

SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
NÖVÉNYVÉDELMI INTÉZET
NÖVÉNYORVOS SZAK

ALMA VÍRUSOK DIAGNOSZTIZÁLÁSI MÓDSZEREINEK
ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSE

Készítette: Fürtön Alíz

Konzulens:

Dr. Bán Rita egyetemi docens

Külső konzulens:

Dr. Várallyay Éva tudományos főmunkatárs

Intézetigazgató:

Dr. Kiss József egyetemi tanár

GÖDÖLLŐ 2018

Tartalomjegyzék

ALMA	VÍRUSOK	DIAGNOSZTIZÁLÁSI	MÓDSZEREINEK
ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSE			1
1. Bevezetés			4
2. Irodalmi áttekintés			5
2.1. Vírusok általános jellemzése			5
2.2. Az almafélék jelentősebb vírusos betegségei			9
2.3. Gyümölcs szaporítóanyagok előállítása és forgalomba hozatala			10
2.4. Karanténvírusok jellemzése.....			11
2.4.1. Alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV)			11
2.4.2. Alma törzsbarázdáltság vírus (ASGV).....			12
2.4.3. Alma törzsgödrösödés vírus (ASPV)			13
2.4.4. Alma mozaik vírus (ApMV)			13
2.5. Növényi biotesztek			14
2.6. Nagy áteresztőképességű szekvenálás.....			15
3. Anyag és módszertan.....			16
3.1. Mintavételezés.....			16
3.2. Bioinformatikai elemzés.....			16
3.3. RNS tisztítás			17
3.4. cDNS szintézise reverz transzkripcióval			18
3.3. Aktin teszt a cDNS minőségének ellenőrzésére			19
3.5. Víruskimutatás RT-PCR-rel			20
3.6. Primer tervezés Citrus concave gum-associated virus-ra			21
4. Eredmények			24
4.1. NÉBIH NTAI Velencei Virologiai Laboratórium telephelyén beállított biotesztek értékelése.....			24
4.2. Bioinformatikai elemzés eredménye			27
4.3. Víruskimutatás RT-PCR-rel			31

5. Következtetések és javaslatok	34
6. Összefoglalás.....	36
7. Irodalmi hivatkozások	37
Köszönetnyilvánítás	41
NYILATKOZAT.....	42

1. Bevezetés

A növénytermesztés alapját a minőségi szaporítóanyagok jelentik. A vegetatívan szaporított fajok prebázis és bázis anyanövény-jelöltjei esetében fontos igazolni, azok zárlati kártevőktől és betegségektől való mentességét. Almafák esetében a következő négy karantén vírustól kell a szaporítóanyagnak mentesnek lennie: az alma törzsbarázdáltság vírus, alma klorotikus levélfoltosság vírus, almamozaik vírus és az alma törzsgödrösödés vírus. Az ellenőrző vizsgálatokat jelenleg indikátornövényeken végzett biológiai tesztekkel végzik.

A kutatásom során az almafa vírusok különböző diagnosztizálási módszereit, a szabadföldi biotesztet, és a nagy áteresztőképességű szekvenálással történő vírusdiagnosztikát hasonlítottam össze. A szabadföldi bioteszteket a NÉBIH NTAI Velencei Virologiai Laboratórium telephelyén állították be 2016-ban 10 fajtára. A bioteszt 2. éves eredményeit 11 indikátorfajtán 2018 nyarán értékeltük. A tesztelt 10 anyafa kis RNS alapú szekvenálása 2017-ben történt, én a szekvenálás adatait elemeztem bioinformatikai módszerekkel. A kapott eredmények visszaigazolásához a mintákból RNS-t vontam ki, majd cDNS-t készítettem belőlük a PCR alapú detektáláshoz. Az RT-PCR reakciót mindegyik vírus esetében elvégeztem, a kapott eredményeket nemcsak a nagy áteresztőképességű szekvenálás, hanem a bioteszt eredményeivel is összevettem.

Kutatásom célja volt összehasonlítani a különböző ellenőrzési eljárásokat, a módszerek előnyeit és hátrányait, mely a későbbi szaporítóanyag ellenőrzéseket jelentősen megkönnyítheti.

Munkám során a szabadföldi biotesztek eredményeit hasonlítottam össze egy molekuláris technika, az RT-PCR-rel, és egy új módszer, az nagy áteresztőképességű szekvenálással szemben.

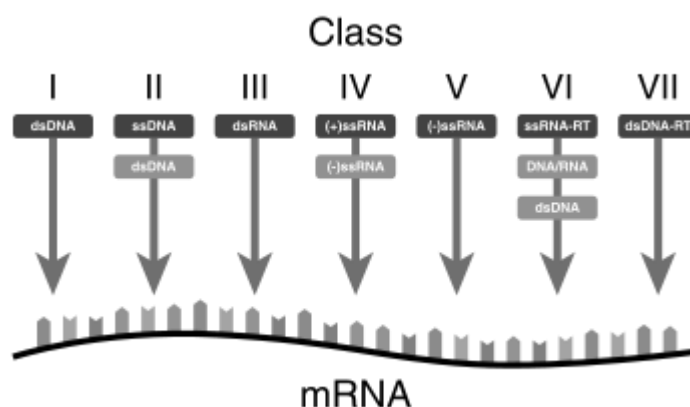
2. Irodalmi áttekintés

2.1. Vírusok általános jellemzése

A vírusok olyan parazita szervezetek, melyek súlyos megbetegedéseket okozhatnak mind az emberekben, az állatokban, és a növényekben is, mégis kutatásukkal a tudomány a XIX. században kezdett el foglalkozni (Horváth és Gáborjányi 2000). A növényi vírusok ennél már sokkal régebben részesei voltak életünknek. Az első írásos feljegyzés egy versben található, melyet 752-ben írtak. Az 1600-as években készült számos nyugat-európai festményen megfigyelhetők különböző színű foltos tulipánok, melyek egy vírusfertőzés következtében váltak ilyenné (Salamon 2007, Hull, 2014).

A vírusok az élő anyag szerveződésének legegyszerűbb formái, saját energiarendszerrel nem rendelkeznek. A vírusok nukleinsavból és fehérjeburokból állnak, ezt a burkot lipoprotein hártya (capsid) határolja néhány esetben. Önálló szaporodásra nem képesek, a gazdaszervezet sejtjeit használják erre a célra. Nem rendelkeznek saját anyagcserével, a gazdasejtet használják saját replikációjukhoz. Ez a folyamat hat szakaszra bontható, az adszorpcióra, penetrációra, dekapszidációra, eklipszisre, maturációra és kiszabadulásra. A vírusok élete két szakaszra bontható, inaktív, azaz sejten kívüli nyugalmi állapotú (virion), és sejten belüli önmagát megsokszorozó vegetatív szakaszra (Glits és Folk 2001, Bálint 2006). A virionok felépítése kétféle lehet, helikális vagy izometrikus, a helikális vírusok további két csoportba oszthatók alakjuk alapján, amely lehet pálcika vagy fonál. Csoportosíthatjuk őket nukleinsav alapján, RNS-t vagy DNS-t tartalmazó vírusokra, illetve, hogy egy (single)- vagy kétszálúak (double stranded) (Virányi 2010, Cann 2016)

A nukleinsavak irányultsága lehet negatív vagy pozitív.



1. ábra: Vírusok csoportosítása (<http1>)

Jelenleg 189 nemzetségbe (166 nemzetség és 23 családi hovatartozását még meg nem állapított nemzetség (1. táblázat)), több mint 3600 vírusfajról számol be az univerzális vírus taxonómiai rendszer. Ez a rendszer négy kritériumra épül: (1) a vírusgenom típusa, (2) a vírusgenom egy- vagy kétszálúsága, (3) a fordított transzkripció (átírás) lehetősége, (4) a vírusgenom polaritása. A legújabb vírus taxonómiai kiadvány a vírusokat fő gazdanövényeik alapján csoportosítja. A növénypatogén vírusokat 12 családba osztják, ezen belüli 51 nemzetség található, ebből 34 növényi.

1. táblázat: A növénypatogén vírusok családjai, nemzetségeinek száma/növénypatogén nemzetségek (Horváth és Gáborjányi 2000)

Bromoviridae 5/5	Bunyaviridae 5/1	Closteroviridae 2/2	Comoviridae 3/3	Geminiviridae 3/3
Luteoviridae 3/3	Partitiviridae 4/2	Potyviridae 5/3	Reoviridae 9/3	Rhabdoviridae 5/2
Sequiviridae 2/2	Tombusviridae 5/5	Összesen: 12 51/34		

A vírus-gazda kapcsolat csak valamilyen vektor segítségével alakulhat ki. Terjesztésükben a legfontosabb szerepet a rovarok játsszák, de terjesztőik között lehetnek parazita fajok (*Cuscuta* spp.) vagy talajlakó gombák például az *Polymyxa betae* vagy a *Spongospora* fajok (Campbell, 1996). A növénypatogén vírusok terjesztőinek 87%-a szívó- és 13%-a rágó szájszervű. Legnagyobb számban a levéltetvek, utánuk a kabócák állnak. Kapcsolatuk a betegségekkel három fázisban írható le: a vírus felvételére, hordozására, leadására (2. ábra). Átvitel szempontjából négy csoportba oszthatjuk őket, mely szerint megkülönböztetünk, nem perzisztens, szemiperzisztens, cirkulatív és propagatív vírusokat (Armijo et al. 2016).



2. ábra: Vírusvektorok (http2)

A nem perzisztens vírusok esetében a kórokozó az állat szipókájára tapad, így az rögtön fertőzőképes lesz, ahogy egy egészséges növényre kerül. A vektor a kórokozót két-három szívogatás idejéig hordozza, ezután elvesztik terjesztő képességüket. A vírusok a levél parenchimában lokalizálódnak, mozaikos tüneteket okoznak, mechanikailag könnyen átvihetők (pl.: burgonya Y-vírus (potato Y *potyvirus*).

A szemiperzisztens vírusok átmenetet képeznek a perzisztens és nem perzisztensek között. Átvitelük mechanikailag nem, vagy nehezen lehetséges pl: répa sárgaság closterovírus (BYV).

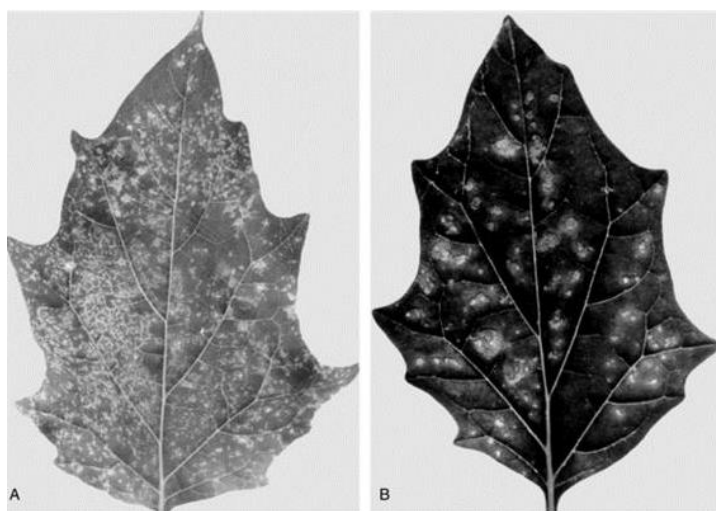
A cirkulatív vagy perzisztens vírusok a floémában helyezkednek el, így egyszeri szívás alatt nem vehetők föl, hosszabb szívogatás szükséges. Sárgaság típusú tüneteket okoznak, és mechanikailag alig, vagy nehezen vihetők át. A propagatív vírusok a cirkulatív vírusok közé tartoznak. Ezen csoportba tartozó kórokozók képesek a szaporodni a terjesztőjükben, gyakran bennük is tüneteket okoznak. A vektorok tojásai is gyakran fertőzöttek, s az állatok egész életükben hordozók maradnak. Ebbe a csoportba tartozik például a burgonya levélsodródás vírus (PLRV- vektora a *Myzus persicae*) vagy a Maize mosaic nucleorhabdovirus (MMV- vektora *Peregrinus maidis*) (Barandoc-Alaviar et al. 2016).

Amennyiben a vírus inokuláció sikeres volt, megkezdődik a fertőzés. A fehérjeburok leválik, így szabaddá válik az RNS, mely magában képes megindítani a fertőzést. A vírus RNS megkezd a sokszorozódást a gazdasejt segítségével. A sikeres fertőzés tünetekben

nyilvánul meg, melynek megjelenési idejét több tényező is befolyásolja. Az első tünet megjelenése és a fertőzés közt eltelt időt nevezzük inkubációs időnek.

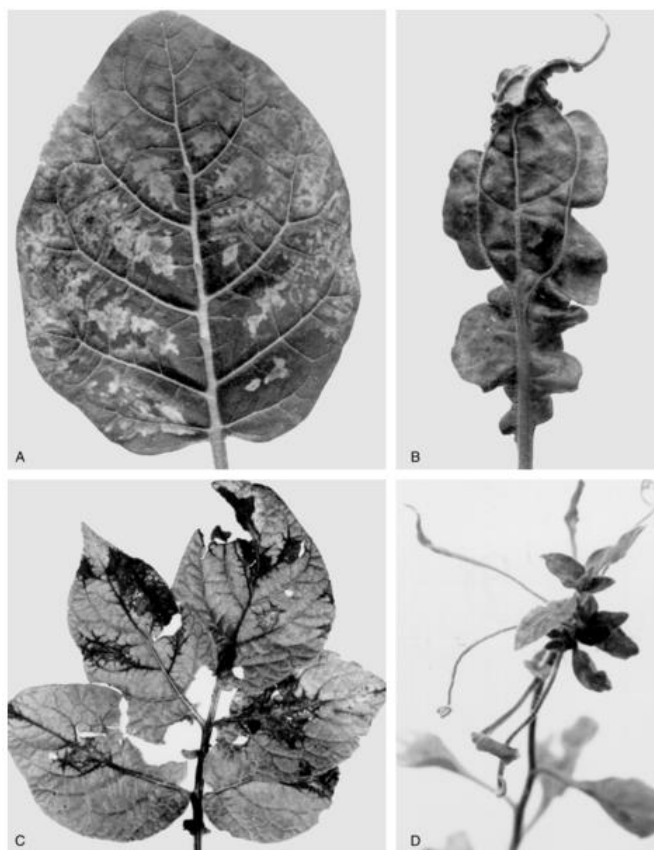
A tüneteket két nagy csoportra oszthatjuk, szemmel látható, és szemmel nem láthatókra. A szemmel látható, vagy más néven makroszimptomás csoport további két csoportra osztható, lokális (3. ábra) és szisztemikus (4. ábra) fertőzésre. Másik csoportosítási forma a növény fertőzési helye alapján történő.

Egy kompatibilis kapcsolatban létrejött lokális fertőzés esetén helyi nekروزisok és/vagy elszíneződések keletkeznek, ezeket lokális lézióknak nevezzük. Ezen léziók mérete, alakja és színe igen változatos.



3. ábra: Lokális tünetek (Horváth és Gáborjányi 2000)

Szisztemikus fertőzés esetén a tünetek megjelenéséig sokkal több idő telik el, mint lokális fertőzés esetében. A lágyszárú növények hamarabb mutatják, mint a fásszárúak, valamint a fiatal növények fogékonyabbak, mint az idősek. A leggyakrabban szisztemikus tünetek a mozaik, érnekrosis, érkivilágosodás, hólyagosodás, márványozottság, levéldeformáció, páfránylevelűség, kinövések (Horváth és Gáborjányi 2000).



4. ábra: Szisztémikus tünetek (Horváth és Gáborjányi 2000)

2.2. Az almafélék jelentősebb vírusos betegségei

A *Malus*, mint alma vagy almafa nemzetség, a rózsafélék családjába tartozik. A nemzetségbe tartozó fajok az egyik legrégebb óta termesztett növényeink, melyet akár egész évben, mindkét földtekén eredményesen termesztene. A 15 almafajból 2 Európából, 4 Észak-Amerikából és a többi Ázsiából származik. Beltartalmi értékei alapján az egyik legkiegyensúlyozottabb gyümölcsünk, melyet minden korban fogyaszt az ember. Az almatermesztés korszerűsítése az elmúlt évtizedekben nagy ütemben fejlődött, mely az integrált védekezési mód használatával vált lehetővé. Magyarországon még nem folytatnak ilyen szintű környezetbarát termesztéstechnológiát.

2. táblázat: Magyarország éves almatermelése. (<http3>)

2014	779850	tonna
2015	511460	tonna
2016	497108	tonna
2017	459612	tonna

3. táblázat: 14/2017. (III. 23.) FM rendelet, Malus Mill. vizsgálati köteles károsítói

Vírusok	Viroidok
Alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV)	Alma gyümölcshegesedés viroid (ASSVd)
Alma törzsbarázdáltság vírus (ASGV)	Alma gyümölcsgöndörödés viroid (ADFVd)
Alma törzsgödrösödés vírus (ASPV)	
Alma mozaik vírus (ApMV)	
Vírusszerű betegségek	
Fapuhulás, áglaposodás	
Alma patkós kéregpusztulás vírusszerű betegség: A gyümölcs betegségei: apró termés, zöld ráncosodás, a Ben Davis fajta gyümölcsének egyenetlen felszíne, megvastagodott héj, csillagszerű repedés, vörösesbarna gyűrűk, vörösesbarna szemölcsszerű foltok	

2.3. Gyümölcs szaporítóanyagok előállítása és forgalomba hozatala

A növényfajták állami elismeréséről, valamint a szaporítóanyagok előállításáról és forgalomba hozataláról a 14/2017. (III. 23.) FM rendelet rendelkezik ([http4](http://www.mlds.gov.hu)).

A gyümölcs szaporítóanyagok előállításával, forgalomba hozatalával kapcsolatos ellenőrzései feladatokat a NÉBIH, a növénytermesztési hatáskörében eljáró járási hivatal, valamint a növény- és talajvédelmi hatáskörben eljáró járási hivatal látja el.

Gyümölcs szaporítóanyagot faiskolában vagy más szaporításra engedélyezett ültetvényben szabad előállítani, valamint csak a hazai Nemzeti Fajtajegyzékben elismert fajtákat szabad szaporítani (14/2017. (III.23) 3.§ (1), (2) bekezdés).

A certifikációs rendszerben történő szaporítóanyag akkor minősíthető, ha a szaporítóanyag előállítását szolgáló anyanövény megfelel a fajta leírásának, és ez ellenőrzésre került, a szaporítóanyag fenntartása az e rendeletben foglaltak szerint történik, a szaporítóanyag megfelel az egészségi állapotra vonatkozó, e rendeletben meghatározott követelményeknek, a szaporítóanyag termesztési körülménye - a rovarmentesen termesztett prebázis anyanövény és szaporítóanyag kivételével - megfelel a talajra vonatkozó, e rendeletben meghatározott

követelményeknek, a szaporítóanyag megfelel a minőségi hibák tekintetében az e rendeletben meghatározott követelményeknek, a szaporítóanyagot közvetlenül a kategóriájának megfelelő anyanövényből szaporították, a szaporításra vonatkozó, e rendeletben meghatározott egyedi feltételek teljesülnek, az oltvány szaporítási fokozatát az alacsonyabb szaporítási fokozatú komponens határozza meg (14/2017. (III.23) 7.§ (1) bekezdés).

Az anyanövény és szaporítóanyag fenntartására vonatkozó követelmények a certifikációs rendszerben a prebázis anyanövényeket és szaporítóanyagokat olyan, az érintett nemzetségek vagy fajok számára kijelölt, rovarmentes létesítményekben kell fenntartani, amelyek az előállítási folyamat során biztosítják a légbeli vektorok általi vagy bármely egyéb lehetséges forrásból eredő fertőzéstől való mentességet (14/2017. (III.23) 8.§).

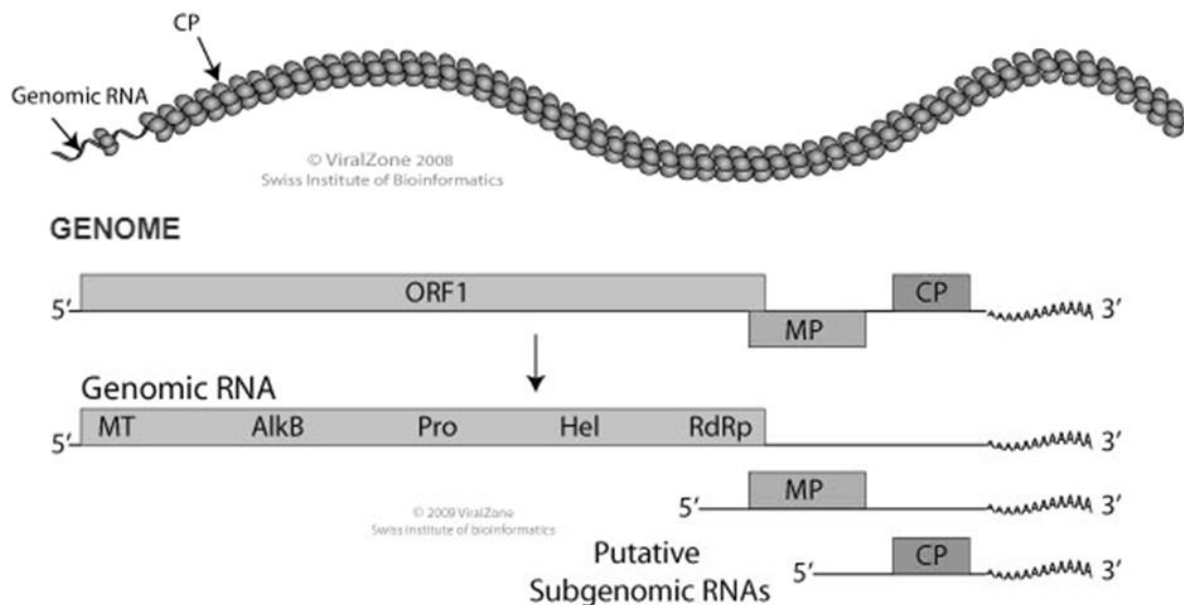
Forgalomba hozni csak a NÉBIH, illetve a növény- és talajvédelmi hatáskörben eljáró járási hivatal által ellenőrzött gyümölcs szaporítóanyagot szabad, az ellenőrzésnek pedig a a növény-egészségügyi feladatok végrehajtásának részletes szabályairól szóló jogszabályban előírt növény-egészségügyi követelmények alapján kell történnie (14/2017. (III.23) 14.§).

2.4. Karanténvírusok jellemzése

2.4.1. Alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV)

Az Alma klorotikus levélfoltosság vírus (Apple chlorotic leaf spot virus) a Betaflexiviridae családba, azon belül pedig a Trichovirusok közé tartozik.

Helikális szimmetriával rendelkeznek, a virionok mérete 640-760 nm hosszú és 12 nm széles. A virion lineáris, pozitív, egyszálú RNS-sel rendelkezik.



5. ábra: Trichovirusok virionja és genomszerveződése (http5)

Gazdanövényeik egyaránt a citrusfélék, az almatermésűek, a csonthéjasok is lehetnek (http6). Terjedése szemzéssel és oltással történik (Garcia-Ibarra et al. 2010). A betegség változatos tüneteket mutat, melyek lehetnek barnás-vöröses színű kéreghasadás, kambium pusztulás, illetve hajtáspusztulás, nekrotikus vagy gyűrűs foltok gazdanövénytől függően. Jellemzően szilván, cseresznyén, meggyen, valamint kajszin a termést támadja, míg őszibarackon már megfigyelhető a nekrózis a törzsön is. Napjaink jelentős almafajtái esetében látens fertőzés jelentkezik (Németh 1979).

A *Trichovirus* nemzetséget újabban a Nidovirales rend Barnaviridae új víruscsaládjába sorolták (Pringler 1998).

2.4.2. Alma törzsbarázdáltság vírus (ASGV)

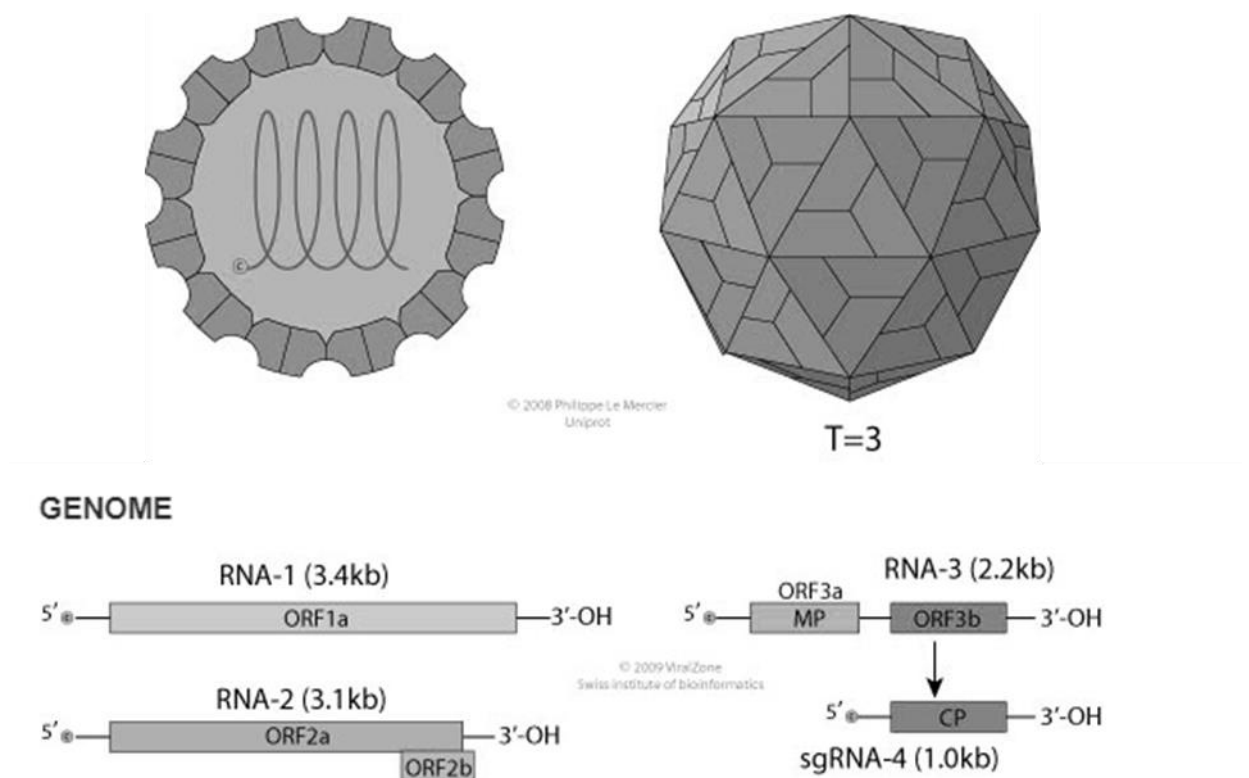
Az Alma törzsbarázdáltság vírus (Apple stem grooving virus) a Betaflexiviridae családba, a Capillovirus genusba tartozik. A Capillovirusokra jellemzően 640 nm hosszú és 12 nm széles virionnal rendelkezik, mely lineáris, pozitív, egyszálú. Ezek a vírusok legalább három fehérjét kódolnak (Hisae 2003). Világszerte elterjedtek, gazdanövénykörük megegyezik az ACLSV-nál leírtakkal. A betegség tünete jellemzően a nekrotikus foltok kialakulás. Terjedése történhet mechanikusan vagy maggal, nincs ismert vektora (http7, http8).

2.4.3. Alma törzsgödrösödés vírus (ASPV)

Az ASPV, azaz Apple stem pitting virus szintén a Betaflexiviridae családba, tartozik, de a Foveavirus genusba ([http9](#)). Lineáris, pozitív RNS-sel rendelkezik, mely öt fehérjét kódol. Virionja legalább 800nm hosszú, 12-13 nm széles. Gazdanövényei az almatermésűek, a *Chaenomeles japonica* (CNMJA, Valódi japánbirs), *Cydonia oblonga* (CYDOB, Birs), *Malus domestica* (MABSD, Alma), *Pyrus communis* (PYUCO, Körte) fajok (Govind P. Rao, Arben Myrta, Kai-Shu Ling 2008). Egyaránt jellemző rá a mozaik és a gyűrűsfoltosság is ([http10](#), Hadidi 2011).

2.4.4. Alma mozaik vírus (ApMV)

Az Apple mosaic virus a Bromoviridae családba, az Ilarvirusok közé tartozik, melyek virionjai ikozaéder szimmetriájúak, amelynek 29 nm hosszú az átmérője. A virionok belsejében három genomi és egy szubgenomi egyszálú RNS molekula van (Horváth és Gáborjányi 1999).



6. ábra: Ilarvirusok virionja és genomszerveződése ([http5](#))

Gazdanövényei igen változatosak, melynek köszönhetően az egész világon elterjedt. Képes fertőzni mind fás-, mind lágyszárú növényeket is, de legjellemzőbb a *Malus domestica* (MABSD, Alma) és *Rubus idaeus* (RUBID, Málna) fajták fertőzése ([http11](#)). A tünetek lehetnek levél deformálódások, elszíneződések, okozhat rozettás levélállást vagy a teljes növény torzulást (Grimova et al. 2016, [http11](#)). A gazdanövénytől függetlenül különböző

formájú nekrotikus de főként klorotikus elszíneződések jelennek meg a leveleken. A tünetek nyáron látensek (Grimova et al. 2016).

2.5. Növényi biotesztek

Napjainkban a vírusok meghatározására már számos módszert alkalmazhatunk, melyek lehetnek szerológiai vizsgálatok, RNS alapú vizsgálatok vagy szabadföldi biotesztek alkalmazása.

A tesztnövényes víruskimutatás módszere együtt fejlődött a virológiával, szükségességük még a gyorsesztek megjelenésével sem csökkent, ugyanis a biotesztek jelentősége főleg abban van, hogy a vírusok patológiai tulajdonságai csak tesztnövényeken vizsgálhatók, és eredményei bizonyos esetekben megbízhatóbbak, mint a szerológiai és egyéb vizsgálatoké. A biotesztek lényege, hogy vírusfertőzésre érzékeny tesztnövényeket inokulálják a vizsgálni kívánt kórokozóval. A fásszárú tesztnövények használata a vírusdiagnosztikában drága; sok kézi munkát, helyet és időt igényel (Horváth és Gáborjányi 2000, Bunikis & Barbour 2002, Legrand 2015).

Az 5/1988. (IV. 26.) MÉM számú rendelet 8. melléklete szerint az állami minősítésre bejelentett, a már köztermesztésben levő és a külföldről behozott növényfajták vírustól és vírusszerű szervezetektől való mentességének megállapítását, fertőzöttségük esetén a kórokozóktól való mentességüket a minisztérium által előírt és egységes módszerekkel kell elvégezni. Ezeket a speciális vizsgálatokat a növényvédelmi és agrokémiai állomások szakemberei végzik (Bach és Szőnyegi 1996). A tesztelés időtartama, a telepítés és szemzés évét is beleszámítva, 4 év. A bonitálások az almástermésűeknél júniustól szeptember közepéig tartanak.

Alma vírusok kimutatására többféle bioteszt is alkalmazható, ezek az almatermésűek lágý-, valamint fás szárú biológiai tesztelése (Bach és Szőnyegi 1996). Fásszárú alanyoknál a vírustvitel oltással történik, jól meggyökeresedett alanyra. Kettős oltást akkor alkalmaznak, ha az alany, a vizsgált fa és az indikátor azonos fajhoz tartoznak. A kéregátültetést akkor kell használni, ha az alany és a vizsgált fa nem azonos fajhoz tartozik (Horváth és Gáborjányi, 2000). Lágý szárú biológiai tesztelés során használt tesztnövények a következők: *Cucumis sativus* (mozaik és NEPO vírusok), *Chenopodium quinoa* (alma klorotikus levélfoltosság vírus (apple chlorotic leaf spot *trichovirus*)); alma törzsbarázdáltság vírus (apple stem grooving *capillovirus*) és NEPO vírusok és a *Celosia argentea* (alma klorotikus levélfoltosság vírus). A

vizsgálatokat március–április hónapokban kell elvégezni. A tesztelésnél használt növényi rész a virágszirom, amelyhez 1:5 arányban stabilizáló puffer szükséges. Az almástermésűek esetében kétféle puffert használnak: 0,01 M Tris/HCl-puffer (pH 8,5) + 0,005 M MgSO₄ + 1% koffein; 0,01 M Tris/HCl-puffer (pH 8,5) + 0,005 M MgSO₄ + 0,1% Na₂SO₃ + 0,1% aszkorbinsav + 1% nikotin. A virágszirmokat porcelánmozsárban, a stabilizáló puffer jelenlétében kell szétdörzsölni, és a kapott szövetnedvvel inokulálni a teszt növények leveleit. A *Cucumis sativus* esetében 20, a *Chenopodium quinoa* és a *Celosia argentea* esetében 6-6 ismétlés beállítása szükséges. A teszt növényeket a vizsgálat időtartamára (kb. 20 napra) 20–22 °C-os, vektormentes üvegházban kell elhelyezni.

2.6. Nagy áteresztőképességű szekvenálás

A virológia tudományának fejlődése az elmúlt években jelentősen felgyorsult. A vírusdiagnosztika egyik újabb módszere a nagy áteresztőképességű szekvenálás (HTS). Ez egy nagy hatékonyságú, és gyors módszer. Az nagy áteresztőképességű szekvenáláson alapuló metagenomika egyik változata során nem az örökítőanyagot vizsgáljuk, hanem a növény védekező rendszere által termelt kis RNS-ek szekvenciáját határozzuk meg (Adams 2009, Varvara 2018).

A vírus sokszorozódása közben kétszálú RNS molekulák képződnek, ebből keletkeznek növényi enzimek hatására a vírusspecifikus kis RNS-ek. A módszer ezek szekvenciáját határozza meg, és mivel a kis RNS vírusból képződött, így a növényben összes jelenlevő víruskimutatását lehetővé teszi (Várallyay 2015).

Az újgenerációs szekvenáláson alapuló módszerek hátránya, hogy költségesek, bár költségeik várhatóan csökkenni fognak a jövőben, így szélesebb körben is elterjedhetnek. Ezen eljárásokat nagy áteresztőképességű eljárásoknak nevezzük, ugyanis az adott mintából több millió szekvenciát (read-et) képesek leolvasni (Barba et al. 2014).

Ezzel a módszerrel már több vírust sikerült leírni hazánkban elsőként, ilyenek például a Little Cherry Virus 1, Cherry Virus A, Grapevine Pinot Gris Virus (Czotter et al., 2015, Baráth et al., 2018).

3. Anyag és módszertan

3.1. Mintavételezés

A dolgozatomban vizsgált növények az NAIK GYKI érdi törzsültetvényéből származnak. A mintákat munkatársaim gyűjtötték 2017-ben. Tíz fajta (4. táblázat) egy-egy egyedéről szedtek négy levelet. A döntés azért esett ezekre a fákra, mert a NÉBIH velencei virológiai laborban ezekről a növényekből állítottak be biotesztet 2016-ban.

4. táblázat: Vizsgált fajták

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Red Elstar	Jim Brian	Top spur	Redwinter	Jonica	Ozark gold	Florina	Regal prince	Jeasymac	Jonagold

A minták RNS-éből kis RNS szekvenáló könyvtár is készült, melyet az UD Genomed cég szekvenált meg nagy áteresztőképességű szekvenálási módszerrel, az Illumina platformon. Munkám során ezeket a szekvenálási eredményeket elemeztem és igazoltam vissza.

3.2. Bioinformatikai elemzés

A bioinformatika számítógépes módszerek kidolgozása és alkalmazása a biológiai információ kezelésére és elemzésére. Szűkebb értelemben: a biológiai szekvenciaadatok kezelése és elemzése, ill. a 3D szerkezeti információ kezelése és elemzése.

A kis RNS-ek újgenerációs szekvenálási adatok bioinformatikai elemzése lehetővé teszi a mintákban lévő összes ismert és ismeretlen vírus kimutatását. A minták szekvenálását a korábbi években elvégezték, a UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft. (Debrecen) az Illumina® HiScanSQ NGS platformot használva. A szekvenált adatok elemzéséhez a CLC Genomics Workbench 11 (Qiagen Bioinformatics®) programot használtam.

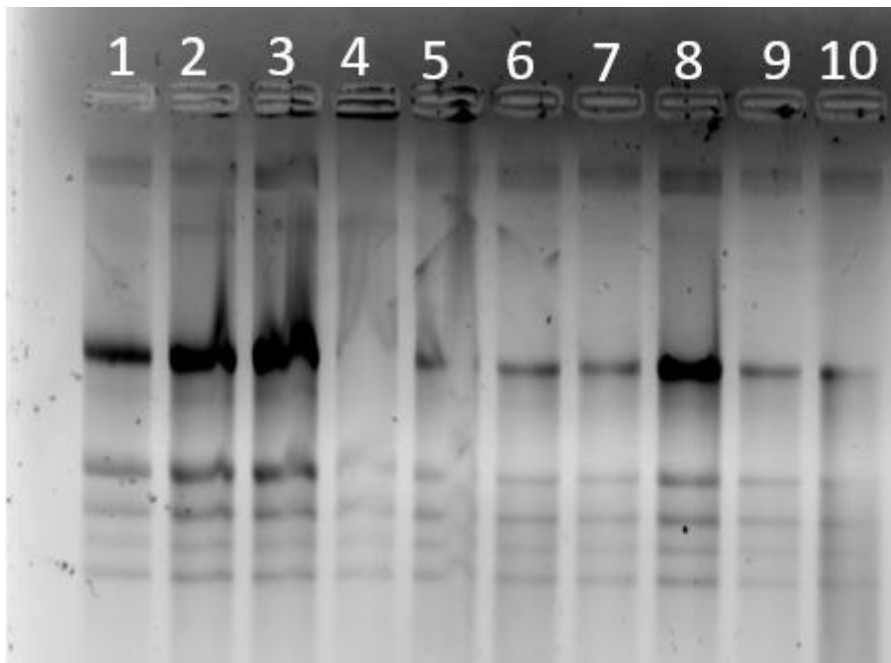
Először trimmeltem a szekvenciákat, azaz eltávolítottam a kis RNS-ekhez ligált adapterek szekvenciáját a szekvenciavégekről, továbbá eltávolítottam a nem megfelelő minőségű szekvenciákat is. A következő lépés az úgy nevezett „contig”-építés, melynek során az átfedő szekvenciákat tartalmazó kis RNS olvasatokról hosszabb szakaszokat épülnek, ezáltal nagyobb pontossággal kapható találat a vírusgenomokra és csökken a hibás illesztések lehetősége. Ezeket a szakaszokat az NCBI vírus-referenciagenomokat tartalmazó adatbázisára illesztettem, így megkaptam, hogy mely vírusok mutathatók ki a mintáimból. A kapott listát a

legalacsonyabb E-value/érték alapján rendeztem, mely maximumát E^5 értékben határoztuk meg. Ez a szignifikancia szintet jelöli, minél kisebb az érték, annál valószínűbb a vírus jelenléte. A lista öt vírus jelenlétét mutatta. Négy vizsgálat köteles: az Alma mozaik vírus (ApMV), Alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV), Alma törzsgödrösödés vírus (ASPV) és az Alma törzsbarázdáltság vírus (ASGV), mellett találatot kaptunk a Citrus concave gum-associated virusra. Az NCBI GenBankból kikerestem a vírusok referencia genomját, ráillesztettem a trimmelt szekvenciákra, ez megmutatta hány read-et tudott a program felilleszteni. Minél nagyobb a lefedettség a referenciára illeszkedő readek elemzése során, annál valószínűbb, hogy az illeszkedő read-ek virális eredetűek. Készítettem nem redundáns read-ek alapján is kimutatást. A nem redundáns read-ek esetében a program a szekvenált kis RNS-eket csak egyszer illeszti fel, míg ellenkező esetben az összes illeszkedést megjeleníti, ezt szemléltetik az eredmények 4.2.-es pontban lévő ábrái. A továbbiakban e vírusok jelenlétét igazoltam vissza molekuláris módszerekkel.

3.3. RNS tisztítás

A levelek tíz fáról származnak, négy-négy mindegyikről. A mintákhoz vegyesen mindegyik levélből vettem, összesen 1-0,15 g-ot, ezeket folyékony N-be tettem, majd összetörtem. 17 μ l β -mercaptoetanolt és 850 μ l 65°C-ra előmelegített extrakciós puffert (EB: 2°C TAB+ 2,5% PVP+ 100mM Tris-HCl+ 25mM EDTA+ 2M NaCl) adtam hozzá. A keveréket vortexeltem, ezután 10 percig 65 °C-os vízbe tettem. Hozzáadtam 850 μ l kloroform:isoamilalkoholt (24:1), ezután óvatosan döntve megkevertem. 10000 rpm-en 10 percig 4°C-on centrifugáltam. Új 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe 250 μ l 9M LiCl-hoz mértem, ehhez pedig 450 μ l fölülúszót adtam a centrifugált mintákból. Óvatos döntögetéssel megkevertem, ezután 30 percre jégre tettem. Centrifugáltam (13.000 rpm), 4°C-on, 20 percig, közben 65°C-ra melegítettem SSTE-t (SSTE: 1M NaCl+ 0,5% SDS+ 10mM Tris-HCl+ 1mM EDTA). Leöntöttem a fölülúszót és a csapadékra 450 μ l 65°C-ra melegített SSTE-t mértem, majd vortexeltem. Ehhez 450 μ l kloroform: isoamilalkoholt mértem, majd lecentrifugáltam (13.000 rpm) 4°C-on, 10 percig. Ismét új Eppendorf csöveket vettem elő, melyekbe mintánként 280 μ l izopropanolt és 30 μ l 4M NaAcetát (pH 5,2) keveréket és 400 μ l fölülúszót mértem. 5-10 percig szobahőmérsékleten hagytam a mintákat. Ezt követően 4°C-on centrifugáltam (13.000 rpm) 20 percig. Leöntöttem a fölülúszót, a csapadékra 1 ml hideg etanolt mértem, centrifugáltam 4°C-on (13.000 rpm) 5 percig. Az alkoholt leöntöttem, majd 10 percig szárítottam a mintákat speed vac-ben. 25 μ l steril milliQ tisztaságú vízbe oldottam vissza a mintákat, végül vortexeltem őket.

Minden mintából két kivonást végeztem. A tisztítás sikerességét 1,2%-os agaróz gélelektroforezissel történő szétválasztásával ellenőriztem. Az egyes minták töménységét és szennyezettségét Nanodrop készülékben mértem.



7. ábra: RNS tisztítás eredménye (1-10: 4. táblázatban jelölt fajták)

5. táblázat: Vizsgált fajtákból tisztított RNS kivonatok koncentrációja

KTÜ I.tábla	Fajta	Sor	Fa	Koncentráció ng/vl
1	Red Elstar	16	9	158,9
2	Jim Brian	13	13	202,6
3	Top spur	20	41	238,3
4	Redwinter	19	25	128,3
5	Jonica	16	3	147,1
6	Ozark gold	8	13	160,3
7	Florina	13	5	116
8	Regal prince	18	1	175,5
9	Jeasymac	15	9	174,8
10	Jonagold	11	1	306,6

3.4. cDNS szintézise reverz transzkripcióval

A korábban tisztított RNS-ekből cDNS-t kellett szintetizálni a vírusok diagnosztizálásához, ugyanis polimeráz láncreakciót (PCR) nem lehet RNS-sel végrehajtani (Wonderlich 2014). Ehhez a Thermo Scientific Revertaid First strand cDNA synthesis kitjét használtam.

A cDNS szintézishez a RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kit-et (Thermo Scientific) használtam.

A szintézishez először 0,25 µl random primerhez 500 ng tisztított RNS-t adtam, majd MQ-val 3 µl-re kiegészítettem az oldatot. A kapott oldatot 65°C-on denaturáltam 5 percig, majd jégre tettem. Jégen hozzáadtam mintánként 2 µl-t a következő keverékből: 1 µl 5x Reaction buffer + 0,5 µl 10 mM dNTP + 0,125 µl Ribolock Náz inhibitor + 0,25 µl Revertaid DNS polimeráz enzimet, amit rövid centrifugálás követett.

A reverz transzkripciót a következő beállítással végeztem:

1. 25°C: 10 perc anellálás
 2. 42°C: 50 perc
 3. 45°C: 10 perc
 4. 70°C: 5 perc inaktiválás/denaturálás.
- } inkubálás

A cDNS-t a PCR reakciókhoz 10-szeresére hígítottam (2 µl cc.RT + 18 µl MQ) és használtam a vírus specifikus PCR-ekhez.

3.3. Aktin teszt a cDNS minőségének ellenőrzésére

Az elkészített cDNS-ek minőségének ellenőrzéséhez aktin tesztet végeztem. Ehhez már korábban tervezett specifikus primereket használtam (Varga 2016). Az amplifikálásban használt primerek:

Mxdaktin1s: GGAAGTGGGAATGGTGAAGGC;

Mxdaktin719as: GCTCCAATTGTGATGACTTG.

A reakcióhoz a Phire Green Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific) enzimet használtam, az ehhez szükséges keveréket 15 µl végtérfogatban állítottam össze (Varga 2016).

- 9,4 µl MQ
- 3,0 µl 5xPhire puffer
- 0,75 µl (10 pmol/µl) Mxdaktin1s primer
- 0,75 µl (10 mol/µl) Mxdaktin719as primer
- 0,3 µl 10mM dNTP
- 0,3 µl Phire enzim
- 0,5 µl 10xhíg cDNS.

A reakció ellenőrzésére negatív kontrollként MQ vizet, míg pozitív kontrollként már a csoport egy már korábban használt templátját használtam. A PCR reakcióhoz az alábbi beállításokat használtam:

1. 98°C: 30 másodperc denaturálás
 2. 98°C: 10 másodperci denaturálás
 3. 55°C: 10 másodperc anellálás
 4. 72°C: 20 másodperc elongáció
 5. 72°C: 1 perc láncépítés
- } 35X

A kapott PCR termékek méretét 1,2%-os agaróz gélen gélelektroforezissel ellenőriztem. Méretmarkernek GeneRuler 100 bp DNA Ladder-t (Thermo Fisher) használtam, a terméket 718 bp-nál vártam.

3.5. Víruskimutatás RT-PCR-rel

A vírusok kimutatásához a csoport által korábban tervezett az adott vírusra specifikus primereket használtam (Varga 2015) (6. táblázat).

6. táblázat: Vírusspecifikus primerek szekvenciája és tulajdonságai

Virus	Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	Size of the amplified product
ASGV	asgv6021s	GAATTGAAAACCTTTGCTGCCAC	337bp
	asgv6358as	GACTYCTAACCCTCCAGTTCCAG	
APMV	apmv1295s	CCGTGAGGAGGACAGCTTGG	487bp
	apmv1779as	CAGATCTTCATCGATAAGTAGAA C	
ACLSV	aclsv6853s	AGACCCCTTCATGGAAAGACAGG	672bp
	aclsv7525as	CTATTTATTATAAGTCTAAACACT	
ASPV	aspv1169s	CTGGAACCTCATGCTGCAAACCTC	384bp
	aspv1553as	CACACATAGCCGCCCCNGTTAGG	

A reakcióhoz elkészítettem egy keveréket az alábbiak szerint:

5x Phire puffer:	3 µl
Phire polimeráz:	0,3 µl
10mM dNTP:	0,3 µl
MQ víz:	9,4 µl
Vírusspecifikus primer forward:	0,75 µl
Vírusspecifikus primer reverse:	0,75 µl

Az előállított keverék 14,5 µl térfogatához hozzáadtam 0,5 µl-t templátot. Minden esetben használtam pozitív és negatív kontrollt. A pozitív kontrollt egy korábbi kísérlet mintáiból mértem össze, a negatív kontroll esetében pedig MQ vizet használtam templát helyett.

Minden esetben ugyanazt a beállítást használtam:

- | | |
|----------------------------------|-------|
| 1. denaturáció: 98°C – 30 s | |
| 2. denaturáció: 98°C – 10 s | } 40X |
| 3. anelláció: 56 °C – 10 s | |
| 4. elongáció: 72°C – 20 s | |
| 5. végső elongáció: 72°C – 1 min | |

Az PCR reakció eredményességét minden esetben 1,2%-os agaróz gélen gélelektroforezissel ellenőriztem. Méretmarkerként 100 bázispár plus markert használtam.

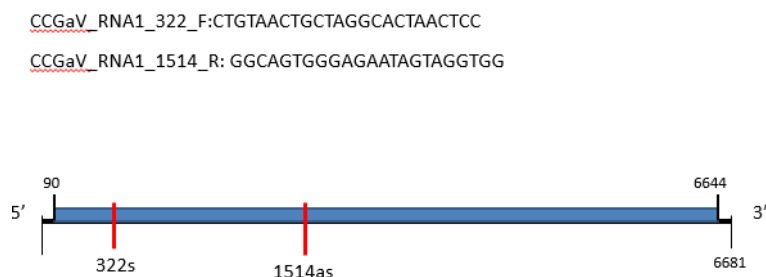
3.6. Primer tervezés Citrus concave gum-associated virus-ra

A bioinformatikai elemzés során találtam a mintákban Citrus concave gum-associated virus-ra (CCGaV) illeszkedő readeket is találtam. Mivel a vírust hazánkban még nem mutatták ki jelenlétének igazolását RT-PCR-rel szerettem volna elvégezni.

A PCR elkészítéséhez speciális primerekre volt szükségem. Tervezésüket a szakirodalomban ismertetett szempontok szerint végeztem, miszerint hosszuk 18-25 nukleotid körül legyen az aspecifikus feltapadást elkerülendő. Lehetőség szerint igyekeztem C vagy G véget találni a 3' véghez (Wonderlich 2014). Arra is figyeltem, hogy primereim és a templátok pontosan illeszkedjenek, ne tartalmazzanak mismatch-et (Malinowski, 2005).

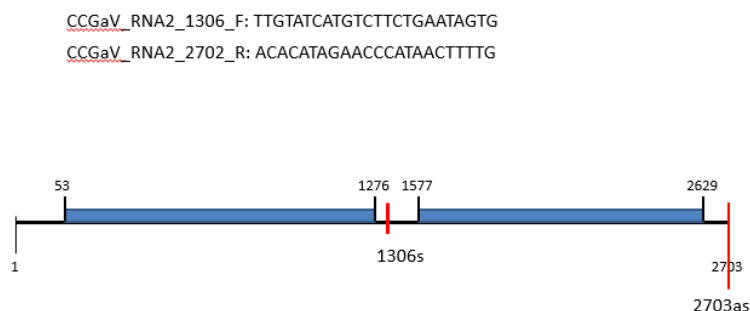
Az NCBI oldalán megkerestem a CCGaV vírus RNS szekvenciáját, melyhez kb. 600 bázispárt összefoglaló sense és antisense primert terveztem.

Primerek RNA1



8. ábra: RNA1 sense és antisense primer

Primerek RNA2



9. ábra: RNA2 sense és antisense primer

A tervezéshez primer tervező programokat használtam, majd ellenőriztem specifikusságukat.

General properties:	PCR suitability tests (Pass / Warning):
Primer name: Untitled	Single base runs: Pass
Primer sequence: CTGTAAGTCTAGGCACTAACTCC	Dinucleotide base runs: Pass
Sequence length: 24	Length: Pass
Base counts: G=4; A=6; T=6; C=8; Other=0;	Percent GC: Pass
GC content (%): 50.00	Tm (Nearest neighbor): Warning: Tm is greater than 58;
Molecular weight (Daltons): 7272.78	GC clamp: Pass
nmol/A260: 4.52	Self-annealing: Pass
micrograms/A260: 32.85	Hairpin formation: Pass
Basic Tm (degrees C): 57	
Salt adjusted Tm (degrees C): 52	
Nearest neighbor Tm (degrees C): 65.01	

10. ábra: RNA1 forward primer, forrás: [http12](http://12)

Citrus concave gum-associated virus isolate CGW2 segment RNA1, complete sequence	
Sequence ID: KX960112.1	Length: 6681
Related Information	Number of Matches: 1
Gene-associated gene details	
Range 1: 322 to 345	GenBankGraphics Next Match
Previous Match	
Alignment statistics for match #1	
Score	Expect
48.1 bits(24)	0.002
Query 1 CTGTAAGTCTAGGCACTAACTCC 24	
Sbjct 322 CTGTAAGTCTAGGCACTAACTCC 345	

11. ábra: RNA1 forward primer, forrás: <http:13>

General properties:	PCR suitability tests (Pass / Warning):
-----	-----
Primer name: Untitled	Single base runs: Pass
Primer sequence: TTGTATCATGTCTTCTGAATAGTG	Dinucleotide base runs: Pass
Sequence length: 24	Length: Pass
Base counts: G=5; A=5; T=11; C=3; Other=0;	Percent GC: Warning: %GC is less than 40;
GC content (%): 33.33	Tm (Nearest neighbor): Warning: Tm is greater than 58;
Molecular weight (Daltons): 7363.88	GC clamp: Pass
nmol/A260: 4.34	Self-annealing: Pass
micrograms/A260: 31.96	Hairpin formation: Pass
Basic Tm (degrees C): 51	
Salt adjusted Tm (degrees C): 45	
Nearest neighbor Tm (degrees C): 59.31	

12. ábra: RNA2 forward primer, forrás: <http:14>

Citrus concave gum-associated virus isolate CGW2 segment RNA2, complete sequence	
Sequence ID: KX960111.1	Length: 2703
Related Information	Number of Matches: 1
Gene-associated gene details	
Range 1: 1304 to 1327	GenBankGraphics Next Match
Previous Match	
Alignment statistics for match #1	
Score	Expect
48.1 bits(24)	0.002
Query 1 TTGTATCATGTCTTCTGAATAGTG 24	
Sbjct 1304 TTGTATCATGTCTTCTGAATAGTG 1327	

13. ábra: RNA2 forward primer, forrás: <https:15>

4. Eredmények

4.1. NÉBIH NTAI Velencei Virologiai Laboratórium telephelyén beállított biotesztek értékelése

A NAIK GYKI érdi törzsültetvényről származó fajtákat a NÉBIH NTAI Velencei Virologiai Laboratórium vizsgálta bioteszttel. A teszteket 2016-ban állították be. A biotesztekhez 10 almafajtát indikátornövényt használtak, 4-5 egyedet vizsgálva fajtánként. Több esetben nem eredt meg az alany vagy a vizsgálandó fajta. A 7. táblázat a második évben, 2018-ban történt bonitálás eredményeit szemlélteti, melynek értékelését a velencei kollegákkal együtt végeztem.

7. táblázat: Indikátornövények vizsgálati eredményei 2018

	Lord Lambourne	Spy 227	R 12740-7A	Malus platycarpa	Virginia Crab
összesen teszten (db)	50	50	50	50	50
megeredt (db)	50	50	49	49	48
%	100	100	98	98	96
Ebből tünetet mutatott (db)	5	5	15	15	0
%	10	10	30,6	30,6	0
	Pyronia weitchii	Stayman	Golden Delicious	Gravensteiner	Red Delicious
összesen teszten (db)	50	40	40	40	40
megeredt (db)	42	39	40	37	40
%	84	97,5	100	92,5	100
Ebből tünetet mutatott (db)	5	0	5	0	0
%	11,9	0	12,5	0	0

A táblázatban jól látható, hogy a növények megeredése nem minden esetben volt tökéletes. Az R 12740-7A, a Malus platycarpa és a Stayman fajta esetén egy, a Virginia Crab esetén kettő, a Gravensteiner fajtánál 3, a Pyronia weitchii fajtánál pedig 8 db növény nem eredt meg.

A 10 vizsgálandó fajta közül négyen láttunk elváltozást, ezek a Redwinter, Jonica és Jeasymac és az Ozark Gold. A Redwinter alanyok R 12740-7A és *Malus platycarpa* indikátornövényeik minden egyede tünetet mutatott. Az R 12740-7A esetében sárgulást, a *Malus platycarpa* világos szabálytalan foltokat figyelhattunk meg (14. ábra).



14. ábra: a) R 12740-7A tünet, b) *Malus platycarpa* tünet

A Jonica alanyú fajták esetében a Lord Lambourne, a Spy 227, az R 12740-7A, a *Malus platycarpa* és a *Pyronia weitchii* indikátorok is egységesen sárgás foltokat és kanalasodást mutattak (15. ábra). A Spy 227 növényeken törpülés is megfigyelhető volt (15. ábra).



15. ábra: Jonica indikátorai

Az Ozark Gold alanyú növényeknél egy indikátornövénynél, a Golden Delicious-nél deformálódott termést figyeltünk meg. A Jeasymac fák Malus platycarpa és R12740-7A indikátornövényei mind sárgulást mutattak (16. ábra).



16. ábra: Malus platycarpa és R 12740-7A

A megfigyelt tünetek alapján a bioteszt eredményeit a 8.táblázatban foglaltam össze.

8. táblázat: Biotesztek eredménye 2018

Redwinter		R 12740-7A	Malus platycarpa		
	megeredt	5/5	5/5		
	tünetek	növény,sárgul	szabálytalan		
Jonica		Spy 227	R 12740-7A	Malus platycarpa	Pyronia weitchii
	megeredt	5/5	5/5	5/5	5/5
	tünetek	kicsik,kanalas fajta	fajta kanalas, sárgás foltok	fajta kanalas, sárgás foltok	sárga folt minden, satnya
Ozark gold		Golden Delicious			
	megeredt	4/4			
	tünetek	3 fán deformálódott a termés			
Jeasymac		R 12740-7A	Malus platycarpa		
	megeredt	5/4	5/5		
	tünetek	sárgul,satnya,1 letört	tünetes, sárga amorf foltok		

4.2. Bioinformatikai elemzés eredménye

A kis RNS szekvenálás a 10 vizsgált fajta RNS-ének keverékéből történt. A bioinformatikai elemzés során, a kis RNS-ekből összeállított kontigokat elemezve találatot kaptam a CCGaV vírusra. Az almafákon kötelezően vizsgálandó ApMV, ACLSV, ASPV és ASGV vírusokra a kontigok illesztése során nem kaptam találatot. Az irodalomból azonban ismert, hogy ezen vírusok ellen meglepően kevés kis RNS keletkezik. Mivel még viszonylag kis számú read jelenléte is utalhat vírusfertőzésre, a kis RNS-eket (redundáns és nem redundáns readeket is) illesztettem e négy vírus referenciagenomjára (17-32. ábra), ennek eredményét a 9. táblázatban foglaltam össze.

9. táblázat: Readek száma vírusrólként

Vírusok	nem redundáns	redundáns
CCGaV RNA1	1717	6479
CCGaV RNA2	2072	14125
ApMV RNA1	400	1139
ApMV RNA2	513	1614
ApMV RNA3	200	431
ACLSV	2458	1037
ASPV	1173	5970
ASGV	1169	2687



17. ábra: A szekvenált kis_RNS könyvtár nem redundáns olvasatainak illesztése a CCGaV vírus 1-es genomjára (RNA1)



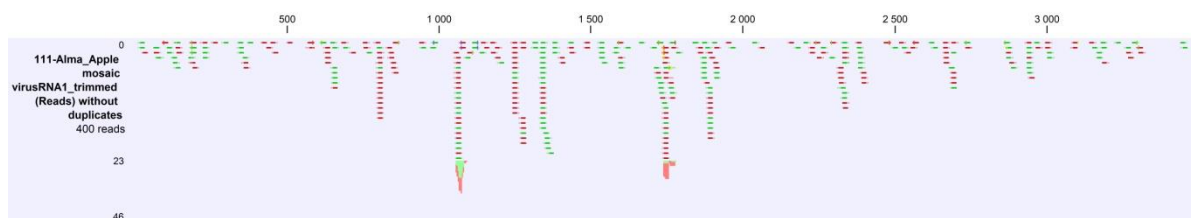
18. ábra: A szekvenált kis_RNS könyvtár redundáns olvasatainak illesztése a CCGaV vírus 1-es genomjára (RNA1)



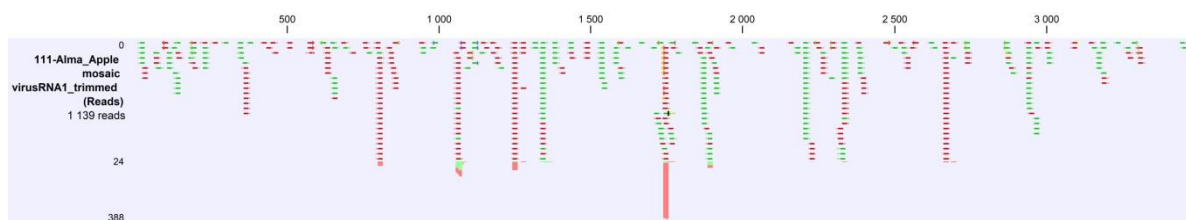
19. ábra: A szekvenált kis_RNS könyvtár nem redundáns olvasatainak illesztése a CCGaV vírus 2-es genomjára (RNA2)



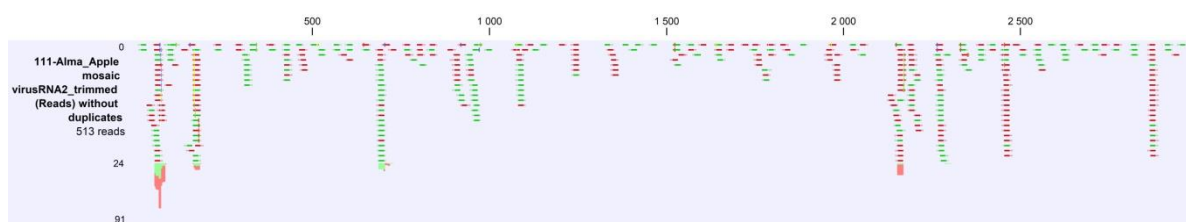
20. ábra: A szekvenált kis_RNS könyvtár redundáns olvasatainak illesztése a CCGaV vírus 2-es genomjára (RNA2)



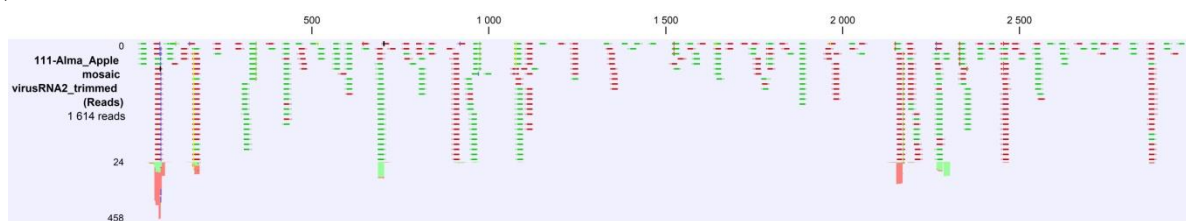
21. ábra: A szekvenált kis_RNS könyvtár nem redundáns olvasatainak illesztése a ApMV vírus 1-es genomjára (RNA1)



22. ábra: A szekvenált kis RNS könyvtár redundáns olvasatainak illesztése a ApMV vírus 1-es genomjára (RNA1)



23. ábra: A szekvenált kis RNS könyvtár nem redundáns olvasatainak illesztése a ApMV vírus 2-es genomjára (RNA 2)



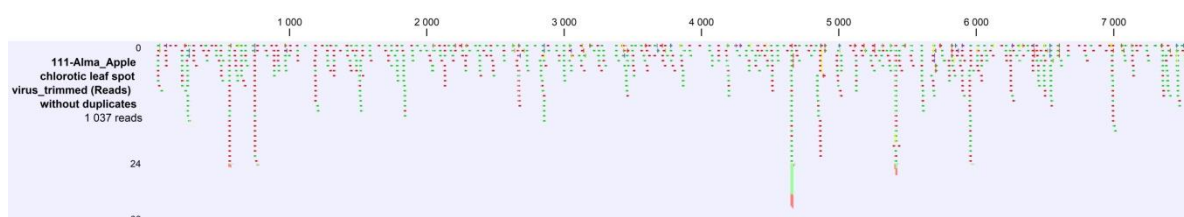
24. ábra: A szekvenált kis RNS könyvtár redundáns olvasatainak illesztése a ApMV vírus2-es genomjára (RNA2)



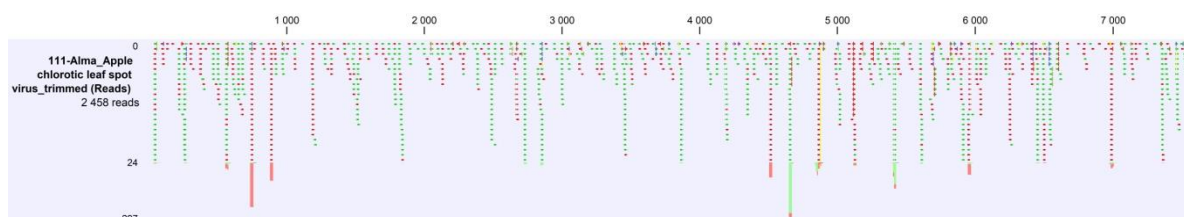
25. ábra: A szekvenált kis RNS könyvtár nem redundáns olvasatainak illesztése a ApMV vírus 3-as genomjára (RNA3)



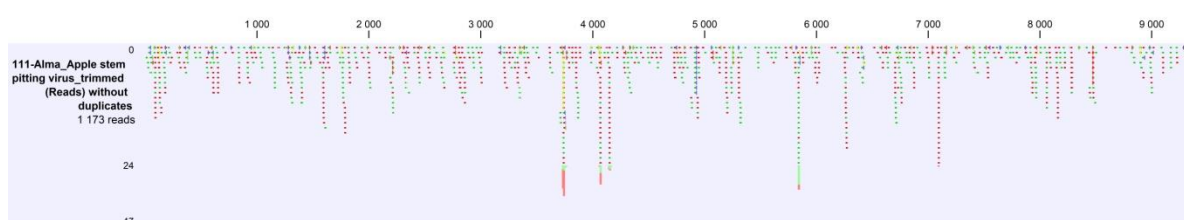
26. ábra: A szekvenált kis RNS könyvtár redundáns olvasatainak illesztése a ApMV vírus 3-as genomjára (RNA3)



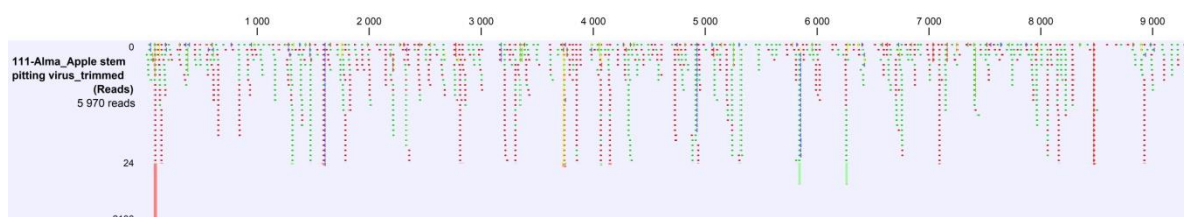
27. ábra: A szekvenált kis RNS könyvtár nem redundáns olvasatainak illesztése a ACLSV vírus genomjára



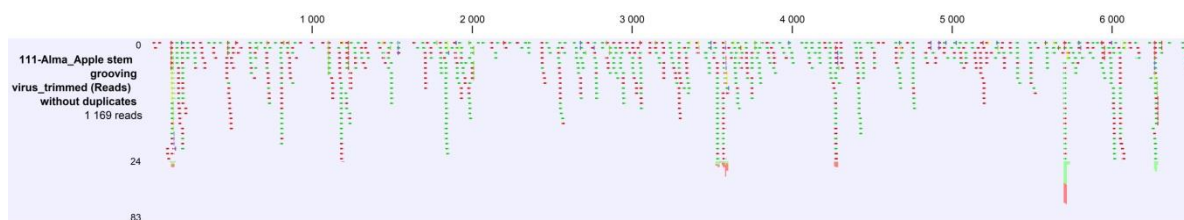
28. ábra: A szekvenált kis RNS könyvtár redundáns olvasatainak illesztése a ACLSV vírus genomjára



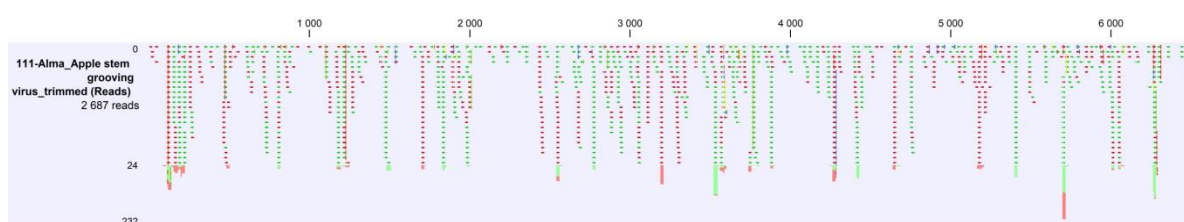
29. ábra: A szekvenált kis RNS könyvtár nem redundáns olvasatainak illesztése a ASPV vírus genomjára



30. ábra: A szekvenált kis RNS könyvtár redundáns olvasatainak illesztése a ASPV vírus genomjára



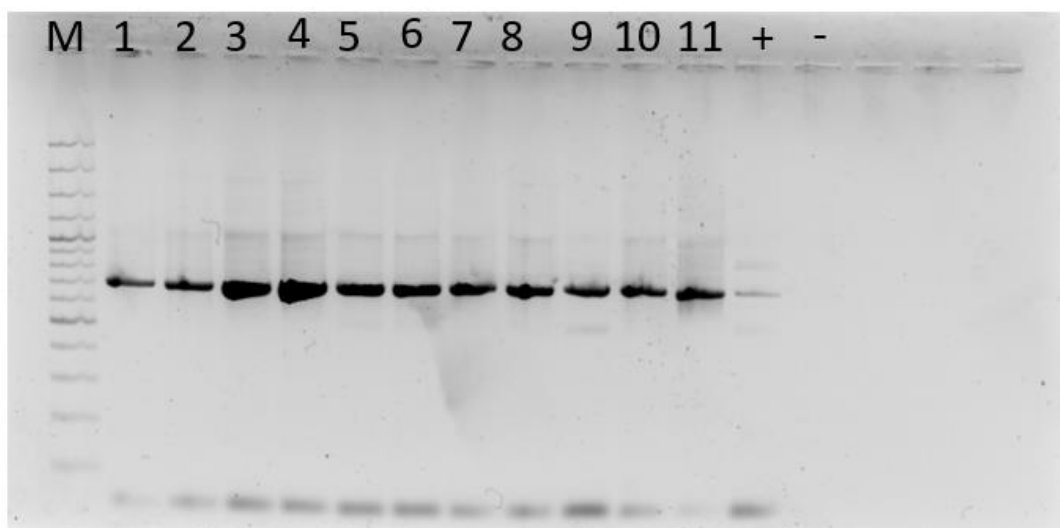
31. ábra: A szekvenált kis RNS könyvtár nem redundáns olvasatainak illesztése a ASGV vírus genomjára



32. ábra: A szekvenált kis RNS könyvtár redundáns olvasatainak illesztése a ASGV vírus genomjára

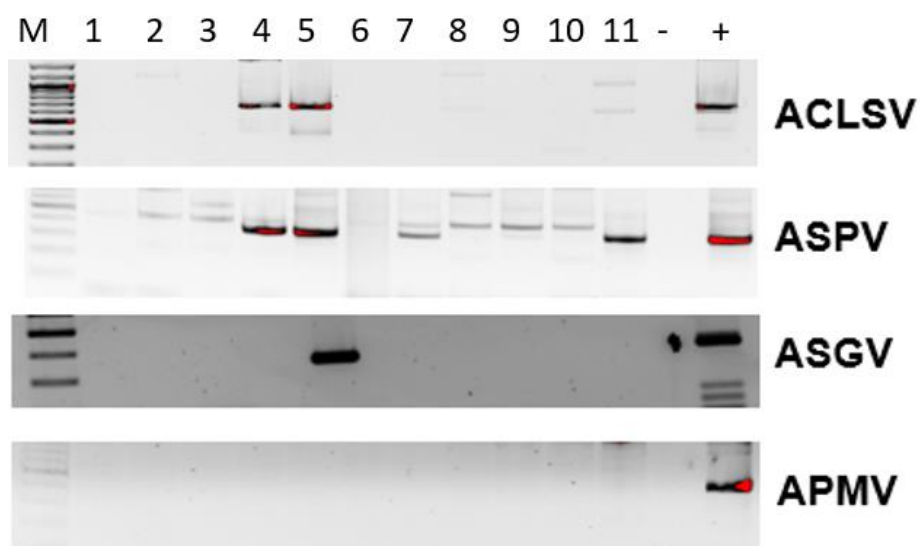
4.3. Víruskimutatás RT-PCR-rel

A mintákban először a kötelezően vizsgálandó vírusok kimutatását végeztem el. Ehhez a fák RNS-éből cDNS-t szintetizáltam. A vírusspecifikus RT-PCR-hez templátként a 10-szeres hígítású cDNS-eket használtam, a reakciók sikerességét minden esetben 1,2%-os agaróz gélen gélelektroforézissel ellenőriztem. A Thermo Scientific GeneRuler 100bp plus markert használtam a termékek méretének beazonosításához.



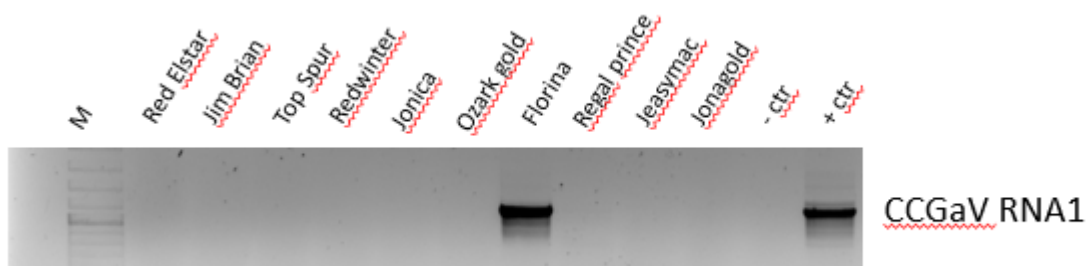
33. ábra: „Aktin teszt” eredménye (M:marker, +:pozitív kontrol, -: negatív kontrol, 1-10:4. táblázatban jelölt fajták, 11: összes keveréke)

A vizsgált négy vírus közül csupán az APMV-t nem tudtuk kimutatni valamelyik fában.
A 34. ábrán a vizsgálatok gél képe látható.



34. ábra: Kötelezően vizsgálandó vírusok kimutatása (M:marker, +:pozitív kontrol, -: negatív kontrol, 1-10:4. táblázatban jelölt fajták, 11: összes keveréke)

A CCGaV esetében ezidáig csak az 1-es RNS-re tervezett primerekkel végeztük el az RT-PCR reakciót. Ennek eredménye szerint egy fajta, a Florina (7-es minta) valóban fertőzött a kórokozóval (35.ábra).



135. ábra: CCGaV RNS1 kimutatás

A 10 almafajta különböző módszerekkel végzett vírusdiagnosztikájának eredményét a 10. táblázatban foglaltam össze.

A biotesztek, három fa esetén mutatta ki vírus jelenlétét (Redwinter: ACLSV; Jonica: ACLSV, ASPV; Jeasymac: ACLSV). A szekvenált adatok bioinformatikai elemzése öt vírus jelenlétét mutatta ki, de az elemzés az összes fára kiterjedően történt, nem külön egyedenként. Az RT-PCR pedig, két almafajta fertőzöttségét bizonyította (Redwinter: ACLSV, ASPV és a Jonica: ACLSV, ASPV és ASGV).

10. táblázat: Diagnosztikai módszerek eredményei

	Bioteszt	kis RNS HTS	RT-PCR
1		CCGaV RNS1, CCGaV RNS2, ACLSV, ASPV, ASGV, APMV?	
2			
3			
4	ACLSV		ACLSV, ASPV
5	ACLSV, ASPV		ACLSV, ASPV, ASGV
6			
7			
8			
9	ACLSV		
10			

5. Következtetések és javaslatok

A NÉBIH Velencei Virologiai Labor tesztjeinek összehasonlítása különböző modernebb típusú vírusdiagnosztikai eljárásokkal érdekes és izgalmas feladat volt.

A vizsgálatok összegzéseként elmondható, a bioteszt nem mutatta ki az ASGV jelenlétét. A kis RNS HTS eredménye sem volt teljesen egyértelmű, viszont kimutatott egy almból eddig le nem írt vírus, a CCGaV jelenlétét. Az RT-PCR nem tudta kimutatni a 9. mintában az ACLSV-t, amelyet a bioteszt detektált.

A szabadföldi tesztek jelentősége továbbra is nagy fontosságú. Hely-, munka-, és időigényük azonban jóval meghaladja az általam vizsgált más módokét. Mivel technikailag is igen nagy kihívás ennyi szemzést megfelelően végezni előfordulhatnak hibák, melyek befolyásolhatják a kísérlet bonitálhatóságát. Az abiotikus tényezők, mint időjárás, csapadék, talaj nagymértékben befolyásolhatják a kísérletet, és ezek szabályozására nincs teljes körű lehetőség. A tápanyaghiány, nem megfelelő művelés akár hibás diagnózist is okozhat, a tünetek változékonysága miatt.

Az nagy áteresztőképességű szekvenálás teljesen új módját mutatja meg a diagnosztikának. Az új vírusok detektálása, egy adott vizsgálni kívánt növény összes keresett vírusának, viroidjának kimutatása sokkal gyorsabb, mint más egyéb módokon, bár első sorban a gazdasági jelentőségüket kell szem előtt tartani. Ezzel a módszerrel akár olyan vírusokat is kimutathatunk egy országban melyeket eddig nem voltak ismertek, ahogyan a CCGaV is. Ezen betegségeknek nem biztos, hogy gazdasági jelentőségük van, az említett vírusról kevés szakirodalom található, gazdasági jelentőségét így nehéz megállapítani. Sajnos a nagy áteresztőképességű szekvenálás még mindig gyerekcipőben jár a többi eljárással szemben, így költsége jelentősen meghaladja őket.

Az nagy áteresztőképességű szekvenálás és annak bioinformatikai elemzésével szemben az RT-PCR-ek használata alkalmasabbnak bizonyult. A RT-PCR nagy érzékenysége mellett a víruskimutatás biztosabbnak mondható ([http16](#)). Míg az RT-PCR kiumtatta az ASGV jelenlétét az egyik fajtában, a bioteszt nem. Az ASGV vírus nagy gazdasági jelentőséggel bír világszerte. Kimutatását szabadföldön nehezíti, hogy a betegség sokáig látens marad ([http17](#)). A másik nagy szerológiai vizsgálat az ELISA módszer, mely számos előnnyel rendelkezik, sokoldalú, számszerűsíthető, egyszerű és érzékeny, de a RT-PCR és ELISA módszer ASGV kimutatási különbségei mégis jelentősek (Chrowter 2001). Az RT-PCR-rel lehetőségünk van

kimutatni a vírust az év bármely időszakában szedett növényi szövetből, míg az ELISA kísérletek nem mutatnak pontos eredményt a tavaszi hónapok kivételével (Kundu 2003). A karantén vírusok kimutatására az RT-PCR tökéletesen alkalmas, gyors, megbízható és nem is drága módszer, emiatt fontos lenne, ha bekerülne a rutin eljárások közé az ELISA teszt mellett.

A dolgozatomhoz elvégzett kísérletek megmutatták, hogy egyik diagnosztikai módszer sem képes teljes mértékben helyettesíteni a többit. A ténylegesen vírusmentes szaporítóanyagok előállításához a diagnosztikai módszerek további tökéletesítése szükséges.

6. Összefoglalás

A szaporítóanyagok vírusmentessége nélkülözhetetlen a gazdaságban. Ezt pedig a megfelelő vírusdiagnosztikai módszerek alkalmazásával, és a vírusmentesítési folyamatok végrehajtásával lehet kizárólag elérni.

Munkám során a szabadföldi biotesztek eredményeit hasonlítottam össze egy molekuláris technika, az RT-PCR-rel, és egy új módszer, az nagy áteresztőképességű szekvenálással szemben. Kutatásom célja a NAIK GYKI érdi törzsültetvényről származó alma minták vírusdiagnosztikájának elkészítése, a különböző módszerek összehasonlításával. A mintázott fákról a NÉBIH Velencei Virologiai Labor 2016-ban biotesztet állított be. A második évben végzett bonitálásban én is részt vettem. A második évben elvégzett bonitáláskor a tíz almafajtából négy fajta mutatott tünetet.

A korábban elkészített kis RNS könyvtár bioinformatikai elemzése során az almafák esetében kötelezően tesztelendő vírusok jelenlétét vizsgáltam, a kis RNS szekvenálás a 10 vizsgált fajta RNS-ének keverékéből történt. Ezután ennek eredményét igazoltam vírus specifikus RT-PCR-rel. Ehhez a kollégáim által korábban begyűjtött mintákból először RNS-t tisztítottam, majd cDNS-t készítettem belőle. A kapott cDNS minőségét aktin tesztel ellenőriztem. A cDNS-eket templatként használva vírus specifikus RT-PCR reakciókat hajtottam végre. A vizsgálatok során végzett PCR-ek sikerességét minden esetben 1,2%-os agaróz gélen történő gélelektroforézissel ellenőriztem.

A vizsgálatok összegzéseként elmondható, a bioteszt nem mutatta ki az ASGV jelenlétét. A kis RNS HTS eredménye sem volt teljesen egyértelmű, viszont kimutatott egy almából eddig le nem írt vírus, a CCGaV jelenlétét. Az RT-PCR nem tudta kimutatni a 9. mintában az ACLSV-t, amelyet a bioteszt detektált.

A dolgozatomhoz elvégzett kísérletek megmutatták, hogy egyik diagnosztikai módszer sem képes teljes mértékben helyettesíteni a többit. A ténylegesen vírusmentes szaporítóanyagok előállításához a diagnosztikai módszerek további tökéletesítése szükséges.

7. Irodalmi hivatkozások

Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M. and Boonham, N. (2009) Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10(4), 537-545.

Armijo, G., Schlechter, R., Agurto, M., Muñoz, D., Nuñez, C., Arce-Johnson, P. (2016) Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios, *Frontiers in Plant Science*, 382:11-12 p.

Bach I. és Szönyegi S., (1996) A szaporítóanyag certifikációs rendszere és követelményei. OMMI, Budapest, 95 p.

Bálint M. (2006): Molekuláris biológia I-II. Műszaki Kiadó, Budapest, 414 p.

Barandoc-Alviar, K., Ramirez, G.M., Rotenberg, D., Whitfield, A.E. (2016): Analysis of Acquisition and Titer of Maize Mosaic Rhabdovirus in Its Vector, *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae). *Journal of Insect Science*, 16(1):14.

Baráth, D., Jaksa-Czotter, N., Molnár, J., Varga, T., Balássy, J., Szabó, K.L., Kirilla, Z., Tusnády E, G., Preininger, É., Várallyay É. (2018): Small RNA NGS Revealed the Presence of Cherry Virus A and Little Cherry Virus 1 on Apricots in Hungary. *Viruses*, 10 (6): 318-330

Barba, M., Czosnek, H., Hadidi A. (2014). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6(1): 106–36.

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, Elsevier, *VirusResearch* 186:20–31

Bunikis, J., & Barbour, A. G. (2002). Laboratory Testing for suspected Lyme disease, 86(2), 311–340.

Campbell, R.N. (1996): Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 87-108.

Cann, A.J. (2016): Principles of Molecular Virology. 6th ed., Elsevier, 308p.

Chrowther J. R. (2001): The ELISA guidebook, Humana Press Inc., Totova, New Jersey 420p.

Czotter, N., Szabó, E., Molnár, J., Deák, T., Lázár, J., Szegedi, E., Bisztray, Gy., Tusnády, E. G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015): Új diagnosztikai módszerek a szőlő vírusfertőzöttségének megállapítására. Borászati Füzetek különszám, 153-155. IF:0262-268

García-Ibarra, A., Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., Soler, F., Sánchez-Navarro, J.A. (2010): Pollen and Seed Transmission of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) in Apricot. Acta Horticulturae, 862: 483-487.

Glitsch M. és Folk Gy. (2001): Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 582 p.

Govind P. Rao, Arben M., Kai-Shu L.: (2008): Characterization, diagnosis & management of plant viruses, Stadium press LLC USA, 15p.

Grimová, L., Winkowska, L., Konrady, M., Rysánek P. (2016): Apple mosaic virus. Phytopathologia Mediterranea, 55(1): 1–19

Hadidi, A., Barba, M., Candress, T., Jelkmann (2011): Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits, pp.35-40

Hisae H., Xiaoyun L., Yasuyuki Y., Satoshi K., Masashi U. and Shigetou N. (2003): A single silent substitution in the genome of Apple stem grooving virus causes symptom attenuation, Journal of General Virology, 2579-2583 p.

Horváth J. és Gáborjányi R. (2000): Növényvírusok és virológia vizsgálati módszerek. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 426 p

Hull R, (2014): Plant Virology, Elsevier 1118 p.

Kundu J.K., Svoboda J., Polák J. (2003): Detection of Apple stem grooving virus in different tissues of apple trees throughout the year. Plant Protect. Sci., 39: 93–96.

Legrand, P. (2015): Biological assays for plant viruses and other graft-transmissible pathogens diagnoses: a review. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 45(2): 240–251.

Malinowski, T. (2005) Potential problems with the reliability of PCR based diagnostic methods related to plant viruses sequence variation. *Phytopathologia polonica* 35: 125–139

Németh M (1979): Gyümölcsfák vírusos, mikoplazmás és rickettsiás betegségei. Mezőgazda kiadó, Budapest, 628 p.

Salamon, P. (2007) Növényvírusok, viroidok és szatellitok osztályozása és nevezéktana, Növényvédelem, Különszám 147 p.

Sastry, K.S. (2013): Seed-borne plant virus diseases. Springer India, 328 p.

Várallyay, É. (2015): Új korszak a növényi diagnosztikában. Fászfűzések vírusváltója. *Élet és Tudomány*, 70(49): 1542-1544

Varga T. (2015): RNS alapú diagnosztikai módszer kidolgozása az alma vírusfertőzöttségének kimutatására, XXXII. OTDK Biológia Szekció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Budapest, 33 p.

Varvara I. M., Angelantonio Minafra, Pasquale Saldarelli, Ruiz-García A., Miroslav G., Nikolaos K. and Antonio O. (2018): Recent Advances on Detection and Characterization of Fruit Tree Viruses Using High-Throughput Sequencing Technologies, *Viruses* 436:1-5 p.

Virányi F. (2010): Általános növénykórtan. Szent István Egyetem, Gödöllő, 104 p.

Wonderlich L. (2014): Molekuláris biológiai technikák. Typotex Kiadó, Budapest, 231 p.

Internetes források

http1: <http://infectiousdiseases.edc.org/content/module/1/reading/2>

http2: <http://macroid.ru/>

http3: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

http4: <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=A1700014.FM>

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

http6: <https://viralzone.expasy.org/273>

http7: <https://viralzone.expasy.org/267>

http8: <https://gd.eppo.int/taxon/ASGV00>

http9: <https://gd.eppo.int/taxon/ASPV00>

http10: <https://viralzone.expasy.org/269>

http11: <https://gd.eppo.int/taxon/APMV00>

http12: http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html

http13: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

http14: http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html

http15: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

http16:

<https://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=1057077340&topicorder=12&maxto=14&minto=1> (2019 szeptember)

http17:

<https://www.plantwise.org/knowledgebank/datasheet/6560#SymptomsSection>

8. Köszönetnyilvánítás

Első sorban szeretnék köszönetet mondani Várallyay Évának, az elmúlt két évben nyújtott rengeteg szakmai segítségéért és hogy bevezetett a biotechnológia rejtelseibe.

Szeretném köszönetem kifejezni az intézet munkatársainak, a dolgozatom elkészítésében nyújtott támogatásért.

Szeretnék köszönetet mondani dr. Bán Rita tanárnőnek, amiért mindig segítőkész és megértő volt.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni a családomnak, hogy lehetővé tették számomra, hogy idáig eljuthassak, valamint, hogy mindvégig mellettem álltak.

NYILATKOZAT

Alulírott Fürtön Alíz, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság-és Környezettudományi Kar Növényorvos MSc szak 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 diplomadolgozatomban egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Kar / Intézet honlapjára. A digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatomban elérhető legyen a témát vezető 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, _____ év _____ hó _____ nap

hallgató aláírása

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

A diplomadolgozatot záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom.

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

Gödöllő, _____ év _____ hó _____ nap

konzulens aláírása

intézetigazgató aláírása