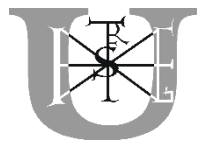


DIPLOMADOLGOZAT

Fábián Richárd

Gödöllő

2020



SZENT ISTVÁN EGYETEM

MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR

NÖVÉNYORVOS SZAK

**Szőlő vírus - viroid
fertőzöttség kimutatása RT-PCR alapú teszt és újgenerációs
szekvenálási technika alkalmazásával**

Készítette:

Fábián Richárd

Konzulens:

Dr. Bán Rita

egyetemi docens

Kertészettudományi Kar

Növényvédelmi Intézet

Integrált Növényvédelmi Tanszék

Külső konzulens:

Dr. Várallyay Éva

tudományos főmunkatárs

Demián Emese

tudományos segédmunkatárs

GÖDÖLLŐ

2020

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1 Vírusok általános jellemzése	7
2.2 A növényeket fertőző vírusok	8
2.3 A vírusok fertőzés mechanizmusa és terjedése	9
2.4 A vírusok elleni védekezés	10
2.5 A szőlő vírusbetegségei	10
2.5.1 Szőlő leromlás komplex betegségét okozó vírusok.....	10
2.5.1.1 Szőlő fertőző leromlás vírus - Grapevine fanleaf virus (GFLV).....	10
2.5.1.2 Arabisz mozaik vírus-Arabis mosaic virus (ArMV).....	11
2.5.1.3 Szőlő króm-mozaik vírus - Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)	12
2.5.1.4 Paradicsom fekete gyűrűs vírus - Tomato black ring virus (TBRV).....	12
2.5.2 Szőlő levélsodródását okozó vírusok.....	13
2.5.3 Szőlő faszöveti barázdáltság komplex betegségét kialakító vírusok.....	14
2.5.4 Látens foltosság tünetegyüttes	15
2.5.5 Szőlő Pinot gris vírus – Grapevine Pinot gris virus (GPGV).....	15
2.5.6 Szőlő vonalas mintázottság vírus–Grapevine line pattern virus (GLPV)	16
2.6 A szőlőt fertőző viroidok	17
3. Anyag és módszer.....	18
3.1 Mintavétel	18
3.1.1. NAIK-MBK üvegház.....	19
3.1.2. Pécsi ültetvény	20
3.1.3. Szigetközről származó ligeti szőlő mintavételezése	21
3.2. RNS kivonás	22
3.3. RNS keverék (pool) összeállítása	23
3.4. Kis RNS könyvtár készítés	23
3.5. Bioinformatikai adatfeldolgozás	25
3.6. cDNS készítése.....	25
3.7. cDNS minőségellenőrzése PCR-rel	26
3.8. Szőlőt fertőző vírusok és az Ausztrál szőlő viroid kimutatása RT-PCR segítségével.....	27
3.9 PCR reakciókhoz használt keverék összeállítása a vizsgált vírusok kimutatására	28
4. Eredmények	29
4.1 GLPV jelenlétének vizsgálata.....	29

4.1.2. A szőlő vonalas mintázottság vírus (GLPV) kimutatása.....	30
4.2 Pécsi ültetvény vírusfertőzöttségének vizsgálata	31
4.2.1. A szőlő Syrah vírus 1 (GSyV-1) kimutatása	32
4.2.2. A szőlő legyezőlevelűség vírus (grapevine fanleaf virus, GFLV) kimutatása	33
4.2.3. A szőlő Pinot gris vírus (grapevine Pinot gris vírus, GPGV) kimutatása	34
4.2.4. A szőlő levélsodródással-társult vírus 2 (grapevine leafroll-associated virus 2, GLRaV-2) kimutatása.....	35
4.2.5. A szőlő levélsodródással-társult vírus 3 (grapevine leafroll-associated virus 3, GLRaV-3) kimutatása.....	36
4.2.6. Az Ausztrál szőlő viroid (AGVd) kimutatása	37
4.2.7 A vírusfertőzöttség változása 2015 és 2019 között.....	37
4.3 A <i>Vitis sylvestris</i> kisRNS könyvtár szekvenciájának elemzése	39
5. Következtetések és javaslatok.....	41
5.1 A GLPV terjedésének vizsgálata	41
5.2 Pécsi ültetvény vírusfertőzöttségének változása	41
5.3 A ligeti szőlő bioinformatikai elemzése.....	42
6. Összefoglalás	44
7. Köszönetnyilvánítás.....	46
8. Irodalomjegyzék	47
9. NYILATKOZAT	51

1. Bevezetés és célkitűzések

Hazánkban a szőlő jelentős gazdasági és kulturális értéket képvisel. Napjainkban azonban igen nagy problémát okoznak a gyümölcs- és szőlőtermesztésben egyaránt a növényeket megbetegítő vírusok. Ennek háttérében az állhat, hogy nincs ellenük kidolgozott növényvédelmi technológia vagy engedélyezett növényvédőszer, kártételüket alapvetően rezisztens fajták termesztésével, kórokozómentes szaporítóanyag használatával, illetve a vírusvektorok elleni védekezéssel csökkenthetjük.

A vírusfertőzöttség által megannyi gazdasági probléma léphet fel egy gazdaságban, a fokozott tőkeleromlás miatt romlik a termésminőség és termésveszteség következik be, a szőlő produktív időszaka, valamint élettartama rohamosan csökkenhet, illetve a tőkék teljes pusztulása is bekövetkezhet. Ezen gazdasági hátrányok ismeretében a szőlőt fertőző vírusok kutatásának fontossága felértékelődött és egyre több információ derült napvilágra terjedésükről és életmódjukról. Napjainkban azonban a globalizáció miatt kialakult intenzívebb kereskedelemnek és szaporítóanyag forgalomnak köszönhetően nagyban megnőtt az esélye annak, hogy akaratlanul is segítsük az ismert vagy eddig még nem ismert, új kórokozók, esetleg azok vektorainak terjedését.

A vírusok kimutatására több lehetőség is rendelkezésünkre áll, amelyben szerepelnek hagyományos diagnosztikai módszerek (szerológiai vizsgálat-ELISA, PCR alapú vizsgálat) és az újgenerációs szekvenálási technikák. Míg az előbbinél szükség van a kórokozó előzetes ismeretére, addig az utóbbinál ez nem szükséges. A vírusfertőzés során a növény védekező rendszerének, az RNS interferencia folyamatának aktiválásával, vírus eredetű, a vírus bázissorrendjének megfelelő kis RNS-ek keletkeznek. Az adott növény kis RNS-einek szekvenálásával és a szekvenciák bioinformatikai vizsgálatával az eddig ismert és ismeretlen kórokozók jelenléte is igazolhatóvá válik.

Kutatásom során ilyen diagnosztikai technikák alkalmazásával próbáltam kimutatni több, különböző helyről származó szőlőmintában a vírus és viroid fertőzöttséget.

Célkitűzések

1. Kutatásom egyik célja a szőlőt fertőző, szőlő vonalas mintázottság vírus (grapevine line pattern virus, GLPV) terjedési módjának feltérképezése RT-PCR alapú teszttel, amelyhez a vírus fenntartására használt Baco22-ről hajtattott vesszőt, oltványokat és magoncokat vizsgáltam.

2. A PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet szőlőalany-fajtagyűjteményének virológia állapotfelmérését 2015-ben végezték (Demián et al 2020). Kutatásom célja az volt, hogy felmérjem újra az ültetvény vírusfertőzöttségének állapotát RT-PCR segítségével, ezzel képet kapva arról, hogy 2015 óta milyen mértékben terjedtek bizonyos vírusok és viroidok az adott ültetvényben. A mintavételezés során olyan fajtákra összpontosítva szedtük a mintákat, amelyekről a korábbi tesztelés során tudtuk, hogy milyen vírusokkal, illetve viroidokkal voltak fertőzöttek.
3. Kutatásom célja volt továbbá az is, hogy a Hédervár-Kimle és Feketeerdőből származó ligeti szőlők vírusfertőzöttségét vizsgáljam kis RNS alapú új generációs szekvenálási módszer segítségével, hogy következtethessünk arra, vajon milyen szőlővírusok lehettek Magyarországon az 1875-ben bekövetkező filoxéra járvány előtt.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Vírusok általános jellemzése

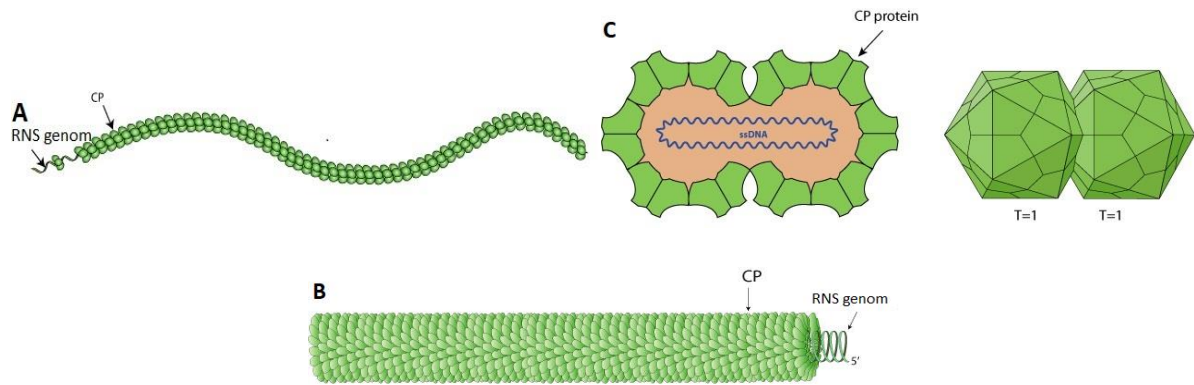
Földünk egyik legkülönlegesebb organizmusai közé tartoznak a vírusok. Hatásuk a biológia tudományágának minden területén megmutatkozik, annak ellenére, hogy nem képesek önálló mozgásra és önállóan funkcionáló anyagcserével sem rendelkeznek, valamint élő és élettelen anyagra jellemző tulajdonságaik is vannak. Kezdve parazita szerepükkel betöltött helyüket az ökológiában, évtizedenként nagyfokú epidémiákat, egyes esetekben pandémiákat okozhatnak bizonyos állatpatogén vírusok. A jelentősebb járványok a populációs kölcsönhatások megváltozásához, fajok kipusztulásához is vezethetnek. Az egyedek szintjén történő kifejeződésük nem írható le pusztán a tünetek jellemzésével. Meg kell figyelni azok differenciáltságát, a növény válaszreakcióját, életműködésére történő hatását, illetve, hogy a vizsgált fertőzést követően milyen más parazita jelenik meg. Azt a jelenséget miszerint, egy vírusfertőzés soha nem folyik le önmagában és egy-egy betegség kialakításában mindig valamilyen más kórokozó is közrejátszik már tényként könyvelhetjük el. Ilyen eset a növényeknél gyakran megjelenő multiplex infekció. Molekuláris szinten vizsgálódva pedig egyre többet tudunk bizonyos vírusok felépítéséről, a fertőzés végbemeneteléről és a háttérben működő biokémiai folyamatokról. Még ha a gazdaszervezet önálló védekezése révén képes volt a vírus terjedésének megakadályozására, annak örökítőanyaga kimutatható a gazdaszervezet genomjából akár évtizedekkel később is. Ezen információk birtokában kijelenthetjük, hogy ezek a nanométeres nagyságrendű kórokozók nagy jelentőséggel rendelkeznek.

Elnevezésük a latin *Virus* szóból ered, valamint ennek angol megfelelője, a poisonous is arra következtet, hogy ezek kárt okozó, toxikus mikroorganizmusok. Olyan fertőző, betegséget okozó kórokozók, amelyek mindössze genetikai anyagból és az azt körülvevő fehérjeburokból állnak és rendszerint magas gazdaspecifitással bírnak (Lázár 2011). A gazdasejt mechanizmusait használják fel, a genom és a fehérjeburok szintéziséhez, valamint az új vírusok előállításához is, mivel önálló reprodukcióra és metabolikus folyamatokra nem képesek. Virion formájában vannak jelen a gazdasejten kívül, amely egyfajta kitartóképletnek felel meg. Apró méretük miatt fénymikroszkóppal nem vizsgálhatók (csak elektromikroszkóppal), mindössze a 30-500 nm-es mérettartományba esnek, így kb. 100-szor kisebbek, mint egy átlagos baktérium (http1).

2.2 A növényeket fertőző vírusok

Jelenleg több, mint 5560 fitopatogén vírus ismert, számuk pedig folyamatosan növekszik (http2). A betegség kialakulása a növény és vírus találkozásának nem feltétlen következménye, mivel a növények a legtöbb esetben képesek kivédeni a vírusfertőzés kialakulását (Pallas és García 2011). Ahhoz, hogy egy vírus megfertőzze a növényt az adott gazdanövény faktoraira van szükség, sok esetben egy-egy vírus csak egy adott gazdanövénykört fertőz, a többi növényt nem, mivel ezekben képtelen a sokszorozódásra. Ezt a jelenséget nem gazda rezisztenciának hívjuk (Heath 2000).

A növényi vírusok örökítőanyaga sokféle szerkezetbe rendeződhet, azonban többnyire elmondható, hogy csak nukleinsavból és az azt körülvevő fehérjeburokból állnak. Ez a nukleinsav lehet egyszálú DNS (pl.: *Geminivirus*), kettősszálú DNS (pl.: *Caulimovirus*), kétszálú RNS (pl.: *Reovirus*) és a leggyakrabban előforduló egyszálú, pozitív irányultságú (+) RNS, amely körülbelül a növényvírusok 70%-ban fordul elő, beleértve a legtöbb szőlőt fertőző vírust is (Buck 1996). Genomjuk lehet szegmentált és egykomponensű is. Az előbbi esetében csak együtt fertőzőképesek az elemei. Az egyszálú, pozitív irányultságú RNS vírusok által kódolt legismertebb fehérjék közé tartozik a köpenyfehérje, illetve rengeteg vírusnál detektáltak mozgási fehérjét, amelyek a vírus éleciklusában különböző funkciókat tölthetnek be. A köpenyfehérje legfontosabb szerepe a vírusrészecske külső burkának felépítése, amely védelmet nyújt a vírus RNS számára a sejtben levő nukleáz hatásoktól, ugyanakkor szerepet játszhat a sejtről-sejtre történő terjedésben (Lucas 2006). A mozgási fehérjének funkciója a növényben, a sejtről-sejtre és a szállítónyalábokban történő terjedésben határozható meg, ez a sejtről-sejtre való terjedés a sejteket összekötő plazmodezmákon keresztül lehetséges (Niehl és Heinlein 2011). A virion alakját, a genetikai anyagot körülvevő fehérjeburok határozza meg. Ez alapján a morfológiájuk nagyon sokféle lehet, pálcika alakútól, a helikálison át, a szférikusig. (1. ábra) (Horváth 1999). A leggyakrabban előforduló forma a helikális, amely a növénypatogén vírusok több, mint 50%-ánál fordul elő. 300-500 nm hosszúságúak és 15-20 nm átmérővel rendelkeznek. Ilyen az elsőként leírt és egyben legismertebb vírus is, a dohány mozaik vírus (tobacco mosaic virus, TMV). A második legelterjedtebb az izometrikus struktúra, amely leginkább 40-50 nm átmérőjű. Az ikervirionnak nevezett (*Geminiviridae*) vírusok olyanok, mintha két összetapadt izometrikus alegységből épülnének fel (D'Arcy 2000).



1. ábra A virionok különböző morfológiája és genom struktúrája. CP: Coat Protein (köpenyfehérje), A: Closteroviridae B: Tobamoviridae C: Geminiviridae (<http3>)

2.3 A vírusok fertőzés mechanizmusa és terjedése

A növényi vírusok nem képesek aktívan bejutni a növénybe, mint a növényeket fertőző gombák, mivel nem rendelkeznek olyan apparátussal, ami ezt lehetővé teszi. A növényi kutikulán és sejtfalon történő bejutásuk rendszerint valamilyen sérülésen vagy egy ún. vektoron, közvetítőn keresztül, passzív módon történik. Replikációjuk során a fitopatogén vírusok virionja az adott gazdasejthez kötődik, majd a köpenyfehérjében lévő nukleinsav bejut a sejtbe. A megfertőzött gazdasejt maga állítja elő a vírus nukleinsavat és fehérjét, amelyek a gazdasejtben virionokká épülnek össze, majd a növény szállítószövein keresztül elterjednek az egész növényben, szisztemikus fertőzést okozva (Buck 1996).

Terjedésének legfőbb módjai a mechanikai átvitel (pl. metszés), oltással történő átvitel (oltás, szemzés), vegetatív szaporítószervekkel történő átvitel (gumó, rizóma, hagyma), pollenátvitel, magátvitel és a vektorokkal történő átvitel (Pocsai 2016). A legjelentősebb vektorok közé tartoznak a levéltetvek és a liszteskék, de terjedhetnek fonálférgekkel és bizonyos esetekben növénypatogén gombákkal is (Armijo et al. 2016). A kabócák vírus vektor szerepe a hazánkban termesztett kertészeti növényeken jelentős tényező. A kabócákkal átvihető vírusokat cikadofil vírusoknak nevezzük.

2.4 A vírusok elleni védekezés

A prevenció a legfontosabb, és egyetlen védekezési lehetőség a vírusokkal szemben. Az ellenük való védekezés az ültetvényekben a fajtaválasztással kezdődik, hiszen számos vírusrezisztens és vírustoleráns fajta áll rendelkezésre a termelők számára, azonban a rezisztencia kialakítása hosszú folyamat és nem minden vírus ellen megoldható a rezisztencia/tolerancia kialakítása. A fajtatulajdonság megőrzésének érdekében sok faj, pl. szőlő esetében vegetatívan állítják elő a szaporítóanyagokat és így fennáll annak a veszélye, hogy vírusfertőzött növénytől származik a szaporítóanyag (Gáborjányi 2007). Az ültetvénybe a legtöbb esetben rovarvektorok segítségével jutnak be a vírusok, ezért elengedhetetlen a potenciális vírusokat hordozó vektorok elleni folyamatos preventív védekezés (Glits et al. 2000).

2.5 A szőlő vírusbetegségei

2.5.1 Szőlő leromlás komplex betegséget okozó vírusok

A szőlő leromlás komplex betegséget a szőlő legyezőlevelűség vírus (GFLV), a szőlő krómsárga mozaik vírus (GCMV), az *Arabis* mozaik vírus (ArMV) és a paradicsom fekete gyűrűs vírus (TBRV) okozzák (Demián 2019). A szőlő legjelentősebb vírus betegsége, amely általánosan elterjedt az egész világon. Az imént felsorolt vírusok mindegyike a *Nepovirus* nemzetségbe tartozik, valamint a *Secoviridae* víruscsalád tagja (Mayo és Robinson 1996). A szőlő fajtáink nagy része fogékony ezekre a vírusokra. Elsősorban szaporítóanyaggal és fonalféreg vektorokkal (*Xiphinema spp.*) terjednek a vírusok, erről kapták elnevezésüket is. Előfordulhat még oltással és pollennel történő átvitelük is.

2.5.1.1 Szőlő fertőző leromlás vírus - Grapevine fanleaf virus (GFLV)

A szőlő fertőző leromlás betegséget hazánkban 1963-ban írták le. Tünettaniilag két törzset különböztethetjük meg: sárga mozaik törzs (Grapevine fanleaf virus – yellow mosaic strain, GFLV-YM) és érmenti szalagosodás törzs (Grapevine fanleaf virus – vein banding strain, GFLV-VB) (Lázár 1996). A sárga mozaik törzsszel megbetegedett növényeken kora tavasszal alakulhatnak ki először a tünetek. Nagyméretű foltosodás formájában jelenik meg az érmenti és érközi területeken, de akár az egész levélzet elsárgulhat (Martelli 1993). Az érmenti szalagosodás törzsnél az ér mentén, valamint az ér mellett végigfutó, sárga, hosszanti lefutású, klorotikus elszíneződés figyelhető meg (2. ábra). A hajtások gyengén fejlettek, deformáltak és rövid szártagúak és rendszerint sok oldalhajtás képződik, így a tőke bokorszerűvé válik.

Megfigyelhető a hajtástengely ellaposodása és a nóduszokon történő szemközi rügyképződés miatt kialakult villás elágazódás, valamint a rendellenes kacs képződés. A fürtök madárkásak. A betegség a tőkék korai elhalásával vagy néhány éven belül azok leromlásával jár (Sárospataki 1964).



2. ábra Szőlő fertőző leromlás vírus érmenti szalagosodás törzse által okozott levéltünet
(fotó: Apró, 2015)

2.5.1.2 Arabisz mozaik vírus-Arabis mosaic virus (ArMV)

Az Arabisz mozaik vírus (ArMV) szerológiailag a GFLV-vel rokon és az A típusú tőkesatnyulás betegség kórokozója (Panjan és Saric 1963). A vírus által okozott tünetek hasonlóak a fertőző leromláshoz, sőt általában együtt fordulnak elő (3. ábra). Széles gazdanövénykörű kórokozó és ebbe számos különböző gyomnövény is beletartozik (Baracsi 1999).



3. ábra Arabisz mozaik vírus által okozott levéltünet (<http4>)

2.5.1.3 Szőlő krómmozaiik vírus - Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)

A szőlő krómmozaiik vírus (GCMV) jellemzője a rövid ízközök és a kettős nóduszok kialakulása. A levelek megjelenése után a vírus jelenlétére mutathat a levelek krómsárgára színeződése. Előfordulhatnak a levélen még deformációk és klorotikus foltok (4. ábra). Vannak olyan törzsei is a kórokozónak, amelyek csak látens, nem látható tüneteket okoznak. Ezen variánsok az adatbázisban szereplő szekvenciák alapján mind Magyarországról származnak (Czotter 2018). Mechanikailag oltással és fertőzött szaporítóanyaggal is átvihető. A vírus feltehetőleg fonálféreggel terjed a talajban, noha a pontos fajok egyelőre még nem ismertek (Le Gall et al. 1997).



4. ábra A szőlő krómmozaiik vírus által okozott kezdeti levéltünet (<http5>)

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

Hazánkban először 1981-ben írták le jelenlétét (Lehoczky és Burgyán 1986). ATBRV által okozott betegség a tökesatnyulás T típusa. Fertőzése során az idős leveleken pöttyökben mutatózó klorotikus elváltozást, valamint a levélszéleken sárgulást lehet megfigyelni (5. ábra), ezzel gátolva a tőkék optimális növekedését. A vírus a fonálféregvektoron kívül oltással és maggal is terjedhet (Baracsi 1999).



5. ábra A paradicsom fekete gyűrűs vírus okozta tünetek szőlőlevélen (fotó: Apró, 2015)

2.5.2 Szőlő levélsodródását okozó vírusok

A szőlő levélsodródását többféle vírus is okozhatja, ezek egymáshoz hasonló tulajdonságú vírusok, melyek külön-külön, de akár együtt is előidézhetik a tüneteket. A szőlő levélsodródás vírus 1 (GLRaV-1) és a szőlő levélsodródás vírus 3 (GLRaV-3) a *Closteroviridae* víruscsalád *Ampelovirus* nemzetségébe, a szőlő levélsodródás vírus 2 (GLRaV-2) pedig a *Closteroviridae* víruscsalád, *Closterovirus* nemzetségébe tartozik (Komínek et al. 2005). A kórokozók által okozott tünetekre jellemző a lefelé sodródó és megvastagodó levéllemez, amely a fehér bort adó szőlőfajtáknál sárgára, míg a vörösbort adó szőlőfajtáknál vörösre színeződik (6. ábra), továbbá jellemző még a kései bogyóérés és azok alacsony cukortartalma. A vegetációs időszak vége felé a vesszők csak részlegesen érnek be (Little és Rezaian 2006). A kórokozó fertőzött szaporítóanyaggal, oltással terjed és a szőlő levélsodródás 1-es és 3-as vírusok esetében vektorként ismertek a közönséges teknőspajzstetvek (Komínek et al. 2005).



6. ábra A szőlő levélsodródás vírus levéltünete fehérbort adó szőlőfajtáknál, majd vörösbort adó fajtáknál (http6)

2.5.3 Szőlő faszöveti barázdáltság komplex betegséget kialakító vírusok

Ez az oltással terjedő vírusbetegség az egész világon elterjedt, melyet először Olaszországban írtak le (Graniti és Martelli 1965), majd két évvel később Magyarországon is megfigyelték (Martelli et al. 1967). A betegséget a szőlő Rupestris faszöveti barázdáltság vírussal kapcsolták össze (grapevine Rupestris stem pitting associated virus, GRSPaV), amelyet a *Tymovirales* rendbe, *Betaflexviridae* családba és a *Foveavirus* nemzetségbe soroltak. A kórokozó vektora eddig nem ismert, mechanikai módon nem terjed (Nakaune et al. 2008). Tünetei a tőke farészénél, leginkább az oltás feletti részen megfigyelhető hosszanti barázdák és gödrök (7. ábra). A szőlő A vírus (grapevine virus A, GVA) és a szőlő B vírus (grapevine virus B, GVB) által okozott betegség együttes is okozhatja a szőlő faszöveti barázdáltságát. A *Tymovirales* rendbe, *Betaflexviridae* családba és a *Vitivirus* nemzetségbe tartozó két kórokozó nem különböztethető meg tünettanilag, ezért elkülönítésükhöz fás szárú tesztelésre, szerológiai, illetve molekuláris vizsgálatok szükségesek (Kuniyuki et al. 2006).



7. ábra A faszöveti barázdáltság vírus tünete (<http7>)

A GVA a szőlő hancsrészében kárt tevő kórokozó. Vektorai a pajzstetvek (*Pseudococcus longispinus*, *Planococcus ficus*, *Heliococcus bohemicus*). Legismertebb vektora a közönséges teknőspajzstetű (*Parthenolecanium corni*) (Minarfa et al. 1997). A szőlő B vírustól nem különböztethető meg tünettanilag, ezért elkülönítésükhöz fás szárú tesztelésre,

szerológiai, illetve molekuláris vizsgálatok szükségesek. A GVB a parakérgűség kórokozójaként ismert. Terjesztésében szerepet játszik a *Planococcus citri*, *Pl. ficus*, *Pseudococcus longispinus*, *P. affinis* és a *Phenacoccus aceris* (Nakaune et al. 2008).

2.5.4 Látens foltosság tünetegyüttes

Vitis vinifera fajtákon többnyire látensen vannak jelen a betegséget okozó vírusok (Martelli 2014). A látens foltosság betegség legelterjedtebb tagja a hazánkban leírt (Lehoczy és Farkas 1981) *Tymovirales* rendbe, *Tymoviridae* családba és *Maculavirus* nemzetségbe tartozó szőlő foltosodás vírus (*grapevine fleck virus*, GFKV) (Martelli et al. 2002). A „fleck-komplexet” még további három vírus együttes jelenléte okozhatja, amelyek közül a nemzetség további tagja a *grapevine redglobe virus* (GRGV), míg a *grapevine asteroid mosaic associated virus* (GAMaV) és a *grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVfV) a *Marafivirus* nemzetségbe tartoznak (Martelli 2014). Ide sorolható még a GFKV vírussal közeli rokonságban álló, *Marafivirus* nemzetségbe tartozó szőlő Syrah vírus1 (*grapevine Syrah virus 1*, GSyV-1), mely morfológiai és molekuláris tulajdonságait tekintve nagyon hasonló a GFKV vírushoz. 2009-ben fedezték fel a vírust Amerikában új generációs szekvenálási módszer segítségével (Al Rwahnih et al. 2009; Sabanadzovic et al. 2009), majd 2015-ben hazánkban is leírták (Czotter et al. 2015). A GFKV által fertőzött szőlőn a levelek csúcsi részén található erek közelében áttetsző foltok jelennek meg, majd megfigyelhető ezen levelek ráncosodása, deformációja és felfelé kanalasodása. Elterjedésüket elsősorban a fertőzött szaporítóanyag alkalmazása okozhatja, ugyanis mechanikai átvitelrel nem terjednek. Laboratóriumban, aranka fajok által a betegség komplexet okozó vírusok átvihetőek (Martelli et al. 2002; Woodham és Krake 1983).

2.5.5 Szőlő Pinot gris virus – Grapevine Pinot gris virus (GPGV)

A szőlő Pinot gris virus (*grapevine Pinot gris virus*, GPGV) a *Tymovirales* rendbe és a *Betaflexviridae* családba tartozó trichovirus, melyet elsőként Olaszországban írtak le 2012-ben kis RNS-ek nagy áteresztőképességű szekvenálása által (Giampetruzzi et al. 2012). A vírust illetve az okozott tüneteit szerte a világon több országban is megfigyelték, valamint megállapították, hogy szőlőn kívül lágyszárú növényeket is képes megfertőzni. Az eddigi ismeretek alapján *Silene latifolia subsp. Alba* és *Chenopodium album L* gyomnövényeken jelent meg (Gualandri et al. 2016). Egyszálú, pozitív irányultságú (+) RNS genommal rendelkező kórokozó, mely a leveleken torzulást és jellegzetes levélfoltosodást idéz elő. A kórokozónak leírták egy gyakrabban megjelenő tünetet nem mutató, látens variánsát is (Saldarelli et al. 2015).

Vektorként a szőlő gubacsatka (*Colomerus vitis*) tehető felelőssé, továbbá terjedhet fertőzött szaporítóanyaggal és oltással (Malagnini et al. 2016).

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

Több olyan kórokozót ismerünk, amelyek területi előfordulása behatároltabb, ezáltal kevésbé elterjedtek és csekélyebb gazdasági jelentőséget tudhatnak magukénak. Ide sorolható a feltételezhetően az *Ilarvirus* nemzetségbe tartozó szőlő vonalas mintázottság vírus (grapevine line pattern virus, GLPV). A kórokozót Magyarországon írták le (Lehoczky et al. 1987). Tünetei közé tartoznak a levélen mutatkozó, juharfalevél mintázatot öltő, világos, szétszórtan elhelyezkedő foltok (8.ábra).



8.ábra GLPV tünetek eredeti megfigyelése, Lehoczky János nyomán

A vírus örökítőanyagának nukleinsavsorrendjének meghatározásával kutatócsoportunk foglalkozik. Valószínűleg a szekvencia hiánya magyarázza azt, hogy újabb előfordulásáról eddig nem tudunk (9.ábra).



9. ábra GLPV fertőzött szőlő (Baco22A) levéltünetek 2017-ben a kecskeméti patogén kertben (fotó: Demián, 2017)

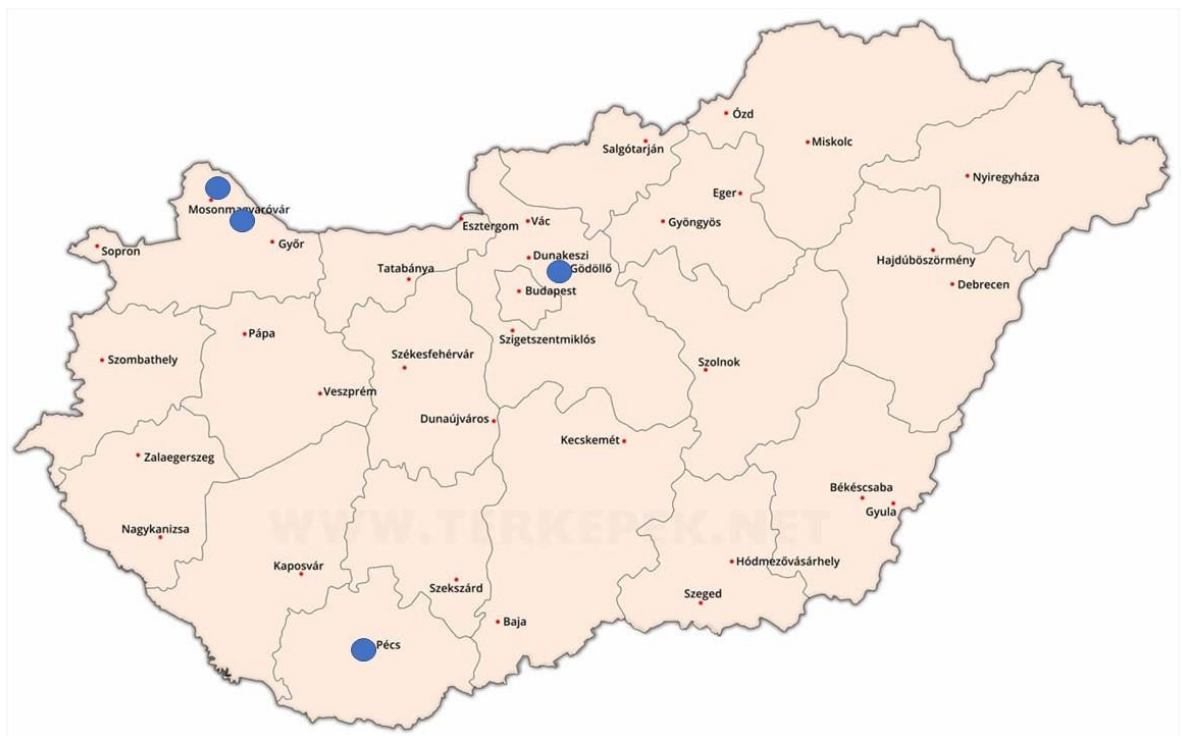
2.6 A szőlőt fertőző viroidok

A növényeket fertőzni képes genetikai ágensek közül a viroidok a legkisebbek. Olyan kisméretű (250-400 nt) cirkuláris, egyszálú RNS-el rendelkeznek, melyek nem kódolnak fehérjét. Az első szőlőben leírt viroid a komló törpülés viroid volt (hop stunt viroid, HSVd), melyet egy japán ültetvényben írtak le (Sano et al. 1985). Az Ausztrál szőlő viroidot (Australian grapevine viroid, AGVd) először Ausztráliában jegyezték fel, majd szerte a világon leírták jelenlétét, de előfordulását tekintve kevésbé gyakori. Eddig mindössze a szőlőt írták le, mint gazdanövényét, melyen tünetet nem mutat (Rezaian et al. 1988).

3. Anyag és módszer

3.1 Mintavétel

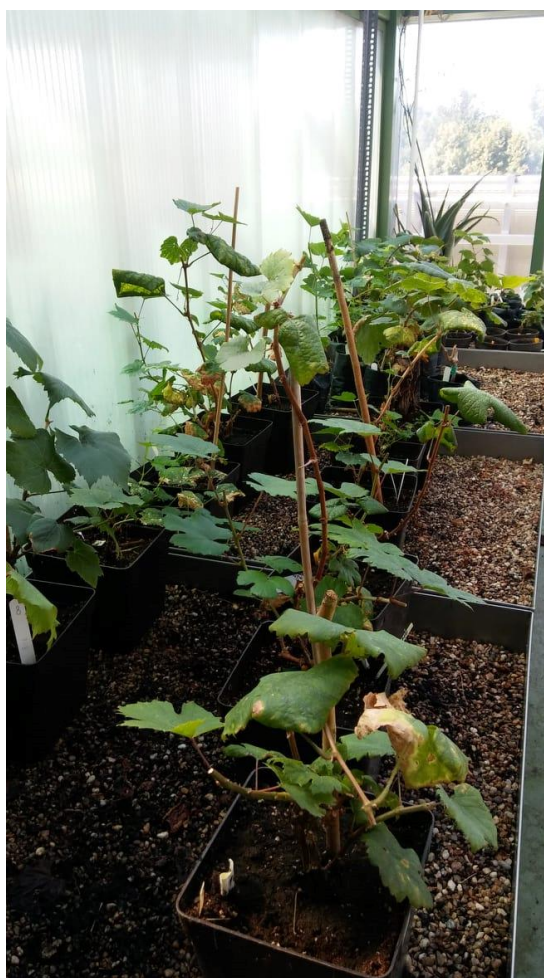
A tesztelésbe vont növényminták több különböző helyről származnak, valamint mintavételezésük is más időpontokban történt. A NAIK-MBK növényházából 2019. május 10-én, Szigetköz területéről két helyről, Feketeerdőből és Hédervár-Kimle közötti térségből 2019. június 27-én, valamint Pécsről 2019. október 4-én lettek begyűjtve a különböző fajtájú szőlő levélminták. A növényházból származó minták azonnal felhasználásra kerültek, míg a többi területről származó leveleket felhasználásukig -70 °C-on tároltam. A felsorolt területek elhelyezkedését az országban a kék pontok mutatják a 10. ábrán.



10. ábra A kutatásban érintett mintavételi területek az országban

3.1.1. NAIK-MBK üvegház

A NAIK-MBK üvegházában találhatók olyan magból kelt szőlő egyedek, melyek bizonyítottan a szőlő vonalas mintázottság vírussal (grapevine line pattern virus, GLPV) fertőzött anyanövényekről származnak. Az eredeti megfigyelések alapján a vírus maggal is terjed (Lehoczky et al. 1992), de azt nem tudtuk, hogy a fenntartásra használt Baco22 tőkén érett termés magjaiba vajon belekerül-e a vírus. Vizsgálataimban ezeket a növényeket teszteltem, hogy megfigyelhessem az esetlegesen maggal, vagy szemzéssel történő vírusátvitelt. A vizsgálat során 21 növényből izoláltam RNS-t, melyből 13 db magonc, 2 db az eredeti Baco22-ről hajtatott vessző, illetve 6 db oltvány szolgált a mintavételhez. Az oltványok közül 2 db Hárslevelű, 2 db Jubileum 75 és 2 db Irsai Olivér fajták voltak. Az egyedeket külön cserépben vagy fekete fóliában nevelték (11. ábra). Az üvegházat vektormentes környezet jellemzi. A mintavételt 2019. május 10-én végeztem, amely során steril szikével vágtam a csúcsi hajtás közelében lévő fiatal levelekből és az alattuk levő idősebb levelekből egyaránt, majd alufóliába és jégre helyeztem őket és azonnal RNS-t izoláltam belőlük.



11. ábra Üvegházban található szőlők (saját felvétel)

3.1.2. Pécsi ültetvény

A PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet szőlőalany-fajtagyűjteményének virológia állapotfelmérését 2015-ben végezték (Demián et al. 2020). Egy újabb kísérletünkhöz, melyben a filoxérák esetleges vektor szerepét vizsgáljuk újabb mintákat szedtünk (2019 októberében). Az állományban nagy számban fellelhetőek filoxérával (*Viteus vitifoliae*) fertőzött egyedek (12. ábra). A mintavételezés során csak olyan fajtákra összpontosítva szedtük a mintákat, amelyekről a korábbi tesztelés során tudtuk, hogy milyen vírusokkal, illetve viroidokkal voltak fertőzöttek. Hat különböző fajtából 15 db mintát szedtünk, a Teleki-Kober 5BB fajtából 3 db, a Teleki-Huhr S.O.4-ből 2 db, a Teleki-Kober 5BB Wei. 48-ból 3db, a Teleki 5C P-ből 3db, a Morvédre x Rupestris1202 c.-ből 3 db és a Rupestris du Lot fajtából 1 db élő filoxérákat tartalmazó levél lett begyűjtve. A későbbi vizsgálatokhoz a mintafeldolgozás során a levelekről a filoxérákat is izoláltuk, és mind a levélben és mind a filoxérában lévő, előzetesen megállapított vírusok és viroidok jelenlétét teszteltük.



12. ábra Pécsi ültetvényben található filoxérával fertőzött levél, valamint egy filoxéra gubacs kibontva fénymikroszkóp alatt (saját felvétel)

3.1.3. Szigetközről származó ligeti szőlő mintavételezése

A ligeti szőlő mocsaras területen, vadon élő növény (13. ábra). Ezek a természetes állományok a filoxéra vész idején nem pusztultak ki, így feltételezésünk szerint vírusvizsgálatuk során következtethetünk arra, hogy a filoxéra vész előtti időkben milyen szőlővírusok lehettek Magyarországon. A mintagyűjtést a NAIK-MBK Molekuláris Növénykórtan csoportjából Dr. Várallyay Éva és Demián Emese végezte 2019. június 27.-én. A minták több helyről származnak, Feketeerdő területéről 6 db és Hédervár-Kimle közötti területéről pedig 3 db ligeti szőlőről szedtek levél és kacs mintát, amelyeket alufóliába csomagoltak és hűtőtáskába helyeztek, majd felhasználásukig -70 °C-on tároltak.



13.ábra Ligeti szőlő az eredeti termőhelyén (Demián 2019)

3.2. RNS kivonás

Az RNS tisztításához az üvegházból frissen szedett leveleket használtam, a külső helyszínekről gyűjtött levélmintákat feldolgozásukig -70 °C-on tároltam.

1. Először kb. 200 mg növényi szövetet dörzscsészében eldörzsöltem, majd hozzáadtam 850 µl, 65 °C hőmérsékletre előmelegített CTAB tartalmú extrakciós puffert és 17 µl β-merkaptoetanolt mértem rá.
2. Az így kapott homogenizált mintát 2 ml-es Eppendorf csövekbe öntöttem és Vortex segítségével erősen megkevertem, majd vízfürdőben 10 percen át 65 °C-on rázattam őket.
3. Ezt követően 850 µl kloroform-izomailalkoholt (24:1) pipettáztam a mintákra és óvatosan döntögetve kevertem, majd 10 percen át, 4 °C-on, 10000 rpm fordulaton centrifugáltam őket.
4. Új, 2 ml-es Eppendorf csövekbe 800 µl kloroform-izomailalkoholt (24:1) mértem és erre pipettáztam rá a felső fázist.
5. Óvatos keverést követően 10 percig, 4 °C-on, 10000 rpm-en végeztem a centrifugálást.
6. 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe 250 µl 9M-os LiCl-ot készítettem elő és erre rámértem 450 µl felső vizes fázist a mintákból. Óvatos forgatás után 30 percre jégre tettem, majd ezt követően 20 percig, 4 °C-on, 13000 rpm fordulaton centrifugáltam.
7. Ezután leöntöttem a felülúszót és 450 µl, 65 °C-ra előmelegített SSTE oldatot pipettáztam a csapadékra, ezután vortex segítségével kevertem, majd hozzáadtam 450 µl kloroform-izomailalkoholt (24:1) és 10000 rpm fordulatszám mellett, 10 percig 4 °C-on centrifugáltam.
8. A nukleinsav kicsapásához 400 µl felső fázist rámértem az előre elkészített, új, 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe, amelyekbe 280 µl izopropanolt és 30 µl 4M-os nátrium-acetátot mértem. Ezt követően óvatosan forgattam és szobahőmérsékleten inkubáltam a mintákat 10 percig.
9. 20 percig, 4 °C-on és 13000 rpm-en centrifugáltam a mintákat, majd a keletkezett felülúszót leöntöttem és a csapadék mosását 1 ml, 70%-os hideg etanollal végeztem.
10. Az előző beállításokkal, 10 percig tartó centrifugálást követően a felülúszót ismételen leöntöttem és alaposan kicsepegtettem, majd a csapadékot 5 percig vákuumcentrifugában szárítottam.

11. A kicsapódott RNS-t 25 µl steril mQ vízben oldottam vissza.
12. A kapott RNS oldat minőségét 1,2 %-os agaróz gél-elektroforézissel történő szétválasztásával ellenőriztem, illetve Nanodrop készülékkel mértem a koncentrációt és a tisztaságot.

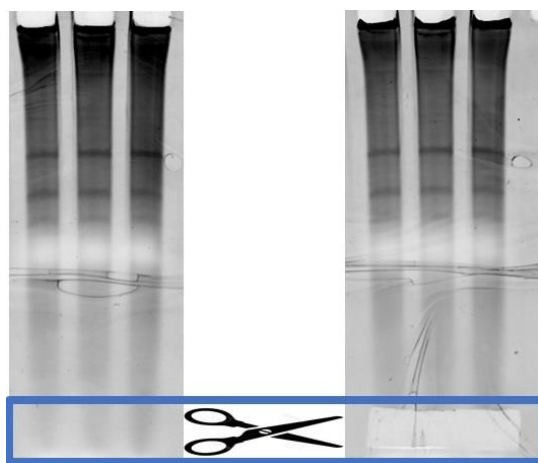
3.3. RNS keverék (pool) összeállítása

A Szigetközről származó ligeti szőlőmintákból RNS keveréket készítettem. Minden tőkérről legalább 2 levélmintából és legalább 1 kacs mintából készítettem RNS kivonatokat és ezeket egyenlő arányban elegyítettem (egyed pool), majd az így kapott mintákat sós-alkoholos kicsapással (2,5 V cc. EtOH, 0,1 V 4M NaOH) kicsaptam és 25 µl MQ vízben visszaoldottam. Minőségellenőrzéshez 2 µl-t használva minden mintából 1,2 %-os agaróz (1x TBE) gélen elválasztottam az RNS-eket, valamint Nanodrop készüléken ellenőriztem a keverékek koncentrációját. A kutatás további lépéseihez az egyed pool-okból úgynevezett ültetvény pool-t készítettem, mely képviselte az általam vizsgált ligeti szőlők mindegyikét. A közel azonos koncentrációk miatt minden mintából 4 µl-t használtam fel, amely végeredményben tartalmazta az összes gyűjtött egyed RNS keverékét, egyenlő arányban.

3.4. Kis RNS könyvtár készítés

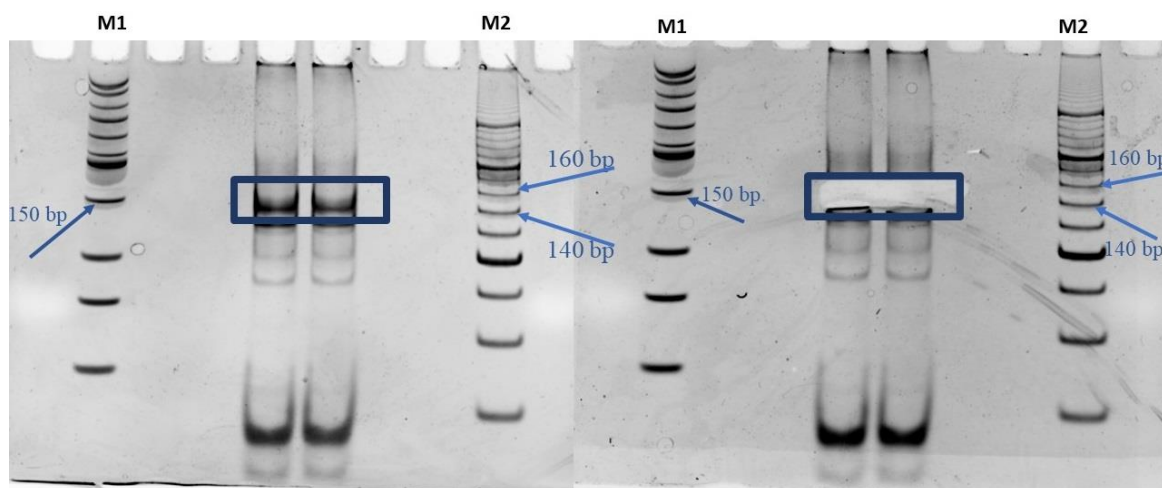
A Szigetközről származó ligeti szőlőlevél-mintákból tisztított RNS keverékből kis RNS könyvtárat készítettem az Illumina TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina) protokollja alapján.

A kis RNS könyvtár előállításakor az RNS pool-t 8%-os, ureát tartalmazó denaturáló poliakrilamid gélen választottam el. A mintafelvétel előtt az RNS-hez egyenlő térfogatban FDE RNS festéket adtam, majd denaturáltam 20 percig 65 °C-on. A futás feszültségszabályozottan, először 50 V-on történt, míg a minták befutottak a gélbe a zsebekből, majd 100 V-on, amíg a brómfenolkék (BFB) festék a gél aljára nem ért. A kis RNS frakció mérettartományánál, ami a BFB festék feletti 5 mm-es sáv, kivágtam az ott található RNS-eket (14. ábra).



14. ábra A kis RNS mérettartományának kivágása 8%-os, ureát tartalmazó akrilamid gélből a BFB festék (a kék keretezés alatt) alapján

A kivágott gélből a kis RNS-t 0,3 M NaCl oldat segítségével oldottam ki (egy éjszakán keresztül történő inkubálás és rázatás mellett 4°C-on), majd alkohollal kicsaptam. A visszaoldott, tiszta kis RNS 3' és 5' végeihez adaptereket ligáltam. Ezután a RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) segítségével cDNS-t szintetizáltam. Az Illumina Kit speciális primereit felhasználva végeztem a PCR reakciót. A kapott terméket 8%-os natív poliakrilamid gélen futtattam meg. A PCR termékek kivágását UV fény alatt végeztem, amihez EtBr-os festéssel tettem láthatóvá a DNS-t. A megfelelő méretű PCR termék (140-150 bp) beazonosításához két különböző molekula méret markert használtunk (15. ábra).



15. ábra 8%-os akrilamid gélen a kis RNS könyvtárak ellenőrző futtatása. M1: O'RangeRuler™ 20 bp DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific), M2: Low Molecular Weight DNA Ladder (NEB)

Végül a kapott terméket a kis RNS frakció esetében ismertetett módon a gélből visszaizoláltam, majd a csapadékot 1x TE pufferben oldottam vissza. A minőségellenőrzést és a szekvenálást az UD Genomed Kft. végezte Illumina platformon.

3.5. Bioinformatikai adatfeldolgozás

A kapott kis RNS szekvenálás eredményének adatfeldolgozását a CLC Genomic Workbench (Qiagen) szoftverrel végeztem. A szekvenálás minőségét FastQC program használatával ellenőriztem. Az alapelemzés során először a kapott 50 bp hosszú szekvenciák trimmelését végeztük el, amely a kis RNS könyvtár készítéséhez és a szekvenáláshoz szükséges primerek és adapterek szekvenciáinak eltávolítását jelenti. Ennek eredményeként kaptunk egy listát, amelyben minden egyedi kis RNS szekvencia ismétlődő kópiái is szerepelnek (redundáns readok - szekvencia olvasatok). A következő lépés során eltávolítottuk a redundáns adatokat a kis RNS szekvenciák közül, így kapva a nem redundáns read listát, melyek már csak egyedi szekvenciákat tartalmaznak. A kis RNS szekvenciákból *de novo* hosszabb szakaszokat építettük, így kapva az úgynevezett kontigokat. A kapott kontig szekvenciákat az NCBI RefSeq adatbázis növény vírus referencia szekvenciáihoz illesztettük BLAST algoritmus segítségével. Ez alapján készítettünk egy vírus találati listát. A kapott vírusokra való találatok valószínűségét az E-érték (e-value, expect value) alapján határoztuk meg úgy, hogy pozitív találatnak értékeltük az $E \leq 1e-5$ értékű eredményeket.

3.6. cDNS készítése

A cDNS olyan egyszálú DNS szál, ami reverz transzkriptáz enzim segítségével az RNS-ről szintetizálódik és bázissorrendje komplementere az RNS bázissorrendjének.

Random primereket alkalmazva reverz transzkripcióval cDNS-t készítettem az RNS templátokról, ehhez a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Thermo Fisher Scientific) használtam. Az RNS minták koncentrációját Nanodrop készüléken mértem meg, majd ezt követően minden csőbe 0,5 µg RNS mennyiséget használtam templátként. Minden mintához 0,25 µl random primert adtam és 2,75 µl MilliQ tisztaságú vizet pipettáztam, hogy kiegészítsem 3 µl-es végtérfogatra. Keverés után denaturáltam a mintáimat, ez 65 °C-on 5 percig tartott, majd

minimum 5 percig jégen tartottam azokat. A reakció további részéhez reakció mixet készítettem, amely mintánként tartalmazott 1 µl 5X reakció puffert, 0,5 µl 10 mM dNTP-t, 0,25 µl Ribolock RNáz inhibitor, 0,25 µl RevertAid reverz transzkriptáz enzimet. A jégen lévő, denaturált mintákhoz pipettáztam 2 µl-t a fentebb említett mixből, majd a következő protokoll szerint zajlott le a további reakció:

25 °C 10 perc

42 °C 60 perc

45 °C 10 perc

70 °C 10 perc

Az így előállított cDNS-t tízszeres hígítás után templátként használtam fel a PCR alapú vírustesztelések során.

3.7. cDNS minőségellenőrzése PCR-rel

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjak róla, hogy a cDNS szintézis rendben lezajlott, úgynevezett aktin tesztet végeztem. Ennek alapja az, hogy a cDNS szintézishez totál RNS kivonatot használtam, amely tartalmazza a szőlő összes RNS-ét, köztük az mRNS-eket is. Egy olyan konstans génexpressziós aktivitással rendelkező génről, mint az aktin gén, feltételezhetően folyamatosan szintetizálódik mRNS, amit így a totál RNS kivonatok tartalmaznak. A szőlő aktin mRNS-re specifikus primer pár használatával és a szintetizált cDNS mintánkat templátként használva elvégzett PCR eredménye megmutatja, hogy a lezajlott reverz transzkripció sikeres volt-e. Ha az aktin mRNS-ről származó cDNS valóban megtalálható a mintában, akkor pozitív lesz a PCR eredménye. Így feltételezhetjük, hogy az összes többi RNS-ről, így az összes virális RNS-ről is keletkezett cDNS. A PCR reakció összeállítását és menetét a következő részben ismertetem.

3.8. Szőlőt fertőző vírusok és az Ausztrál szőlő viroid kimutatása RT-PCR segítségével

A diplomadolgozatomban vizsgált vírusok és az Ausztrál szőlő viroid kimutatására specifikus primer szekvenciákat használtam, amelyeket az 1. táblázatban mutatok be. Ebben a táblázatban tüntetem fel az aktin teszthez használt primerek szekvenciáit is.

1. táblázat A vírusok kimutatására használt specifikus primerek

Vírus	Méret (bp)	Primer párok neve	Bázissorrend	Annellálási hőmérséklet	Elongáció ideje	Hivatkozás
GLPV	1288	GLPV RNA3 F1 GLPV RNA3 R1	GCACTGCTGTGGTGCCTGAGT GGGAAGAACGGATTCCTATACTC	59 °C	1 min	
GSyV-1	373	Sy5922F Sy6259R	CCAATGGGTCGCACTTGTTG ACTTCATGGTGGTGCCGGTG	60 °C	20 s	Glasa et al., 2015
GPGV	411	GPG6609F GPG7020R	GAGATCAACAGTCAGGAGAG GACTTCTGGTGCCTTATCAC	62 °C	20 s	Glasa et al., 2014
GFLV	118	GFLV-F GFLV-R	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG	62 °C	20 s	Gambino and Gribaudo, 2006
GRSPaV	155	RSPaV-For RSPaV-Rev	GGGTGGGATGTAGTAACTTTTGA GCAAGTGAAATGAAAGCATCACT	55 °C	20 s	Gambino and Gribaudo, 2006
GFkV	358	GFKV1/F GFKC1/R	GGTCCTCGGCCAGTGAAAAAGTA GGCCAGGTTGTAGTCGGTGTGTC	62 °C	20 s	Gambino and Gribaudo, 2006
GLRaV2	543	GLRaV2 For GLRaV2 Rev	GGTGATAACCGACGCCTCTA CCTAGCTGACGCAGATTGCT	55 °C	20 s	Gambino and Gribaudo, 2006
GLRaV3	336	GLRaV-3 For GLRaV-3 Rev	TACGTTAAGGACGGGACACAGG TGCGGCATTAATCTTCATTG	62 °C	20 s	Gambino and Gribaudo, 2006
AGVd	365	AGV F1 AGV R2	TGGGCACCAACTAGAGGT GGGCCTCCAAACAGGGAG	62 °C	20 s	
Vitis vinifera		Vvactin601s Vvactin601s	ACTGGTATTGTGCTGGATTC GGATGCAAGAATTGATCCTC	55 °C	1 min	

Jelmagyarázat:

1. GLPV: grapevine line pattern virus – szőlő vonalas mintázottság vírus
2. GSyV-1: grapevine Syrah virus 1 – szőlő Syrah vírus 1
3. GPGV: grapevine Pinot gris virus – szőlő Pinot gris vírus
4. GFLV: grapevine fanleaf virus – szőlő fertőző leromlás vírus
5. GRSPaV: grapevine Rupestris stem pitting-associated virus – szőlő Rupestris faszöveti barázdáltság vírus
6. GFkV: grapevine fleck virus – szőlő foltosodás vírus
7. GLRaV-2: grapevine leafroll-associated virus 2 – szőlő levélsodródás vírus 2
8. GLRaV-3: grapevine leafroll-associated virus 3 – szőlő levélsodródás vírus 3
9. AGVd: Australian grapevine viroid – Ausztrál szőlő viroid

3.9 PCR reakciókhoz használt keverék összeállítása a vizsgált vírusok kimutatására

Az alábbi keveréket készítettem el a PCR reakciókhoz, mintánként 15 µl végtérfogattal számolva:

steril mQ víz: 9,4 µl

5X Phire Green Reaction Buffer: 3 µl

*10 µM forward primer: 0,75 µl

*10 µM reverz primer: 0,75 µl

10 mM dNTP: 0,3 µl

Phire Enzyme: 0,3 µl

templát: 10x hígított cDNS 0,5 µl

*: A PCR reakciókhoz tartozó specifikus forward és reverz primereket a 2. táblázatban feltüntettem.

A PCR reakciók az alábbi protokoll alapján készültek:

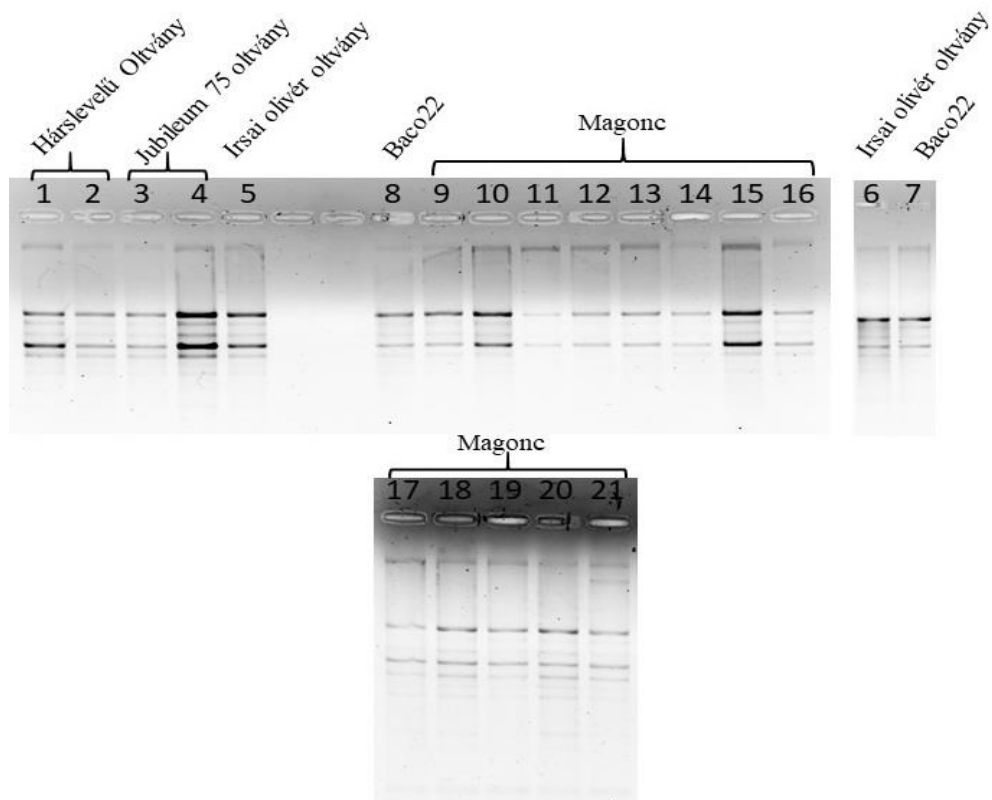
1. elő-deanturáció: 98 °C – 30 s
 2. denaturáció: 98 °C – 10 s
 3. *anelláció: 55-62 °C – 10 s
 4. *elongáció: 72 °C – 20 s -1 min
 5. végső elongáció: 72 °C – 2 min
- } 40X

*: A csillaggal jelölt anelláció hőmérséklete és az elongáció ideje vírusonként változó, ezeket az információkat a 2.táblázatban ismertettem.

4. Eredmények

4.1 GLPV jelenlétének vizsgálata

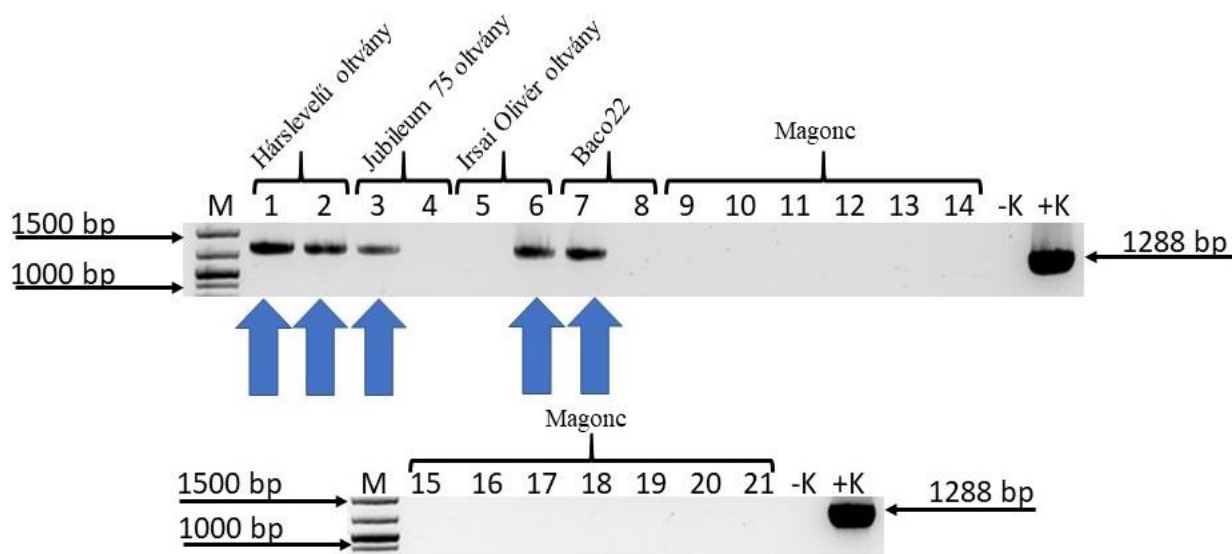
A NAIK-MBK üvegházában tartott szőlők közt találhatók magból kelt egyedek, és oltványok, melyek olyan anyaszőlőkről származtak, amelyek bizonyítottan a szőlő vonalas mintázottság vírus (grapevine line pattern virus, GLPV) által fertőzöttek. A kutatás során 21 darab növényből izoláltam RNS-t, amelyből 13 db magonc, 6 db oltvány és 2 db eredeti tőkéről származó Baco22-es szőlő volt. Az izolált RNS minták képe a 16. ábrán látható.



16. ábra A NAIK-MBK üvegházában található GLPV-vel fertőzött szőlőtőkéről származó magoncok és oltványok RNS kivonatainak képe 1,2%-os agaróz gélen való elválasztás után

4.1.2. A szőlő vonalas mintázottság vírus (GLPV) kimutatása

A GLPV specifikus PCR reakció gélelektroforézis képe alapján a becsült mérettartományban a pozitív kontrollon kívül még 5 általam készített izolátumban kaptam terméket. Ez alapján kimondható, hogy az 1-es, 2-es, 3-as, 6-os oltványban a vírus kimutatható. Az eredeti Baco22-es növényről származó 7-es mintában jelen van a GLPV, míg az ugyanerről izolált 8-as mintában nem volt kimutatható. A 9-21-es számú magonc mintákban a gélkép alapján elmondható, hogy nincs jele GLPV fertőzöttségnek, tehát ez esetben a vírus nem terjedt magátvitel során (17. ábra).



17. ábra A szőlő vonalas mintázottság vírus (GLPV) jelenlétének vizsgálata RT-PCR-rel

M: GeneRuler 100 bp Plus marker, -K: steril mQ víz, +K: GLPV fertőzött szőlőmint

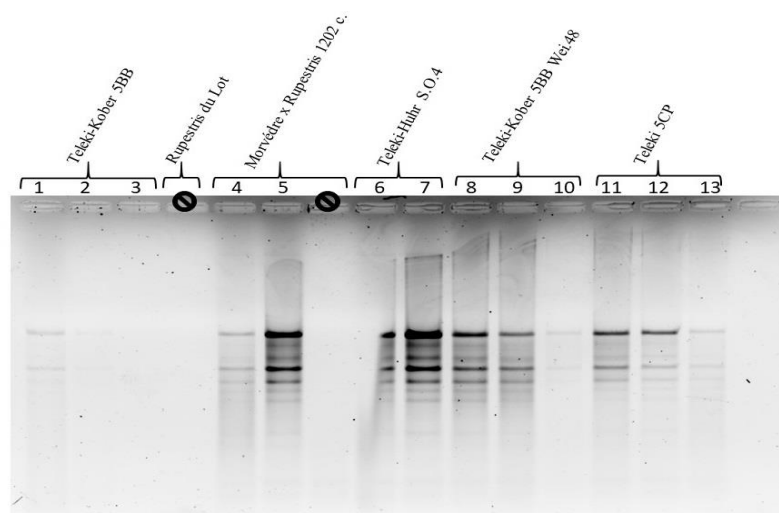
4.2 Pécsi ültetvény vírusfertőzöttségének vizsgálata

A pécsi kutatóintézet filoxérával (*Viteus vitifoliae*) fertőzött szőlő alany fajtagyűjteményének virológia állapotfelmérését 2015-ben végezték (Demián et al. 2020) (2.táblázat), így az előzetes vírusfertőzöttség ismeretében a mintavételezés során olyan egyedekre összpontosítva szedték a mintákat, amelyekben legalább 2 vírus és/vagy viroid megtalálható volt és a filoxéra levéllakó alakja is jelen volt.

2 .táblázat A pécsi ültetvény 2015-ben végzett vírusfertőzöttség felmérésének eredményei

Fajta			Detektált vírusok							Detektált viroidok
			Vizsgálat köteles vírusok				Nem vizsgálatköteles vírusok			AGVd
			GFLV	GFkV	GLRaV2	GLRaV3	GRSPaV	GSyV1	GPGV	
1.	Teleki-Kober 5BB	5BB		+				+	+	+
2.	Rupestris du Lot			+		+			+	
3.	Mourvédre x Rupestris 1202 C.		+				+	+	+	
4.	Teleki-Fuhr S.O.4	S.O.4		+			+	+	+	
5.	Teleki-Kober 5BB Wei.48	5BB		+				+	+	+
6.	Teleki 5C P	5C	+			+			+	

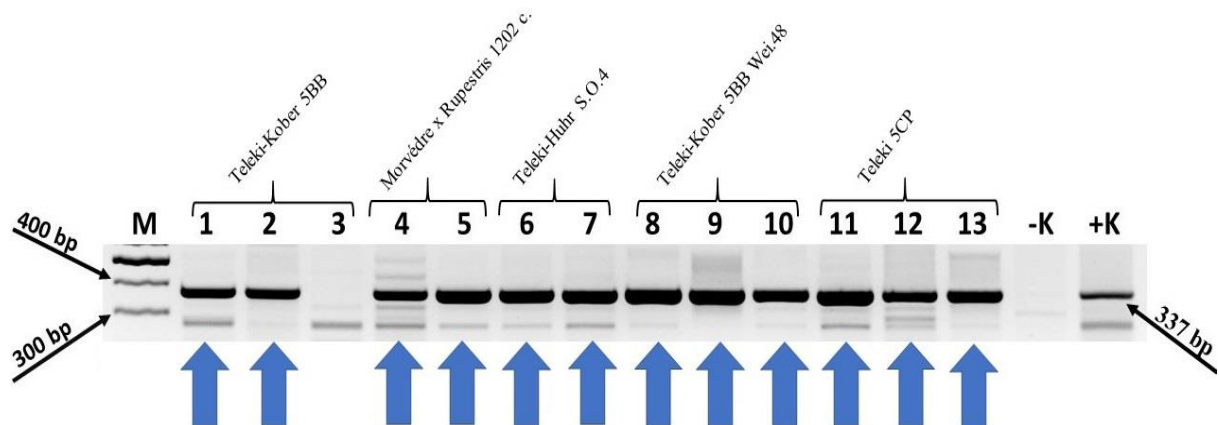
A 2019-es mintákról elmondható, hogy a vegetáció kései szakaszában lettek szedve, így az RNS-ek izolálása az öreg levelekből nem minden esetben lettek sikeresek, a Rupestris du Lot valamint a Morvédre x Rupestris 1202 c. fajtából egy-egy esetben sikertelen lett az RNS kivonás, ezért a későbbiekben 15 helyett csak 13 mintával dolgoztam, amelyet a 18. ábrán szemléltetek.



18. ábra A pécsi ültetvényből származó minták RNS kivonatainak képe 1,2%-os agaróz gélen való futtatás után

4.2.1. A szőlő Syrah vírus 1 (GSyV-1) kimutatása

A gélképen jól látható, hogy a PCR reakció sikeres volt, mivel a negatív kontrollban nem, míg a pozitív kontrollban láthatjuk, hogy a várt mérettartományban megjelent a termék a várt mérettartományban. A 3-as minta kivételével mindegyik általam készített izolátumban kimutatható a kórokozó jelenléte, így megállapíthatjuk, hogy az 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13-as számú minták GSyV-1 vírussal fertőzöttek (19. ábra).

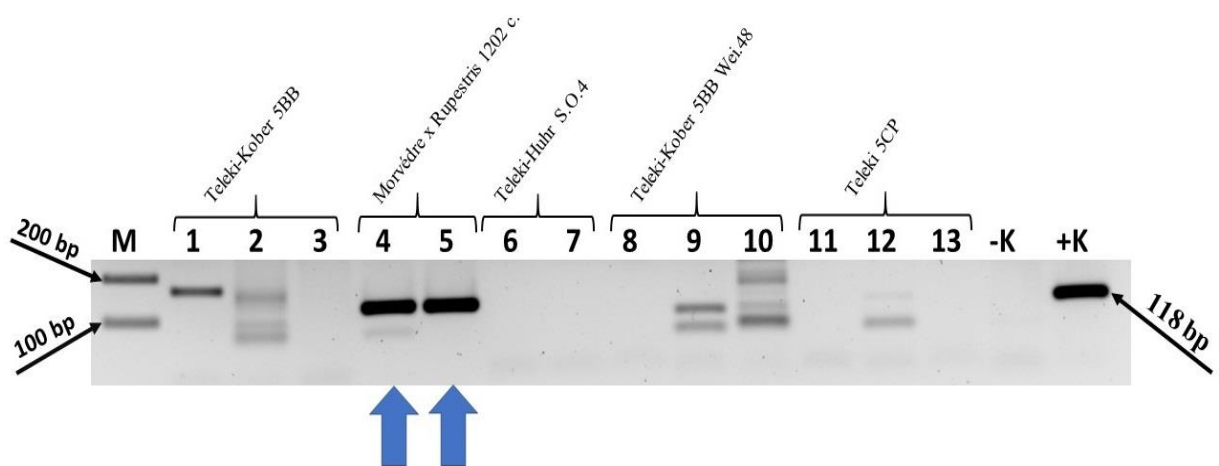


19. ábra A szőlő Syrah vírus 1 jelenlétének kimutatása RT-PCR-rel

M: GeneRuler 100 pb Plus marker, -K: mQ víz, +K: GSyV-1 fertőzött szőlő minta

4.2.2. A szőlő legyezőlevelűség vírus (grapevine fanleaf virus, GFLV) kimutatása

A sikeres PCR eredményeként az 1-es, 2-es, 9-es, 10-es és 12-es mintában aspecifikus jelet kaptam, amelyek a várt mérettartományon kívülre estek, így ezek a minták GFLV kórokozótól mentesnek tekinthetők, azonban a pozitív kontrollban, valamint a 4-es és 5-ös számú Morvédre x Rupestris 1202 c. fajtából származó mintában a becsült mérettartományban kaptam a terméket, tehát ezek a minták a GFLV vírus által fertőzöttek voltak (20. ábra).

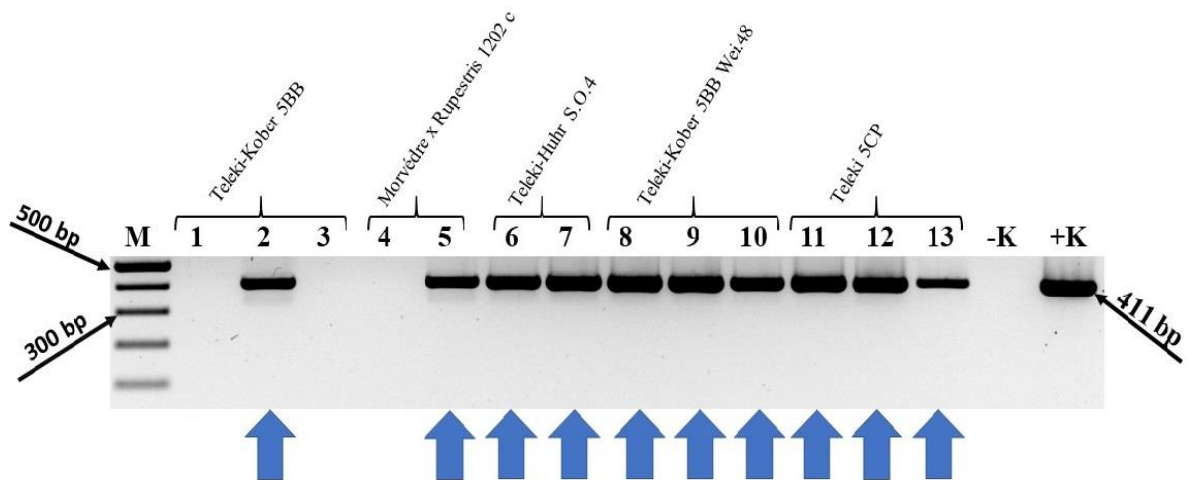


20. ábra A szőlő fertőző leromlás vírus (GFLV) jelenlétének kimutatása RT-PCR-rel

M: GeneRuler 100 pb Plus marker, -K: mQ víz, +K: GFLV fertőzött szőlő minta

4.2.3. A szőlő Pinot gris vírus (grapevine Pinot gris virus, GPGV) kimutatása

A GPGV a kutatócsoportunk által már korábban is vizsgált kórokozó, ami szőlőn igen elterjedt, azonban a vírus gyakran látens marad, nem okoz tünetet. A pozitív kontrollban a várt mérettartományban látható a vírus jelenléte, a negatív kontroll vártan megfelelően üres maradt. Az eredmények azt mutatták, hogy a Teleki-Kober 5BB fajta 1-es és 3-as, valamint a Morvédre x Rupestris 1202 c. fajta 4-es mintájának kivételével az összes egyedben kimutatható volt a GPGV (21. ábra).

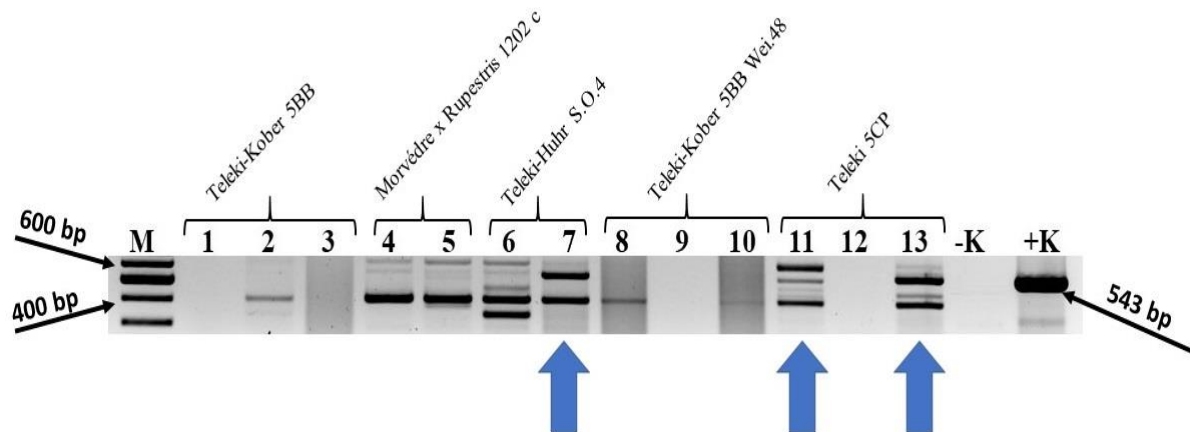


21. ábra A szőlő Pinot gris vírus jelenlétének kimutatása RT-PCR-rel

M: GeneRuler 100 pb Plus marker, -K: mQ víz, +K: GPGV fertőzött szőlő minta

4.2.4. A szőlő levélsodródással-társult vírus 2 (grapevine leafroll-associated virus 2, GLRaV-2) kimutatása

A 22. ábra bemutatja a GLRaV-2 vizsgálatának eredményét. A Teleki-Huhr S.O.4 7-es és a Teleki 5CP fajta 11-es és 13-as mintájában jól kivehető a vírus jelenléte a keresett mérettartományban, ezért a gélkép alapján elmondható, hogy ebben a három mintában a GLRaV-2 jelen van. A 2, 4, 5, 6, 8, 10 és 12-es mintákban csak aspecifikus jelet kaptam, amelyek a várt mérettől eltérő tartományban helyezkednek el, így ezek a minták mentesek a GLRaV-2-től.

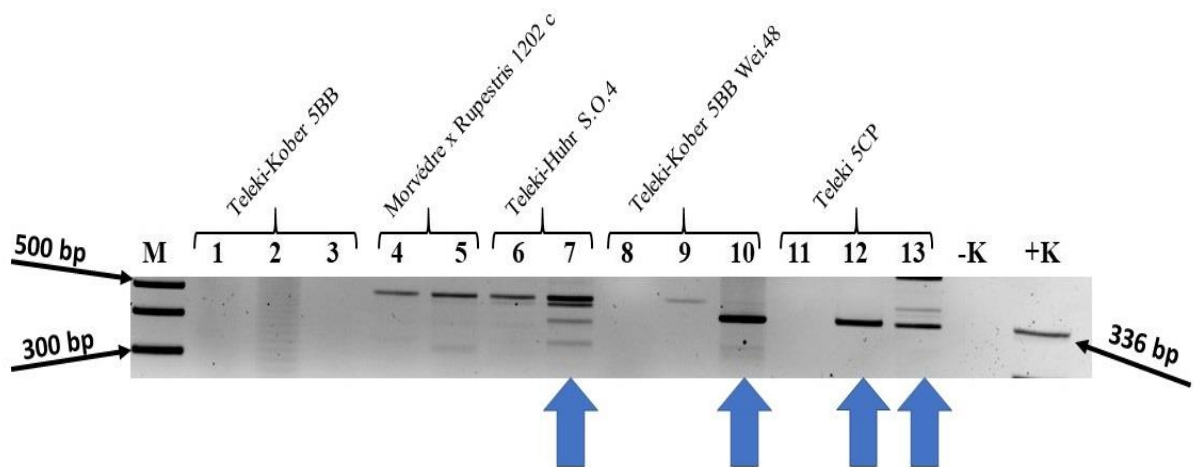


22. ábra A szőlő levélsodródással-társult vírus 2 jelenlétének kimutatása RT-PCR-rel

M: GeneRuler 100 pb Plus marker, -K: mQ víz, +K: GLRaV-2 fertőzött szőlő minta

4.2.5. A szőlő levélsodródással-társult vírus 3 (grapevine leafroll-associated virus 3, GLRaV-3) kimutatása

A 23. ábra szemlélteti a GLRaV-3 vizsgálata során kapott eredményt. A Teleki-Kober 5BB Wei. 48 fajta 10-es és a Teleki 5CP fajta 12-es és 13-as mintájában a becsült mérettartományban kaptam terméket, így kijelenthető, hogy a GLRaV-3 kórokozóval fertőzöttek ezek az egyedek. A 7-es számú PCR termék mérete talán kisebb a vártnál, így nem mondhatjuk ki biztosan, hogy csak aspecifikus jelet kaptam vagy GLRaV-3 vírussal fertőzött-e a minta. A 4, 5, 6 és 9 számú mintákban a várt mérettartománytól eltérő helyen kaptam aspecifikus jelet, tehát ezek a minták a keresett kórokozótól mentesek.

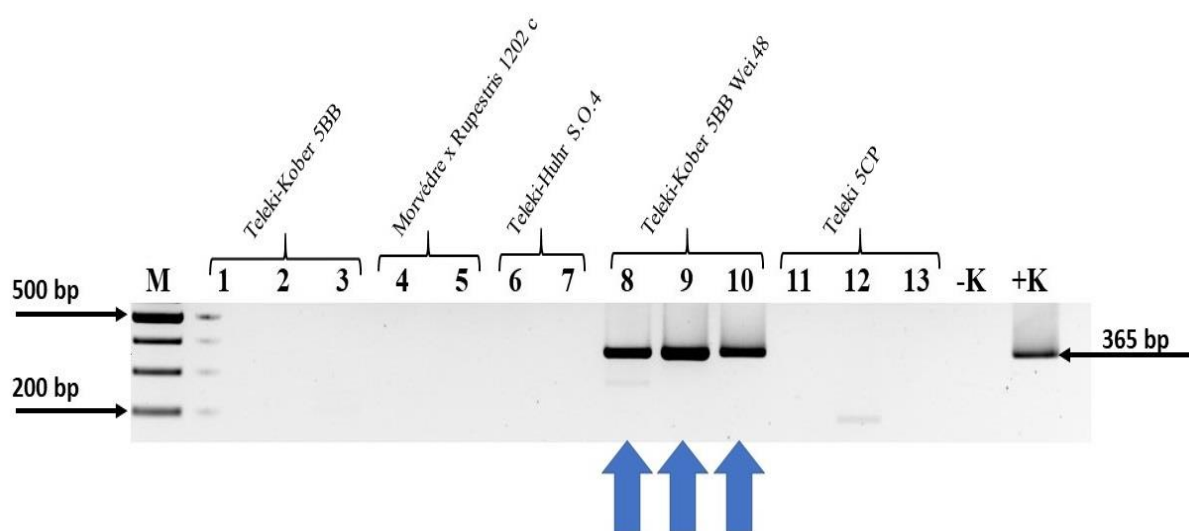


23. ábra A szőlő levélsodródással-társult vírus 3 (GLRaV-3) jelenlétének kimutatása RT-PCR-rel

M: GeneRuler 100 pb Plus marker, -K: mQ víz, +K: GLRaV-3 fertőzött szőlő minta

4.2.6. Az Ausztrál szőlő viroid (AGVd) kimutatása

A 24. ábra szemlélteti az AGVd RT-PCR segítségével kapott eredményeket. A 8-as, 9-es és 10-es mintákban a becsült mérettartományban látható a vírus, így a Teleki-Kober 5BB Wei. 48 fajtából származó szőlőminták mindegyike AGVd viroiddal fertőzöttnek tekinthető. Az 1-es számú minta helyén csak a marker átszivárgása látható. Az 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13-as számú mintákban a keresett kórokozó nincs jelen. A 12-es mintában aspecifikus jel látható a várt mérettartomány alatt, ezért a minta kórokozótól mentes.



24. ábra Az Ausztrál szőlő viroid (AGVd) jelenlétének kimutatása RT-PCR-rel

M: GeneRuler 100 pb Plus marker, -K: mQ víz, +K: AGVd fertőzött szőlő minta

4.2.7 A vírusfertőzöttség változása 2015 és 2019 között

A GLRaV-2 esetében 2015-ben nem mutattak ki vírusfertőzöttséget a vizsgált mintákban, míg 2019-ben az általam végzett kutatás során a Teleki-Huhr S.O.4 fajta 7-es mintája és a Teleki 5CP fajtánál a 11, 12-es minta pozitív eredményt mutatott GLRaV-2-re.

2019-ben a Teleki-Huhr S.O.4 7-es, a Teleki-Kober 5 BB Wei.48 10-es, valamint a Teleki 5CP 12 és 13-as mintájában detektáltam a GLRaV-3 vírust, azonban 2015-ben csak a Teleki 5CP és a Rupestris du Lot fajtánál volt jele a kórokozónak.

A nem vizsgálatköteles vírusok közül a GSyV-1-nél a Teleki-Kober 5BB 3-as mintáján kívül 2019-ben minden mintában kimutattam a vírus jelenlétét. 2015-ben is igen elterjedt volt a GSyV-1, de a Teleki 5CP fajta vizsgálata során még nem észlelték jelenlétét.

2019-ben ugyan az 1, 3 és 4-es minta vizsgálata során negatív eredményt kaptam a GPGV-re, de mindkét kutatásban, minden fajta esetében igazolható volt a vírusfertőzöttség.

GFLV vizsgálata során különös volt, hogy míg 2015-ben a Mourvédre x Rupestris 1202 C. és Teleki 5C P fajtájú szőlőalanyoknál detektálták a vírust, addig a 2019-ben végzett kutatásom során csak a Mourvédre x Rupestris 1202 C. fajtánál igazoltam jelenlétét. Az AGVd-nél is ez a jelenség mutatkozott, de itt a Teleki-Kober 5BB fajtánál nem tudtam kimutatni a viroidot, azonban a Teleki-Kober 5 BB Wei.48 szőlőalanyánál igen.

A Rupestris du Lot fajtánál és a Mourvédre x Rupestris 1202 C. fajtánál egy minta esetében sikertelen volt az RNS izolálása, míg a GFkV és GRSPaV vírusoknál a PCR reakció (3.táblázat). A megfigyelt eltéréseket magyarázhatja, hogy a vegetáció során folyamatosan változik a vírusok koncentrációja és eloszlása a növényben (Charles et al. 2006), ezért előfordulhat, hogy egy-egy hajtásban a vírus kimutathatósága a módszer érzékenységének határa alatt vagy felette van.

3.táblázat A vírusfertőzöttség változása 2015 és 2019 között

Fajta		Mintagyűjtés éve/Minta száma	detektált vírusok							viroid	
			vizsgálatköteles vírusok				nem vizsgálatköteles vírusok				
			GFLV	GFkV	GLRaV-2	GLRaV-3	GRSPaV	GSyV-1	GPGV	AGVd	
1.	Teleki-Kober 5BB	2015		+				+	+	+	
		2019/1									
		2019/2									
		2019/3									
2.	Rupestris du Lot	2015		+		+			+		
		2019 									
3.	Mourvédre x Rupestris 1202 C.	2015	+				+	+	+		
		2019/4									
		2019/5									
		2019 									
4.	Teleki-Huhr S.O.4	2015		+			+	+	+		
		2019/6									
		2019/7									
5.	Teleki-Kober 5 BB Wei.48	2015		+				+	+	+	
		2019/8									
		2019/9									
		2019/10									
6.	Teleki 5C P	2015	+			+			+		
		2019/11									
		2019/12									
		2019/13									

4.3 A *Vitis sylvestris* kisRNS könyvtár szekvenciájának elemzése

A ligeti szőlő mintákból kis RNS könyvtárat készítve a könyvtár a levél és kacs mintákban fellelhető összes kis RNS-t tartalmazni fogja, tehát nem csak a növényhez tartozó kis RNS-eket, hanem a ligeti szőlőt fertőző RNS vírusok ellen keletkező kis RNS-eket is. A ligeti szőlő mintákból készített kis RNS-könyvtárak bázissorrendjének meghatározására az UD Genomed Kft. nagy áteresztőképességű Illumina szekvenálást használt, majd a kapott adatokat bioinformatikai módszerekkel elemeztem. Az ilyen módszerrel történő vizsgálat során teljes körű képet kaphatok a mintáimban előforduló vírusokról, viroidokról valamint eddig még ismeretlen kórokozókról (Adams et al. 2009, Visser et al. 2014).

A szekvenálás minőségét FastQC program használatával ellenőriztem. Az alapelemzés során először a kapott 50 bp hosszú szekvenciák trimmelését végeztük el, amely a kis RNS könyvtár készítéséhez és a szekvenáláshoz szükséges primerek és adapterek szekvenciáinak eltávolítását jelenti. Ennek eredményeként megkaptuk a redundáns read (szekvencia olvasat) listát, amelyben minden egyedi kis RNS szekvencia ismétlődő kópiái is szerepelnek. A táblázatból kivehető, hogy a trimmelés után a további munkára alkalmas readok száma a könyvtárban 12 millió, ami megfelelő (4.táblázat).

A következő lépés során eltávolítottuk a redundáns adatokat a kis RNS szekvenciák közül, így kapva a nem redundáns read listát, melyek már csak egyedi szekvenciákat tartalmaznak. A kis RNS szekvenciákból *de novo* hosszabb szekvenciákat építettünk, így kapva az úgynevezett kontigokat.

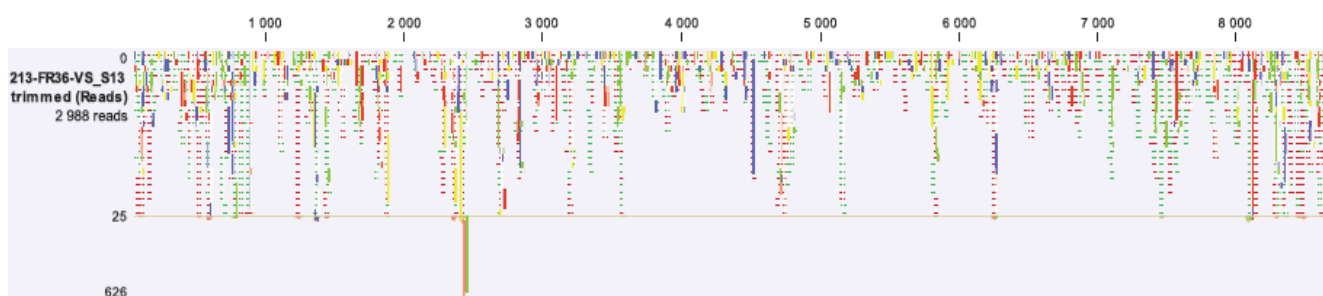
4.táblázat A kis RNS könyvtár szekvenálás kezdeti statisztikája

Könyvtár száma	Szekvenált readok	Trimmelt readok (redundáns)	Nem redundáns readok		Összes kontig szám
				%	
213_FR36_VS	14615543	12060850	1790297	14,8%	4702

A kapott kontig szekvenciákat az NCBI RefSeq adatbázis növény vírus referencia szekvenciáihoz illesztettük BLAST algoritmus segítségével. Ez alapján készítettünk egy vírus találati listát. Az így kapott lista alapján láthattuk, hogy milyen vírusokról keletkezhetnek a kis RNS-ek, illetve az is kiderül, hogy melyik vírusra hány darab read illeszkedik a könyvtárakból. A kapott vírusokra való találatok valószínűségét az E-érték (e-value, expect value) alapján határoztuk meg úgy, hogy pozitív találatnak értékeltük az $E \leq 1e-5$ értékű eredményeket. A

könyvtárban csupán egy vírusra, a GRSPaV-re kaptam találatot. Meglepő módon nemcsak más vírusra, de egyetlen viroidra sem kaptam találatot az elemzés során.

A következő lépés során lefedettségi ábrákat csináltam, hogy a hibás illesztések kiszűrésre kerüljenek. Ehhez a kis RNS könyvtárat a vizsgált vírus GenBank-ben található referenciagenomjára illesztettem. Amennyiben a genomot több helyen is lefedi bizonyos számú read, akkor a vírusfertőzöttség valószínűsíthető, viszont ha csak néhány helyen látható kevés találat, akkor az arra utalhat, hogy a növény némely endogén RNS-részlete mutat hasonlóságot a vírus örökítőanyagának egy szakaszával (25. ábra).



25. ábra Ligeti szőlő mintákban található kis RNS-ek illesztése GRSPaV referenciagenomra

A csoport tapasztalatai szerint a bioinformatikai elemzés akkor mutatja ki egy vírus jelenlétét, ha találunk vírus specifikus kontigot, valamint, ha a normalizált redundáns readok száma eléri a 200-at. A vírus specifikus kontig találat az előbbieik alapján GRSPaV fertőzésre utalt (5.táblázat).

5.táblázat A szekvenált kis RNS könyvtár bioinformatikai analízise

Könyvtár száma	Bioinformatikai analízis		GRSPaV
213_FR36_VS	Virus hit	CLC kontigok	10
		Nem-redundáns readok	1718
		Redundáns readok	2988
		Normalizált redundáns readok	204
		Genom lefedettség	87%

14,62

5. Következtetések és javaslatok

5.1 A GLPV terjedésének vizsgálata

A NAIK-MBK üvegházában találhatók olyan magoncok és oltványok, amelyek bizonyítottan a szőlő vonalas mintázottság vírus (Grapevine line pattern virus, GLPV) által fertőzött anyanövényekről származnak. Vizsgálataimban megfigyeltem az esetlegesen maggal, vagy oltással történő vírusátvitelt. A kutatás során 21 darab növényből izoláltam RNS-t, amelyből 13 db magonc, 6 db oltvány és 2 db eredeti tőkéről származó Baco22-es szőlő volt. A GLPV specifikus PCR reakció gélelektroforézis képe alapján kimondható, hogy az 1-es, 2-es, 3-as, 6-os oltványban a vírus kimutatható. Az eredeti Baco22-es növényről származó 7-es mintában jelen van a GLPV. A vizsgált 13 (9-21-es jelű) magonc mintákban nem volt jele GLPV fertőzöttségnek, tehát ez esetben a vírus nem terjedt magátvitel során.

A vírusok gyors változásokra képesek, alkalmazkodásuk a megváltozott körülményekhez gyorsan lezajlik. A végbement változások hosszú evolúció eredményei, amelyben szerepet játszhat a gazdaszervezettel való tartós együttélés és a koevolúció is, mely során a vírus és a gazdanövény között folyamatos behatások alakulnak ki, amely végül a vírus genom megváltozását eredményezi (Roossinck 1997). Ahhoz, hogy egy vírus maggal képes legyen terjedni, be kell jutnia a mag valamely szövetébe. Ezt a folyamatot azonban különböző gátló faktorok akadályozhatják. A magátvitel jelentős változásait több tényező is befolyásolhatja, például a gazdanövény fajtája, a vírus törzs, a gazda fertőzésének ideje és a hőmérsékleti viszonyok (Sastri 2012). Ezen kívül bizonyos változások az aminosav sorrendben, melyek hatással vannak konzervált virális motívumokra, képesek javítani vagy csökkenteni a különböző vírusátviteli módok hatékonyságát. Például a szója mozaik vírus (soybean mosaic virus, SMV) köpenyfehérjéjében történő egyetlen aminosav csere képes növelni a levéltetvek általi átvitel hatékonyságát, ezzel párhuzamosan pedig csökkenteni a magátvitelét (Jossey et al. 2013). Mivel a GLPV egy 30 évvel ezelőtt azonosított vírus, amely ez idő alatt nagyon sokat változhatott, így lehetséges, hogy azért nem produkálja a tüneteket, mert jól adaptálódott a gazdához és ezen változások okozhatják, hogy maggal már nem képes terjedni.

5.2 Pécsi ültetvény vírushatározottságának vizsgálata

A PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet szőlőalany-fajtagyűjteményének virológia állapotfelmérését 2015-ben végezték (Demián et al, 2020). Az eredmények ismeretében a mintavételezés során olyan egyedekre összpontosítva szedtük a mintákat 2019 októberében,

amelyekben legalább 2 vírus és/vagy viroid megtalálható volt és a filoxéra levéllakó alakjának károsítása is megfigyelhető volt.

Az eredmények azt mutatták, hogy 3 vírus esetében (GLRaV-2, GLRaV-3, GSYV-1) megfigyelhető volt a terjedés, mivel 2019-ben több egyed is fertőzött volt a vírussal, mint 2015-ben. Azt gondoljuk, hogy az ültetvényben valószínűleg helyszíni fertőzés történt, amely történhetett akár mechanikai átvitel során vagy vektor által. Egy fajta esetében az RNS izolálás, valamint két vírus (GFkV, GRSPaV) RT-PCR-rel történő detektálása sikertelen volt, így további vizsgálatok szükségesek. A filoxéra feltételes vektorszerepének meghatározása érdekében a NAIK-MBK Molekuláris Növénykórtan csoportja már megkezdte kutatásait, mely során azon filoxérák vírusfertőzöttségét vizsgálják, amelyek az általam vizsgált szőlőlevél mintákról származnak.

5.3 A ligeti szőlő bioinformatikai elemzése

Egy olasz kutatócsoport 2018-ban Toszkána területén található ligeti szőlőkben végzett virológiai felmérést, amely során négy vírust (GLRaV-1, GLRaV-3, GRSPaV, GVA) mutattak ki (Sabella et al. 2018). Mivel kollegáink a NAIK SZBKI-ben a ligeti szőlő eredetét kutatják molekuláris markerezéssel, ismertek olyan helyszíneket, ahol ez a növény a természetes flórában fellelhető. Az általam végzett kísérletben Hédervár-Kimle és Feketeerdőből származtak a ligeti szőlő minták és vírusfertőzöttségük feltérképezése kis RNS alapú új generációs szekvenálási módszer segítségével történt. Mivel a ligeti szőlők élőhelyüknél fogva (mocsaras területeken, a magas vízállás miatt a filoxéra nem él meg) nem voltak kitéve az 1875-ben bekövetkező filoxéra járványnak, így nem pusztultak ki, ezért következtethetünk Magyarország szőlővírusaira a járvány előtti időkből.

Az olasz kutatócsoporttal ellentétben az én mintáimban csak a GRSPaV-t tudtam kimutatni. A toszkán ligeti szőlőből származó GRSPaV izolátumok filogenetikai elemzése azt mutatta, hogy a termesztett *Vitis vinifera* fajtákból származó izolátumokkal csoportosulnak. Azt nem tudták megfejtetni, hogy a vadon élő *Vitis* fajok hogyan fertőződhetek meg az ismert szőlővírusokkal. Azt a hipotézisüket találták megfelelő magyarázatnak, hogy a vírusok ősei együtt evolválódtak a régi *Vitis* fajokkal, majd mikor ezek a *Vitis* fajok elkülönültek egymástól, a vírusok is elkülönültek, ezután mechanikai úton, oltással kerülhettek a különböző vírusvariánsok át a termesztett *Vitis vinifera* fajtákba. Összességében a vad *Vitis* fajok vírus rezervoárként szolgálhatnak a szőlővírusok számára, melyek potenciális esélyt nyújtanak

különböző vírusok vektor általi átjutására a termesztett szőlő fajtákra (Sabella et al, 2018). Azonban sem a Toszkán területen, sem a nálunk vadon növényi ligeti szőlő egyedekben nem találtunk olyan vírusokat, amelyek leírása az utóbbi 10-15 évben történt, mint pl. a GPGV, GSYV-1 vagy GVT. Ebből akár arra is következtethetünk, hogy ezek a vírusok nemcsak leírásuk időpontja szerint, hanem evolúciósan is újabbnak számítanak. Ennek a kijelentéséhez azonban nem elég csupán néhány tőkét megvizsgálnunk, a megalapozott következtetéshez további vizsgálatok szükségesek.

6. Összefoglalás

A szőlőültetvények egészségügyi állapotát nagymértékben befolyásolja azok vírusokkal, viroidokkal való fertőzöttsége. Az ilyen vegetatíván szaporított, fás szárú növények esetében az egészséges, kórokozómentes állapot fenntartása, meglehetősen nehéz feladat, mivel az ellenük való védekezés csupán a rezisztens fajták termesztésével, a kórokozó mentes szaporítóanyag használatával, illetve a vírusvektorok elleni védekezéssel oldható meg. A már jelenlévő kórokozók pontos kimutatása pedig csak korszerű diagnosztikai módszerek segítségével lehetséges.

Diplomadolgozatom során RT-PCR alapú teszttel vizsgáltam a szőlő vonalas mintázottság vírus (grapevine line pattern virus, GLPV) terjedési módjait, amelyhez a vírus fenntartására használt 2 db Baco22-ről hajtattott vesszőről, 6 db oltványról és 13 db magoncról izoláltam RNS-t. A GLPV specifikus PCR reakció gélelektroforézis képe alapján kimondható, hogy 4 db oltványban és 1 db eredeti Baco22-es növényben volt kimutatható a vírus. A vizsgált magoncok egyikében sem volt jele GLPV fertőzöttségnek, tehát ez esetben a vírus nem terjedt magátvitel során. Ennek háttérében az állhat, hogy a tartós együttélés során a vírus adaptálódott a gazdanövényhez, aminek következtében nem képes maggal terjedni.

RT-PCR segítségével elvégeztem a PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet szőlőalany-fajtagyűjteményének virológia állapotfelmérését, amelyhez a 2015-ben végzett kutatási eredményeket is felhasználtam (Demián et al 2020), hogy megfigyelhessem az ültetvényben történő vírusok terjedését. Az eredmények alapján 3 vírus esetében (GLRaV-2, GLRaV-3, GSYV-1) volt megfigyelhető a terjedés, 2019-ben ugyanis több egyed volt vírusfertőzött, mint 2015-ben. Azt gondoljuk, hogy az ültetvényben valószínűleg helyszíni fertőzés történt, amely történhetett akár mechanikai átvitel során vagy vektor által.

Felmértem a Hédervár-Kimle és Feketeerdőből származó ligeti szőlők vírusfertőzöttségét kis RNS alapú új generációs szekvenálási módszer segítségével, hogy következtethessünk arra, vajon milyen szőlővírusok lehettek Magyarországon az 1875-ben bekövetkező filoxéra járvány előtt. Egy olasz kutatócsoport (Sabella et al 2018), 2018-ban Toszkána területén található ligeti szőlőkben végzett virológiai felmérést, amely során négy vírust (GLRaV-1, GLRaV-3, GRSPaV, GVA) mutattak ki. Az olasz kutatócsoporttal ellentétben az én mintáimban csak a GRSPaV-t tudtam kimutatni. Olyan vírusokat azonban nem mutattunk ki ligeti szőlőkben, amelyek leírása az utóbbi 10-15 évben történt, mint pl. a GPGV, GSYV-1 vagy GVT, amiből arra következtethetünk, hogy ezek nemcsak leírásuk szerint, hanem evolúciósan is újabb

vírusok. Ennek a kijelentéséhez azonban nem elég csupán néhány tőkét megvizsgálnunk, a megalapozott következtetéshez további vizsgálatok szükségesek.

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni külső témavezetőimnek Dr. Várallyay Évának és Demián Emesének a kitartó munkájukat és szakmai javaslataikat, amelyek hozzásegítettek a diplomadolgozatom megírásához. Köszönöm nekik, hogy a felmerülő kérdéseimet készséggel és szakszerűen megválaszták. Szeretnék köszönetet mondani a NAIK-MBK Molekuláris Növénykórtan csoportjának, akik mindig segítettek munkámat a laboratóriumban.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Bán Rita Tanár Nőnek támogatásáért, a Szent István Egyetem Növényvédelmi Intézetének.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom szüleimnek és barátaimnak, akik folyamatosan támogattak a diplomadolgozatom megírása során.

8. Irodalomjegyzék

1. Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Rowhani, A. (2009): Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, 387(2): 395-401.
2. Apró M. és Cseh E. és Gáborjányi R. és Takács A. P. (2015): Leggyakoribb vírusbetegségek a hazai szőlőültetvényekben, *Agrofórum Extra*, 2015. (26.évf.) Extra 61. sz. 84-87.
3. Baracsi É. (1999): A biotesztek virológiai alkalmazása In: Horváth, J. és Gáborjányi, R. (szerk.) *Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 156-159.
4. Buck, K.W. (1996): Comparison of the replication of positive stranded RNA viruses of plants and animals. *Advances in virus research*, 47:159-251.
5. Charles, J. G., Cohen, D., Walker, J. T. S., Forgie, S. A., Bell, V. A., Breen, K. C. (2006): A review of Grapevine leafroll-associated virus Type 3 (GLRaV-3) for the New Zealand wine industry. Report to New Zealand wine growers. Hort Research Client Report. 18447, 79.
6. Czotter, N., Molnar, J., Szabó, E., Demian, E., Kontra, L., Baksa, I., Szittyá, Gy., Kocsis, L., Deák, T., Bisztray, Gy., Tusnady, G.E., Burgyan, J., Varallyay, E. (2018): NGS of Virus-Derived Small RNAs as a Diagnostic Method Used to Determine Viromes of Hungarian Vineyards. *Frontiers in Microbiology*, doi.org/10.3389/fmicb.2018.00122
7. Czotter, N., Szabó, E., Molnár, J., Kocsis, L., Deák, T., Bisztray, Gy., Tusnady, G.E., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015a): First description of grapevine syrah virus 1 in vineyards of Hungary. *Journal of Plant Pathology*, 97: S67-S77.
8. D'Arcy, C.J. and L.L. Domier. 2000. Barley yellow dwarf. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1103-01
9. Demián E. és Turcsán M. és Jaksa-Czotter N. és Varga T. és Szénási M. és Kocsis L. és Oláh R. és Várallyay É. (2019) Virological survey of grapevine rootstock plantations and test of the effectivity of different sanitation methods using small RNA HTS, 4.
10. Demian, E., Jaksa-Czotter, N., Molnar, J., Tusnady, G.E., Kocsis, L., Varallyay E. (2020): Grapevine rootstocks can be a source of infection with non-regulated viruses. *European Journal of Plant Pathology*, 156: 897–912.
11. Gáborjányi R. és Király Z. (2007) Molekuláris növénykórtan. Agroiinform Kiadó, 21-25.
12. Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., Terlizzi, F., Credi, R., Saldarelli, P. (2012): A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Res*, 163(1): 262-268.
13. Glits M. és Folk Gy. (2000) Kertészeti Növénykórtan. Mezőgazda Kiadó, 250-254.
14. Graniti, A., Martelli, G.P. (1965): Further investigations on legno riccio (rugose wood), a graft-transmissible stem-pitting of grapevine. In Proceedings international conference on virus and vector on perennial hosts with special reference to vitis, Davis, USA, 168-179.
15. Gualandri, V., Asquini, E., Bianchedi, P., Covelli, L., Brilli, M., Malossini, U., Bragagna, P., Saldarelli, P., Si-Ammour, A. (2016): Identification of herbaceous hosts of the Grapevine pinot gris virus (GPGV). *European Journal of Plant Pathology*, 147(1):21-25.

16. Heath M.C. (2000): Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 315-319
17. Horváth J. és Gáborjányi R. (1999). Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek, Mezőgazda Kiadó, 68-74.
18. Jossey, S., Hobbs, H.A., Domier, L.L. (2013). Role of Soybean mosaic virus-encoded proteins in seed and aphid transmission in soybean. *Phytopathology* 103, 941–948.
19. Komínek, P., Glasa, M. and Bryxiová, M. (2005): Analysis of molecular variability of Grapevine leafroll-associated virus 1 reveal the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines. *Virus Genes* 31: (3) 247-255.
20. Kuniyuki, H., Gioria, R. and Rezende, J. A. (2006): Transmission of the Grapevine virus B by the mealybug *Pseudococcus longispinosus* Targioni- Tozzetti (Hemiptera: Pseudococcidae) in Brazil. *Summa Phytopathol.* 32 (2): 151-155.
21. Lázár J. (1996): A szőlő vírusokkal kapcsolatos újabb hazai kutatások eredményei-Vírusbetegségek és mentes törzsültetvények létesítése. Doktori értekezés. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem. Budapest.
22. Lázár, J. 1 & Bisztray, Gy. D. (2011.): Virus and virus-like diseases of grapevine in Hungary.” *International Journal of Horticultural Science* 17 (3): 25-36.
23. Le Gall, O., Candresse, T., and Dunez, J. (1997): An RNA-dependent-RNA-polymerase activity associated with grapevine chrome mosaic nepovirus infection. *Arch Virol.* 142: 15-156.
24. Lehoczky, J., Boscia, D., Martelli, G.P., Burgyan, J., Castellano, M.A., Beczner, L., Farkas, G. (1987): Occurrence of line pattern a hitherto unknown virus disease of grapevine in Hungary. *Kertgazdaság*, 19: 61-79.
25. Lehoczky, J., Burgyán, J. (1986): A paradicsom fekete gyűrűs foltosság vírus előfordulása szőlőben Magyarországon. *Kertgazdaság*, 18 (4):47-57.
26. Lehoczky, J., Farkas, G. (1981): A szőlő látens foltosságának előfordulása Magyarországon. *Kertgazdaság*, 13(1):15-25.
27. Little, A. and Rezaian, M.A. (2006): Improved detection of grapevine leafroll-associated virus 1 by magnetic capture hybridisation RT-PCR on a conserved region of viral RNA. *Arch. Virol.* 151: 753-761.
28. Lucas, W.J. (2006): Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, 344:169-184.
29. Malagnini, V., de Lillo, E., Saldarelli, P., Beber, R., Duso, C., Raiola, A., Zanutelli, L., Valenzano, D., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Ratti, C., Causin, R., Gualandri, V. (2016): Transmission of Grapevine Pinot Gris virus by *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) to grapevine. *Archives of Virology*, 161(9):2595-2599.
30. Martelli, G.P. (1993): Graft Transmissible Diseases of Grapevines, FAO Editions, Rome
31. Martelli, G.P. (2014): Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96 (1 Supplement): 1-136.
32. Martelli, G.P., Quaquarelli, A., Lehoczky, J., Sárospataki, Gy. (1967): A disorder resembling „legno riccio” (rugose wood) of grapevine in Hungary. *Phytopath. Mediterr.*, 6: 110-112.
33. Martelli, G.P., Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Saldarelli, P. (2002): Maculavirus, a new genus of plant viruses. *Arch. Virol.*, 147: 1847-1853.

34. Mayo, M.A., Robinson, D.J. (1996): Nepoviruses: Molecular biology and replication. In the plant viruses: Polyhedral virions and bipartite RNA genomes, ed. B.D. Harrison and A.F. Murrant, vol. 5, 139-185. New York: Plenum Press.
35. Minafra, A., Saldarelli, P. and Martelli, G. P. (1997): Grapevine virus A: nucleotide sequence, genome organization, and relationship in the Trichovirus genus. *Arch. Virol.* 142: 417-423.
36. Nakaune, R., Inoue, K., Nasu, H., Kakogawa, K., Nitta, H., Imada, J., Nakano, M. (2008): Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of Rupestris stem pitting-associated virus. *J. Gen. Plant pathol.*, 74: 156-163.
37. Niehl, A., Heinlein, M. (2011): Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma*, 248 (1): 75-99.
38. Panjan, M. Saric, A. (1963): Seroloska dijagnostika Arabis mozaik virusa iz vinove loze I tresnje gel-difuzinom metodom. *Agronomski Glasnik* 3: 204-206.
39. Pocsai E. (2016): A csonthéjas gyümölcsfák vírus-és vírusszerű betegségei (1.)-Agrárágazat, (17.) Szőlő és gyümölcstvetvények különszám, 72-74.
40. Rezaian, M.A., Koltunow, A.M., Krake, L.R. (1988): Isolation of three viroids and a circular RNA from grapevines. *Journal of General Virology*, 69: 413-422.
41. Roossinck, M.J. Ann. (1997): Mechanisms of plant virus evolution. *Rev. Phytopathol.* 35: 191-209.
42. Sabanadzovic, S., Ghanem-Sabanadzovic, N.A., Gorbalenya, AE. (2009): Permutation of the active site of putative RNA-dependent RNA polymerase in newly identified species of plant alpha-like virus. *Virology*, 394(1): 1-7.
43. Sabella E., Pierro R., Luvisi A., Panattoni A., D'Onofrio C., Scalabrelli G., Nutricati, E., Aprile, A., Luigi De Bellis, Materazzi, A. (2018): Phylogenetic analysis of viruses in Tuscan Vitis vinifera sylvestris (Gmel.) Hegi. *PLoS ONE* 13(7): e0200875
44. Saldarelli, P., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Malossini, U., Pirolo, C., Bianchedi, P., Gualandri, V. (2015): Genetic Variability of Grapevine Pinot gris virus and Its Association with Grapevine Leaf Mottling and Deformation. *Phytopathology* 105(4), 555-563.
45. Sano, T., Uyeda, I., Shikata, E. (1985): A viroid like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. *Journal of General Virology*, 66: 333-338.
46. Sárospataki Gy. (1964): A szőlő-vírusbetegségek hazai vizsgálata. Kísérleti közlemények 57/C. 63-80.
47. Sastry, K. S. (2012): Mechanism of Seed Transmission. *Seed-Borne Plant Virus Diseases*, 85-100. doi:10.1007/978-81-322-0813-6_5
48. Woodham, R.C., Krake, L.R. (1983): Investigations on transmission of grapevine leafroll, yellow speckle and fleck diseases by dodder. *Journal of Phytopathology*, 106: 193-198

Internetes hivatkozások:

Armijo, G., Schlechter, R., Agurto, M., Muñoz, D., Nuñez, C., Arce-Johnson, P. (2016): Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066032>

Pallas V. & García JA. (2011): How do plant viruses induce diseases? Interactions and interference with host components <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900418>

- http1: <http://www.virology.ws/2013/09/06/how-many-viruses-on-earth/> (2018. jún.)
- http2: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases (2020. március)
- http3: https://viralzone.expasy.org/34?outline=all_by_species (2018. jún.)
- http4: <https://gd.eppo.int/taxon/ARMV00/photos> (2018. jún.)
- http5: <https://agraragazat.hu/hir/szolo-fontosabb-virusos-es-fitoplazmas-betegsegei> (2018. jún.)
- http6: <https://agraragazat.hu/hir/szolo-fontosabb-virusos-es-fitoplazmas-betegsegei> (2018. jún.)
- http7: <https://agraragazat.hu/hir/szolo-fontosabb-virusos-es-fitoplazmas-betegsegei> (2018. jún.)

9. NYILATKOZAT

Alulírott _____, 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 diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Kar / Intézet / Tanszék honlapjára. A digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető intézetben / tanszéken, illetve a 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

szakfelelős aláírása