



SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGUS MSC., NAPPALI TAGOZAT

A magyar és szlovén Raspberry Bushy Dwarf Virus vonalak összehasonlítása

Készítette:

Kenessey Zoárd Vitold

Belső témavezető:

Dr. Kiss Erzsébet

egyetemi tanár

Genetikai, Mikrobiológiai- és Biotechnológiai Intézet

Külső témavezető:

Dr. Várallyay Éva

csoportvezető

NAIK-MBK, Diagnosztikai
Csoport

Külső témavezető:

Baráth Dániel

PhD hallgató

NAIK-MBK, Diagnosztikai
Csoport

Gödöllő

2017

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés és célkitűzés	5
3. Irodalmi áttekintés	6
3.1. A vírusokról általánosságban	6
3.2. A vírusok fertőzése és replikációja	6
3.3. Vírus detektálási módszerek	7
3.3.1. Módszerek fejlesztése.....	7
3.4. A Raspberry Bushy Dwarf Virus	8
3.4.1. Az RBDV előfordulása.....	8
3.4.2. A vírus felépítése	9
3.4.3. A Raspberry Bushy Dwarf Virus fertőzése és tünetei.....	11
4. Anyag és módszer.....	13
4.1. A növényi minták	13
4.2. RNS kivonás	14
4.3. cDNS szintézis	16
4.4. Gradiens PCR.....	18
4.5. RBDV diagnosztikai PCR	18
4.6. Az RBDV köpenyfehérjéjét és mozgási fehérjéjét kódoló gének sokszorozása PCR-rel.....	19
4.7. PCR termékek izolálása gélből	20
4.8. Klónozás	21
4.8.1. Táptalajok	21
4.8.2. Ligálás	22

4.8.3.	Transzformálás.....	22
4.8.4.	A klónozás sikerességének ellenőrzése	23
4.8.4.1.	Kolónia PCR.....	23
4.8.4.2.	Plazmid izolálás	24
4.8.4.3.	Restrikciós emésztés	25
4.9.	Szekvenálás – nukleinsav sorrend meghatározás.....	25
4.10.	Bioinformatikai elemzések.....	25
5.	Eredmények és értékelésük	27
5.1.	RBDV fertőzés azonosítása	27
5.2.	Az RBDV CP és MP amplifikálása PCR-rel.....	28
5.3.	Az RBDV CP és MP klónozása	32
5.4.	Szekvenciák elemzése különböző bioinformatikai módszerekkel.....	34
5.4.1.	A köpenyfehérjét kódoló gének összehasonlítása.....	34
5.4.2.	A köpenyfehérje aminosav sorrendjeinek összehasonlítása	35
5.4.3.	A mozgási fehérjét kódoló gének összehasonlítása	36
5.4.4.	A mozgási fehérje aminosav sorrendjeinek összehasonlítása	38
6.	Következtetések és javaslatok	40
7.	Összefoglalás.....	41
	Köszönetnyilvánítás	42
	Irodalomjegyzék.....	43

1. Rövidítések jegyzéke

amp	ampicillin
bp	bázispár
cDNS	kópia (copy) DNS
CP	köpenyfehérje (coat protein)
dsDNS	kétszálú DNS (double-stranded)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
kDa	kilodalton
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
MP	mozgási fehérje (movement protein)
mRNS	messenger RNS
NGS	új generációs szekvenálás (Next Generation Sequencing)
nt	nukleotid
ORF	nyitott leolvasási keret (Open Reading Frame)
PCR	polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction)
qPCR	valós idejű PCR (real time, quantitative PCR)
RBDV	Málna bokros törpülés vírus (Raspberry Bushy Dwarf Virus)
ssRNS	egyszálú RNS (single-stranded)

2. Bevezetés és célkitűzés

A vírusok mint kórokozók régóta ismertek, de a velük kapcsolatos kutatások csak a XIX. század végétől kezdődtek meg. Az ellenük való védekezésben a megelőzésnek van a legnagyobb jelentősége. Ez magában foglalja a vírus vektorok (rovarok, nematódák stb.) és gyomok gyérítését, illetve a vírusmentes szaporítóanyag használatát is.

A Málna bokros törpülés vírus (Raspberry Bushy Dwarf Virus - RBDV) a málna egy jelentős kórokozója. Gazdasági szerepe abban rejlik, hogy fertőzés esetén csökken a növény vigora és a termés törékenysége miatt nehezebb a betakarítás. A vírust először 2003-ban detektálták szőlőn, ezzel bebizonyítva, hogy természetes úton képes fertőzni a *Rubus* nemzetségen kívüli fajt is. A jelenlegi kutatási eredmények szerint vektora nem ismert, csak pollennel, maggal és vegetatív úton terjed, ezért terjedésének megakadályozására az egyetlen védekezési módszer az anyanövények tesztelése. Az RBDV a málnán karantén kórokozóként van nyilvántartva, de a szőlőn való jelenléte hatóságilag nincsen szabályozva, ebből kifolyólag a szőlő szaporítóanyagot nem szükséges RBDV-re tesztelni.

A vizsgálataim során az RBDV vírussal foglalkoztam. A kutatásaimat a Kmetijski inštitut Slovenije (KIS) és a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet laboratóriumában végeztem.

Kutatásaim célja, hogy a szlovén és a magyar RBDV vonalakat megvizsgálva megfigyeljem, milyen eltérés figyelhető meg a málnát (*Rubus idaeus* L.) és a szőlőt (*Vitis vinifera* L.) fertőző vonalak között.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. *A vírusokról általánosságban*

A vírusok obligát intracelluláris paraziták, amelyeknek nincs önálló anyagcseréjük. Genomjuk lehet DNS vagy RNS, amely lehet egy- vagy kétszálú, illetve helikális és cirkuláris szerkezetű. A méretük kb. 10-400 nm nagyságú (a baktériumoknál jóval kisebb mérettartományba esnek, amelyek átlagosan 1000 nm-esek) /HORVÁTH & GÁBORJÁNYI 2000/.

A vírusok két alapvető részből állnak: nukleinsavból és köpenyfehérjéből. A köpenyfehérjék alkotják a vírus kapszidját, ami kapszomerekből épül fel, ez látja el az örökítőanyag védelmét. A nukleinsav és a hozzá kapcsolódó kapszid alkotják együttesen a nukleokapszidot. Bizonyos vírusoknál ez maga a virion. A vírusok egy részénél a nukleokapszidot körbeveszi a peplon (envelope), amely egy külső burok. Ebbe épülhetnek be a vírusspecifikus fehérjék és glikoproteinek /HORVÁTH & GÁBORJÁNYI 2000/.

A vírusoknak két megjelenési formája van. 1.) Virion: morfológiailag komplex, izoláltan fenntartható forma. 2.) Vegetatív vírus: a gazdasejtbe bejutott, replikációban részt vevő forma /HORVÁTH & GÁBORJÁNYI 2000/.

A vírusok genom mérete 2,6 kb (*Mastrevírusok*) és 19,3 kb (*Closterovírusok*) közötti lehet, a szatellit vírusoké kb. 1 kb /HULL 2014/.

3.2. *A vírusok fertőzése és replikációja*

A növényi vírus csak akkor tud a növény sejtjeibe behatolni, ha annak a sejtfa megsemmisül. Ehhez mechanikai sérülésre van szükség (rovarok, metszés, jégverés). A megtapadás 37°C-on a legintenzívebb, de 4°C-on is bekövetkezhet /NÉMETH 1986, HORVÁTH & GÁBORJÁNYI 2000/.

A sejtbe hatolást inokulációnak nevezik, ami nem egyenlő a fertőzéssel. A vírus az inokulációtól számított 10-12 órás periódusban lappang, nincsenek tünetek. Ezt az időszakot inkubációs fázisnak nevezzük. Az inokuláció után a vírusok dekapszidálódnak, az örökítőanyag szabaddá válik és megkezdődik a sokszorosodás. Az újonnan termelt nukleinsavakról megkezdődik a transzláció a riboszómában vagy a kloroplasztisban. Végül a nukleinsavak összeállnak a köpenyfehérjékkel, így alkotva fertőzőképes viriont /NÉMETH 1986/.

A fertőzés megjelenése (ami lehet klorózis, nekrózis vagy akár tünetmentes is maradhat) a növény érzékeny részein jellemző. A növény fogékony részeinek száma eltérhet még akár egy növényen belül is, pl. a levél korától és szintjétől függően /NÉMETH 1986/.

BALTIMORE 1971-es publikációja szerint a fertőzés során minden vírusnak át kell esnie az mRNS szintézisen /in HULL 2014/. Számos (+)ssRNS vírus, amint bejut a növényi sejtbe, mRNS-ként lép működésbe. Azok a vírusok, melyek ettől eltérő örökítőanyagot tartalmaznak [dsDNS, (-)ssRNS stb.] a gazdanövény transzkripcióját felhasználva szintetizálnak mRNS-t /HULL 2014/.

3.3. Vírus detektálási módszerek

A növényi vírus detektálási módszerek folyamatos fejlődésének ellenére viszonylag kevés technológiai újítást vettek át a tesztelő laboratóriumok rutinvizsgálataikhoz, habár az új módszereknek számos előnyük van /BOONHAM *et al.* 2014/.

A két legsikeresebben adaptált vírus diagnosztikai módszer az ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay) és a valós idejű polimeráz láncreakció (real time PCR) /BOONHAM *et al.* 2014/.

Nukleinsav hibridizációs módszereket gyakran alkalmaznak egyes vírusok, kiváltképp viroidok detektálásánál, de a legelterjedtebb módszerek PCR-alapúak /BOONHAM *et al.* 2014/.

3.3.1. Módszerek fejlesztése

A növényi vírus diagnosztikai módszerek fejlesztésének három fő irányvonala van:

1. Helyszínen vagy alacsony felszereltségű laborokban is végre lehet hajtani a vizsgálatot (pl.: LAMP = Loop-mediated Isothermal Amplification) (1. ábra).
2. Multiplex módszerek, melyekkel egy teszt során több vírust is ki lehet mutatni (pl.: Luminex bead arrays, PCR macroarray potato virus kit, BIOREBA) (2. ábra).
3. Ismeretlen szekvenciájú vírusok tesztelésére alkalmas módszerek (pl: új generációs szekvenálás – Next Generation Sequencing NGS) /BOONHAM *et al.* 2014/.



1. ábra: LAMP vizsgálathoz használt Genie® III. műszer /KENESSEY 2017/.



2. ábra: PCR macroarray potato virus kit, BIOREBA /SAJÁT FELVÉTEL/.

3.4. A Raspberry Bushy Dwarf Virus

3.4.1. Az RBDV előfordulása

A Málna bokros törpülés vírus (Raspberry Bushy Dwarf Virus, továbbiakban RBDV) az *Idaeovirus* genusba tartozik /HORVÁTH & GÁBORJÁNYI 2000/. Az örökítőanyaga pozitív egyszálú RNS [(+)ssRNS]. Az *Idaeovirus* jelenleg egyik rendbe sincs besorolva.

Az RBDV természetes gazdanövényei a *Rubus* nemzetség tagjai /ZIEGLER *et al.* 1991/ például a *R. ursinus*, a *R. loganobaccus* (Kaliforniai szedermálna) és *R. occidentalis* /MILUSEVA *et al.* 2012/. Számos fertőzött *Rubus* faj és fajta tünetmentes, viszont az érzékeny fajok és fajták a sárga kór (yellow disease) tüneteit mutatják /DERRICK *et al.* 2006/.

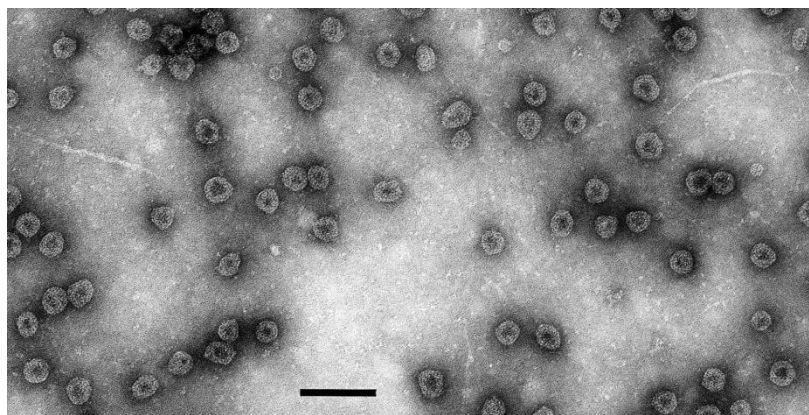
A világon először Szlovéniában /MAVRIČ *et al.* 2003/, majd a későbbiekben Magyarországon /PLEŠKO *et al.* 2012/ és Szerbiában /JEVREMOVIČ & PAUNOVIČ 2015/ is megtalálták az RBDV-t szőlőben, ezzel bebizonyítva, hogy az RBDV képes természetes módon fertőzni nem *Rubus* nemzetségbe tartozó növényeket is.

MAVRIČ PLEŠKO & VIRŠČEK MARN 2006-os munkájában hét fehér szőlő fajtában találták meg az RBDV-t: Fehér burgundi (White Pinot), Chardonnay, Olaszrizling (Italian Riesling), Malvázia (Istrian Malvasia), Rajnai Rizling (White Riesling), Sauvignon Blanc és Furmint. Későbbi kutatások során a fertőzést Pinot Noir egyedekben is megfigyelték. Természetes fertőzés során fedezték fel az RBDV-t *Rubus multibracteatus*-ban is /CHAMBERLAIN *et al.* 2003/.

Számos kétszikű növénybe át lehet vinni mesterségesen a vírust. JONES és munkatársai /1982/ a tesztelések során *Cydonia oblonga* (birs) és *Pyronia veitchii* növényeket alkalmaztak az RBDV kimutatására, mivel ezeken a növényeken jól megfigyelhetők voltak a tünetek /MAVRIČ PLEŠKO & VIRŠČEK MARN 2009/. *Fragaria vesca* (erdei szamóca) és *Prunus mahaleb* (sajmeggy) is fertőzhető, de ilyenkor a gazdanövényeken nem jelentkeznek tünetek. A vírus mechanikai úton is átvihető egyes gyomnövényekbe is /MAVRIČ PLEŠKO & VIRŠČEK MARN 2008/.

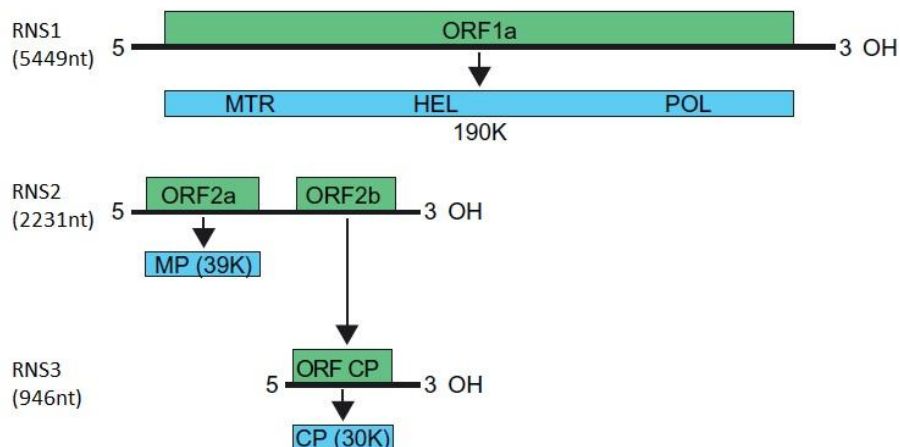
3.4.2. A vírus felépítése

Az RBDV egy izometrikus, kapsziddal rendelkező vírus (3. ábra), mely 33 nm átmérőjű, (+)ssRNS genomja osztott. A vírus három eltérő RNS-t tartalmaz (4. ábra) /Hull 2014/.



3. ábra: Az RBDV negatív kontrasztos elektronmikrográfias képe. A vonal 100 nm-nek felel meg /BARNETT & MURANT 1970/.

Raspberry bushy dwarf virus, RBDV



4. ábra: A Raspberry Bushy Dwarf Virus genomi felépítése. ORF: nyitott leolvasási keret (Open Reading Frame); MTR: metil-transzferáz; HEL: helikáz; POL: RNS-függő RNS-polimeráz; MP: mozgási fehérje (movement protein); CP: köpenyfehérje (coat protein) /HULL 2014/.

Az RNS-1 5449 nt hosszú és egy nyitott leolvasási keretet (Open Reading Frame – ORF) tartalmaz, ami egy nem strukturális poliproteint kódol (GenBank accession no. NC_003739). RNS-1 104-5188-ig kódolja a vírus RNS dependens RNS polimerázát. A transzlációs termék 190 kDa nagyságú, polimeráz, metil-transzferáz, valamint helikáz aktivitású fehérjék motívumait tartalmazza. Ebből arra következtettek, hogy az RNS-1 terméke részt vesz a replikációban /ZEIGLER *et al.* 1992/.

Az RNS-2 2231 nt hosszúságú (Genbank accession no. NC_003740). Két ORF található, az 5' ORF a mozgási fehérje (Movement Protein - MP), a 3' ORF a köpenyfehérje (Coat Protein - CP) kódoló régiót tartalmazza. Az RNS-2 3'ORF-je és az RNS-3 ORF-je megegyezik /NATSUAKI *et al.* 1991/. Az RNS-2 3'-végén található 18 nukleotid megegyezik az RNS-1 3'-végén található nukleotidokkal /ZEIGLER *et al.* 1992/. Emellett az RNS-1 és RNS-2 hasonló hurok szerkezetet mutat, valamint hasonló szekvenciák vannak jelen a hurokban /NATSUAKI *et al.* 1991/.

Az RNS-3, egy szubgenomikus RNS az RNS-2-ről keletkezik, 946 nukleotidból áll, egy ORF található meg benne /MAYO *et al.* 1991/, ami a vírus köpenyfehérjéjét kódolja /JONES *et al.* 1996/.

Az osztott genomnak számos előnye van:

- Az RNS-ek gyors rekombinációs újrendeződése
- A genom mérete megnövelhető (nincs enkapszidációs korlát)
- Csökken a mutagének hatása, javul az RNS replikáció megbízhatósága
- Könnyebb a transzláció önellenőrzése, a termékek arányainak önszabályozása
- A kis virionok vektorokkal könnyebben átvihetők, a növényben egyszerűbb a mozgásuk

Emellett hátránya is van az osztott genomnak: mechanikai átvitelük bonyolultabb, mivel ugyanabban a sejtben az összes komponensnek minimum egyszer meg kell lennie. Ez rovar- és mag általi fertőzésnél biztosított /HORVÁTH & GÁBORJÁNYI 2000/.

Filogenetikus elemzések alapján az RBDV-t jelenleg három csoportra oszthatjuk a teljes elérhető szekvenciák, valamint a CP és MP aminosav szekvenciái alapján. A málnát és szedret fertőző RBDV alkot egy csoportot, a szőlőben izolált RBDV, valamint a *Rubus multibracteatus* növényben talált vírus ágensek pedig külön-külön csoportba tartoznak /MAVRIČ PLEŠKO & VIRŠČEK MARN 2008/.

A málnát fertőző vírus ágensen belül két vonalat különböztetnek meg. Az egyiket törzsre jellemző, hogy a málna fajták nagy része rezisztens. Ezzel szemben a másik törzs képes olyan fajtákon is tüneteket produkálni, melyek ellenálltak az előbb említett törzs általi fertőzésnek /JEVREMOVIČ & PAUNOVIČ 2015/.

A vírusok különböző törzseinek főbb tulajdonságai megegyeznek. A gazdanövényeik általában hasonlóak, jobban vagy kevésbé reagálnak egymás antigénjeire és megjelenik a keresztvédelem, vagyis amikor a növény megfertőződött a szisztemikusan fertőző vírus egyik törzsével, a másik törzssel való fertőzés után nem jelentkeznek tünetek. A vírus törzsek antagonizmusa megjelenhet, míg a szinergizmus csak nem rokon vírusok között fordulhat elő /NÉMETH 1986/.

3.4.3. A Raspberry Bushy Dwarf Virus fertőzése és tünetei

Az RBDV a gazdanövények generatív szaporodása során képes terjedni. A vírus továbbvihető akár pollennel, akár maggal, így képes az utódnövényeket és a megporzott anyanövényeket is megfertőzni. Kutatások bebizonyították, hogy a virágzásban gátolt málna egyedek nem fertőződtek meg, míg a virágzásban nem gátolt egyedek igen, így a pollen tűnik az egyetlen természetes vírusterjedési módnak /MURANT *et al.* 1974/. Eddig nem ismert egyetlen állati vektor

sem (kivéve a megporzó rovarokat) /MURANT *et al.* 1974/. Azóta több kutatócsoport is kereste a vektorokat, de még nem találtak, bár Szlovéniában kimutatták az RBDV-t *Longidorus juvenilis* fonálféregben, melyeket RBDV-vel fertőzött szőlőültetvényben gyűjtöttek, viszont eddig még nem bizonyított, hogy a fonálféreg képes-e fertőzni ezzel a vírussal /MAVRIČ PLEŠKO & VIRŠČEK MARN 2008/.

Az RBDV által okozott tünetek az alábbiak lehetnek: levélsodródás, nekrozis, korai levélhullás, csökken a vigor, a termés törékennyé válik, oldalhajtások elhalnak, nő a fagykár (5. és 6. ábra) /JONES & MAYO 1998, JONES 2000 in MAVRIČ PLEŠKO & VIRŠČEK MARN 2008/.



5. ábra: Az RBDV tünete málnán

/SAJÁT FELVÉTEL/.



6. ábra: Az RBDV tipikus tünete szőlőn

/MAVRIČ PLEŠKO & VIRŠČEK MARN 2009/.

Enyhe tünetek esetén csökkenhet a termés minősége, főleg, ha a gazdanövény egyszerre több vírussal fertőződött meg /JEVREMOVIČ & PAUNOVIČ 2015/. A fertőzött pollennel való megtermékenyítés növelte a málna összetett termésének terméske abortálódását, attól függetlenül, hogy az anyanövény egészséges volt-e vagy sem. Az RBDV fertőzés nem mindig vezet a bogyók lehullásához. Valószínűleg a megtermékenyítés idején ható környezeti tényezők is befolyásolják azt /MURANT *et al.* 1974/.

A névadó törpe bokrosodás tünet csak akkor jelentkezik, ha az egyed RBDV-vel és *Black Raspberry Necrosis Virus*-sal egyszerre fertőződött /MARTIN *et al.* 2013/.

4. Anyag és módszer

4.1. A növényi minták

A vizsgált növényi mintáink szlovén és magyar lelőhelyről gyűjtött szőlő és málna növények. A Kmetijski inštitut Slovenije (KIS) jóvoltából egy szlovén szőlőt (7. ábra), egy szlovén málnát és két magyarországi szőlőt vizsgáltam.



7. ábra: A szlovén szőlő minta /LAMOVSÉK 2017/.

A képen látható szőlő levél vírusfertőzés tüneteit mutatja. Mivel vizsgálataim nem terjedtek ki az RBDV kívüli patogének tesztelésére, más vírus jelenléte sem zárható ki.

A Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetétől (NAIK-MBK) származik egy további szőlő és egy málna minta (8. ábra). A vizsgált növények vírusfertőzés tüneteit mutatták. A Magyarországon gyűjtött mintákat egész levélként csomagoltuk el egyesével alufóliákba, a Szlovéniában gyűjtött mintákat előzőleg folyékony nitrogénben szétmorzszoltuk, majd Eppendorf csövekbe helyezve tároltuk -70°C-on.



8. ábra: RBDV tüneteit mutató málna Szadáról /SAJÁT FELVÉTEL/.

A KIS és az MBK laborjaiban alapvetően ugyanazt a folyamatot végeztem el, viszont más protokollt követve, így a továbbiakban két módszer leírása található.

A minták esetében az alábbi egyszerűsített elnevezést használom.

1. táblázat: A vizsgált minták elnevezése és származása.

A minta neve:	Növény:	Származási hely:
Vitis_SI	Szőlő	Lipje (Velenje, Szlovénia)
Vitis_HU	Szőlő	Szegilong (Borsod-Abaúj-Zemplén megye)
Vitis_HU1	Szőlő	Csörnyeföld (Zala megye)
Vitis_HU2		
Rubus_HU	Málna	Szada (Pest megye)
Rubus_SI	Málna	Brdo (Szlovénia)

4.2. RNS kivonás

A növényi mintákból a további vírusdiagnosztikához első lépésként RNS-t tisztítottam.

Szlovéniában MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) protokoll segítségével tisztítottam RNS-t. Ehhez az alábbi előkészületeket végeztem el:

- *Bead mix*: mintánként 10 µl RNA Binding Beads-hez 10 µl Lysis/binding enhancer-t mértem. Felhasználásig jégen tároltam.
- *TURBO DNase solution*: a MagMAX TURBO DNase pufferből 49 µl-t mértem ki, amihez 1 µl TURBO DNase-t adtam. A reagenseket vortexeltem és szobahőmérsékleten tároltam.
- *Lysis/Binding Solution*: 90 µl Lysis Binding Solution Concentrate és 10 µl Plant RNA Isolation Aid elegye. Az összemérés után alaposan elkevertem.
- Minta előkészítés: 100 mg -80°C-on tárolt mintát 2 ml-es Eppendorf csőbe mértem, majd 100 µl Lysis/Binding Solution pipettáztam rá és két db 5 mm-es rozsdamentes acél golyót helyeztem bele. Ezeket a mintákat elhelyeztem a MixerMill-be (Qiagen), ami 3 percen keresztül 30 Hz-en rázatta a tesztcsöveket. Ennek leteltével 10 percig centrifugáltam 1000 g-n.
- A plate feltöltése: A plate-re soronként az adott reagenseket pipettáztam bele.

Sor	Mennyiség (µl)	Reagens
A	50	Növényi kivonat
	35	Izopropanol
	20	Bead Mix
B	150	Wash solution 1
C	150	Wash solution 2
D	50	DNaze oldat
E	150	Wash solution 2
F	150	Wash solution 2
G	50	Elution puffer

Kb. 15 perc után a D sorba RNA Re-binding solution-t kellett mérni. A kivont RNS-t a H sor tartalmazta. Az RNS minőségének ellenőrzését munkatársaim végezték Bioanalysert használva.

A NAIK-MBK intézetében GAMBINO *et al.* módosított módszerével vontam ki RNS-t /2008/. Első lépésben előkészítettem az RNS kivonás során szükséges eszközöket és reagenseket: folyékony nitrogén, jég, pipetták, pipettahegyek, dörzsmozsarak, pisztillusok, Eppendorf csövek (1,5 ml-s, 2 ml-s), extrakciós puffer, β-merkaptotetanol, kloroform-izoamilalkohol (24:1), 9M

LiCl, SSTE, izopropanol, 4M-os Na-acetát (pH:5,2), 70%-os alkohol, MQ víz. A vízfürdőt és a termoblokkot 65°C-ra előmelegítettem, a centrifugát 4°C-ra előhűtöttem.

150-200 g levélmintát homogenizáltam egy folyékony nitrogénnel lehűtött dörzsmozsárban, amihez adtam 17 µl β-merkaptotetanolt és 850 µl, vízfürdőben előmelegített extrakciós puffert, áttöltöttem egy 2 µl-es Eppendorf csőbe és erősen vortexeltem. 10 percig rázattam a 65°C-os vízfürdőben, közben vortexeltem. Ezután 850 µl, jégen tartott kloroform-izoamilalkoholt (24:1) mértem hozzá és óvatosan elkevertem. 10 000 rpm-en 10 percig centrifugáltam 4°C-on, közben új 2 ml-es tesztcsöveket készítettem elő. Az új csövekbe 800 µl kloroform-izoamilalkoholt (24:1), majd arra a felülúszót mértem és óvatosan elkevertem. Újra centrifugáltam 10 000 rpm-en 10 percig és 4°C-on, eközben új 1,5 ml-es Eppendorf csöveket készítettem elő. Minden csőbe 250 µl 9M-os LiCl-t mértem. Erre pipettáztam rá 450 µl felülúszót és óvatosan döntögetve összekevertem, majd 30 percre jégre helyeztem. Ezalatt felmelegítettem az SSTE-t 65°C-ra. A fél óras inkubálás végén 13 000 rpm-en 4°C-on 20 percig centrifugáltam a mintákat. A felülúszót leöntve a csapadékra mértem 450 µl felmelegített SSTE-t, vortexeltem, ezt követően további 450 µl kloroform-izoamilalkoholt (24:1) adtam hozzá és óvatosan összekevertem. 10 percig 4°C-on centrifugáltam 10 000 rpm-en, miközben új 1,5 ml-es teszt csöveket készítettem elő. Az új csövekbe mintánként 280 µl izopropanolt és 30 µl 4M-os Na-acetátot pipettáztam, majd erre mértem rá kb. 400 µl felülúszót. Óvatosan forgatva elkevertem és 5-10 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. A következő lépésben 20 percig 4°C-on 13 000 rpm-en centrifugáltam. Miután leöntöttem a felülúszót, rámértem 1 ml hideg etanolt és újabb 5 percig centrifugáltam 13 000 rpm-en 4°C-on. Ennek végeztével leöntöttem az alkoholt a tesztcsövekből és törlőpapíron lecsöpögtettem azokat, majd 10 percig szárítottam a mintákat vákuumcentrifugában. Végül 25 µl MQ vízben visszaoldottam a terméket és vortexeltem. Az RNS izolálás sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. A mintákat gélre való felvitel előtt a következőképpen kezeltem: 5 µl FDE festék, 2 µl MQ víz, 3 µl izolált RNS, majd denaturáltam 5 percig 65°C-on. A denaturált RNS-eket 1,2%-os gélen futtattam 115V feszültségen.

4.3. cDNS szintézis

Ahhoz, hogy az RNS vírusok adott szakaszait DNS polimerázzal amplifikálni tudjam, az RNS molekulákat cDNS-é írtam át RNS-dependens DNS polimerázzal.

A KIS-nél High Capacity cDNA Arcive kit (Applied Biosystem) segítségével készítettem cDNS-t. A reakció elegybe mintánként az alábbiakat mértem bele: 2,5 µl Random Primer Buffer, 1 µl dNTP, 2,5 µl RT buffer, 1,25 µl RNase inhibitor, 1,25 µl Multiscribe Reverse Transcriptase, valamint 14,5 µl MQ víz. A végtérfogat 23 µl + 2 µl RNS templát. A reakcióelegyet steril körülmények között mértem össze, hogy elkerüljem a környezetben jelen lévő nukleinsavakkal való kontaminációt. A steril boxot UV fénnyel, valamint 70%-os alkohollal sterilizáltam. Az RNS templátot egy másik helységben adtam hozzá egy lamináris boxban. Az RNS templátot végig hűthető blokkban tartottam, hogy meggátoljam annak degradációját. Miután a reakcióelegyet összemértem, lecentrifugáltam, majd egy PCR készülékben a következő protokollt alkalmaztam:

- 25°C 10 min
- 37°C 120 min
- 85°C 5 min
- 4°C ∞

A további vizsgálataim során az így kapott cDNS-t használtam.

A NAIK-MBK laboratóriumában Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase-t használtam (Thermo Fisher Scientific). Az Eppendorf csőbe 500 ng mennyiségnek megfelelő RNS-t mértem be, amihez 0,25 µl random primert adtam. Ezt kiegészítettem MQ vízzel 3 µl-re. Ezt 65°C-on denaturáltam 5 percen keresztül, majd jégre helyeztem. Ezután hozzáadtam 1 µl Reaction Buffer-t, 0,25 µl RiboLock RNase Inhibitor-t, 0,5 µl dNTP-t, 0,25 µl RevertAid reverz transzkriptázt.

A cDNS szintézishez a mintáimat PCR készülékbe helyeztem és a következő protokollt hajtottam végre:

- 25°C 10 min
- 42°C 60 min
- 45°C 10 min
- 70°C 10 min
- 4°C ∞

A reakció végeztével tízszeresére hígítottam a terméket és azzal dolgoztam a továbbiakban.

4.4. *Gradiens PCR*

A Q5 enzim (New England Biolabs® Inc.) a többi DNS polimerázhoz viszonyítva sokkal magasabb hőmérsékleten aktív. Annak eldöntésére, hogy milyen primer-kapcsolódási hőmérséklet az optimális a CP és MP kódoló szakaszok polimerizációjához, a NAIK-MBK laborjában gradiens PCR-t végeztem. A mix mintánként: 9 µl MQ, 3 µl Q5 Buffer (5x), 1 µl Forward primer (CP: CPUP, MP: MPUP, 10 µM), 1 µl Reverse primer (CP: RNA 1,2 LO, MP: MPLO, 10 µM), 0,3 µl dNTP (10 mM), 0,2 µl Q5 enzim és 0,5 µl templát. A végtérfogat 15 µl.

A PCR-hez az alábbi protokollt alkalmaztam:

- | | | | |
|---|---------|--------|-------|
| • | 98°C | 30 sec | |
| • | 98°C | 10 sec | } 40x |
| • | 52-60°C | 20 sec | |
| • | 72°C | 1 min | |
| • | 72°C | 2 min | |
| • | 4°C | ∞ | |

Primerpáronként hat eltérő hőmérsékletet alkalmaztunk, melyek az alábbiak voltak: 52°C; 52,7°C; 54,5°C; 56,5°C; 58,5°C; 59,8°C.

4.5. *RBDV diagnosztikai PCR*

Annak eldöntésére, hogy az adott mintánk tartalmazza-e az RBDV-t, diagnosztikai PCR-t végeztem el. A PCR során keletkezett termék azt jelzi, hogy a mintában megtalálható a vírus örökítőanyaga.

Szlovéniában a PCR reakcióhoz Fermentas Kit-et használtam (Thermo Fisher Scientific). Mintánként az alábbiakat mértem össze: 2,5 µl 2(NH₄)₂SO₄ PCR buffer, 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP (10mM), 0,2 µl Forward primer (RBDV_F, 100 µM), 0,2 µl Reverse primer (RBDV_R, 100 µM), 0,3 µl Taq DNS Polymerase (5 U/µL), 17,3 µl MQ. Ehhez adtam hozzá 2 µl-t a cDNS mintákból.

Az alábbi PCR programot állítottam be:

- 94°C 5 min

- 94°C 30 sec
 - 55°C 45 sec
 - 72°C 1 min
 - 72°C 7 min
 - 4°C ∞
- } 40x

A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen választottam el.

Magyarországon a diagnosztikai PCR során Phire enzimet használtam (Thermo Fisher Scientific). Az alábbi mixet mértem össze: 9,4 µl MQ, 3 µl Phire Buffer (5x), 0,75 µl Forward primer (RBDV_F, 100 µM), 0,75 µl Reverse primer (RBDV_R, 100 µM), 0,3 µl dNTP, 0,3 µl Phire Enzyme, 0,5 µl templát.

Ehhez a reakcióhoz az alábbi protokollt alkalmaztam:

- 98°C 30 sec
 - 98°C 10 sec
 - 55°C 10 sec
 - 72°C 20 sec
 - 72°C 1 min
 - 4°C ∞
- } 40x

A PCR végeztével a terméket 1,2%-os agaróz gélen választottam el.

4.6. Az RBDV köpenyfehérjéjét és mozgási fehérjéjét kódoló gének sokszorozása PCR-rel

Azért, hogy a különböző gazdanövényről és földrajzi helyről származó RBDV variánsokat összehasonlíthassuk, PCR segítségével felsokszoroztam a vírus köpenyfehérjéjét és mozgási fehérjéjét kódoló géneket.

A diagnosztikai PCR során RBDV pozitívnak bizonyuló minták köpenyfehérjéjét (CP) és mozgási fehérjéjét (MP) kódoló vírusdarabokra specifikus PCR-t készítettem. A KIS laborjában a mix az alábbiak szerint tevődött össze: 12,5 µl Phusion Flash MM (Thermo Fisher Scientific), 1,25 µl Forward primer (CP: CPUP, MP: MPUP, 10 µM), 1,25 µl Reverse primer (CP: RNA 1,2 LO, MP: MPLO, 10 µM), 8 µl MQ, valamint 2 µl cDNS. A végtérfogat 25 µl.

Az alkalmazott primerek szekvenciái:

- CP: **CPUP** - CGGTACTGGTGAGGTGTATTT
 RNA1,2LO – GGGGTTTGCTCAGCAAAC
- MP: **MPUP** – CTGGACATCTCGAGTTTGC
 MPLO - CGATTGGTGGAACAGCT

A PCR protokoll mindkét esetben az alábbi volt:

- 95°C 5 min
 - 94°C 1 min
 - 55°C 1,5 min
 - 72°C 1,5 min
 - 72°C 7 min
 - 4°C ∞
- } 40x

Magyarországon Q5 enzimmel szintetizáltam a CP-t és MP-t kódoló szakaszokat. A mix összetétele: 12 µl MQ, 4 µl Q5 Buffer (5x), 1,3 µl Forward primer (CP: CPUP, MP: MPUP, 10 µM), 1,3 µl Reverse primer (CP: RNA 1,2 LO, MP: MPLO, 10 µM), 0,4 µl dNTP (10 mM), 0,27 µl Q5 enzim és 0,5 µl templát. A végtérfogat 20 µl.

A protokoll:

- 98°C 30 sec
 - 98°C 10 sec
 - 56,5°C (CP), 58,5°C (MP) 20 sec
 - 72°C 1 min
 - 72°C 2 min
 - 4°C ∞
- } 40x

A PCR termékeket 1%-os (Magyarországon 1,2%-os) agaróz gélen választottam el, majd a pozitív mintákból a PCR terméket kivágtam és -20°C-on tároltam a gél darabokat a gélből való tisztításig.

4.7. PCR termékek izolálása gélből

Ahhoz, hogy a PCR termékeket klónozni tudjam, azokat agaróz gélből izoláltam.

A mintákat mindkét helyen a GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Sciences) használatával izoláltam.

A gél darabhoz 1:1 arányban adtam Binding Buffer-t (pl 100 mg-hoz 100 µl Buffer-t). Ezt 10 percre 57°C-ra állított termo rázatóba helyeztem. Időnként ellenőriztem, hogy a gél mennyire olvadt fel. Miután a gél felolvadt, az elegyet GeneJET Kit DNS-kötő oszlopára pipettáztam át. Ezt 1 percig 13 100 g-n centrifugáltam szobahőmérsékleten. Az átszűrődött folyadékot kiöntöttem, az oszlopot ugyanabba a csőbe visszahelyezem. Rámértem 700 µl Wash Buffer-t, szintén 1 percig centrifugáltam, majd leöntöttem a folyadékot a tesztcső aljából és az oszlopot visszatéve újabb 1 percig centrifugáltam. Végül a membránt áthelyeztem egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, 50 µl Elution Buffer-t mértem a membránra és újabb 1 percig centrifugáltam. Az így izolált PCR termékeket felhasználásig -20°C-on tároltam.

A NAIK-MBK laborjában némi módosítással használtam ugyanezt a Kit-et. Kezdetben 65°C-on olvasztottam a gélt egy termoblokkban. Az összes centrifugálás 75 másodpercig és 13 400 rpm (Eppendorf Mini Spin) ment végbe. A legvégén 25 µl Elution Bufferben eluáltam a terméket. A centrifugálás után visszapiptáztam az átfolyt puffert a membránra és megismételtem az utolsó lépést a hatékonyabb elúció érdekében.

4.8. Klónozás

4.8.1. Táptalajok

A KIS-nél három különböző táptalajt készítettem. Az első, szilárd médiumot a transzformált *E. coli* baktériumok kitenyésztéséhez alkalmaztam. Ebben agart tartalmazó 35 g/l LB broth található. Ehhez autoklávozás után, amint 40°C alá hűlt a táptalaj, 150 mg/l ampicillint és 800 µl/l X-galt mértem. Ezután szétosztottam műanyag Petri-csészékbe, hagytam megszilárdulni, majd a használatig 4°C-on tároltam.

A másik két táptalaj annyiban különbözött, hogy az egyikbe 20 g/l LB Broth és 150 mg/l ampicillin került, míg a másikhoz nem adtam ampicillint. Az előbbi a transzformált baktériumok folyékony kultúrájához, míg az utóbbit a pozitív kontrollhoz alkalmaztam.

A NAIK-MBK intézetében CloneJET PCR Cloning Kit-et használtam (Thermo Fisher Scientific). A ligálást 10 µl végtérfogatba mértem össze a következőképpen: 4 µl gélből tisztított

PCR termék, 0,5 µl pJET vektor, 5 µl Reaction Buffer, 0,5 µl ligáz. Ennek elkészítése után fél órán át szobahőmérsékleten inkubáltam.

4.8.2. Ligálás

A ligálás során a klónozni kívánt templátot plazmidba juttatom, amelyet a kompetens sejtek a transzformálás révén felvesznek.

A KIS-nél a One Shot Top10 Cloning Kit-et használtam (Thermo Fisher Scientific). 4 µl gélből tisztított PCR termékhez adtam 1 µl Salt solution-t és 1 µl TOPO TA vektort. Minimum 30 percet inkubáltam szobahőmérsékleten.

A NAIK-MBK intézetében CloneJET PCR Cloning Kit-et használtam (Thermo Fisher Scientific). A mix az alábbiakból tevődött össze: 4 µl gélből tisztított PCR termék, 0,5 µl pJET vektor, 5 µl Reaction Buffer, 0,5 µl ligáz. A végtérfigat 10 µl. Ennek elkészítése után fél órán át szobahőmérsékleten inkubáltam.

4.8.3. Transzformálás

A transzformálás során a templátot tartalmazó plazmidot kompetens sejtekbe juttatjuk.

A KIS-ben a vízfürdőt előmelegítettem 42°C-ra, a SOC tápoldatot és a plate-eket kivettem a 4°C-ról szobahőmérsékletre. A Kit tartalmaz TOP10 kompetens *E. coli* sejteket, tesztcsővenként 50 µl-t. Ezeket -80°C-on tároljuk. A transzformáláshoz kivettem annyi csövet, amennyi mintám volt és plusz egyet a pozitív kontrollnak. A kompetens sejteket jégen olvasztottam fel, majd a centrifuga short spin funkciójával centrifugáltam. Minden kompetens sejthez adtam 2 µl ligáló mixet (a pozitívba 1 µl-t) közvetlenül, nem pipetázva. Ezután 30 percig inkubáltam jégen, majd fél percig a 42°C-os vízfürdőben, utána visszatettem még két percre a jégre.

A következő lépésben lamináris boxban minden tesztcsőhöz 250 µl SOC folyékony táptalajt, a pozitív mintához 900 µl ampicillin mentes táptalajt adtam, majd egy órán át 37°C-on rázattam 225 rpm-en. Az egy óra elteltével Petri-csészékben szélesztettem a transzformálás termékét. Mintánként két plate-et használtam, az egyikben 50 µl, a másik plate-en 100 µl transzformált sejtet szélesztettem, majd 37°C-ra helyeztem inkubálni egy éjszakán át.

A NAIK-MBK laborjában 100 µl kompetens sejtet 10-15 perc alatt jégen felolvasztottam, majd egy 15 ml-es műanyag csőbe belemértem 5 µl ligálást és 100 µl kompetens sejtet, majd

jégen inkubáltam. 20 perc eltelteével 30 másodpercig 42°C-on hősokkoltam a baktériumokat, ezután 0,5 ml SOC tápoldatot adtam hozzá és 40 percig rázattam 37°C-on. A rázatás ideje alatt a plateket 4°C-ról kivettem és szobahőmérsékletre helyeztem. A rázatás végeztével a lamináris boxban minden plate-re 300 µl szuszpenziót mértem rá és szélesztettem ki. Végül 37°C-on inkubáltam egy éjszakán keresztül.

4.8.4. A klónozás sikerességének ellenőrzése

4.8.4.1. Kolónia PCR

A kolónia PCR segítségével ellenőrizni tudjuk, hogy a transzformálás után kinőtt telepek tartalmazzák-e a kívánt templátot.

Kolónia PCR-t csak a KIS-nél végeztem. Az itt használt TOPO vektor, kék-fehér szelekciót tesz lehetővé. Transzformánsokként 5-5 telepet kiválasztottam, megjelöltem a plate-en és készítettem egy kolónia PCR-t. Ehhez az alábbi mixet mértem össze mintánként: 10 µl Taq polimeráz, 0,1 µl Forward Primer (CP: RBDV-F és RBDV-R; MP: CPUP, MPLO), 9,8 µl MQ.

A PCR protokoll mindkét esetben az alábbi volt:

- | | | | |
|---|------|---------|-------|
| • | 95°C | 1 min | |
| • | 95°C | 1,5 sec | } 35x |
| • | 55°C | 1,5 sec | |
| • | 72°C | 30 sec | |
| • | 72°C | 7 min | |
| • | 4°C | ∞ | |

A kolónia PCR termékeket 1%-os agaróz gélen futtattam. CP esetében 250 bp, MP-nél pedig 200 bp hosszúságú terméket kaptunk. Transzformánsokként minimum három pozitív terméket teszteltünk, hogy megbizonyosodjunk a transzformálás sikerességéről.

A pozitív telepekből folyékony kultúrát készítettem, ehhez egy-egy telepet steril pipetta hegygel a megjelölt telepekből felszedtem és belehelyeztem a pipettahegyet egy kémcsőbe, ami 5 ml LB Broth táptalajt tartalmazott. Ezeket 37°C-on egy éjszakán át rázattam.

A NAIK-MBK-nál pJET vektort használtam. Ennek klónozó tartományában egy letális gén található. Ha nem épül be az inszert, nem nő ki a baktérium, emiatt nincs szükség kolónia PCR-re. Kiválasztottam 2-2 különálló, nagy telepet, majd egy steril fogpiszkálóval egy-egy csíkot

húztam egy LB + amp. plate-re. A fogpiszkálót ezután egy üvegbe helyeztem, ami 3 ml LB Broth+amp táptalajt tartalmazott. A master plate-et 37°C-on inkubáltam egy éjszakán át. A folyékony kultúrát szintén 37°C-on rázattam egy éjszakán keresztül.

4.8.4.2. Plazmid izolálás

A plazmid izolálás során az *E. coli* baktériumokból kinyertem a plazmidokat, amelyek tartalmazzák a kívánt DNS szakaszt, amelyet későbbiekben szekvenáltattunk.

A KIT-ben az egy éjszakán át tartó rázatás után a GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével plazmidot izoláltam.

4 ml folyékony kultúrát két darab 2 ml-es Eppendorf csőbe töltöttem, majd 2 percig maximum sebességen centrifugáltam (13 400 rpm) és a felülúszót eltávolítottam a pelletről. Az azonos mintákat tartalmazó tesztesővek egyikébe belemértem 250 µl Resuspension Solution-t és fel-le pipettázással reszuszpendáltam a pelletet, majd ezt átmértem a másik, azonos mintát tartalmazó csőbe és az abban található pelletet is reszuszpendáltam. A következő lépésben 250 µl Lysis Solution-t (lízis oldat)mértem a csővekbe, majd óvatosan 4-6x megforgattam, amíg kissé ki nem tisztult és 5 percen belül hozzámértem 350 µl Neutralization Solution-t (semlegasító oldat). Szintén óvatosan megforgattam kb. 6x a csöveket. Ezek után 5 percig centrifugáltam és a felülúszót átpipettáztam egy GeneJet Spin oszlopra. Egy percig centrifugáltam, majd az átszűrődött folyadékot kiöntöttem, az oszlopot ugyanabba a csőbe visszahelyeztem. Rámértem 500 µl Wash Buffer-t, egy percig centrifugáltam, leöntöttem az átszűrődött frakciót és megismételtem újra a mosást. Miután leöntöttem a folyadékot a teszteső aljából, a membránt visszatéve újabb 1 percig centrifugáltam. Végül a membránt áthelyeztem egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, 50 µl Elution Buffer-t mértem a membránra és újabb 1 percig centrifugáltam. Az így kitisztított plazmidot felhasználásig -20°C-on tároltam.

A maradék folyékony kultúrát áttöltöttem egy 2 ml-es tesztesőbe, 750 µl glicerint mértem rá és eltettem -80°C-ra. Az így eltárolt folyékony kultúrák a későbbiekben szükség esetén újra felhasználhatóak lehetnek.

Magyarországon a NucleoSpin® Plasmid Kitet (Macherley – Nagel) használtam. Mintánként 1,5 ml folyékony kultúrát mértem egy 1,5 ml-es teszt csőbe, amit 1 percig centrifugáltam 13 400 rpm (Eppendorf Mini Spin). A felülúszót leöntöttem és újabb 1,5 ml kultúrát mértem rá és ismételten centrifugáltam. A felülúszó leöntése után maradt csapadékra 250 µl Buffer A1-et

mértem és fel-le pipettázással reszuszpendáltam a pelletet. A következő lépésben 250 µl Buffer A2-t adtam hozzá és kb. 6-szor megforgattam a csöveket. 5 percen belül hozzámértem 300 µl Buffer A3-at és a csöveket addig forgattam, míg a kék szín teljesen el nem tűnt.

A mintákat 10 percen át centrifugáltam 13 400 rpm-en és a felülúszót átmértem egy oszlopra, amit 75 másodpercen át centrifugáltam. Az átszűrődött frakciót kiöntöttem, az oszlopot visszahelyeztem ugyanabba a csőbe. A mosásnál először 500 µl Buffer AW-t mértem rá, centrifugáltam 75 sec-on át és leöntöttem az átszűrődött frakciót, majd ugyanezt megismételtem 600 µl Buffer A4-gyel. A membrán szárításához 4 percen át centrifugáltam az oszlopokat mosó puffer nélkül. Az utolsó lépésnél 50 µl MQ vízben eluáltam a terméket. Centrifugálás után visszapiptáztam az átfolyt MQ vizet a membránra és megismételtem az utolsó lépést.

4.8.4.3. Restrikciós emésztés

Restrikciós emésztést használtam az inszert klónozáshoz használt plazmidba való ligálásának ellenőrzésére.

Szlovéniában a mintákat TOPO TA (Thermo Fisher Scientific) vektorba ligáltam, amely multiklónozó helyének mindkét oldalán megtalálható az EcoR I. hasítóhely, ezért EcoR I. enzimet használtam az emésztéshez. A reakcióhoz mintánként az alábbiakat mértem össze: 1 µl EcoR I. Buffer, 0,1 µl EcoR I. enzim (Thermo Fisher Scientific), 7 µl MQ víz és 2 µl plazmid.

A magyarországi mintákat pJET (Thermo Fisher Scientific) vektorba ligáltam. Az emésztéshez az alábbi mixet készítettem mintánként: 2 µl Tango Buffer, 0,4 µl Xba I., 0,2 µl Xho I. (Thermo Fisher Scientific), 5,4 µl MQ víz és 2 µl templát.

A mixet 37°C-on 1 órán át inkubáltam.

Az emésztés sikerességének ellenőrzéséhez a tisztított plazmidból mintánként 2 µl-t festettem meg 2 µl DNS festékkel, míg az emésztett termék teljes 10 µl-es mennyiségét festettem meg 2 µl DNS festékkel az Eppendorf-csőben. Ezután az emésztett és az emésztetlen termékeket egymás mellett 1,2%-os agaróz gélen választottam el.

4.9. Szekvenálás – nukleinsav sorrend meghatározás

A szekvenálás Sanger-féle enzimatisz szekvenálással történt, a BIOMI Kft által.

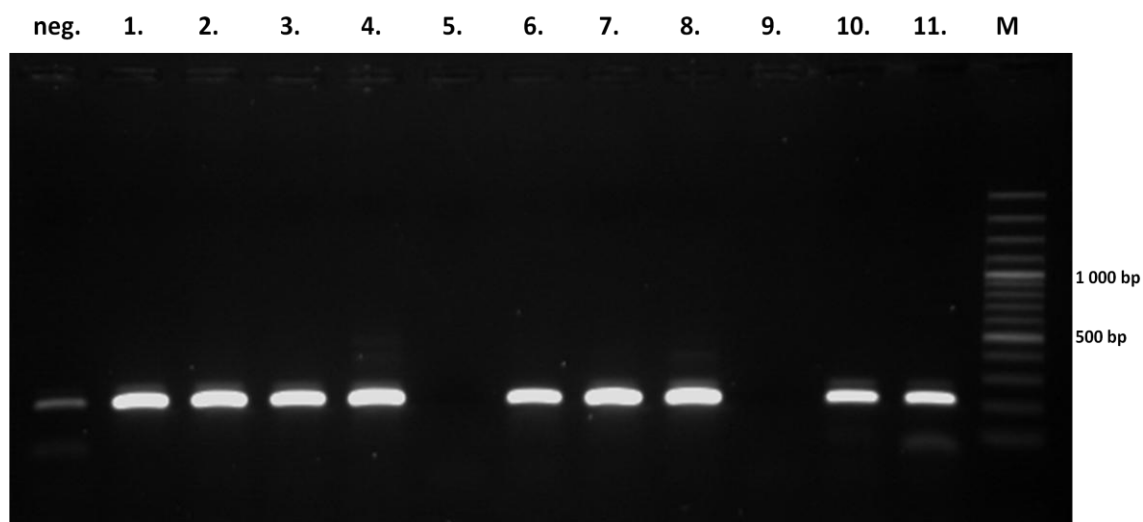
4.10. Bioinformatikai elemzések

A Sagner szekvenálás eredményét kromatogram formájában kaptam meg a BIOMI Kft-től. Ezeket a kromatogramokat Chromas program segítségével nyitottam meg, majd az NCBI honlapján található BLAST programmal (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) hasonlítottam össze a vírus referencia genomjának adott génjével. Az így azonosított szekvenciákat a Clustal Omega online program használatával hasonlítottam össze (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), melynek eredményeként az adott génekre nézve százalékos egyezőséget kaptam. Az aminosav sorrendet EMBOSS Transeq-kel (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) fordítottam le, és az így kapott aminosav sorrendeket szintén a Clustal Omega programmal hasonlítottam össze, így megfigyelhettem a százalékos egyezőségeket egymáshoz képest. A génekből és az aminosav sorrendekből MEGA6 programmal filogenetikai fákat szerkesztettem. A fák szerkesztésénél a mintáimon és a referencián kívül a *Rubus multibracteatus* (Genbank accession no. DQ120126) és a Citrus *Idaeovirus*-t (CIV) (Genbank accession no. DQ100358) génjeit is felhasználtam.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. *RBDV* fertőzés azonosítása

A KIS-nél azt vizsgáltam, hogy a vírusfertőzés tüneteit mutató szőlő és málnanövények közül mely egyedek voltak RBDV-vel fertőzöttek. Az első lépésben cDNS-t készítettem random primerekkel. Az így kapott cDNS-t használtam templátként, majd az RBDV-F, RBDV-R diagnosztikai primer párt használva diagnosztikai PCR-t végeztem (9. ábra). A termékek 250 bp nagyságúak.

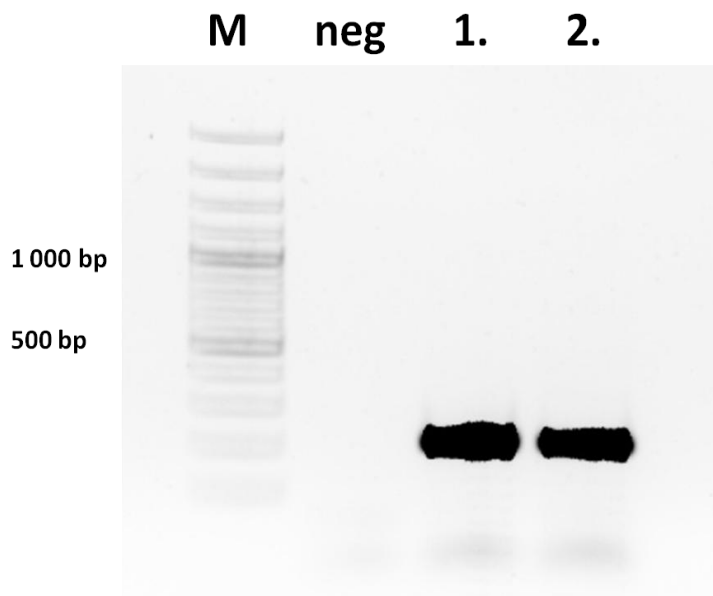


9. ábra: RBDV kimutatása diagnosztikai PCR-rel Szlovéniában. Neg: negatív kontroll; 1.: Vitis_HU1., 2.: Vitis_HU2.; 3.: Vitis_SI; 4.: Rubus_SI; 5-9. további szlovén málna minták; 10-11.: pozitív kontroll M: DNS molekulatömeg marker (GeneRuler, 100 bp ladder plus, Thermo Scientific).

A gélekép alapján kiderült, hogy a Vitis_HU1, Vitis_HU2, Vitis_SI, Rubus_SI minták, valamint három további szlovén málna minta pozitív volt. A végén található két pozitív kontroll (10-11.). A negatív kontrollban is megfigyelhető az RBDV-t jelző specifikus fragmentum, ami keresztszennyezésre utal, viszont az alkalmazott primerpár megbízható, a pozitív mintáknál erős jelet kaptam, a két további málna mintánál nincs jel, vagyis negatív, emiatt nem tartottam

szükségesnek a reakció ismétlését. A továbbiakban a Vitis_HU1, Vitis_HU2, Vitis_SI, Rubus_SI és a három pozitív málna mintával dolgoztam.

A NAIK-MBK-ban vizsgált minták közül a málnán tünetek jelentkeztek, míg a szőlő esetében kis RNS-ek újgenerációs szekvenálásával végzett vírusdiagnosztika alapján derült ki, hogy RBDV-vel fertőzött. Szintén a RBDV-F, RBDV-R primereket használtam a vírus diagnosztikához, ahogy azt a KIS-nél is elvégeztem (10. ábra).



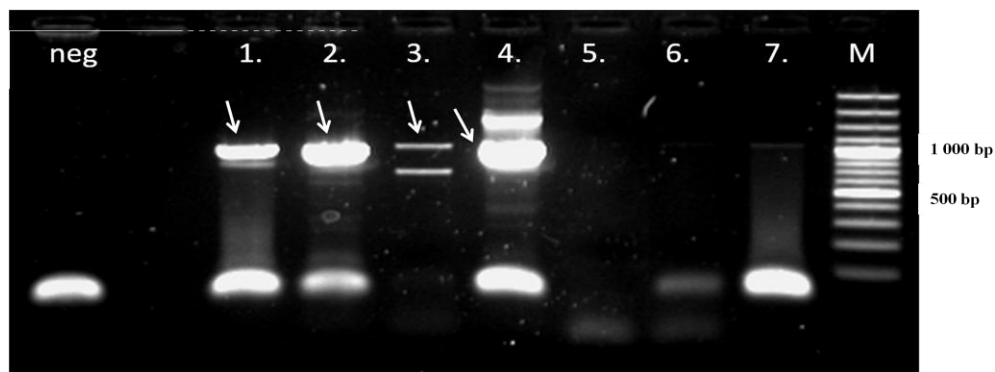
10. ábra: RBDV kimutatása Magyarországon diagnosztikai PCR-rel. M: DNS molekulatömeg marker (GeneRuler, 100 bp ladder plus, Thermo Scientific); neg: negatív kontroll; 1.: Vitis_HU; 2.: Rubus_HU.

A diagnosztika során beigazolódott, hogy mindkét magyarországi minta RBDV-vel fertőzött.

5.2. Az RBDV CP és MP amplifikálása PCR-rel

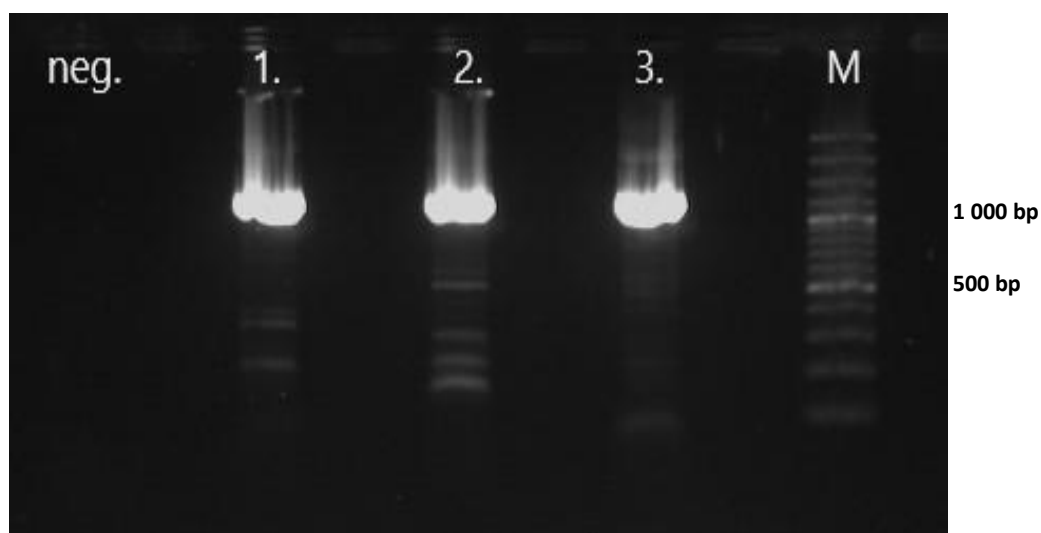
A diagnosztikai primerekkel végzett PCR alapján RBDV fertőzöttséget mutató mintákból klónoztam a vírus mozgási fehérjéjét és a köpenyfehérjéjét kódoló régiókat, hogy azok bázissorrendjét megállapíthassam és ezek alapján filogenetikai vizsgálatokat végezhessenek.

A klónozás első lépéseként a KIS-nél egy meglévő protokollt alkalmazva végeztem el a CP és MP szekvenciák amplifikációját (11. és 12. ábra).



11. ábra: RBDV CP amplifikációjának eredménye a KIS-nél. Neg: negatív kontroll; 1.: Vitis_HU1_CP., 2.: Vitis_HU2_CP.; 3.: Vitis_SI_CP; 4.: Rubus_SI_CP; 5-7. további szlovén málna minták; M: DNS molekulatömeg marker (GeneRuler, 100 bp ladder plus, Thermo Scientific).

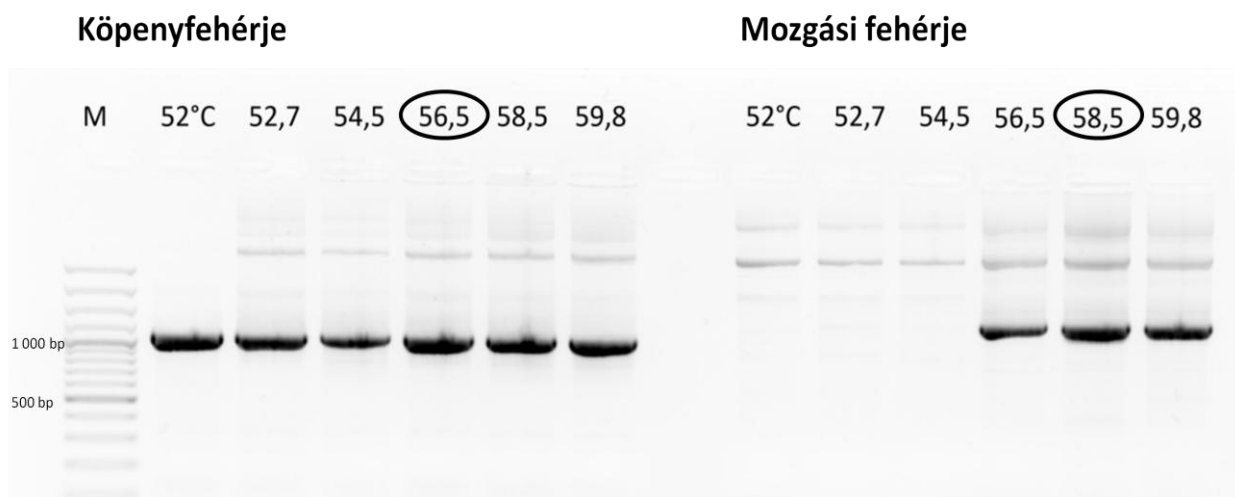
A köpenyfehérjék esetében egyes mintáknál a várt mérettartományban két fragmentum keletkezett. Ezekből kiválasztottam az 1 000 bp-hoz közelebb lévőket. Ezt az ábrán nyíllal jelöltem.



12. ábra: RBDV MP amplifikációjának eredménye a KIS-ben Neg.: negatív kontroll; 1.: Vitis_HU2_MP.; 2.: Vitis_SI_MP; 3.: Rubus_SI_MP; M: DNS molekulatömeg marker (GeneRuler, 100 bp ladder plus, Thermo Scientific).

Ezen eredményeket felhasználva választottam ki négy mintát további vizsgálataimhoz, melyek az alábbiak: Vitis_HU1, Vitis_HU2, Vitis_SI és Rubus_SI.

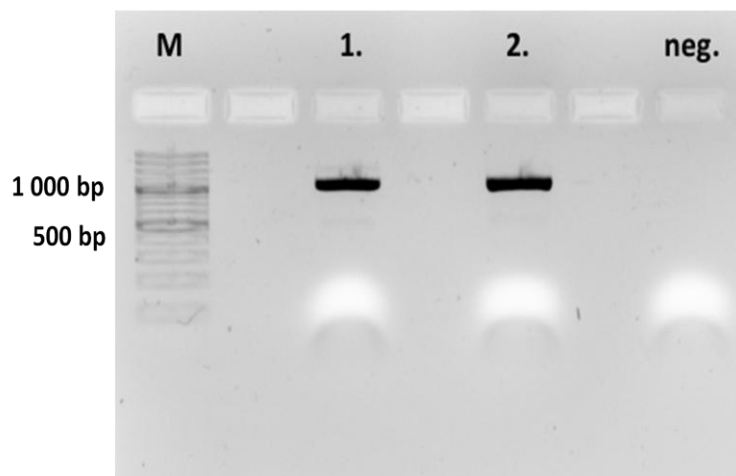
A NAIK-MBK-nál a CP és MP amplifikációjához jó hibajavító tulajdonsággal rendelkező Q5 DNS polimerázt használtam, amihez először gradiens PCR-rel meghatároztam a primer kapcsolódási hőmérsékletének optimumát. A reakció sikerességét 1,2%-os agaróz gélen történő gélelektroforézissel vizsgáltam (13. ábra).



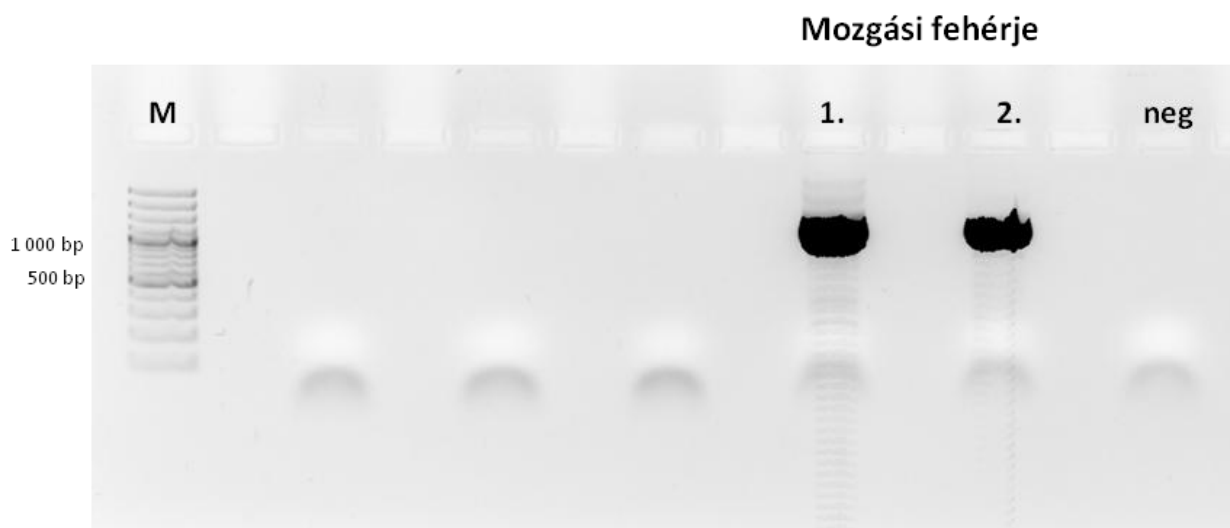
13. ábra: Gradiens PCR a CP és MP Q5-tel való amplifikációjának optimális primer-kapcsolódási hőmérsékletének megállapítására. M: DNS molekulatömeg marker (GeneRuler, 100 bp ladder plus, Thermo Scientific).

A PCR során kiderült, hogy Q5 enzimmel a köpenyfehérjét kódoló szakasz amplifikálásánál az optimális primer-kötődési hőmérséklet 56,5°C, míg a mozgási fehérjét kódoló szakasz polimerizálásához 58,5°C os primer-kapcsolódási hőmérséklet szükséges.

Az optimalizált protokollt használva végeztem el a CP-t és az MP-t kódoló szakaszok amplifikálását (14. és 15. ábra).



14. ábra: Köpenyfehérjé kódoló szekvencia amplifikációja. M: DNS molekulatömeg marker (GeneRuler, 100 bp ladder plus, Thermo Scientific); 1.: Vitis_HU_CP; 2.: Rubus_HU_CP; neg.: negatív kontroll.



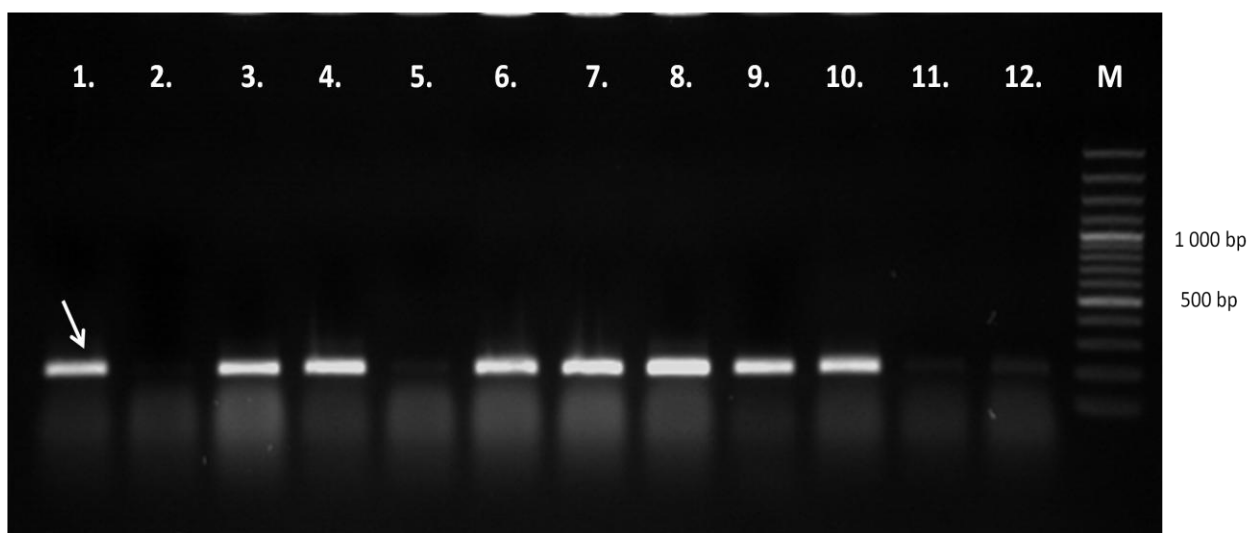
15. ábra: Köpenyfehérjé és mozgási fehérjé kódoló szekvencia amplifikációja. M: DNS molekulatömeg marker (GeneRuler, 100 bp ladder plus, Thermo Scientific); 1.: Vitis_HU_MP; 2.: Rubus_HU_MP; neg.: negatív kontroll.

Elvégeztem a CP és az MP specifikus PCR-t, amely során a köpenyfehérjé és a mozgási fehérjé kódoló gén szakaszait sikeresen amplifikáltam mindkét mintából (Vitis_HU_CP és Vitis_HU_MP; Rubus_Hu_CP és Rubus_Hu_MP).

5.3. Az RBDV CP és MP klónozása

A CP és MP kódoló szakaszokat kitisztítottam a gélből és plazmidba ligáltam (KIS: TOPO TA vektor, NAIK-MBK: pJET vektor), majd ezekkel kompetens *E. coli* sejteket transzformáltam. A transzformált sejteket táptalajon szélesztettem.

A KIS-nél kolónia PCR-rel ellenőriztem, hogy a transzformálás után kinőtt *E. coli* telepek közül melyekben található meg a klónozott DNS darab, azaz sikeres volt-e a klónozás. A CP kolónia PCR-t RBDV-F és RBDV-R, a MP kolónia PCR-t CPUP és MPLO primerekkel végeztem. A 16. ábrán szemléltetésképpen az MP kolónia PCR eredménye látható.

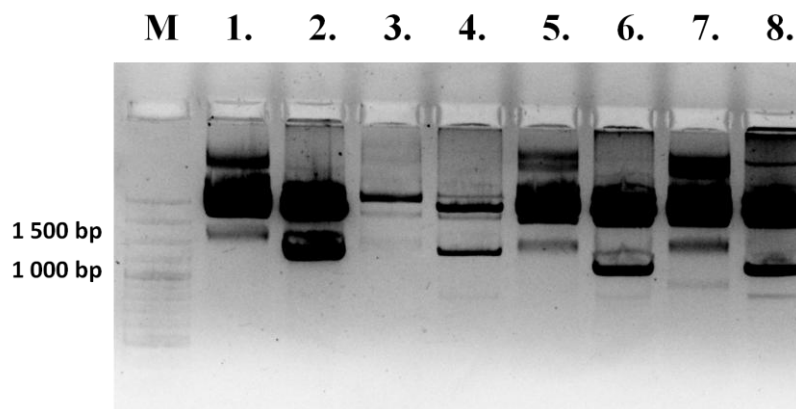


16. ábra: A mozgási fehérje kolónia PCR eredménye. A keletkezett termék (nyíllal jelölve) azt bizonyítja, hogy az adott telep tartalmazza a klónozott DNS fragmentumot. 1-12.: a telepek száma; M: DNS molekulatömeg marker (GeneRuler, 100 bp ladder plus, Thermo Scientific).

Az eredmények alapján nem minden telep tartalmazta a klónozott DNS darabot. A kolónia PCR alapján pozitív baktériumtelepeket folyadékkultúrában felnevesztettem, majd ezekből plazmidot tisztítottam.

Az MBK-ban a transzformálás után kinőtt telepeket folyadékkultúrában felnevesztettem és belőlük plazmidot tisztítottam. A plazmid izolálás és a klónozás sikerességét restrikciós emésztéssel ellenőriztem. Ez esetben az emésztés során a plazmidot olyan restrikciós enzimmal kell emésztetni, melynek hasítóhelye a klónozó plazmidot közrefogja. (TOPO TA vektor – EcoR

I. restrikciós enzim, pJET vektor - Xba I. és Xho I. enzimek). A 17. ábrán szemléltetésképpen a Vitis_HU és Rubus_HU minták restrikciós emésztése látható.

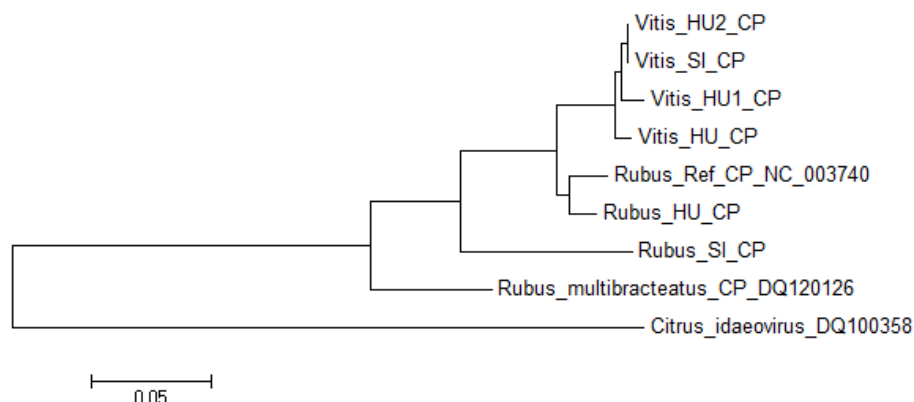


17. ábra: A köpenyfehérje és mozgási fehérje gének restrikciós emésztésének eredménye. M: λ EcoR I. HIND III. marker; 1.: Vitis_HU_MP; 2.: Vitis_HU_MP emésztett termék; 3.: Rubus_HU_MP; 4.: Rubus_HU_MP emésztett termék; 5.: Vitis_HU_CP; 6.: Vitis_HU_CP emésztett termék; 7.: Rubus_HU_CP; 8.: Rubus_HU_CP emésztett termék.

Az agaróz gélelektroforézis eredményén látható, hogy a MP esetében kb. 1 200 bp, a CP esetében egy kb. 1 000 bp hosszúságú termék keletkezett az emésztés során. Ezek alapján a klónozás sikeres volt, az *E. coli*-ból tisztított plazmidok tartalmazták az RBDV egy darabját, így ezeknek a bázissorrendjét hagyományos Sanger szekvenálással meghatároztattuk.

5.4. Szekvenciák elemzése különböző bioinformatikai módszerekkel

5.4.1. A köpenyfehérjét kódoló gének összehasonlítása



18. ábra: Filogenetikus fa az RBDV köpenyfehérjéjét kódoló gén alapján.

A köpenyfehérjét kódoló szekvenciák szerint az RBDV-nek az irodalmi adatokkal megegyezően három csoportja van /MAVRIC PLEŠKO & VIRŠČEK MARN 2009/. A szőlőt, a málnát, valamint a *Rubus multibracteatus*-t fertőző RBDV külön-külön csoportot alkotnak. A Citrus *Idaeovirus*-t (CIV) 2006-ban publikálták /DERRICK *et al.*/. Az RBDV is ebbe a genusba tartozik, emiatt bizonyos fokú hasonlóság figyelhető meg az RBDV és a CIV köpenyfehérjét kódoló génjei között (63%-os egyezés a referenciához képest). Földrajzilag a Kínában talált *Rubus multibracteatus*-ból izolált vírus CP génje az, ami nagyobb eltérést mutat a málna és szőlő mintákhoz képest.

2. táblázat: Az RBDV köpenyfehérje gén hasonlósági mátrixa százalékban megadva

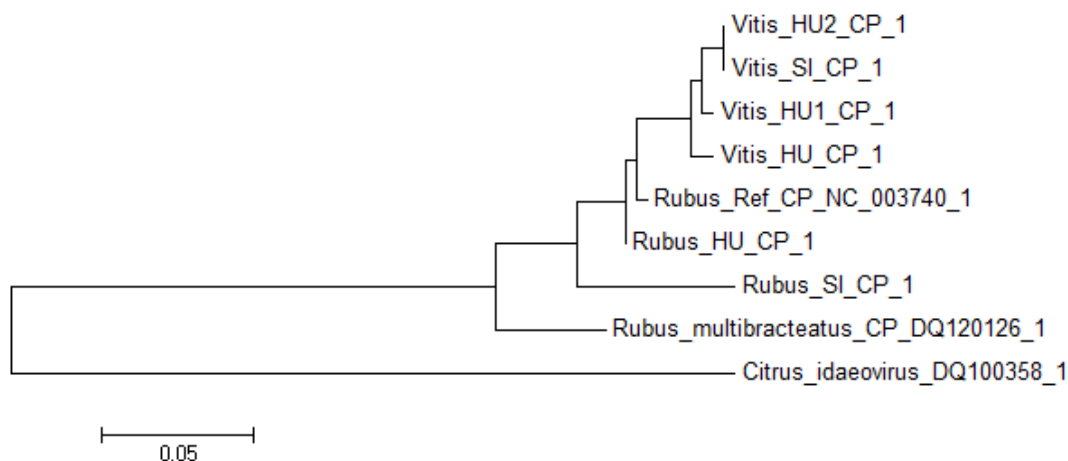
	Ref.	Rubus_SI	Rubus_HU	Vitis_HU	Vitis_HU1	Vitis_HU2	Vitis_SI	R. multib.
Ref.	100	88	97,2	94,9	94,6	95	95	87,5
Rubus_SI	88	100	88,6	87,4	87,2	87,9	87,9	85,5
Rubus_HU	97,2	88,6	100	95,4	95,	95,5	95,5	88,2
Vitis_HU	94,9	87,4	95,4	100	98,2	98,6	98,6	87,4
Vitis_HU1	94,6	87,2	95	98,2	100	98,7	98,7	86,9
Vitis_HU2	95	87,9	95,5	98,6	98,7	100	100	87
Vitis_SI	95	87,9	95,5	98,6	98,7	100	100	87
R. multib.	87,5	85,5	88,2	87,4	86,9	87	87	100

A referencia szekvencia a vizsgált mintáim közül leginkább a magyar málnával egyezik, 97,2%-ban, míg legtávolabb a szlovén málna minta van. Ebben az esetben csak 88% az azonosság.

A szőlő izolátumok 98-100%-ban azonosak és 94,6-95%-ban hasonlóak a referencia szekvenciával. A táblázatban látható, hogy a Vitis_HU2 és Vitis_SI minták köpenyfehérje génjei 100%-ban megegyeznek.

R. multibracteatus 85-88%-ban homológ a szőlő és málna mintákkal, 87,5%-ban pedig a referenciával. Ez a nagyfokú eltérés nagyobb eséllyel ered a földrajzi elhelyezkedésből, nem pedig a gazdanövény fajából, mivel a *Rubus* nemzetségen belül nagyobb eltérést mutat a két fajban izolált vírus CP génjei (*Rubus idaeus* és *Rubus multibracteatus*), mint a *Rubus* és *Vitis* nemzetség között.

5.4.2. A köpenyfehérje aminosav sorrendjeinek összehasonlítása



19. ábra: Filogenetikus fa az RBDV köpenyfehérje aminosav sorrendje alapján.

Az aminosav sorrendek alapján nagyobb az RBDV izolátumok közötti homológia, mint nukleinsav szinten, ami a lötyögő géneknek tudható be, vagyis hogy egy aminosavat több kodon is kódolhat, így az eltérő bázissorrend is kódolhatja ugyanazt az aminosavat.

3. táblázat: Az RBDV köpenyfehérje aminosav sorrend hasonlósági mátrixa százalékban megadva

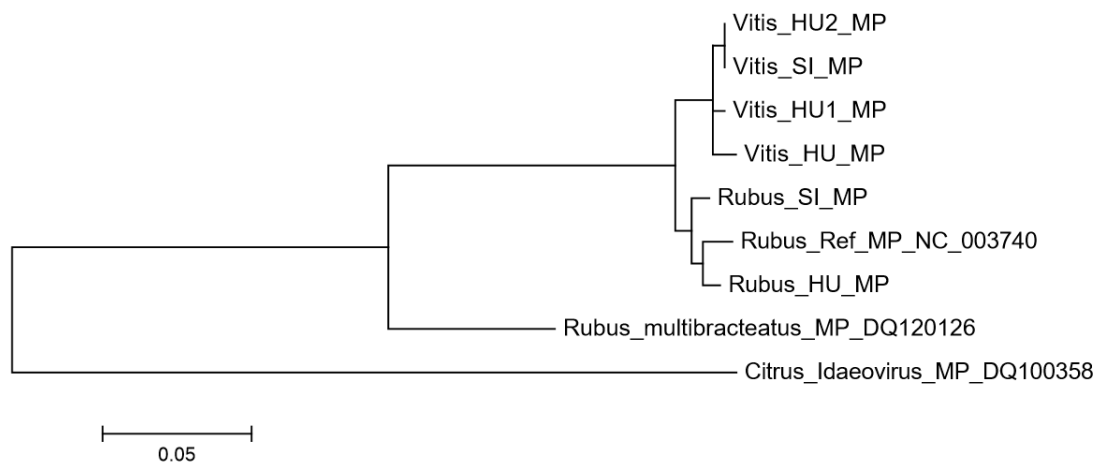
	Ref.	Rubus_SI	Rubus_HU	Vitis_HU	Vitis_HU1	Vitis_HU2	Vitis_SI	R. multib.
Ref.	100	93,1	99,3	97,1	97,1	97,5	97,5	91,6

Rubus_SI	93,1	100	93,4	91,6	92	92,3	92,3	89,8
Rubus_HU	99,3	93,4	100	97,1	97,1	97,5	97,5	92,3
Vitis_HU	97,1	91,6	97,1	100	98,5	98,2	98,2	91,2
Vitis_HU1	97,1	92	97,1	98,5	100	98,9	98,9	91,2
Vitis_HU2	97,5	92,3	97,5	98,2	98,9	100	100	91,6
Vitis_SI	97,5	92,3	97,5	98,2	98,9	100	100	91,6
R. multib.	91,6	89,8	92,3	91,2	91,2	91,6	91,6	100

A referencia 99,3%-ban azonos a magyarországi málna mintával. Ez a legnagyobb homológia a referencia és az általam vizsgált minták között. Az ábrán látható, hogy a szlovén málna minta kissé elkülönül a referenciától, 93,1%-ban egyezik az aminosav sorrendjük, míg ugyanez a minta 90%-ban azonos a *R. multibracteatus*-szal.

A Vitis_HU2 és Vitis_SI minták CP génjei 100%-ban egyeznek, így az aminosav sorrendjükben sincs eltérés. Ezen felül a szőlő minták kb. 97%-ban megegyeznek a referenciával és 98-99%-ban egymással.

5.4.3. A mozgási fehérjét kódoló gének összehasonlítása



20. ábra: Filogenetikus fa az RBDV mozgási fehérjét kódoló gén alapján.

Az RBDV mozgási fehérjét kódoló gének esetén nagyobb a homológia mértéke a málna és a szőlő minták között, de itt is megfigyelhető a három csoport: a szőlőt, a málnát és a *Rubus multibracteatus*-t fertőző RBDV között.

4. táblázat: Az RBDV mozgási fehérje gén hasonlósági mátrixa százalékban megadva.

	Ref.	Rubus_HU	Rubus_SI	Vitis_HU	Vitis_HU1	Vitis_HU2	Vitis_SI	R. multib.
--	-------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------	------------------	-----------------	-------------------

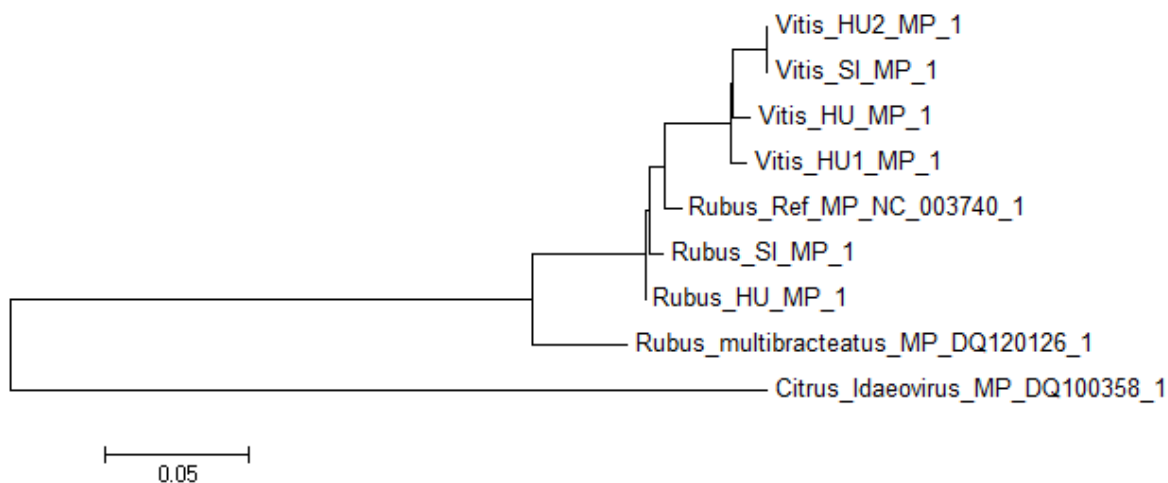
Ref.	100	98,4	97,8	95,5	96	96	95,9	86,5
Rubus_HU	98,4	100	98	95,8	96,5	96,5	96,4	86,5
Rubus_SI	97,8	98	100	95,5	96,1	96,1	96,1	86,6
Vitis_HU	95,5	95,8	95,5	100	98,5	98,4	98,3	86,5
Vitis_HU1	96	96,6	96,1	98,5	100	99	98,9	86,6
Vitis_HU2	96	96,5	96,1	98,4	99	100	99,9	86,4
Vitis_SI	95,9	96,2	96	98,3	99	99,9	100	86,4
R. multib.	86,5	86,5	86,6	86,5	86,6	86,4	86,4	100

A referenciához a mintáim közül legközelebb, ahogy a CP génnél is megfigyelhető, a magyarországi málna minta áll, 98,4%-os egyezőséggel, míg legtávolabb a Vitis_HU minta 95,5%-kal. A *Rubus multibracteatus* 86,5%-ban azonos a referenciával.

A málna minták szekvenciája kb. 98%-ban megegyezik egymással.

A Vitis_HU2 és a Vitis_SI 99,9%-os hasonlóságot mutat egymással, ami összhangban van a CP gén homológiájával. Emellett a szőlő minták 98-99%-os azonosságot mutatnak egymással, és kb. 96%-ban egyeznek a referencia génnel.

5.4.4. A mozgási fehérje aminosav sorrendjeinek összehasonlítása



21. ábra: Filogenetikus fa az RBDV mozgási fehérje aminosav sorrendje alapján.

Itt is jól megfigyelhető a három csoport. Az ábrán látható, hogy a Vitis_HU2 és a Vitis_SI minták azonosak.

5. táblázat: Az RBDV mozgási fehérje aminosav sorrend hasonlósági mátrixa százalékban megadva.

	Ref.	Rubus_HU	Rubus_SI	Vitis_HU	Vitis_HU1	Vitis_HU2	Vitis_SI	R. multib.
Ref.	100	98	98,6	94,7	96,1	95,5	95,5	89,4
Rubus_HU	98	100	99,2	94,7	95,8	95,3	95,2	89,9
Rubus_SI	98,6	99,2	100	95	96,4	95,8	95,8	89,4
Vitis_HU	94,7	94,7	95	100	97,2	96,9	96,9	88
Vitis_HU1	96,1	95,8	96,4	97,2	100	98	98,0	88,6
Vitis_HU2	95,5	95,3	95,8	96,9	98,1	100	100	87,4
Vitis_SI	95,5	95,3	95,8	96,9	98,1	100	100	87,4
R. multib.	89,4	89,9	89,4	88	88,6	87,4	87,4	100

A referencia aminosav sorrendje legnagyobb mértékben (98,6%) a szlovén málna mintához hasonlít, míg az általam vizsgált minták közül a Vitis_HU mintától tér el a leginkább (94,7%). A málna minták kb. 98-99%-ban azonosak a referenciával, 99,2%-ban egymással.

A Vitis_HU2 és a Vitis_SI MP gén nukleinsav sorrendje 99,9%-ban egyezett, míg az aminosav sorrendjük 100%-ban azonos. A szőlő minták 97-98%-os egyezőséget mutatnak egymással, 95-96%-ban a referenciával is homológ az aminosav sorrendjük.

A *R. multibracteatus* 89,4%-ban homológ a referenciával. A legnagyobb mértékű azonosságot a Rubus_HU mintával mutatja, közel 90%.

6. Következtetések és javaslatok

A vizsgálataim során arra kerestünk választ, hogy mennyiben különböznek az eltérő gazdanövényen és a különböző országokban izolált RBDV vonalak. Ezt nukleinsav és aminosav szinten is vizsgáltam.

A vizsgálataim során azt tapasztaltam, hogy az irodalommal megegyezően az RBDV vonalak három csoportba oszthatók: málnát és szedret fertőző, szőlőt, valamint *R. multibracteatus*-t fertőző ágensre. Bár a szőlő és a málna rendszertanilag távol áll egymástól, az azokat fertőző RBDV-k nagyobb mértékben azonosak egymással, mint a málnát és az azzal egy családba tartozó *Rubus multibracteatus*-t fertőző RBDV. Emellett nincs eltérés a más országokban, de azonos fajon izolált RBDV-k között, vagyis az eltérő genusba tartozó, de földrajzilag közel elhelyezkedő növényeket fertőző RBDV-k között nagyobb volt a homológia, mint az azonos genusba, de földrajzilag távol lévő növényeket fertőző RBDV-k között.

Az RBDV komoly termés – és állományvesztést okozhat a málna esetében. A szőlő vonatkozásában az eddig leírt tünetek a szabálytalan foltok és a levél sárgulása. Véleményem szerint szükséges megállapítani, hogy a vírus képes-e átkedni szőlőről málnára, és ha igen, milyen módon.

7. Összefoglalás

A növénypatogén vírusok számos esetben okoznak nagy gazdasági kárt, emiatt fontos az ellenük való védekezés.

A Málna bokros törpülés vírus (RBDV) egy jelentős málna patogén, világszerte fertőzi a *Rubus* nemzetség tagjait. Természetes körülmények között először 2003-ban izolálták szőlő gazdanövényen. Céлом az volt, hogy megállapítsam, mennyire hasonlítanak a más országban és eltérő gazdanövényről izolált RBDV vonalak.

A kutatásom egy részét a Kmetijski inštitut Slovenije (KIS)-ben végeztem, azzal a kutatócsoporttal, akik először detektálták az RBDV-t szőlőn, a vizsgálatok másik fele pedig a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetben (NAIK-MBK) zajlott. A vizsgálatba vont egyedek szlovén és magyar lelőhelyről gyűjtött szőlő és málna minták voltak. Először a minták RBDV-vel való fertőzöttségét vizsgáltam, a vírussal fertőzött mintákból pedig az RBDV darabjait klónoztam, hogy a vírusvariánsok rokonsági viszonyait megállapíthassam. Ennek érdekében a mintákból RNS-t tisztítottam, majd cDNS-t írtam. Diagnosztikai PCR-rel megvizsgáltam, hogy a minták fertőzöttek-e. A fertőzött mintákból klónoztam és szekvenáltattam az RBDV köpeny-, és mozgási fehérjéjét kódoló génszakaszt. A kapott szekvenciákat bioinformatikai módszerekkel elemeztem.

Az eredményeim szerint az RBDV a szakirodalommal egyezően klasztereződik málnát, szőlőt és *R. multibracteatus*-t fertőző vonalakra.

Ezek alapján azt a következtetés lehet levonni, hogy bár a szőlő és a málna rendszertanilag nincsenek közel egymáshoz, az azokat fertőző RBDV nagyobb mértékben azonosak egymással, mint a málnát és az azzal egy családba tartozó *Rubus multibracteatus*-t fertőző RBDV, vagyis az eltérő genusba tartozó, de földrajzilag közel elhelyezkedő növényeket fertőző RBDV-k között nagyobb volt a homológia, mint az azonos genusba, de földrajzilag távol lévő növényeket fertőző RBDV-k között.

A jövőben fontos lenne megállapítani, hogy a szőlőn okoz-e a levél sárgulásán és foltosodásán kívül más tünetet is, illetve az RBDV képes-e természetes úton szőlő gazdanövényről málnát fertőzni.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik a segítségemre voltak a dolgozat megírásában.

Mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki a konzulenseimnek, Dr. Kiss Erzsébet Professzor Asszonynak, dr. Várallyay Évának NAIK-MBK Diagnosztikai Csoport csoportvezetőjének és Baráth Dániel PhD hallgatónak. Az iránymutatásuk és segítségük nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat.

Ki szeretném még emelni Dr. Irena Mavrič Pleško-t és Barbara Grubar-t, a Kmetijski inštitut Slovenije munkatársait, akik áldozatos munkájukkal segítették a Szlovéniában zajló munkámat.

Továbbá szeretném megköszönni a NAIK - Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet Diagnosztikai Csoportjának és a Kmetijski inštitut Slovenije dolgozóinak, hogy megvalósulhatott ez a kísérlet.

Irodalomjegyzék

1. Barnett, O. W. & Murrant, A. F. (1970): Host range, properties and purification of raspberry bushy dwarf virus. *Annals of applied Biology*, 65(3), 435-449.
2. Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J. & Mumford, R. (2014): Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus research*, 186, 20-31.
3. Chamberlain, C. J., Kraus, J., Kohnen, P. D., Finn, C. E., & Martin, R. R. (2003): First report of Raspberry bushy dwarf virus in *Rubus multibracteatus* from China. *Plant Disease*, 87(5), 603-603.
4. Derrick, K. S., Beretta, M. J., Barthe, G. A. (2006): Detection of an *Idaeovirus* in Citrus with implications as to the cause of Citrus blight. *Proc. Florida State Horticultural Society*. 119, 69-72.
5. 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), 520-525.
6. Horváth J., Gáborjáni R. (szerk. 2000): Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 15, 17, 80, 219, 237. pp.
7. Hull, R. (szerk. 2014): Plant virology. Academic press, 271, 929-930 pp.
8. Jevremovic, D., & Paunovic, S. (2015): Raspberry bushy dwarf virus—a Grapevine Pathogen in Serbia.
9. Jones, A. T., Mayo, M. A., & Murrant, A. F. (1996): Raspberry bushy dwarf idaeovirus. In *The plant viruses*, Springer US, 283-301.
10. Kenessey Z. (2017): A szőlő vírus detektálás módszerei. XXII. Bolyai Konferencia, poszter.
11. Martin, R. R., MacFarlane, S., Sabanadzovic, S., Quito, D., Poudel, B., & Tzanetakis, I. E. (2013): Viruses and virus diseases of Rubus. *Plant disease*, 97(2), 168-182.
12. Mavrič, I., Marn, M. V., Koron, D., & Žežlina, I. (2003): First report of Raspberry bushy dwarf virus on red raspberry and grapevine in Slovenia. *Plant Disease*, 87(9), 1148-1148.
13. Mayo, M. A., Jolly, C. A., Murrant, A. F., & Raschke, J. H. (1991): Nucleotide sequence of raspberry bushy dwarf virus RNA-3. *Journal of general virology*, 72(2), 469-472.
14. Milusheva, S., Koumanov, K., & Kornov, G. (2012): First report on identification of Raspberry bushy dwarf virus in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) in Bulgaria. In *Proceedings and abstracts of Third Congress of Virology*, 127-131 pp..
15. Murrant, A. F., Chambers, J., & Jones, A. T. (1974): Spread of raspberry bushy dwarf virus by pollination, its association with crumbly fruit, and problems of control. *Annals of applied biology*, 77(3), 271-281.
16. Natsuaki, T., Mayo, M. A., Jolly, C. A., & Murrant, A. F. (1991): Nucleotide sequence of raspberry bushy dwarf virus RNA-2: a bicistronic component of a bipartite genome. *Journal of general virology*, 72(9), 2183-2189.
17. Németh Mária (szerk. 1986): Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Akadémia kiadó, Budapest, 57 pp.
18. Pleško, I. M., Marn, M. V., Nyerges, K., & Lázár, J. (2012): First report of Raspberry bushy dwarf virus infecting grapevine in Hungary. *Plant Disease*, 96(10), 1582-1582.

19. Pleško, I. M., Marn, M. V., Širca, S., & Urek, G. (2009): Biological, serological and molecular characterisation of Raspberry bushy dwarf virus from grapevine and its detection in the nematode *Longidorus juvenilis*. *European journal of plant pathology*, 123(3), 261-268.
20. Viršček Marn, M., Mavrič, I., (2006): The occurrence of Raspberry bushy dwarf virus in different grapevine varieties in Slovenia. In: *15th Meeting of the International Council for the Study Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine* – Extended Abstracts, 266, Stellenbosch (South Africa Society for Enology and Viticulture).
21. Ziegler, A., Natsuaki, T., Mayo, M. A., Jolly, C. A., & Murrant, A. F. (1992): The nucleotide sequence of RNA-1 of raspberry bushy dwarf virus. *Journal of general virology*, 73(12), 3213-3218.

NYILATKOZAT

Alulírott **Kenessey Zoárd Vitold**, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar **Mezőgazdasági biotechnológus MSc.** szak nappali tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy szakdolgozatom/diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Kar / Intézet / Szak honlapjára. A digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető tanszéken/intézetben, illetve a kialakításra kerülő Kari központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 201.....hó.....nap

.....
hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot/diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmak korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot/diplomadolgozatot záróvizsgán történő védelemre javaslom/ nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 201.....hó.....nap

.....
témavezető aláírása

STATEMENT OF CONSENT

Me, **Janja Lamovšek PhD**, Bacteriology researcher of Kmetijski inštitut Slovenije, agree to picture I took will be used by Zoárd Vitold Kenessey (Neptun code: F00OE7).

Ljubljana, 2017.....month.....day

.....

Signature