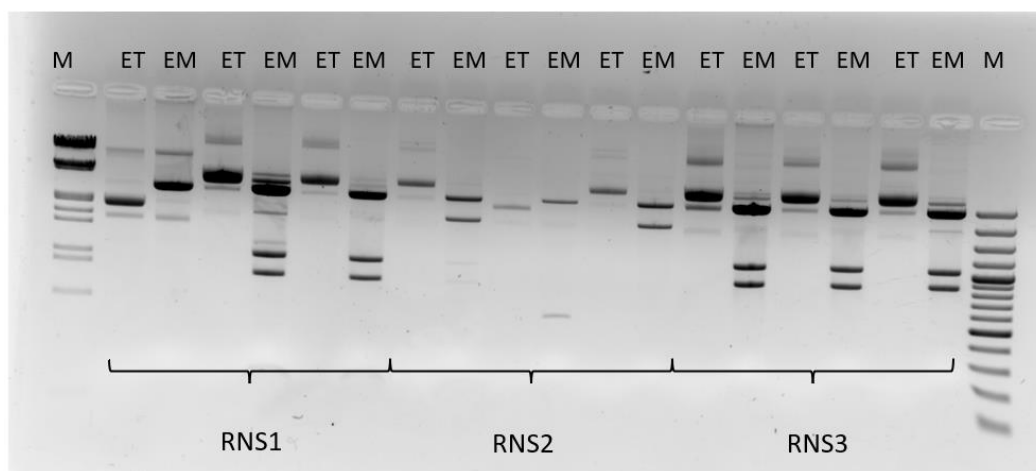
A csopaki területéről már előzőleg, a kutatócsoport által tervezett primerek alkalmazásával sikerült RT-PCR-el visszaigazolnom a CMV jelenlétét. Mindhárom RNS esetén körülbelül 1800 bp hosszú terméket vártam, melyek jól láthatóak a gélképen is (26. ábra).



26. ábra: A csopaki pool-ban a CMV mindhárom RNS-ét sikeresen visszaigazolam. Az RNS 1 esetében 1845 bp, az RNS 2-nél 1827 bp, az RNS 3-nál pedig 1831 bp méretű terméket sikerült amplifikálni.

4.4.3 Klónozás és restriktíós emésztés

Mindkét terület esetén a PCR termékeket gélből tisztítottam és klónoztam a 3.8 és 3.9 fejezetekben leírtak alapján. A klónozás ellenőrzésére XbaI és XhoI enzimeket használva emésztettem a PJET konstrukciót. Az emésztett és az emésztetlen termékeket is 1,2%-os agaróz gélen futtattam meg. A gélelektroforézis során az emésztetlen (ET) és az emésztett (EM) mintákat egymást váltva vittem fel a zsebekbe. A gélképek alapján a ligálás sikeres volt, így alkalmasak voltak a Sanger szekvenálásra, melyet a Biomi Kft. végzett el. A sikeres restriktíós emésztést mutató gélképet az 27. ábra szemlélteti.

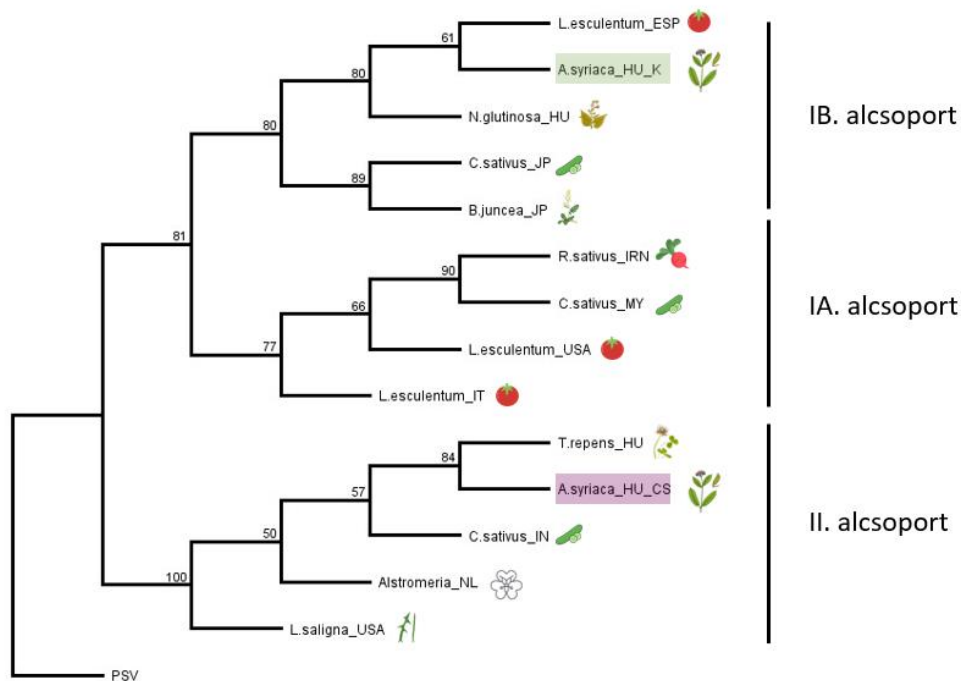


27. ábra: CMV RNS1, RNS2, RNS3 ligálásának ellenőrzése restriktíós emésztéssel.

4.4.4 Filogenetikai elemzések

A PCR termékek tisztítása, klónozása és a klónok tisztítása sikeres volt, a minták Sanger szekvenálását külső vállalkozóként a Biomi Kft. végezte el.

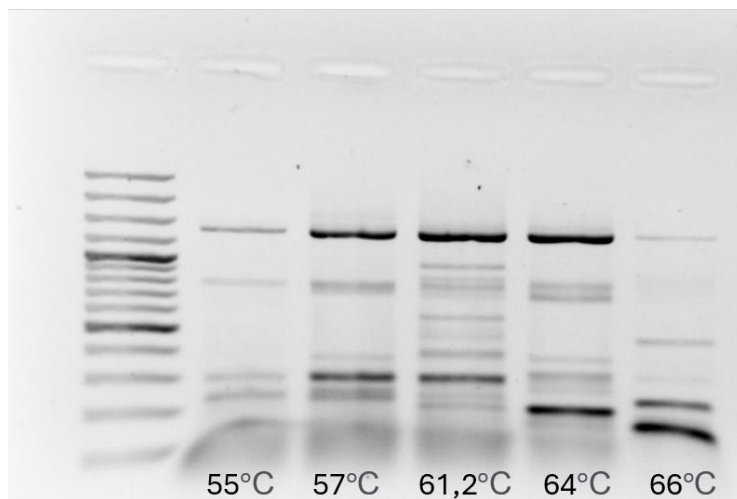
A filogenetikai fa elkészítéséhez az NCBI adatbázisába feltöltött, különböző földrajzi régiókból és gazdanövényekből izolált CMV szekvenciákat használtam. Külcsoportnak a CMV-vel közeli rokon, szintén a Cucumovirus nemzetségbe tartozó Peanut stunt virus (PSV) referenciagenomját választottam. A kapott filogenetikai fa alapján elmondható, hogy a kecskeméti és a csopaki terület poolokból meghatározott CMV szekvenciák különböző alcsoportokba tartoznak (28. ábra). A kecskeméti izolátum az IB. alcsoportba, míg a csopaki izolátum a II. alcsoportba sorolható. A kecskeméti izolátum egy spanyol, paradicsomból kimutatott szekvenciával, míg a csopaki egy magyar, fehér heréből meghatározott szekvenciával klasztereződik együtt.



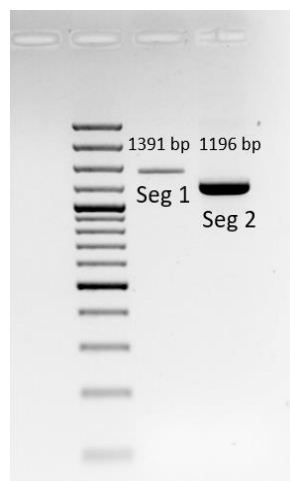
28. ábra: Filogenetikai fa a CMV szekvenciák leszármazási viszonyainak feltárására. Az általam izolált vírusok két külön alcsoportba tartoznak.

4.5 WHAV-2 visszaigazolása

A WHAV-2 visszaigazolását RT-PCR-el végeztem el, melyhez új primereket terveztem. A primerek optimális annealálási hőmérsékletét gradiens PCR segítségével állapítottam meg. PCR reakcióval a vírus első és második szegmensét sikerült visszaigazolnom. A gradiens PCR során a tervezett primerek minden vizsgált hőfokon (55-66 °C) megfelelően működtek (29. ábra). A tervezett primerek segítségével a PCR során a szegmens 1 1391 bp, a szegmens 2 1196 bp hosszú szakaszát sikerült amplifikáltam (230. ábra).



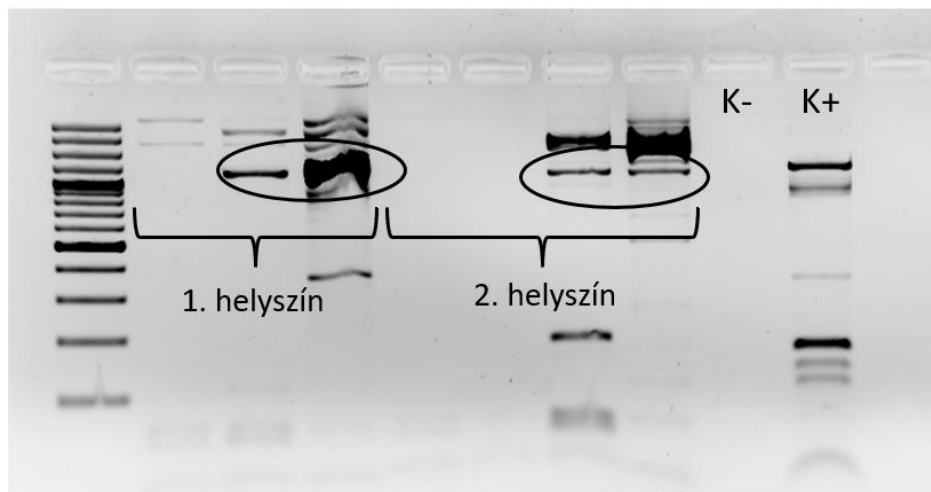
29. ábra: Gradiens PCR a WHAV2 első szegmensének visszaigazolására tervezett primerekkel. A tervezett primerek minden vizsgált hőfokon működtek.



30. ábra: WHAV2 visszaigazolása RT-PCR-el.

A szegmens 2 esetében nem csak a csopaki területpool-ból, hanem az egyes egyedekből is sikerült visszaigazolnom a vírus jelenlétét (31. ábra). A PCR alapján a 7 egyedből 4-et találtam

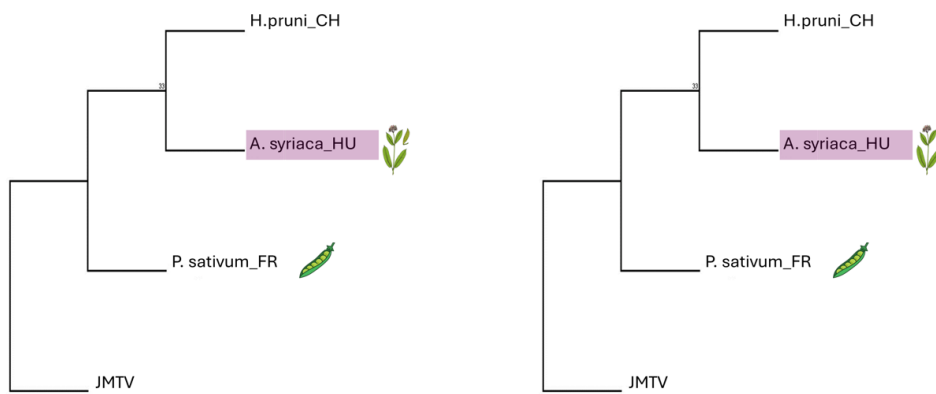
fertőzöttek. A 4 fertőzött egyedből 2 az első és 2 a második mintavételi helyszínről gyűjtött minták közül került ki. A vírusfertőzésre utaló tüneteket mutató 2 egyed közül 1 bizonyult WHAV-2-vel fertőzöttnek.



31. ábra: WHAV2 szegmens 2 kimutatása a selyemkóró egyed poolokból. A 7 egyedből 4 bizonyult fertőzöttnek. A bekarikázott minták esetében kaptunk a várt méretben (1196 bp) PCR terméket.

4.5.1 Filogenetikai elemzések

A filogenetikai fa készítését elvégeztem a szegmens 1 és a szegmens 2 szekvenciáival is (32. ábra). Az NCBI adatbázisába eddig csupán szegmensenként 2 szekvencia került feltöltésre erről a vírusról, így az elemzésekhez kis számú referencia genom állt rendelkezésre. Mindkét dendrogram alapján az általam vizsgált, selyemkóróból izolált vírus a Kínában levéltetűből izolált vírus szekvenciájával klasztereződik együtt, míg a Franciaországban zöldborsóból kimutatott vírus külön helyezkedik el ezektől. A kis mintaelemszám miatt ezek az eredmények kevésbé reprezentatívak, azonban felvethetik azt a kérdést, miszerint biztosan magából a növényből izoláltam-e a WHAV-2-t, vagy esetleg valamilyen ízeltlábú szennyeződés lehetett a mintákon, mely hordozta a vírust.



32. ábra: A WHAV2 szegmens 1 (bal oldal) és szegmens 2 (jobb oldal) szekvenciáival készített filogenetikai fák.

5 Következtetések és javaslatok

Az irodalomban már ismert, hogy a Magyarországon invazív gyomnövényként terjedő selyemkóró vírusrezervoár szereppel bírhat, azonban ez a szerep még nem teljesen feltárt. A CMV bizonyítottan képes fertőzni a selyemkórót, ezt az általam vizsgált kutatás is megerősítette. Eredményeim továbbá hozzájárultak a különböző alcsoportokba tartozó CMV törzsek magyarországi elterjedésének megismeréséhez.

A határozatlan besorolású, Jingmenvírusok közé tartozó WHAV2-t elsőként Kínában írták le. Európai jelenléte egy franciaországi mintából való kimutatásának köszönhetően már ismert a szakirodalomban, azonban Magyarországi megjelenéséről eddig még nem volt tudomásunk. Kutatásom során Magyarországon elsőként izoláltam a WHAV2-t, valamint ez volt a vírus első selyemkóróból történő kimutatása is. A filogenetikai elemzések során az általam izolált WHAV2 a várttal ellentétben nem a növényi mintából izolált, hanem a levéltetűből meghatározott szekvenciákkal klasztereződött együtt. A kevés elérhető, NCBI adatbázisába feltöltött szekvencia miatt kis mintaelemszámmal történt a dendrogram készítése, így az eredmények is kevésbé reprezentatívak. Ugyanakkor ezek az eredmények felvetik azt a kérdést, hogy vajon valóban magából a selyemkóró növényből, vagy valamilyen, a mintákon található ízeltlábú szennyeződésből mutattam-e ki a kórokozót. Az általam meghatározott WHAV2 szekvenciák az NCBI adatbázisába feltöltve segíthetik ennek a vírusnak a további vizsgálatát.

Eredményeim tehát megerősítik, hogy a gyomnövények fontos szereppel bírhatnak a növénypatogén vírusok terjedésében, valamint hozzájárulnak a közönséges selyemkóró vírusrezervoár szerepének mélyebb megismeréséhez. Kutatásom alapján elmondható, hogy ez az invazív növény fontos szereppel bírhat növénypatogén vírusok fennmaradásában és akár új vírusok megjelenésében is, ezzel növelve a művelt területeken okozott kártételét.

További kutatási irányok

Az általam végzett kutatás eredményei megerősítik, hogy a selyemkóró vírusrezervoár szerepe fontos kutatási terület, vizsgálatát érdemes a jövőben folytatni.

A továbbiakban mindenképpen érdemes lehet a CMV, nem csak területeket reprezentáló poolokból, hanem a selyemkóró egyedekből történő visszaigazolása RT-PCR-el. Az amplifikált termékek tisztítása és klónozása után a Sanger-szekvenálással meghatározott szekvenciák filogenetikai elemzése pontosabb képet adhat a kórokozó adott területen való variabilitásáról.

A WHAV2 részletesebb vizsgálatának publikálása még nem történt meg a szakirodalomban, így ez a kórokozó több jövőbeli kutatás alapját képezheti. A harmadik és a negyedik szegmens független módszerekkel való visszaigazolása és szekvenciáinak elemzése jelenleg is folyamatban van. A kutatásom során felmerült kérdés, miszerint valóban növényi eredetűek-e az általam izolált kórokozók, további vizsgálatok elvégzését teheti szükségessé. A kutatócsoport a mintavétel során a selyemkóró növényekről levéltetű mintákat is begyűjtött, így ezek vizsgálata választ adhat erre a kérdésre. A kórokozó által jelentett kockázat a kutatás jelenlegi fázisában még nem felmérhető, mivel az általa okozott tünetek és az esetleges további gazdaszervezetek köre még nem került felderítésre. A WHAV2 további tulajdonságainak megismerésére irányzott részletes kutatás a fentebb említett okok miatt új és akár növényvédelmi szempontból jelentős adatokkal gazdagíthatja a szakirodalmat.

A bioinformatikai elemzések során felmerült egyéb vírusok visszaigazolása és vizsgálata is a kutatás jövőbeli céljai közé tartozik.

6 Összefoglalás

A növényi vírusfertőzésekkel szemben jelenleg nincs rendelkezésünkre álló növényvédelmi technológia. Ezért a gyomnövények, mint vírusrezervoárok által jelentett kockázat felmérése kulcsfontosságú lehet a növénypatogén virális kórokozók terjedésének és fennmaradásának megelőzésében. A vírusrezervoár szerep megismerése különösen fontos lehet az invazív növények esetén, melyek új vírusok vagy variánsok megjelenésében is nagy szerepet játszhatnak. A selyemkóró (*Asclepias syriaca*) Észak-Amerikából származó invazív gyomnövény, mely Magyarországon egyre nagyobb területen van jelen. Kedveli a bolygatott, tápanyagban gazdag talajt, így gyakran megjelenik mezőgazdasági művelés alatt álló területeken is, ahol gyomnövényként nagy károkat okozhat. A szakirodalomban ismert, hogy elterjedt és jelentős károkat okozó növénypatogén vírusok, mint például az uborka-mozaikvírus (CMV) és a dohány-mozaikvírus (TMV) gazdanövénye lehet, így elterjedése egy új fertőzési forrás megjelenésének veszélyét hordozza magában. Az új vizsgálati módszerek, többek között a nagy áteresztőképességű szekvenálási technikák (HTS) fejlődése, lehetővé teszi a selyemkórón előforduló további vírusok kimutatását és diagnosztikai vizsgálatát.

Diplomadolgozatomban egy Kecskeméten található szőlősből és egy Csupakon található meggyültetvényből gyűjtött selyemkóró mintákat vizsgálatam. A begyűjtött selyemkóró növények levelei közül több is vírusos megbetegedésre utaló tüneteket mutatott. A mintákból totál nukleinsavat tisztítottam, majd DNáz-os kezelés után a minták szekvenálása Illumina platformon történt. A kapott szekvenciák elemzését a CLC programban végeztem el. A bioinformatikai elemzés több vírus lehetséges jelenlétét mutatta ki, melyek közül két vírus RNS-ét független módszerekkel is visszaigazoltam. Az uborka mozaik vírus (CMV) jelenlétét mindkét mintavételi területről származó mintákból RT-PCR és lateral flow szerológiai gyorseszteszt segítségével is validáltam. A csopaki mintában a Wuhan aphid virus 2 (WHAV-2), jelenleg bizonytalan besorolású Jingmenvírusok közé tartozó, ssRNS (+), 4 szegmensű genommal rendelkező kórokozó jelenlétét RT-PCR-el igazoltam vissza. A WHAV-2-t eddig, a szakirodalom alapján, csak levéltetű fajokból és zöldborsóból mutatták ki. Magyarországi jelenléte és selyemkóró gazdanövénye eddig még nem volt ismert. Eredményeim rávilágítanak arra, hogy a selyemkóró jelentős szereppel bírhat vírusrezervoárként, ezzel növelve invazív gyomnövényként okozott kártételét.

7 Irodalomjegyzék

1. Bagi, I. (1999). A selyemkóró (*Asclepias syriaca* L.)- Egy invazív faj biológiája, a védekezés lehetőségei. *Kitaibelia*, 4(2), 289–295.
2. Bagi, I. (2008). Common milkweed (L.). In *The Most Important Invasive Plants in Hungary* (pp. 151–159). Institute of Ecology and Botany, Hungarian Academy of Sciences.
3. Bakacsy, L., & Bagi, I. (2020). Survival and regeneration ability of clonal common milkweed (*Asclepias syriaca* L.) after a single herbicide treatment in natural open sand grasslands. *Scientific Reports*, 10(1), 14222. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71202-8>
4. Bellardi, M. G., & Rubies-Autonell, C. (1999). Occurrence of arabis mosaic nepovirus (ArMV) on *Asclepias syriaca* L. *Phytopathologia Mediterranea*, 38(1), 40–42.
5. Berki, B., & Csecserits, A. (2021). Segítheti-e a növényfajok invázióját az ellenségeik hiánya? : Irodalmi áttekintés a közönséges selyemkórót és Európában őshonos rokonait, a méreggyilokfajokat fogyasztó rovarokról. *Természetvédelmi Közlemények*, 27, 55–76. <https://doi.org/10.20332/tvk-jnatconserv.2021.27.55>
6. Colmant, A. M. G., Charrel, R. N., & Coutard, B. (2022a). Jimgmenviruses: Ubiquitous, understudied, segmented flavi-like viruses. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.997058>
7. Colmant, A. M. G., Charrel, R. N., & Coutard, B. (2022b). Jimgmenviruses: Ubiquitous, understudied, segmented flavi-like viruses. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.997058>
8. Colmant, A. M. G., Furlong, M. J., & Etebari, K. (2022). Discovery of a Novel Jimgmenvirus in Australian Sugarcane Soldier Fly (*Inopus flavus*) Larvae. *Viruses*, 14(6), 1140. <https://doi.org/10.3390/v14061140>
9. Csecserits, A., Halassy, M., Rédei, T., Szitár, K., & Botta-Dukát, Z. (2020). A selyemkóró (*Asclepias syriaca* L.) tömegességének változásai homoki parlagokon szukcesszió és természetvédelmi kezelés hatására. *Természetvédelmi Közlemények*, 26, 1–15. <https://doi.org/10.20332/tvk-jnatconserv.2020.26.1>
10. Demian, E., Jaksa-Czotter, N., & Varallyay, E. (2022). Grapevine Pinot Gris Virus Is Present in Different Non-Vitis Hosts. *Plants*, 11(14), 1830. <https://doi.org/10.3390/plants11141830>
11. Doolittle, S. P. (1916). A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, 6(2), 145–147.

12. Gaafar, Y. Z. A., & Ziebell, H. (2020a). Comparative study on three viral enrichment approaches based on RNA extraction for plant virus/viroid detection using high-throughput sequencing. *PLOS ONE*, *15*(8), e0237951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237951>
13. Gaafar, Y. Z. A., & Ziebell, H. (2020b). Comparative study on three viral enrichment approaches based on RNA extraction for plant virus/viroid detection using high-throughput sequencing. *PLOS ONE*, *15*(8), e0237951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237951>
14. Gao, X., Zhu, K., Wojdyla, J. A., Chen, P., Qin, B., Li, Z., Wang, M., & Cui, S. (2020). Crystal structure of the NS3-like helicase from Alongshan virus. *IUCrJ*, *7*(3), 375–382. <https://doi.org/10.1107/S2052252520003632>
15. Jacquemond, M. (2012). *Cucumber Mosaic Virus* (pp. 439–504). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00013-0>
16. Jagger, I. C. (1916). Experiments with the cucumber mosaic disease. *Phytopathology*, *6*(2), 149–151.
17. Kazinczi, G., Horváth, J., & Lesemann, D. E. (2002). Perennial plants as new natural hosts of three viruses. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *109*, 301–310.
18. Kobayashi, D., Kuwata, R., Kimura, T., Shimoda, H., Fujita, R., Faizah, A. N., Kai, I., Matsumura, R., Kuroda, Y., Watanabe, S., Kuniyoshi, S., Yamauchi, T., Watanabe, M., Higa, Y., Hayashi, T., Shinomiya, H., Maeda, K., Kasai, S., Sawabe, K., & Isawa, H. (2021). Detection of Jingmenviruses in Japan with Evidence of Vertical Transmission in Ticks. *Viruses*, *13*(12), 2547. <https://doi.org/10.3390/v13122547>
19. Kouadio, K. T., De Clerck, C., Agneroh, A., Parisi, O., Lepoivre, P., & Jijakli, H. (2013). A Role of satellite RNAs in cucumber mosaic virus-host plant interactions. A review. In *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* (Vol. 17, Issue 4).
20. Lebas, B., Adams, I., Al Rwahnih, M., Baeyen, S., Bilodeau, G. J., Blouin, A. G., Boonham, N., Candresse, T., Chandelier, A., De Jonghe, K., Fox, A., Gaafar, Y. Z. A., Gentit, P., Haegeman, A., Ho, W., Hurtado-Gonzales, O., Jonkers, W., Kreuze, J., Kutjnak, D., ... 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. <https://doi.org/10.1111/epp.12863>
21. Lucía-Sanz, A., & Manrubia, S. (2017). Multipartite viruses: adaptive trick or evolutionary treat? *Npj Systems Biology and Applications*, *3*(1), 34. <https://doi.org/10.1038/s41540-017-0035-y>

22. 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>
23. Massart, S., Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnikar, M., Reynard, J.-S., Rumbou, A., Saldarelli, P., Škorić, D., Vainio, E. J., Valkonen, J. P. T., Vanderschuren, H., Varveri, C., & Wetzels, T. (2017). A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00045>
24. 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>
25. 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>
26. 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>
27. Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G., & Francki, R. I. B. (1992). Cucumber mosaic virus. In *Advances In Virus Research* (Vol. 41).
28. Power, A. G., & Mitchell, C. E. (2004). Pathogen Spillover in Disease Epidemics. *The American Naturalist*, *164*(S5), S79–S89. <https://doi.org/10.1086/424610>
29. Qin, X.-C., Shi, M., Tian, J.-H., Lin, X.-D., Gao, D.-Y., He, J.-R., Wang, J.-B., Li, C.-X., Kang, Y.-J., Yu, B., Zhou, D.-J., Xu, J., Plyusnin, A., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2014). A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(18), 6744–6749. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111>
30. Roossinck, M. J., Zhang, L., & Hellwald, K.-H. (1999). Rearrangements in the 5' Nontranslated Region and Phylogenetic Analyses of Cucumber Mosaic Virus RNA 3 Indicate Radial Evolution of Three Subgroups. *Journal of Virology*, *73*(8), 6752–6758. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6752-6758.1999>
31. Rózsa, P., & Nagy, M. (1997). Richard Pococke, XVIII. századi angol utazó magyarországi florisztikai adatai. *Kitaibelia*, *2*(2), 160–163.

32. Salamon, P. (1986). *Asclepias syriaca* L., az uborka mozaik vírus (cucumber mosaic virus) rezervoár gazdája Magyarországon. *Kertgazdaság*, 18(2), 45–58.
33. Salamon, P., Horváth, J., Mamula, D., Juretic, N., & Hunyadi, K. (1989). *Asclepias syriaca* L. (common milkweed), a new natural host of cucumber mosaic virus in Hungary and Yugoslavia. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 24(3–4), 363–373.
34. Sárkány, E., Lehoczky, É., Tamás, J., & Nagy, P. (2008). Spreading, ecology and damages by the common milkweed (*Asclepias syriaca* L.) in Hungary. *Cereal Research Communications, Vol. 36, Supplement: Proceedings of the VII. Alps–Adria Scientific Workshop*, 1571–1574.
35. Shi, M., Lin, X.-D., Vasilakis, N., Tian, J.-H., Li, C.-X., Chen, L.-J., Eastwood, G., Diao, X.-N., Chen, M.-H., Chen, X., Qin, X.-C., Widen, S. G., Wood, T. G., Tesh, R. B., Xu, J., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2016). Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses. *Journal of Virology*, 90(2), 659–669. <https://doi.org/10.1128/JVI.02036-15>
36. Temmam, S., Bigot, T., Chrétien, D., Gondard, M., Pérot, P., Pommelet, V., Dufour, E., Petres, S., Devillers, E., Hoem, T., Pinarello, V., Hul, V., Vongphayloth, K., Hertz, J. C., Loiseau, I., Dumarest, M., Duong, V., Vayssier-Taussat, M., Grandadam, M., ... Eloit, M. (2019). Insights into the Host Range, Genetic Diversity, and Geographical Distribution of Jingmenviruses. *MSphere*, 4(6). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00645-19>
37. Tóth, T. (2017). A dual infection of two microscopic fungi on common milkweed (*Asclepias syriaca*) in Hajdúság region (East-Hungary). *Acta Agraria Debreceniensis*, 72, 189–195. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/72/1614>
38. Wisler, G. C., & Norris, R. F. (2005a). 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>
39. Wisler, G. C., & Norris, R. F. (2005b). 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:https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R1263&from=HU>

http2: <https://gd.eppo.int/taxon/ASCSY/distribution>

http3: <https://viralzone.expasy.org/135>

http4: <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus>

http5: <https://viralzone.expasy.org/10859>

8 Rövidítések jegyzéke

CMV – uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus)

EB – extrakciós puffer

FDE - xilene cianol, brómfenolkék, EDTA és deionizált formamid tartalmú festék

GPGV – szőlő Pinot gris vírus (Grapevine Pinot gris virus)

HSVd – komló törpülés vírus (Hop stunt viroid)

HTS – nagy áteresztőképességű szekvenálás (high-throughput sequencing)

NSP – nem struktúrális fehérje (non structural protein)

MP – mozgási fehérje (movement protein)

RT – reverz transzkriptáz

SOC – super optimal broth with catabolite repression

TMV – dohány mozaik vírus (Tobacco mosaic virus)

VP – virális fehérje (viral protein)

WHAV2 – Wuhan aphid virus 2

9 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Várallyay Évának és Nagyné Dr. Galbács Zsuzsannának a diplomamunkám elkészítéséhez nyújtott iránymutatásért, támogatásért és rengeteg segítségért. Köszönöm továbbá a MATE Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszék, Genomikai Kutatócsoport munkatársainak, valamint Grób Adél Borbálának a labormunkában nyújtott segítséget. A kutatást a NKFIH K146087 pályázata támogatta.

10 Ábrák és táblázatok jegyzéke

1. ábra: A selyemkóró termése és magjai (Grób Borbála felvétele).....	5
2. ábra: A selyemkóró elterjedése (http2).....	6
3. ábra: Az uborka mozaik vírus felépítése (http3).....	8
4. ábra: Az uborka mozaik vírus genomszerveződése (http3).....	9
5. ábra: A Jingmenvírusok feltételezett felépítése (http4).....	11
6. ábra: A WHAV2 genomszerkezete(Colmant, Charrel, et al., 2022a).	13
7. ábra: A mintavételi helyszíneken készített képek. Bal oldalon a kecskeméti, jobb oldalt pedig a csopaki terület látható.....	15
8. ábra: Vírusos megbetegedésre utaló tüneteket mutató minták.....	16
9. ábra: A CMV RNS1-re tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.	22
10. ábra: A CMV RNS2-re tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.	22
11. ábra: A CMV RNS3-ra tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.	23
12. ábra: A WHAV2 szegmens 1-re tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.	23
13. ábra: A WHAV2 szegmens 2-re tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.	23
14. ábra: A WHAV2 szegmens 3-ra tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.	23
15. ábra: A WHAV2 szegmens 4-re tervezett primerek által felamplifikált régió (kék vonal) a referenciagenomon.	23
16. ábra: pJET vektor felépítése.....	26
17. ábra: A csopaki minták totál nukleinsav tisztításának ellenőrzése gélelektroforézis segítségével. A gélkép a kutatás során vizsgált összes minta esetében pozitív eredményt mutatott.	28
18. ábra: A kecskeméti (bal oldal) és a csopaki (jobb oldal) terület poolok DNázos kezelése a gélkép alapján sikeres volt.	29
19. ábra: A CMV RNS1-3 lefedettsége a kecskeméti könyvtár eredményei alapján.	30
20. ábra: A WHAV2 szegmens 1-4 lefedettsége a csopaki könyvtár eredményei alapján.	30
21. ábra: A CMV RNS1-3 lefedettsége a csopaki könyvtár eredményei alapján.....	30
22. ábra: A kecskeméti mintákból szintetizált cDNS aktin tesztje. A teszt alapján a cDNS minősége a kutatás során vizsgált összes minta esetén megfelelő volt.	31
23. ábra: Pozitív lateral flow teszt. A tesztcsíkon jól látható a kontroll vonal és alatt a pozitív eredményt mutató teszt vonal is.	32
24. ábra: A tervezett primerek annellálási hőmérsékletének meghatározása a kecskeméti pool, CMV RNS1 esetében.	33
25. ábra: A CMV RNS1, RNS2 és RNS3 visszaigazolása a kecskeméti területről RT-PCR-el. Mindhárom RNS esetében a várt mérettartományban kaptam terméket.	33
26. ábra: A csopaki pool-ban a CMV mindhárom RNS-ét sikeresen visszaigazolam. Az RNS 1 esetében 1845 bp, az RNS 2-nél 1827 bp, az RNS 3-nál pedig 1831 bp méretű terméket sikerült amplifikálni.	34
27. ábra: CMV RNS1, RNS2, RNS3 ligálásának ellenőrzése restriktív emésztéssel.	34
28. ábra: Filogenetikai fa a CMV szekvenciák leszármazási viszonyainak feltárására. Az általam izolált vírusok két külön alcsoportba tartoznak.	35
29. ábra: Gradiens PCR a WHAV2 első szegmensének visszaigazolására tervezett primerekkel. A tervezett primerek minden vizsgált hőfokon működtek.	36

30. ábra: WHAV2 visszaigazolása RT-PCR-el.....	36
31. ábra: WHAV2 szegmens 2 kimutatása a selyemkóro egyed poolokból. A 7 egyedből 4 bizonyult fertőzöttnek. A bekarikázott minták esetében kaptunk a várt méretben (1196 bp) PCR terméket.	37
32. ábra: A WHAV2 szegmens 1 (bal oldal) és szegmens 2 (jobb oldal) szekvenciáival készített filogenetikai fák.....	38
1. táblázat: A csopaki területen gyűjtött mintákból tisztított nukleinsavak poolozása.....	17
2. táblázat: A kecskeméti területen gyűjtött mintákból tisztított nukleinsavak poolozása.	18
3. Táblázat A felhasznált primerek. Zölddel jelölve láthatóak az általam tervezett primerek.....	22
4. táblázat: AZ RNS HTS bioinformatikai elemzése során kapott vírusok (E-value=0).	29
5. táblázat: A kecskeméti és a csopaki területről gyűjtött selyemkóro egyedeken végzett lateral flow szerológiai gyorsteszt eredményei. A gyorsteszt alapján a pirossal jelölt egyedek bizonyultak fertőzöttnek.....	32

11 Nyilatkozatok

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Péri Lilla Dorottya
A Hallgató Neptun kódja: WYDP84
A dolgozat címe: A selyemkóró vírusrezervoár szerepe
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Növényvédelmi Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Növénykórtani Tanszék

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

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan 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 szellemitulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

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

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

Kelt: 2024. év 04. hó 18. nap


Hallgató aláírása

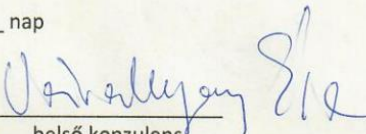
NYILATKOZAT

PÉRI LILLA DOROTTYA (név) (hallgató Neptun azonosítója: WYDP84)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a
záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót¹ 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 javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*3}

Kelt: GÖDÖLLŐ 2024 év 04 hó 18 nap


belső konzulens

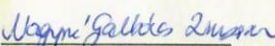
NYILATKOZAT

PÉRI LILLA DOROTTYA (név) (hallgató Neptun azonosítója: WYDP84)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a
záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót¹ 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 javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*3}

Kelt: GÖDÖLLŐ 2024 év 04 hó 18 nap


belső konzulens