

DIPLOMADOLGOZAT

Csabai Orsolya
Növényorvos szak

Gödöllő
2022



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Növényorvos Szak

Vírusdiagnosztikai vizsgálatok selyemkóróban (*Asclepias syriaca*)

Konzulensek:

Dr. Bán Rita

egyetemi docens

Dr. Várallyay Éva

tudományos tanácsadó

Nagyné Dr. Galbács Zsuzsanna

tudományos munkatárs

Készítette:

Csabai Orsolya

LN8TPP

nappali tagozat

Tanszék:

Növényvédelmi Intézet

Integrált Növényvédelmi Tanszék

Gödöllő

2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1.Bevezetés és célkitűzések.....	6
2. Szakirodalmi áttekintés	7
2.1.Növényi vírusok.....	7
2.1.1. Növényi vírusok általános jellemzése	7
2.1.2. Vírusok morfológiája	8
2.1.3. A vírusok reprodukciója.....	9
2.1.4. A vírusok terjedése.....	9
2.2.Uborka mozaik vírus (CMV).....	12
2.2.1. Általános áttekintés	12
2.2.2. CMV okozta tünetek	12
2.2.3. Vírus terjedése.....	13
2.2.4. CMV vírus genom felépítése.....	14
2.3. A viroidok.....	15
2.3.1. Viroidokról általánosan	15
2.3.2. Komló törpülés viroid (hop stunt viroid – HSVd)	16
2.4. Szőlő Pinot gris vírus (Grapevine Pinot gris virus- GPGV).....	17
2.5. Selyemkóró (<i>Asclepias syriaca</i>)	18
2.5.1. Selyemkóró (<i>Asclepias syriaca</i>) származása, elterjedése	18
2.5.2. Selyemkóró (<i>Asclepias syriaca</i>) jellegzetességei.....	19
2.6. Újgenerációs szekvenálás	20
3. A vizsgálatok módszerei.....	21
3.1. Mintavétel	21
3.2.Totál nukleinsav tisztítás	21
3.3.Kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése.....	22
3.4.Molekuláris diagnosztika.....	24
3.4.1. cDNS szintézis	25
3.4.2. Gradiens PCR Q5 enzimmel, HSVd és CMV primerekkel	26
3.4.3. RT- PCR amplifikálás	27
3.4.4. PCR termék tisztítása	31
3.5. Klónozás	32
3.6.Plazmid tisztítása	34

3.7. Tisztított plazmidok restrikciós emésztése	35
3.8. Primer tervezés	35
3.8.1. CMV RNS 1	36
3.8.2. CMV RNS 2	36
3.8.3. CMV RNS 3	37
3.9. Gradiens PCR Q5 enzimmel CMV primer kombinációkkal	38
4. Eredmények és értékelésük	40
4.1. Kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése	40
4.2. HSVd és CMV primerekkel anellálási hőmérsékletének optimalizálása gradiens PCR-rel, Q5 enzim esetén	45
4.3. RT-PCR amplifikálás	46
4.3.1. HSVd RT-PCR amplifikálás	46
4.3.2. GPGV RT-PCR amplifikálása	47
4.3.3. CMV RT-PCR amplifikálása	48
4.4. PCR termék tisztítása	49
4.5. HSVd klónozása	50
4.6. Gradiens PCR Q5 enzimmel CMV primer kombinációkkal	50
4.6.1 CMV RNS 1	50
4.6.2. CMV RNS 2	51
4.6.3. CMV RNS3	51
4.7. Plazmid tisztítás	52
4.8. Restrikciós emésztés	53
4.9. Szekvencia elemzés	53
4.9.1. CMV RNS 1	53
4.9.2. CMV RNS2	54
4.9.3. CMV RNS3	55
4.9.4. HSVd	56
5. Következtetések és javaslatok	59
6. Összefoglalás	60
Irodalomjegyzék	62
Köszönetnyilvánítás	65

Rövidítések jegyzéke

BRRV - áfonya vörös gyűrűsfoltosság vírus (*Blueberry red ringspot virus*)
BWYV - *Beet western yellows polerovirus*
BYV - *Beet yellows closterovirus*
CCR - központi konzervált régió (Central conserved region)
CMV - uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*)
CP - köpeny fehérje (Coat protein)
DBALV - dioscorea bacilus alakú vírus (*Dioscorea bacilliform AL virus*)
EB - extrakciós puffer
FDE - xilene cianol, brómfenolkék, EDTA és deionizált formamid tartalmú festék
GINV - *Grapevine berry inner necrosis virus*
GPGV - szőlő Pinot gris vírus (*Grapevine Pinot gris virus*)
HSVd - komló törpülés vírus (*Hop stunt viroid*)
HTS - high-throughput sequencing
LB - luria-Bertani táptalaj
MMV - *Maize mosaic nucleorhabdovirus*
MP - mozgási fehérje (movement protein)
NGS - next generation sequencing
PLRV - burgonya levélsodródás vírus (*Potato leafroll virus*)
PSTV - *Potato Spindle Tuber Viroid*
PVCV - petúnia érkivilágosodás vírus (*Petunia vein clearing virus*)
RT - reverse transcriptase
SDS - sodium (nátrium) – dodecil-szulfát
SOC - super optimal broth with catabolite repression
SPCSV - édesburgonya klorotikus satnyulás vírus (*Sweet potato chlorotic stunt virus*)
SVBV - levélér sárgulás vírus (*Strawberry vein banding virus*)
TaBCHV - taró bacilus alakú vírus (*Taro bacilliform CH virus*)
TBE - tris/borate/EDTA
TCH - terminális konzervált hajtú (Terminal conserved hairpin)
TCR - terminális konzervált régió (Terminal conserved region)
TMV - dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*)

TSWV - paradicsom bronzfoltosság vírus (Tomato spotted wilt virus)

UTR - untranslated region

Contig - az átfedő szekvenciákat tartalmazó kis RNS olvasatok összeépítése hosszabb olvasatokká

1.Bevezetés és célkitűzések

A folyamatosan változó, globalizálódó agráriumban, főként a növényi szaporítóanyagok kereskedelme miatt új vírusok jelenthetnek meg, és emellett a vírusok genetikai variabilitása miatt az ismert vírusok újabb izolátumai jelenhetnek meg. A megjelenő új patogének a meglévő, jól működő mezőgazdasági modellekre nagy hatással vannak. Világszerte az élelmiszer ellátást leggyakrabban befolyásoló megbetegedések virális eredetűek, és a becsült gazdasági jelentőségük éves szinten 30 milliárd dollár. Továbbá, a vírusos megbetegedések okozta veszteségek egyes esetekben jól bizonyítottak, más esetekben pedig kevésbé, tehát sokszor nagyon alábecsüljük őket (Trebecki 2020). Fontos, hogy ezen, már napjainkban is zajló fordulatokra, nagymértékű változásokra szakmailag felkészüljünk.

A növényvédelemben egyre nagyobb figyelmet kapnak a mikroszkópikus méretű patogén szervezetek, mint a vírusok és fitoplazmák, melyek előfordulását a globalizáción kívül a klímaváltozás is megváltoztathatja. Az éghajlatváltozás optimális feltételeket nyújthat a vektorszervezeteknek, melyek a vírusok legismertebb terjesztői. Napjainkban folyamatosan jelennek meg eddig ismeretlen, vírushordozottságra utaló gazdasági problémák. A vírusok vizsgálata nehéz, kis méretük, dinamikusan változó genetikai információjuk és a változatos, sokszínű tünetek miatt. Az újgenerációs szekvenálás (High-Throughput Sequencing -HTS) megjelenésével és rohamos fejlődésével azonban még szélesebb tárház áll a rendelkezésünkre, hogy könnyebben és gyorsabban tudjunk detektálni még új, és számunkra ismeretlen kórokozókat. Míg a hagyományos diagnosztikai módszereknél (pl. szerológiai vizsgálat-ELISA, PCR alapú vizsgálat) szükség van a kórokozó előzetes ismeretére, addig a HTS technológiánál lehetőségünk van teljesen ismeretlen vírusok azonosítására is kis RNS-ek szekvenálásával és bioinformatikai elemzésekkel (Boonham et al. 2014).

Vizsgálataim során a HTS technológia alkalmazásával szerettem volna feltérképezni a kultúrnövények szomszédságában élő gyomnövények, esetemben a selyemkóró (*Asclepias syriaca*) vírus fertőzöttségét és megállapítani, hogy lehet-e szerepe, mint vírus rezervoár. Munkám során, két különböző helyről származó selyemkóró mintát elemeztem. Az egyik esetben a minták Mogyoródról származtak, egy szőlőültetvény mellől, a másik esetben pedig Keszthelyről egy gabonábla szomszédságából. Munkám során mindkét helyről származó minta kisRNS HTS adatait elemeztem, azonban a bioinformatikai módszerekkel azonosított vírusok jelenlétének visszaigazolását csak a mogyoródi mintákból származó végeztem el.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1.Növényi vírusok

2.1.1. Növényi vírusok általános jellemzése

Az évezredek során sok olyan megbetegedést írtak, le, melyek később vírus eredetűnek bizonyultak, azonban az első nagy áttörést a növényi vírusok felfedezésének irányában a dohánynövények mozaikos, és torzulásos tünetekkel járó megbetegedése jelentette. A betegség leírásában úttörőknek bizonyult Martinus Beijerinck, Adolf Mayer és Dmitrii Iwanowski munkássága, akik a 19. század folyamán egymástól függetlenül kezdték el a különös kór folyamat kutatását. A betegségnek később a dohány mozaik vírus nevét (TMV) adták, és ez lett az első hivatalosan leírt növényi vírus (Zaitlin 1998). A jelenlegi becslések szerint a felfedezett vírusok száma megközelíti a 4000-et. Ebből körülbelül 1000 az növényi vírus, és ezek száma folyamatosan csak növekszik. A növényi vírusok tanulmányozása nagyon fontos ahhoz, hogy őket megismerve elkerüljük, vagy legalább minimalizáljuk, az általuk a gazdasági növényeken okozott, igen súlyos gazdasági károkat ([http8](http://8)). A napjainkban uralkodó világkereskedelem kedvező feltételeket nyújt a vírusok terjedéséhez, valamint az éghajlat változás is hozzájárul a vírusok és vektoraik elszaporodásához (Jones 2009).

A vírusok fertőző kórokozók, melyek mérete a nanométeres tartományba tartozik, fénymikroszkóppal láthatatlanok. Az összes ismert élőlény közül a legkisebbek, kisebbek, mint a sejtek, megfigyelésükhöz elektronmikroszkópra van szükségünk. A gömb alakú növényi vírusok tipikus átmérője 30 nm, néhány fonalas vírus pedig elérheti akár a 2000 nm-t vagy 2 μ m-t, míg egy tipikus levél mezofillum sejt 50 μ m.

Minden vírus egy fertőzőképes obligált sejtparazita, mely reprodukciója rá van utalva a gazdaszervezet sejtjeinek anyagcserefolyamataira. Fennmaradásuk érdekében, reprodukciójuk során a gazdasejt nukleinsav és fehérje szintetizáló rendszerét használják fel. A vírusokat nem lehet tápközegben nevelni, amiben például egy gomba, baktérium, növényi vagy állati sejt minden gond nélkül fenntartható. A sejten kívül örökítőanyaguk a lebontó mechanizmusok számára nem hozzáférhető fehérjeburokba csomagolódik, az ilyen vírus egységeket nevezzük virionoknak (Horváth és Gáborjányi 1999; [http8](http://8)).

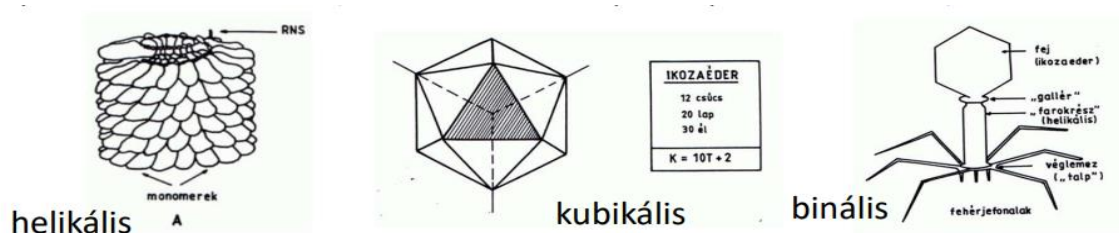
A legtöbb vírus csak egy bizonyos típusú gazdát tud megfertőzni, mégis minden élő szervezet az állatok, a növények, gombák és a baktériumok is alkalmasak arra, hogy vírusok gazdája legyen. A növényi vírusok általában széles gazdanövény spektrummal rendelkeznek, azonban akadnak közöttük fajspecifikusak is. Az eddig vizsgált növényi vírusok nem képesek állatok

fertőzésére, így ártalmatlanok az emberekre (Horváth és Gáborjányi 1999; Dimmock et al. 2007; <http8>).

2.1.2. Vírusok morfológiája

A vírusok olyan obligát paraziták, melyek egy fehérje burokból és kódoló nukleinsavból állnak (Bálint 2006; Cann 2016).

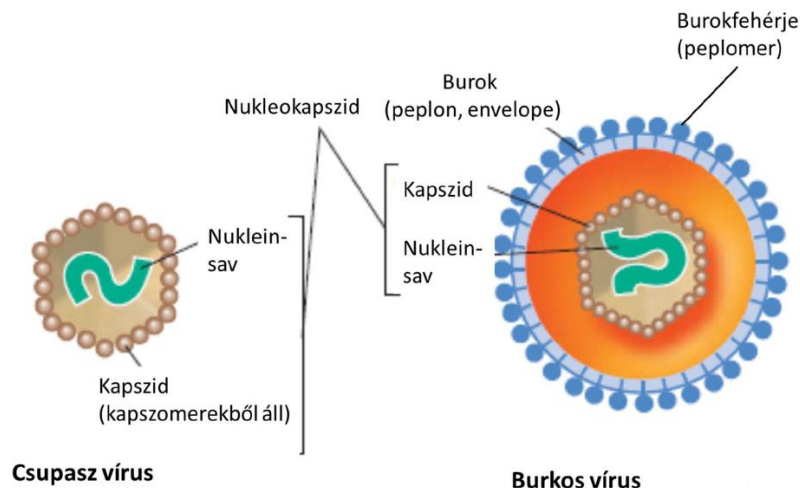
Morfológiájukat tekintve igen változatosak lehetnek (1. ábra). Léteznek helikális, kubikális (vagy ikozahedrális), és más, ezen szerkezetek közé nem besorolható binális alakúak is. Legtöbb vírus helikális szerkezetű.



1. ábra: A virionok morfológiája (<http2>)

A vírusok örökítőanyaga: genomja lehet RNS, vagy DNS. Az RNS genom lehet lineáris vagy cirkuláris, egyszálú (single stranded- ss) RNS vagy kétszálú (double stranded- ds) RNS. A DNS genom is lehet lineáris vagy cirkuláris és egyszálú ssDNS vagy kétszálú dsDNS. A növényi vírusok döntő többsége RNS genommal rendelkezik.

A kapszid a vírus külső fehérjeburka, mely a genomját veszi körbe és a nukleinsav védelmét biztosítja. A nukleokapszid körül további burok is létrejöhet, azonban ilyennel nem rendelkezik minden vírus. A burok foszfolipid membránból, szerkezeti fehérjéből és glikoproteinekből épülhet fel. A vírusok felépítését a (2. ábra) szemlélteti. Azok a vírusokat, amelyek nem rendelkeznek burokkal csupasz vírusoknak vagy burok nélküli vírusoknak nevezzük, és ilyen például a dohány mozaik vírus (TMV). Azok a vírusok, amelyek rendelkeznek burokkal, azokat burkos vírusoknak nevezzük. Ilyen típusú vírus a paradicsom bronzfoltosság vírus (TSWV) (Horváth és Gáborjányi 1999; Hull 2002; <http2>). A vírusok megfelelő működésükhöz háromféle fehérjét kell kódolniuk: a köpeny fehérjét (coat protein (CP)), a replikációhoz szükséges polimerázokat és a mozgáshoz szükséges fehérjéket (movement protein (MP)) (Cann 2016).



2. ábra: Vírusok felépítése (http2)

2.1.3. A vírusok reprodukciója

A vírusok önmagukban képtelenek a replikációra, mind a lebontó, mind a felépítő folyamataikhoz a gazdaszervezetre szorulnak. A gazdasejtekben replikálódnak, szintetizálódnak a fehérjéik (Bálint 2006; Virányi 2010; Cann 2016).

A vírusok a sejtek átprogramozásával érik el, hogy azok előállítsák virionjaik építőelemeit. Sikeres vírusfertőzés esetén 6 szakaszt különböztetünk meg egymástól. A megtapadást (adszorpciót), penetrációt, dekapszidálódást, az eklipszis fázisát, érés-összerendeződés folyamatát, és a kijutás-összerendeződés folyamatát (http2). A gazdasejtek nemcsak aminosavakkal, nukleotidokkal látják el a vírusokat, hanem a polimerizációhoz szükséges energiát, tRNS-eket, riboszómákat, enzimeket is szolgáltatnak nekik. A DNS vírusok például a penetráció után sok esetben a sejtek DNS függő RNS polimerázait használják, hogy DNS-üket átírassák RNS-re (Hull 2002).

2.1.4. A vírusok terjedése

A növényi vírusok képtelenek arra, hogy áthatoljanak a növényi kutikulán, ezért is általában sebzéseken keresztül jutnak be a sejtekbe. Esetenként generatív módon maggal és pollennel is fertőzhetnek. Ha viszont megfertőztek egy adott gazdanövényt, vegetatív módon, például fertőzött szaporítóanyaggal (pl. rizóma, hagyma, dugvány, gumó), oltással és metszéssel is a fertőzött anyanövényről a fertőzés átjut a szaporítóanyagba.

A maggal történő fertőzés során sok vírus esetében még nem tudjuk, hogy a terjedés a magban vagy a magházban meghúzódva történik-e (Stevens 1983; Horváth és Gáborjányi 1999; Sastry 2013; [http8](#)).

A vegetatív fertőzés mellett igen fontos megemlíteni a vektorokkal történő fertőzést. A legfontosabb vírusvektorok a növényeken táplálkozó ízeltlábúak (pl. levéltetvek, liszteskék, poloskák, tripszek), fonálférgek, arankák (*Cuscuta* spp.), és a növényeket parazitáló gombák. Néhány talajlakó gomba is képes vírusok átvitelére, például a *Polymyxa betae*, az *Olpidium brassicae* vagy a *Spongospora* fajok. A vírusok a legtöbb esetben vektor specifikitást mutatnak, vagyis nem képesek többféle vektorral terjedni (Campbell 1996; Horváth és Gáborjányi 1999; [http8](#)).

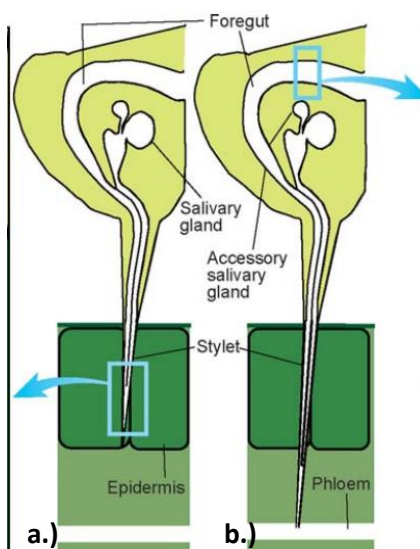
A vírusok vektorok általi terjedése három féle úton lehetséges: perzisztens, szemiperzisztens és nem perzisztens úton.

Azok a vektorok, melyek nem perzisztens módon terjesztik a vírusokat, képesek szinte azonnal felvenni a vírus részecskéket, melyek az epidermisz sejtekben találhatóak. A vírusok akár egy próbaszívás alkalmával is megtapadhatnak a vektorok száj szervén, majd ezt képesek szinte azonnal le is adni, ugyanis ebben az esetben nincs inkubációs idő. Azonban e vektorok nem képesek sokáig megőrizni a fertőzőképességüket. Ebbe a csoportba tartozik a levéltetvek által terjesztett vírusok többsége, amelyek közül számos gazdasági jelentőséggel bír. A nem perzisztens vírusok általánosságban mechanikailag is átvihetők (Day és Irzykiewicz 1954; Ng és Falk 2006).

A perzisztens módon való terjedés esetében a vektorok a vírusokat a növények mélyebb rétegeiből, vagyis a floémből veszik fel. E módon való terjedés során a vektorok nem képesek egyetlen próbaszívás során felvenni a vírust, ehhez hosszabb ideig tartó táplálkozásra van szükség (pár óra). Ebben az esetben felvétel után a vírus képes bejutni az állat hemolymphájába (nyálmirigyeibe), és hosszú inkubációs idő jellemzi, amely lehet néhány óra vagy néhány nap, továbbá a vektor képes sokáig megőrizni a fertőzőképességét. A perzisztens módon való terjedés történhet cirkulatív és propagatív módon is. Mindkét esetben a vektorok egy életen át megőrzik fertőzőképességüket. A cirkulatív módon történő terjedés esetében a felvétel pár órát vesz igénybe, illetve a látens szakasz is beletelhet néhány órába. Cirkulatív módon képes terjedni pl. a *Beet western yellows polerovirus* (BWYV). A propagatív terjedés esetében a vírusok képesek replikálódni a vektorok szervezetében, továbbá képesek átadni a fertőzést az utódaiknak is. A felvétel néhány órát vesz igénybe, azonban a látens időszak eltarthat néhány naptól- néhány hétig is. Propagatív módon képes terjedni pl. a *Maize mosaic*

nucleorhabdovirus (MMV). A perzisztens és a nem perzisztens terjedést a (3. ábra) szemlélteti.

A szemiperzisztens módon terjedő vírusokat a vektorok hosszabb próbaszívások során képesek felvenni, azonban itt nincs inkubációs idő és azonnal képesek leadni azt. A vírusok megtartására órákig vagy napokig is képesek, illetve ezek a vírusok mechanikailag nehezen terjednek. Ebbe a csoportba tartozik a *Beet yellows closterovirus* (BYV) (Ng és Falk 2006).



3. ábra: a.) nem perzisztens módon való vírus felvétel, epidermisz sejtéből

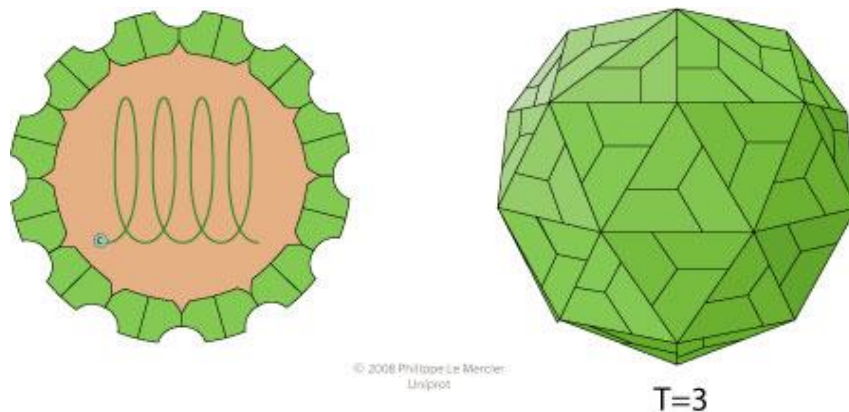
b.) perzisztens módon való vírus felvétel floémből (Ng és Falk 2006)

A vírusok növénybeli terjedése szempontjából két mechanizmust különíthetünk el. Az egyik a lokális terjedés, mely során sejt-sejt közötti mozgásról beszélünk, és ez általában a plazmodezmákon keresztül valósul meg. Ez egy aktív folyamat, mivel ehhez a terjedéshez a plazmodezmák, a vírus és a sejt adott komponenseinek közreműködésére is szükség van. A hosszabb távú mozgás, a szisztémikus terjedés, mely a gazdanövény szállítóedénynyalábjában zajlik. Ez egy passzív folyamatnak, mert a terjedés a fotoszintetikus termékek áramlásával együtt megy végbe a floémbe. A sejtről-sejtre terjedést segíti a mozgási fehérje (MP), azzal, hogy a plazmodezmák közötti interakciót teszi lehetővé. A plazmodezma fehérjéihez kapcsolódva megnöveli azok áteresztőképességet, és ezáltal fizikailag teszi lehetővé a vírusok sejtek közötti átjutását (Tzfira et al. 2000; Kucsera és Kevei 2010).

2.2. Uborka mozaik vírus (CMV)

2.2.1. Általános áttekintés

Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) a Bromoviridae családba, azon belül is a Cucumovirus nemzetségbe tartozik. Burok nélküli, ikozaéder alakú növényi vírus, körülbelül 28-30 nm-es átmérővel (4. ábra).



4. ábra: Uborka mozaik vírus virionja (<http1>)

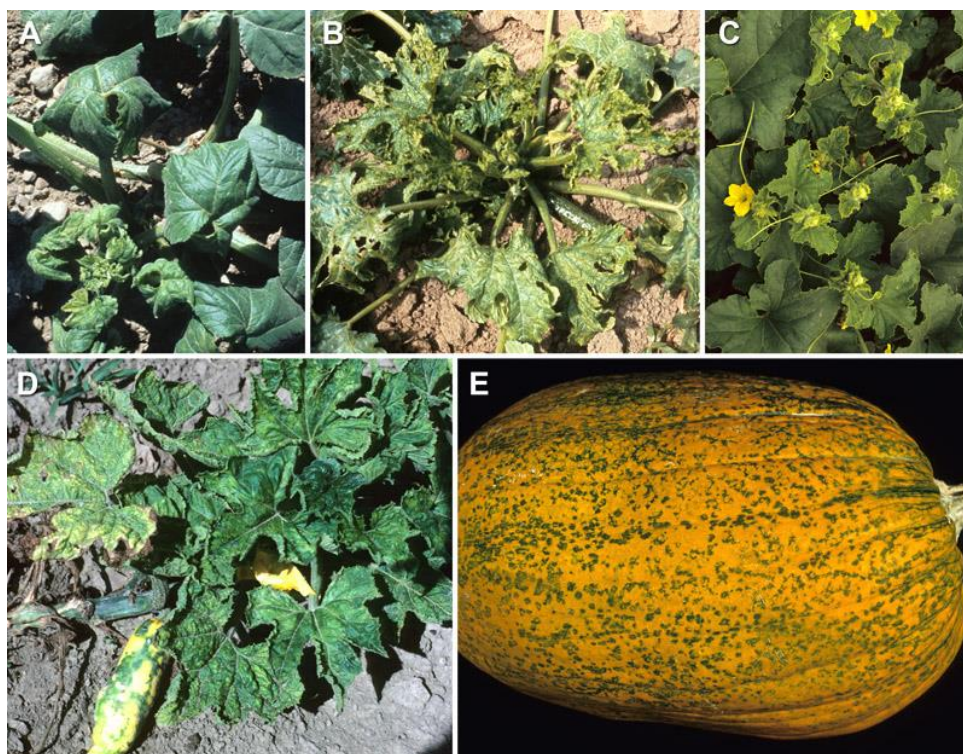
A CMV vírusos megbetegedések felfedezése 100 évre nyúlik vissza. Két tudós, Doolittle Michigan-ben Jagger pedig New York-ban egyidejűleg észlelte az első CMV okozta tüneteket uborka növényeken és más tökféléken. Azóta a CMV vírusok jelenlétét már több mint 100 különböző egyszikű és kétszikű növény család, sokféle zöldség, dísnövény, lágyszárú és fás szárú növény kb. 1200 faján írták le (Mochizuki és Ohki 2012).

Ma már tudjuk, hogy egy világszerte megjelenő nagyon jelentős vírusról van szó, mely mérsékelt és trópusi éghajlatokon is egyaránt előfordul. Jelentős gazdasági károkat képes okozni, mind kertészeti, mind szántóföldi kultúrákban. Számos gazdanövényében szisztémás tüneteket okoz, azonban előfordulnak olyan termények is, melyekben tünetmentesen fertőz. A CMV tünetek különfélék lehetnek, attól függően, hogy milyen növényt fertőznek, illetve, hogy az adott növény milyen vegetációs periódusban van (<http7>).

2.2.2. CMV okozta tünetek

A betegség okozta tünetek nagyon változatosak (5. ábra). A CMV dinnye és uborka leveleken tipikus mozaikosodás tüneteket mutat, valamint a növények satnyasága, törpülése is bekövetkezik, amit gyümölcs hozam csökkenés követ. A tünetek kialakulása függ a gazdanövény és a CMV törzsek specitásától is. Mozaikosodás és márványos tünetek a gyümölcsökön is megfigyelhetők. A CMV fertőzés után pár napon belül uborka kultúrában

hirtelen bekövetkező hervadás is kialakulhat (Lecoq és Desbiez 2012; Mochizuki és Ohki 2012).



5. ábra: Uborka mozaik vírus tünetei (<http7>)

A: A szezon elején CMV hatására bekövetkező levélhervadás és lombcsökkenés tüneteinek szemléltetése; B: a fertőzött Cukkíni növények satnya növekedése, és levéldeformáció láthatóak; C: Sárgadinnye növényen a hajtáscsúcs satnyulását mutatja be az ábra; D: Sárga sütőtök termésen zöld foltos mintázottság kialakulása látható; E: Tökön a CMV fertőzés a termésen foltos mintázottságot mutat

2.2.3. Vírus terjedése

A természetben legalább 75 levéltetű faj képes a CMV átvitelére nem perzisztens módon, de a CMV-t közvetíthetik Aranka fajok (*Cuscuta spp.*), illetve néhány esetben növényi magvakkal is terjedhet (Mochizuki és Ohki 2012). Igen jelentős vírusvektornak számít a zöld őszibarack levéltetű (*Myzus persicae*) és az uborka – levéltetű (*Aphis gossypii*), melyek szintén nem perzisztens módon stylet-borne módszerrel tudják közvetíteni a CMV-t. A nem perzisztens átvitel lehetővé teszi a vírus vektorok számára a vírus felvételét akár próbaszívások által, melyek igen rövid idő alatt lezajlanak (kb. kevesebb, mint 60 másodperc). A vírust hordozó

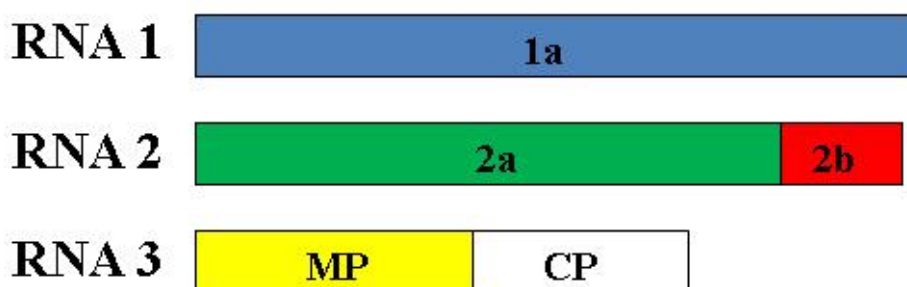
vektorok nem képesek sokáig a vírus megtartására, általában egy következő táplálkozás alkalmával már el is veszítik azt (http 7).

Mivel a vírus nagyon széles gazdanövény spektrummal rendelkezik, számos gyomnövény szolgálhat CMV vírusrezervoárként. A gyomok elősegíthetik a vírus terjedéséhez. Számos évelő, kétnyári, és egyéves növény gyökere, gumója és más földalatti képződményei menedékként szolgálhatnak a tél során a CMV-nek, amely a gyomnövényekben gyakran nem okoz tüneteket (http7).

2.2.4. CMV vírus genom felépítése

Különböző CMV vírus törzsek léteznek, melyek a biológiai sajátosságokban térhetnek el egymástól. Ilyen sajátosságok például a szerológia, gazdanövénykör, virulencia, rezisztencia indukálása, és a levéltetű átvitel. A CMV törzseket három alcsoportra (IA, IB és II) osztották fel, amihez a genomi RNS3 5' (UTR) régióját vették alapul. Az I alcsoport törzsei változatos tüneteket okozhatnak, mozaikosodást, satnyulást, míg a II alcsoport törzsei nagyon enyhe tüneteket váltanak ki, vagy a fertőzött növények teljesen tünetmentesek (Mochizuki és Ohki 2012).

A CMV genom 3 egyszálú (single stranded) RNS-t tartalmaz (6. ábra). Ezek az ssRNS1 (~3,350 nukleotid), ssRNS2 (~3,050 nukleotid) , és ssRNS3 (~2,200 nukleotid). Minden érett CMV három szférikus partikulumból áll, mivel az RNS molekuláit külön álló fehérje burkok védik, így 3 elkülöníthető gömbölyű részecskéről beszélhetünk. Megemlítendő továbbá, hogy az RNS 3 tartalmaz egy RNS 4 szálát is, mely (~1,030 nukleotid) nagyságú, és amely a köpenyfehérje gént kódolja (http7).



6. ábra: A CMV vírus három genomi egyszálú RNS-t tartalmaz, melyeket az RNS 1, RNS2 és RNS 3 jelölés szemléltet. Az ábrán továbbá feltüntettem a genomi RNS-ek által kódolt fehérjék elnevezéseit is (http 7)

Az RNS 1 egyetlen egy fehérjét kódol, amit 1a fehérjének nevezünk. A vírus genom replikációjában játszik fontos szerepet.

Az RNS 2 két fehérjét kódol, melyek a 2a és 2b fehérjék. A 2a fehérjének a vírus replikációban van szerepe, mivel RNS függő RNS polimerázként működik együtt az 1a fehérjével. A 2b fehérjének szerepe a poszttranszkripcionális géncsendesítésben van, ami a növény védekezési mechanizmusa. A 2b fehérje gátolja a növény géncsendesítési rendszerét, így lehetővé teszi a vírus számára, hogy megfertőzze a fiatal fejlődő szöveteket is.

Az RNS 3 szintén két fehérjét kódol, a 3a fehérjét és köpeny fehérjét. A 3a fehérje fontos szerepet játszik a vírus sejtek közötti vándorlásában, azáltal, hogy megköti, akadályozza, és elmeszti az F-aktint, ami bizonyítottan elengedhetetlen a plazmodezmák méretének növeléséhez. A köpenyfehérje amellet, hogy a vírus köpenyt formálja, segíti a viriont, a növényben a sejtek közötti és a hosszú távú mozgásban, valamint a levéltetű átvitelben is segítséget nyújt.

A CMV törzsek néhány esetben szatellit (sat) RNS-eket is tartalmaznak, melyek nem kódoló, kis, lineáris RNS-ek. A szatellit RNS-ek terjedése és replikációja a növényben teljesen a CMV-re támaszkodik, ebből kifolyólag a CMV-t helper (segítő) vírusnak is nevezik. A szatellit RNS úgy tud terjedni levéltetvek segítségével, hogy a CMV-be kapszidálódik, és így képes vele együtt növényről növényre eljutni. A satRNS általában hozzájárul a CMV tünetek módosításához, azáltal, hogy felerősíti vagy gyengíti őket (Mochizuki és Ohki 2012; <http://>).

2.3. A viroidok

2.3.1. Viroidokról általánosan

A 20. század elején gazdaságilag jelentős növényeken figyelték meg a viroidok által okozott tüneteket, azonban a vírusokkal való hasonlóságuk miatt, azt hitték róluk, hogy növényi vírusok. A viroidok a természetben a legkisebb patogének, kis 246-401 nukleotidból álló, nem kódoló, önálló replikációra képes cirkuláris RNS-ek, amelyek csak magasabb rendű növényeket képesek megfertőzni. Számos növényt képesek megbetegíteni, gazdasági károkat és gyümölcs minőségbeli romlásokat okozva azokon. A viroidok a Pospiviroidae és az Avsunviroidae családba tartoznak, aszerint, hogy a sejtmagban, vagy a kloroplasztisban replikálódnak. A viroidok abban különböznek a vírusoktól, hogy nem kódolnak fehérjét, de olyan katalitikus RNS-ek, melyek önmaguk replikálására képesek. A viroidok speciális RNS szerkezetet vesznek fel, központi konzervált régióval (central conserved region (CCR)),

terminális konzervált régióval (terminal conserved region (TCR)), vagy egy terminális konzervált hajtű (terminal conserved hairpin (TCH)) alakú régióval rendelkeznek.

Az első ténylegesen leírt viroid a burgonyában található *Potato spindle tuber viroid* (PSTV) volt, melyről szintén sokáig azt hitték, hogy vírusos megbetegedés. Diener és Raymer bizonyították először, hogy a kórokozó egy szabad fehérjeburok nélküli RNS genomból áll, és hogy a hagyományos vírus részecskék nincsenek jelen a fertőzött növényben. A viroidok kapcsán felmerülő molekuláris biológiai, és fizikai tulajdonságú kérdéseket a PSTV –on vizsgálták, mely a Pospiviridae családba tartozik (Riesner és Gross 1985; Flores et al. 2004; Flores et al. 2012; Jo et al. 2017; Marquez-Molins et al. 2020).

2.3.2. Komló törpülés viroid (hop stunt viroid – HSVd)

A HSVd, a Pospiviroidae családon belül a Hostuviroid nemzetségbe tartozik, és a sejtmagban replikálódik egy úgynevezett aszimmetrikus „rolling-circle” mechanizmus szerint. A HSVd egy egyszálú, cirkuláris, 295-303 nukleotidból álló RNS molekula. Világszerte elterjedt, számos természetes gazdanövénnyel rendelkezik. Gazdanövényei lehetnek a Moraceae félék (eperfa, füge), Rosaceae-félék (mandula, alma, körte, szilva stb.), Anacardiaceae-félék (pisztácia), Malvaceae-félék (kínai hibiszkusz) és a Rutaceae-félék (Citrus fajták) is. A HSVd a legtöbb gazdanövénnyen tünetmentes, azonban néhány esetben különböző tüneteket is produkálhat. Öt különböző betegség kialakulásáért is a HSVd-t okolják, ilyen lehet például a citrus cachexia; a cucumber pale fruit; az őszibarack, szilva, alma, kajsziarck torzulások; és a komló satnyulás. A HSVd terjedhet maggal és mechanikai átvitelrel is egyaránt (Ohno et al. 1983; Sano 2013; Marquez-Molins et al. 2020).

A citrusokat fertőző HSVd-k esetében két variáns is létezik, az egyik az arra hajlamos növényeken képes károkat okozni a másik pedig nem. A tünetek jelentkezhetnek elszíntelenedés, kéreg felhasadás, szár hámlás, klorotikus és satnya növekedés tekintetében egyaránt (Hataya et al. 2017; Marquez-Molins et al. 2020; Stackhouse et al. 2021).

A HSVd- t először közönséges komló növényekben (*Humulus lupulus*) fedezték fel, ahol a tőkék törpülését okozta. A komoly gazdasági károkat okozó betegséget Japánban írták le 1940-1950 között, majd az 1970- es évekre a komlós kertek 10-20 %-át megfertőzte. A satnyaságra utaló valódi jelek csak 10 éves HSVd fertőzés után válnak szembetűnővé az ültetvényekben.

A HSVd genomi RNS-e a plazmodezmákon keresztül kerül be a sejtbe, és számos gazdasejt faktorról interakcióba lépve jut el a sejtmagba, ahol epigenetikai változásokat okoz, ezután pedig a „rolling-circle” mechanizmus szerint megkezdődik a replikáció. A replikáció során a

DNS függő RNS polimeráz (PolII) átírja a viroid RNS-ket oligomerekké, majd a gazdasejt RNase enzime hasítja az oligomereket. Végül a hasítás során keletkezett monomereket a DNS ligáz építi össze, az érett viroidok pedig a floémbe távoznak (Marquez-Molins et al. 2020).

2.4. Szőlő Pinot gris vírus (Grapevine Pinot gris virus- GPGV)

A GPGV egy újonnan felfedezett növényvírus, mely a szőlő (*Vitis vinifera*) klorotikus elszíneződéséért, satnyulásáért, levél deformációs tünetek kialakulásáért, és mennyiségi minőségi leromlásokért felelős (7. ábra). A vegetációs időszak elején a fertőzött növények egyértelmű tüneteket mutatnak, majd az idő előrehaladtával, a nyár folyamán a betegség leplezetlenül marad fent a leveleken.



7. ábra: GPGV betegség okozta tünetek bemutatása:

a.) klorotikus elszíneződés, b.) satnyulás és bokrosodás, c.) deformáció d.) a felvételek Pinot gris fajtában készültek (<http4>)

A betegséget először 2003-ban Trentino-ban (Észak- Olaszország) fedezték fel, egy kereskedelmi célú szőlőskertben, *Pinot gris* szőlőfajtában, a GPGV neve is innen ered, annak ellenére, hogy azóta már más szőlőfajtákban is kimutatták. A GPGV a Betaflexiviridae családon belül a Trichovirus nemzetség alapító tagja (Saldarelli et al. 2017; Tarquini et al. 2019). Genomja ssRNS-el rendelkezik és 7275 nukleotidból áll (Fajardo et al. 2017). A GPGV terjedhet vírusvektorral (pl. *Colomerus vitis*), és fertőzött vegetatív szaporítóanyaggal

(Bertazzon et al. 2015). A lágyszárú növények közül a *Silene latifolia subsp. alba* and *Chenopodium album* is vírusrezervoárjai lehetnek a GPGV-nek (Fajardo et al. 2017).

Legközelebbi molekulárisan kimutatott rokona a *Grapevine berry inner necrosis virus* (GINV), ez is a Trichovirus nemzetségbe tartozik, és Japánban írták le először. A GPGV-t leírták már Szlovákiában, Koreában, Szlovéniában, Franciaországban, Csehországban és Görögországban is (Bertazzon et al. 2015). A betegség a mai napig nem teljesen tisztázott, mivel a vírusnak többféle törzse ismert, illetve a fertőzött kultúrák érzékenysége is nagyban eltér (Fajardo et al. 2017).

2.5. Selyemkóró (*Asclepias syriaca*)

2.5.1. Selyemkóró (*Asclepias syriaca*) származása, elterjedése

A selyemkóró (*Asclepias syriaca*) Észak-Amerikából származik, a homokos laza talajokat szereti. Az *Asclepias* nemzetségnek 140 faja van, legtöbbjük trópusi elterjedésű, azonban Magyarországon ebből csak az *Asclepias syriaca* faj van jelen, a jövőben nem kizárt, hogy más *Asclepias* nemzetség tagok is invazívvá válnak. Európa területére már 1629-ben bekerült. 1736-37 körül már feljegyezték megjelenését Magyarországon is. A selyemkóró dekoratív növény lévén nagyon könnyen elterjedt az országban, ugyanis többféle hasznosíthatóságot tulajdonítottak neki, és a 19. század végén elkezdték intenzív termesztését is. Fiatal hajtásait megfőzve spárga helyett fogyasztották, a mag szőreiből selymet, szigetelőanyagot, virágjából bort, szörpöt, tejnedvét kaucsuk alapanyagként szerették volna felhasználni, sőt a virágja a virágkötészetbe is bekerült díszítőelemként. Végül a selyemkóró nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, úgyhogy felhagytak a mezőgazdasági termesztésével. Manapság már csak mézként hasznosítják, ugyanis nagyon ízletes méz készíthető a nektárjából. A termesztésből visszamaradt állományai invazív centrumokká váltak, és innen terjedt szét a növény. Magyarországon a déli területeken, leginkább a Duna-Tisza köze mentén, és Tolna megyében a leggyakoribb az előfordulása. Utak menti és a pusztaság gyomnövény társulásaiban található. Az utóbbi időben a selyemkóró a művelt területekre is bejutott, különösképp kukorica, szója, cirok, gabona, napraforgó, szőlő, és takarmánynövény területekre, komoly termésveszteségeket okozva. Legkedveltebb területei mégis a degradált területek, vagyis ahol a talajfelszíni rétegeket megzavarták (taposás, szántás, túllegeltetés), illetve tápanyagfeldúsulások fordulnak elő (műtrágyázás, erdőégetés). Minél jobban növeljük a degradált területek számát, annál inkább elősegítjük a selyemkóró terjeszkedését. A selyemkóróval fertőzött területeket, óriási költségek árán lehet csak tartósan

semlegesíteni, általában valamilyen talajbolygatással, kaszálással. Különböző szakaszokban a selyemkóró eredményesen írtható vegyszeres kezelésekkel, például csíranövénykor három hetes állapotáig, illetve bimbózástól-virágzásig (június vége-július eleje). A kezelések legeredményesebbnek glifozát alapú kezelésekkel bizonyultak (Salamon 1986; Bagi 1999; Kazinczi et al. 2001).

2.5.2. Selyemkóró (*Asclepias syriaca*) jellegzetességei

A selyemkóró egy évelő növény, mely kinézetre dohánynövényekre emlékeztet, és megnőhet akár 8-150 cm magasra is (8. ábra). Tarackszerű gyökerei a talaj alatt 10-40 cm mélyen haladnak. Leveleik széles lándzsásak, épszlűek, vaskosak és a levél fonáki részén molyhosak. Virágaik bogernyőkben állnak, hímnősek és a fehértől a pirosig sokféle színváltozatban is előfordulhatnak. A termések szarv alakúak, felszínük pedig lágytüskés. A növény mérgező tejnedvet tartalmaz, mely kiválthat egyensúlyzavart, hasmenést és nehéz légzést is. A magok csírázókéességüket három évig is megtarthatják. A magvak csírázása áprilistól májusig zajlik 15 °C hőmérséklet felett. A kicsírázott növény nagyon gyorsan, három hét alatt évelővé válik, azonban ebben az évben virágzatot nem hoz, csak a tarackgyökerei fejlődnek. A selyemkóró júniustól augusztusig virágzik, és igen népszerűnek számít ilyenkor a beporzó rovarok körében (Bagi 1999).



8. ábra: Selyemkóró félérett terméssel (<http5>)

A gyomnövény gyors terjedését köszönheti a hatékony reprodukciós képességének, és az allelopátiájának is egyaránt. Számos gazdaságilag jelentős vírus gazdanövényeként írták le eddig, mint például a CMV-nek és a TMV-nek is (Salamon 1986). Előfordulhat rajta többféle

gombás növénybetegség is, mint például rozsdagombák, lisztharmatok, alternária, cercospóra, fuzárium, botritisz (Bagi 1999).

2.6. Újgenerációs szekvenálás

Az újgenerációs szekvenálás (Next generation sequencing-NGS), és a bioinformatika a 21. század forradalmi találmányának számít az egész tudományban. A vírusdiagnosztikában is egyre elterjedtebb, számos új, izgalmas lehetőséget kínál, amely lehetőséget ad a korábbinál érzékenyebb diagnosztizálásra és a növényben lévő összes virális kórokozó meghatározására.

Az eddigi legismertebb vírus detektálásra alkalmas módszerek a reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR) és az Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) az 1970-80-as években jelentek meg. Számos előnnyel rendelkeznek, többek között azzal, hogy bármikor könnyen megismételhetők, és egyszerű felhasználhatósággal rendelkeznek, akár egy tapasztalatlan felhasználó számára is.

Egy újabb technológia megjelenésénél, tehát fontos szempont volt, hogy a már meglévő tudást, praktikusságot is nyújtsa, továbbá ezeken kívül még valami újdonságot is kínáljon. Manapság a legelterjedtebb szekvenáló felület az Illumina, de ezeken kívül más platformok is léteznek, melyek árban, és a szekvenálás összeállíthatóságában, azonosításában különböznek (Boonham et al. 2013; Barba et al. 2014; Massart et al. 2017).

Az NGS nagy áteresztő képességű, tehát akár egy teljes genom is szekvenálható vele. Az Illuminának az elmúlt pár évtizedben sikerült jelentős szekvencia hosszát növelni, 35 bp-ról 125 bp-ra. Az NGS platformok mivel a DNS fragmentumok millióit szekvenálják párhuzamosan, gyorsan, nagy mennyiségű szekvencia adathoz juthatunk, amelyeket különféle bioinformatikai módszerekkel elemezhetünk (Behjati és Tarpey 2013; Lu et al. 2016).

Az újgenerációs technológiánál nincs szükségünk vírusspecifikus antitestekre, vagy genomjuk egy részének ismeretére, hogy primereket tervezzünk rájuk, és mégis teljes genomokat tudunk velük megszekvenálni. A nagy áteresztőképességű szekvenálás legnagyobb előnye abban rejlik, hogy a hagyományos jól ismert technológiákhoz (PCR, ELISA stb.) képest nem igényelnek előzetes szekvencia információt, alkalmazásuk lehetővé teszi új kórokozók azonosítását (Massart et al. 2014; Massart et al. 2017).

3. A vizsgálatok módszerei

3.1. Mintavétel

A tesztelésbe vont növényminták két különböző helyről származnak, melyek begyűjtését a vírusdiagnosztikai csoport végezte el. Az egyik mintát mogyoródi szőlőültetvényből, a másik mintát pedig keszthelyi gabonátábla mellől gyűjtötték be selyemkóróból. A mintákat felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

3.2. Totál nukleinsav tisztítás

A begyűjtött mintákból ki kell tisztítanunk az RNS-t ahhoz, hogy vizsgálni tudjuk egy-egy vírus jelenlétét. A mintából tisztított totál nukleinsav az RNS és DNS vírusok jelenléte mellett a növényi gazda összes RNS-ét és DNS-ét is tartalmazni fogja.

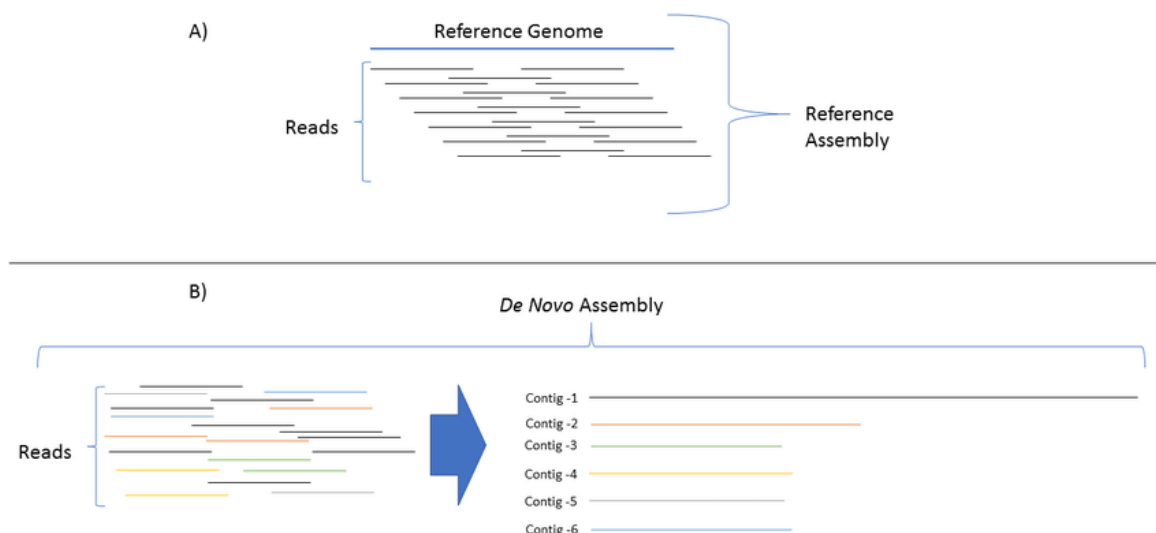
Ahhoz, hogy az RNS-eket az RN-ázok aktivitásától megóvjuk, végig jégen kell dolgoznunk. Ebből kifolyólag a steril dörzsmozsarakat is jégen kell lehűteni, a szikéket pedig leégetni. Első lépésként előkészítettem az Eppendorf csöveket, és ezekbe Eppendorf csövenként 600 µl fenolt mértem. Továbbá előre elkészítettem a kivonó puffert is, ami 10 mintára 7ml steril vizet, 1 ml 10xEB-t és 2 ml 10%-os SDS-t tartalmaz. A -70°C-on fagyasztott mintákat dörzscsészébe helyeztem kb. 200 g-ot 650 µl kivonó puffer hozzáadásával homogenizáltam, majd a szétdörzsölt leveleket pipetta segítségével kiszívtam az előkészített fenolos Eppendorf csövekbe. Ezután a mintákat vortexeltem, majd pedig 5 percig, 15000 rpm-en centrifugáltam őket, 20 °C-on. Új Eppendorf csövekbe előkészítettem 300 µl fenolt, és 300 µl kloroformot. A centrifugálás után a fenol+kloroformra pipettáztam az előző lépés felső fázisát, ügyelve, hogy a két fázis határán található interfázis (fehérjék), ne kerüljenek bele. A csöveket vortextem, centrifugáltam 5 percig 15000 rpm-en, 20°C-on. Újabb Eppendorf csövekbe kloroform: izoamilalkoholt mértem kb. 500-600 µl-t, majd erre pipettáztam rá a lecentrifugált felső fázist. Újra vortexeltem a csövek tartalmát, majd 5 percen keresztül 15000 rpm-en, 20 °C-on centrifugáltam. A keletkezett felülúszóhoz Na-acetátot adtam, hogy 0,2 M-os legyen, (20 µl 4 M-os Na-acetátot), továbbá 1 ml 96%-os EtOH-t. Pár percig jégen inkubáltam a csöveket, ugyanis a nukleinsavak ekkor csapódnak ki. A csöveket forgatva kevertem, majd 15 percig 15000 rpm-en, 4°C-on centrifugáltam. Ezután az alkoholt óvatosan leöntöttem, és a mintát 1 ml 70%-os EtOH-val mostam. A centrifugálás ebben az esetben 3 percen át, 15000 rpm-en és 20 °C-on zajlott. Centrifugálás után az alkoholt leöntöttem és szárítottam a keletkezett csapadékot pár percig, hogy a maradék alkoholt is eltávolítsam. A tisztított nukleinsavakat a száradást követően 30-50 µl steril vízben oldottuk fel, ezt vortexeléssel segítve és a továbbiakban jégen, vagy -20 fokon fagyasztva tároltam.

A tisztított nukleinsavak minőségének és mennyiségének ellenőrzésére a mintákat EtBr-ot tartalmazó 1,2% agaróz gélen TBE pufferben történő elválasztással ellenőriztem. Az elválasztás után UV megvilágításban láthatóvá válnak a különböző méretű nukleinsavak és integritásuk ellenőrizhető. A gélen való elválasztás előtt a mintáimat denaturálnom kell 65°C-on 5 percen át, ehhez 2-3 µl-es mintát kiegészítem 5 µl-re, és hozzámérek még 5 µl FDE-t. A futtatást 115 V-tal végzem, a végén pedig ellenőrizni tudom az RNS kivonás sikerességét a gélképen.

3.3.Kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése

A vírusfertőzött növény (gyom) esetén a szekvenált mintában megtalálható a levélmintából származó összes kisRNS, így nemcsak a növény genomjában kódolt kisRNS-ek, hanem a jelenlevő vírus szekvenciájával megegyező kisRNS-ek is. A mogyoródi szőlőültetvényből, és a keszthelyi gabonatóbla mellől származó selyemkóró minták nagy áteresztőképességű Illumina platformon szekvenált kisRNS-einek elemzését a Qiagen CLC Genomics Workbench 20.0.4. programmal végeztem.

A CLC programba a megszekvenált 50 nukleotid hosszú szekvenciákat importáltam a szekvenálás eredményéül kapott fastq fájlokból. Első lépésként el kell távolítani a kisRNS-ekhez előzőleg ligált adapterek szekvenciáját a szekvenciavégekről. Ezt nevezzük az elemzés trimmelés folyamatának, mely során eltávolításra kerülnek a nem megfelelő minőségű szekvenciák is. A bioinformatikai elemzés következő lépése a contig építés, ami az átfedő szekvenciákat tartalmazó kis RNS olvasatok összeépítését hosszabb olvasatokká jelenti. Ezek a keletkező szakaszok általában nagyobbak, mint 30 nukleotid. Az építés célja, hogy a következő lépéshez, a referencia genomokhoz való illesztéshez hosszabb szakaszokat állítsunk elő, ami nagyobb pontossággal való illesztést tesz lehetővé (9. ábra).



9. ábra: Contig-ok építése (http3)

A contig építés során megkapott szakaszokat (contigokat) BLAST programmal illesztettem az NCBI vírus-referenciagenomokat tartalmazó adatbázisára, melyet az adatbázisból már előzőleg letöltöttem. Az illesztés után kaptam egy listát a növényben előforduló vírusokról. Az E-value/érték-ek azt jelzik, hogy az adott szekvencia mennyire valószínű, hogy az adott vírusról keletkezett. A találatokat az E value alapján, a legalacsonyabbtól a legnagyobbig rendeztem a kapott listában, ugyanis ez az érték minél alacsonyabb, annál nagyobb valószínűséggel illeszkedik az adott contig a találatul adott vírushoz. A későbbi elemzésekhez csak a 10⁻⁵-nél kisebb E value-val rendelkező contigokat tartottam meg. E szűrés után ki tudtam választani a legnagyobb eséllyel előforduló vírusokat, melyet az (1. és 2. táblázatban) szemléltetek.

1. táblázat: E-value érték alapján rendezett keszthelyi mintákból származó vírusok

Keszthelyről származó selyemkóró minták		
Legalacsonyabb E-value	Vírus	Contigok száma
2,00 E ⁻¹¹	Potato leafroll virus	1
8,44 E ⁻⁰⁸	Dioscorea bacilliform	1
9,84 E ⁻⁰⁸	Petunia vein clearing virus	1
2,77 E ⁻⁰⁵	Taro bacilliform	1
3,21 E ⁻⁰⁵	Blueberry red ringspot virus	1
3,21 E ⁻⁰⁵	Sweet potato chlorotic stunt virus	1

A keszthelyi minta esetében a Potato leafroll virus mutatta a legkisebb E-value értéket.

2. táblázat: E-value érték alapján rendezett mogyoródi mintákból származó vírusok

Mogyoródról származó selyemkóró minták		
Legalacsonyabb E-value	Vírus	Contigok száma
3,03 E ⁻⁶⁰	Cucumber mosaic virus RNA 1	21
2,75 E ⁻²⁴	Cucumber mosaic virus RNA 2	21
8,45 E ⁻⁷²	Cucumber mosaic virus RNA 3	15
7,28 E ⁻¹⁰	Grapevine Pinot gris virus	5
1,53 E ⁻²³	Strawberry vein banding virus	7
3,69 E ⁻¹⁹	Hop stunt viroid	8

Következő lépésben megkerestem és letöltöttem az előzőleg kimutatott vírusok referencia genomját az NCBI GenBankból az egyedi kódjuk alapján, és a trimmelt szekvenciákat a referencia genomhoz illesztettem.

3.4.Molekuláris diagnosztika

Kutatásaimban a mogyoródi selyemkóróban található vírusok jelenlétének RT-PCR-rel való visszaigazolását végeztem el.

3.4.1. cDNS szintézis

A mintából az RNS vírusok kimutatásához elengedhetetlen, hogy az RNS-t átírjuk cDNS-sé, mivel a DNS függő DNS polimeráz RNS templátról nem tudja elvégezni a szintézist. Tehát a reverz transzkriptáz enzim segítségével a templátról szintetizálnunk kell először egy cDNS-t. Ebben az esetben a cDNS szintézist selyemkóróból Thermo scientific Revert Aid Reverse Transzkriptáz Kit-el végeztem, mely a Revert Aid Reverse Transcriptase (RT) enzimet használta a folyamat során. Az enzim aktivitását 42-50 °C körül megőrzi, és ez 13 kb méretű cDNS-ek szintéziséig megfelelő. A szintézis során, hogy jó minőségű cDNS terméket kapjunk, nagyon fontos, hogy az RNS-nek megőrizzük a tisztaságát és sértetlenségét. Ugyanis az RNS-eket nagyon könnyen le tudják bontani az RNase enzimek, amelyek jelen lehetnek bármely laboratóriumban.

A folyamat kezdetén megvártam, hogy a szükséges oldatok kiolvadjanak, majd centrifugáltam is a csöveket. Utána folyamatosan ügyelnünk kell arra, hogy jégen dolgozzunk, és az oldatokat is ott tartjuk.

Első lépésként egy Eppenforf csőbe összemértem:

- 1 µl RNS templátot
- 1,75 µl MQ-t
- 0,25 µl Random Hexamer primert

A végtérfogat el kell, hogy érje a 3 µl-t, a MQ-t ennek függvényében adjuk a mintánkhoz.

Az összemért mintákat 65 °C-on denaturáltam, majd betettem jégre 5 percre. Időközben a Kit pontos leírása alapján összemértem az enzimet tartalmazó keveréket (MIX-et) is.

A MIX 1 mintára vonatkoztatva tartalmaz 1 µl 5x puffert, 0,5 µl 10mM dNTP Mix-et, 0,25 µl RiboLoch RNase Inhibitor és 0,25 µl Revert Aid RT-t. A továbbiakban a jégen lévő minták mindegyikéhez 2 µl-t mértem a MIX-ből, és centrifugáltam őket.

A PCR készülék beállítása a protokoll alapján:

- 25 °C 10 perc (anelláció)
- 42 °C 60 perc (cDNS szintézis)
- 45 °C 10 perc (cDNS szintézis)
- 70 °C 10 perc (enzim inaktiválás/denaturáció)

A reverz transzkripció reakció során keletkező cDNS termékeket hígítottam a tízszeresére, majd -20 °C- on tároltam, a következőkben lezajló PCR reakcióig.

3.4.2. Gradiens PCR Q5 enzimmel, HSVd és CMV primerekkel

A cDNS szintézis után, el kellett végezni egy RT-PCR amplifikálást, melyhez ebben az esetben a Q5 Hot Start DNS polimerázt használtam. Egy speciális, rendkívül pontos, hibajavítási funkcióval is rendelkező polimerázról van szó, mely működésének pontos körülményeit optimalizálnunk kell a CMV, HSVd primerekre.

Reakció MIX:

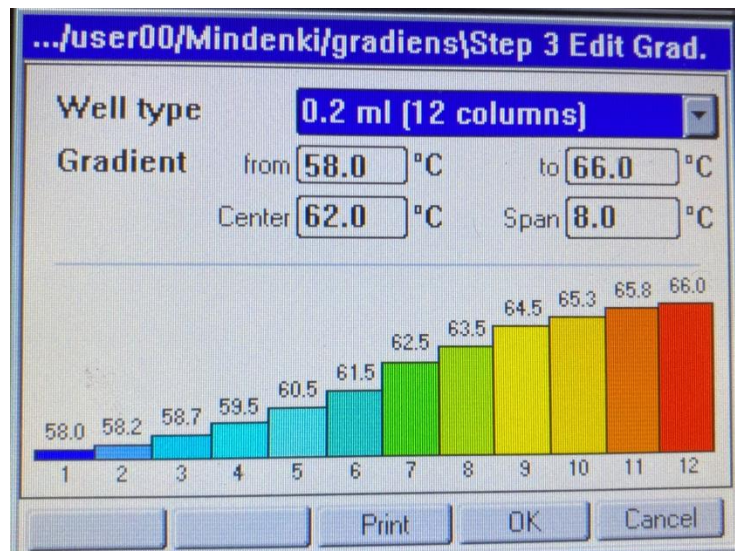
- 65 µl MQ
- 20 µl 5x puffer
- 2 µl 10mM dNTP
- 2 µl Q5

A vizsgálat a továbbiakban szétosztva, két Eppendorf csőben történt, melyek végtérfogata 50 µl volt, és ezt a (3. táblázat) szemlélteti.

3. táblázat: A gradiens PCR-hez használt MIX-ek összetétele

44 µl Q5 Mix	44 µl Q5 Mix
1 µl CMV templát	1 µl HSVd templát
2,5 µl Fny1501 (primer)	2,5 µl HSVdF
2,5 µl Fny2160 (primer)	2,5 µl HSVDR

Az 50-50 µl végtérfogatot, 5-5 csőre osztottam, melyeket a PCR készülékben különböző hőmérsékletet biztosító helyre helyeztem, így tudtam vizsgálni a CMV és HSVd minták esetében optimális annealing hőmérsékletet. A vizsgált annealási hőmérsékletek a következők voltak: 58 °C, 60,5 °C, 62,5 °C, 64,5°C, 66°C (10. ábra).



10. ábra: Vizsgált hőmérsékletek beállításai (fotó: Csabai Orsolya 2022)

PCR ciklusok:

- 98 °C – 30 sec
- 98 °C – 30 sec
- (58 °C, 60,5 °C, 62,5 °C, 64,5°C, 66°C) – 30 sec
- 72 °C – 1 min
- 72 °C – 2 min

3.4.3. RT- PCR amplifikálás

Az előzőekben szintetizált cDNS-t, lehetőségünk van PCR technika segítségével felszorzozni (amplifikálni). A PCR reakcióhoz a keszthelyi ésogyoródi selyemkóró (*Asclepias syriaca*) mintákról készített cDNS-eket használtuk templátként. A reakciót Q5 Hot Start DNS polimerázzal, és a megfelelő primerekkel végeztem, melyek használatakor használt megfelelő annealási hőmérsékletet a fentiek szerint optimalizáltam.

Az RT-PCR amplifikáció során, a különböző vírusok esetében felhasznált primereket a (4. táblázat) szemlélteti.

4. táblázat: Felhasznált primerek listája

Vírus/ Viroid	Primer neve	Primer szekvencia (5'-3')	Termék mérete	Annealing hőmérséklet t Q5 DNS polimerázzal
HSVd	HSVdF	CTGGGGAATTCTCGAGTTGC C	301 bp	63 °C
	HSVdR	AGGGGCTCAAGAGAGGATC CG		
CMV	CMV_RNA1_720F	GGACGATGATGTTTCGACGGT GC	1824 bp	63 °C
	CMV_RNA1_2565 R	GTCGAACGAAGCGTCACGA GAGG		
	CMV_RNA2_178F	GTGAACAACGCGAAGATGC TG	1807 bp	63 °C
	CMV_RNA2_2005 R	GGTCCATCACCTTAGCTTC C		
	CMV_RNA3_207F	GATGCCATCAAGAAGATGG CTAC	1807 bp	63 °C
	CMV_RNA3_2038 R	GCCGTAAGCTGGATGGACA ACC		
GPGV	GPGV-10F	CAATTGATCCCGTGTAGTGC	2004 bp	62 °C
	GPGV-2015R	CAGGTTCATYTTTGGATTCA AC	2004 bp	62 °C
	GPGV5578_F_KpnI	CAGGTACCATGGCTCTGATG AAGAGGAT	1600 bp	64 °C
	GPGV7177_R_XbaI	TCTAGACTACATACTRAATG CACTCTCC	1600 bp	64 °C

A Q5 PCR reakcióelegy összemérése (a primerek nélkül):

- 10 µl 5x puffer
- 1 µl 10mM dNTP
- 32 µl MQ
- 1 µl Q5 enzim

Ebben az esetben a reakcióelegy ötszörösét mértem össze, négy különböző reakcióhoz figyelembe véve az esetenként előforduló mérési hibákat. Eppendorf csővenként 50 µl volt a végtérfogat primerekkel együtt, melyeket aztán további 3 részre osztottam, mivel primer kombinációként 3 mintám volt.

Mindegyik primer kombináció 45 µl-t tartalmazott a Q5 PCR elegyből, és 2,5 µl-t a reverse és 2,5 µl-t a forward primerekből. A primerek fajtái kombinációként eltértek.

A kombinációként eltérő minták mérési lépéseit az (5,6,7,8. táblázatok) szemléltetik.

5. táblázat: HSVd PCR reakcióelegyének tartalma

HSVd		
45 µl Q5 reakció elegy +2,5 µl HSVdF +2,5 µl HSVdR		
1. Minta	2.Minta	3.Minta
14,5 µl Mix	14,5 µl Mix	14,5 µl Mix
0,5 µl Asclepias syriaca (készthelyi minta)	0,5 µl Asclepias syriaca (mogyoródi minta)	0,5 µl Pozitív kontroll minta

6. táblázat: CMV PCR reakcióelegyének tartalma

CMV Fmy		
45 µl Q5 reakció elegy +2,5 µl FnyF +2,5 µl FnyR		
4.Minta	5. Minta	6.Minta
14,5 µl Mix	14,5 µl Mix	14,5 µl Mix
0,5 µl Asclepias syriaca (készthelyi minta)	0,5 µl Asclepias syriaca (mogyoródi minta)	Pozitív kontroll minta 50 X híg plazmid (FMy MP)

7. táblázat: GPGV 10F_2015R PCR reakcióelegyének tartalma

GPGV 10F_2015R		
45 µl Q5 reakció elegy +2,5 µl GPGV10F +2,5 µl GPGV2015R		
7.Minta	8.Minta	9.Minta
14,5 µl Mix	14,5 µl Mix	14,5 µl Mix
0,5 µl Asclepias syriaca (készthelyi minta)	0,5 µl Asclepias syriaca (mogyoródi minta)	Kontroll minta 50X M74/4

8. táblázat: GPGV 5578F_7177R PCR reakcióelegyének tartalma

GPGV 5578F_7177R		
45 µl Q5 reakció elegy +2,5 µl GPGV5578F Kpn. +2,5 µl GPGV7177R XbaI.		
10.Minta	11.Minta	12.Minta
14,5 µl Mix	14,5 µl Mix	14,5 µl Mix
0,5 µl Asclepias syriaca (készthelyi minta)	0,5 µl Asclepias syriaca (mogyoródi minta)	Pozitív kontroll minta M74/1 50X

A PCR reakció beállításai a következők voltak:

Denaturáció: 98 °C - 30s

Denaturáció: 98 °C - 30s

Anelláció:

62 °C	}	30s
63 °C		
64°C		

Elongáció: 72°C - 1 min

Végső elongáció: 72°C - 2 min

Az RT-PCR során keletkezett PCR termékeket agaróz gélen választottam el, és az elektromos áram által, méret szerint elválasztott termékekről készült képet az eredmények cím alatt szemléltetem. A továbbiakban a PCR termékeket tisztítottam a gélből, klónoztam a nukleinsav sorrend meghatározásához pedig Sanger szekvenálást használtunk.

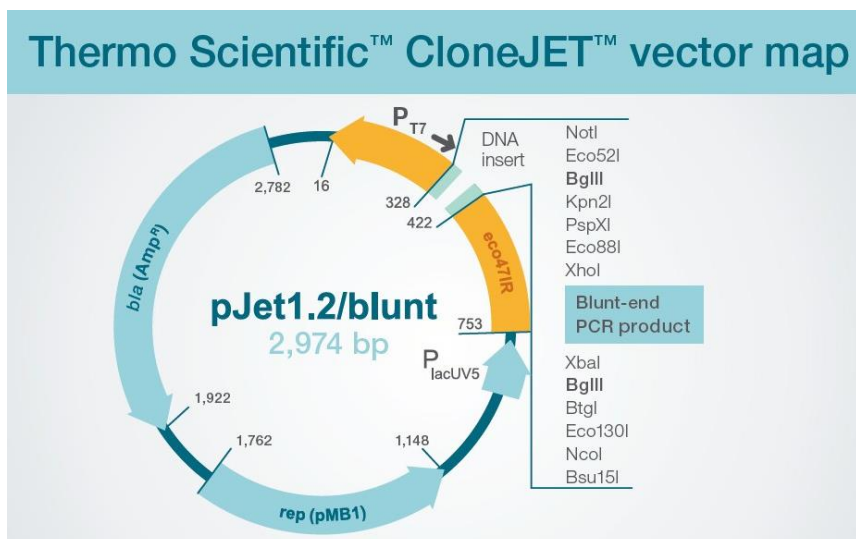
3.4.4. PCR termék tisztítása

Az elválasztott HSVd PCR terméket a gélből kivágtam, és Gene Jet Gel Extraction Kit segítségével izoláltam vissza. A folyamat során a Kit már kidolgozott protokollját követtem. A gélelektroforézist követően a megfelelő mérettartományokban megkapott termékeket szikével kivágtam a gélből és Eppendorf csőbe helyeztem. A minta tömegéhez 1:1 arányban kell hozzámérni a Binding puffert, tehát a mérlegen történő mérés után 50 µl Binding puffert

adtam az agart tartalmazó elegyhez. Az agart és a Binding puffert tartalmazó elegyet ezután 10 percen keresztül 65°C-on inkubáltam egy vízfürdőben, hogy fel tudjon oldódni a gél darab. Ezzel egy időben megkezdtem az Elution Buffer 65°C-ra történő előmelegítését. A feloldódott gél tartalmazó oldatot ezután felvittem a Gene Jet Gel Extraction Kit speciális szűrő oszlopára, majd centrifugáltam 1 percet. Centrifugálás után a szűrőn átjutott, cső alján összegyűlt oldatra már nem volt szükségem a továbbiakban, ez leginkább a feloldódott gél tartalmazza, tehát hulladékként kezeltem, és kiöntöttem. A szűrőt visszahelyeztem a csőbe, és újabb adag Binding Puffert mértem rá, centrifugáltam egy percet, ismét leöntöttem az átszűrt folyadékot és visszahelyeztem a szűrőt az oszlopra. A Wash Buffer egy etanollal hígított folyadék, és következő lépésben ebből 700 µl-t mértem rá a mintára. Ezt a lépést is egy perc centrifugálás követte, majd a cső alján összegyűlt oldat eltávolítása. Utolsó lépésként egy új Eppendorf csőbe helyeztem a szűrőt, és leoldottam a szűrőről a DNS-t 25 µl 65°C-ra előmelegített Elution Bufferrel, melyet szintén a szűrőre vittem fel, majd ezt is centrifugáltam egy percig. Az Elution Bufferrel történő lépést, még egyszer megismételtem, hogy nagyobb eséllyel minden lehetséges DNS-t leoldjak a szűrőről, és töményebb terméket kapjak. Végül a mintából 5 µl-t 3 µl DNS festékkel való keverés után agaróz gélen választottam el, hogy a folyamat sikerességét tudjam ellenőrizni.

3.5. Klónozás

Célunk a baktérium plazmidba beépíteni a tisztított PCR terméket, ez esetben a 280 bp hosszú HSVd szakaszt. Erre azért van szükség, mert így a plazmid szekvenálásakor a plazmidra tervezett primereket használva indítoszekvenciának a teljes klónozott DNS szakasz szekvenciát meg tudjuk határozni. Ehhez szükségünk van egy vektorra, melybe a tisztított PCR terméket beépíthetjük. Ebben az esetben a klónozáshoz mi a CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) szettet használtuk. A CloneJET vektort a (11. ábrán) szemléltetem.



11. ábra: pJET 1.2/blunt vektor térkép (<http6>)

A DNS szakasz ligálásához össze kell mérnünk az alábbi összetevőket:

- 1 µl MQ vizet
- 5 µl 2x puffer
- 0,5 µl PJET vektor
- 3 µl tisztított PCR termék
- 0,5 µl ligáz enzim

A teljes reakció végtérfogata végül 10 µl. Az összemért elegyet 15 percig szobahőmérsékleten pihenni hagytam, ez idő alatt kell, hogy megtörténjen a PCR termékünk vektorba történő integrálódása. Ahhoz, hogy a ligált plazmidból megfelelő mennyiség álljon rendelkezésünkre, a ligátumot baktériumba kell transzformálnunk. A plazmidot így tartalmazó baktériumokat felszaporítva majd nagyobb mennyiségű, egy ligálási folyamatból származó plazmidot (klónt) tudunk tisztítani. A transzformáláshoz kompetens sejtre van szükségünk, melynek a sejthártyája könnyebben átjárható. A kompetens sejtek igen érzékenyek, tehát az egész folyamat során figyelniük kell arra, hogy óvatosan bánjunk vele. A fagyasztóból (-70 °C) elővettem 100 µl kompetens sejtet, és jégen megvártam, hogy kiolvadjon, mely kb. 10-15 percet vesz igénybe.

Jégen dolgozva egy 15 ml-es műanyag csőbe belemértem a kompetens sejtet és 5 µl-t a ligálási keverékből, majd 20 percig hagytam állni a jégen. Ezután a műanyagcső, mely tartalmazza a baktérium szuszpenziót 30 másodpercig 42 °C-on hősokkot kapott egy vízzel telített kádban. A hősokk után fülke alatt a szuszpenzióhoz hozzámértem 0,5 ml SOC-ot, és rázógépbbe helyeztem rázatni 40 percen keresztül 37 °C-on.

Ez idő alatt elővettem egy ampicilint (antibiotikumot) tartalmazó LB táptalajt, és szobahőmérsékleten hagytam, hogy miután a ráztatóból kikerül a baktérium szuszpenzió, szobahőmérsékletű táptalajra szélesztettem. A ráztatóból kivett baktériumból 300 µl-t szélesztettem szilárd táptalajra, majd ezt 37 °C-on hagytam egy egész éjszakára, hogy fel tudjon sokszorozódni. A már kinőtt telepekből néhány kolóniát át kellett oltanom 3 ml folyékony SOC tápoldatba. Az átoltást fogpiszkálóval végeztem, és négy nagyobb telepet választottam ki ehhez a folyamathoz.

3.6.Plazmid tisztítása

A plazmidok tisztítása során a baktérium tenyészetek által felszaporított plazmidot kell kitisztítanunk, mely tisztításhoz a NucleoSpin Plasmid DNA purification Kit-et használtuk.

A tápoldatban felnevelt baktérium tenyészet felét átöntöttem egy 1,5 ml –es Eppendorf csőbe, és centrifugáltam 3 percig, 8000 rpm-el. A felülúszó táptalajt leöntöttem, majd a maradék tenyészetet szintén rátöltöttem, és megismételtem a fent említett lépéseket. A folyamat után, a cső alján megtalálható az összes baktérium, amivel a továbbiakban dolgozni fogok. A baktérium kultúrához, a kinyerés érdekében puffereket kell adnom. Első lépésként hozzáadtam 250 µl A1 Puffert, mely egy RNÁzt tartalmazó reszuszpendáló puffer, és hozzáadása után az oldatot pipetta hegygel szuszpendáltam. Második lépésként hozzámértem 250 µl A2 Puffert, mely egy lízis puffer (mely a sejtek lízisét eredményezi), és ezt is szuszpendáltam. Harmadik lépésként következett 300 µl A3 Puffer, mely egy neutralizáló puffer, hatására színtelenné válik az oldat. Az A3 puffer hatására sejtekből kiszabadult, denaturált DNS nagyon sérülékeny, tehát a csőben található oldatot csak óvatos mozdulatokkal kevertem át. A mintát ezután centrifugáltam, és cső alján lévő fehér színű törmelék felett a felülúszóban pedig megtalálható az átlátszó oldat tartalmazza a plazmid DNS-t. A felülúszót rámértem egy speciális szűrővel rendelkező oszlopra, majd centrifugáltam 1 percig. A gyűjtőcső alján összegyűlt folyadékot leöntöttem, és az oszlopra rámértem 500 µl AW puffert. A csövet ismét centrifugáltam, leöntöttem az alulúszót, és rápipettáztam az oszlopra 600 µl A4 Puffert. A folyamat után két lépésben centrifugáltam, először 1 percig majd 2 percig. A szűrőt ezután áttettem egy másik Eppendorf csőbe, és hozzáadtam 20-25 µl elúciós puffert, majd centrifugáltam 1 percet. Az átszűrt folyadékot, újra rámértem az oszlopra, és centrifugáltam 1 percet. A cső alján összegyűlt folyadék tartalmazta a megtisztított plazmidot.

3.7. Tisztított plazmidok restrikciós emésztése

Ahhoz, hogy leellenőrizzük a ligálás sikerességét, a pJET konstrukciót plazmidot emésztünk kell az XbaI és XhoI enzimekkel. Az emésztési reakció elegyet egy emésztetlen plazmid minta mellett, agaróz gélen elválasztva láthatóvá válik a klónozó helyre beépült DNS szakasz, így ellenőrizhető a klónozás sikeressége. Az emésztéshez elkészítettem a restrikciós enzimeket tartalmazó keveréket, mely tartalmazott:

- 8 µl 10x Tango Puffer
- 1,6 µl XbaI enzimet
- 0,8 µl XhoI enzimet
- 21,6 µl MQ

Egy új Eppendorf csőbe kimértem 2 µl-t a tisztított mintából és rámértem 8 µl-t a keverékből. Ezt inkubáltam 37 °C-on, 1 órán keresztül vízfürdőbe. A folyamat végén az emésztetlen plazmidot és az emésztési elegyet is elválasztottam agaróz gélen. Az emésztetlen esetben 2 µl-t mértem össze a plazmidból és 2 µl-t DNS festékből. Az emésztett esetben, pedig 10 µl-t pipettáztam az emésztett termékből és 2 µl-t a DNS festékből.

3.8. Primer tervezés

Az RT-PCR termékek agaróz gélen való elválasztása után, a CMV esetében a felhasznált, a CMV FNY törzsére specifikus primerek használatával nem kaptunk vírus specifikus terméket. Azt gondoltuk, hogy ez esetben a hiba oka az volt, hogy a mintánkban jelenlevő CMV variáns szekvencia a primerek tapadási helyén eltér, ezért azok nem tudnak megfelelően annealódni, és így a reakció sikertelen lesz. Ennek kiküszöbölésére olyan CMV primerek tervezésére volt szükség a továbbiakban, melyek specifikusak a variánsukra.

A bioinformatikai elemzések során, a mintában levő kisRNS-ekből összeállított CMV-re illeszkedő contigokat, az NCBI BLASTN algoritmusának használatával illesztettem a referencia genomokra a megfelelő contigokat. A contigok referencia genomra való illeszkedése során egy térképet kaptam. A térképek alapján a CMV mindhárom genomja esetében kiválasztottam azokat, amelyek egymástól legtávolabb helyezkednek el és szekvenciájuk alapján új primereket terveztem. A primerek tervezésekor figyelembe kell vennünk, hogy a primerek hossza kb. 21-24 nt hosszú legyen, és 40-50 %-ban tartalmazzon C vagy G nukleotidokat. A legjobb, ha elkerüljük az egymás melletti háromszoros nukleotid ismétlődéseket, ugyanis ezek nehezítik a primerek bekötődését, és pontatlanság léphet fel genom átíródásakor.

3.8.1. CMV RNS 1

A (12,13,14,15,16 és 17. ábrákon) szemléltetem a CMV genomok primer tervezése során a contigok kiválasztását, és azok illeszkedését a referencia genomokra.

Contig 156

Query	605	GCTGCGGATTGCAAAGTACAAGCCCACTTTGCTATATCTATTTCATGGAGGTATGATATG	664
Sbjct	9	GCAGCTGAATGCAAAGTTCAAGCCCACTTTGCTATTTCTATACAGGAGGATATGATATG	68
Query	665	GGCTTTAGAGGATTATGTGAAGCGATGAATGCTCACGGAACCATAATTTTGAAAGGGAACG	724
Sbjct	69	GGCTTTAGAGGTTTATGTGAGGCAATGAACGCTCACGGAAC TACGATTTTGAAAGGGACG	128
Query	725	ATGATGTTTCGATGGTGCGATGATGTTTGACGACCAAGGTGTAATACCCGAACCTTAATGT	784
Sbjct	129	ATGATGTTTCGACGGTGGTATGATGTTTGACGACCAAGGCTTTATTCCTGAACCTTAAATGT	188
Query	785	CAGTGG	790
Sbjct	189	CAGTGG	194

12. ábra: A contig 156-on a primer jelölése van szemléltetve sárga kiemeléssel

Contig 1139

[illegible]

13. ábra: A contig 1139-en a primer jelölése van szemléltetve sárga kiemeléssel

3.8.2. CMV RNS 2

Contig650

```

Query    117  GCCAATCTTTTGAACGCGAGTTACGGTGTGCGACACTCCCAGGATGTGGAACGTTTGCGA  176
      |||||
Sbjct    5    GCCAATCTGTTGAATGGCTCCTATGGTGTTGACACTCCCGAGGAAGTGGAAACGCGTTAGA  64

Query    177  TCTGAGCAACGCGAAGAGGCTGCTGCGGC  205
      |||||
Sbjct    65  CGTGAACAACGCGAAGATGCTGAGGCGGC  93

```

14. ábra: A contig 650-en a primer jelölése van szemléltetve zöld kiemeléssel

Contig5789

Query	1977	TTCAACATGGAAGCTAAGGTGATGGAACCTGCCGTACCATATATTTGTTTCGAA	2029
Sbict	3	TTCAACATGGAAGCTAAGGTGATGGAACCTGCAGTACCTTACATTTGTTTCGAA	55

15. ábra: A contig 5789-en a primer jelölése van szemléltetve zöld kiemeléssel

3.8.3. CMV RNS 3

Contig34

```

Query 120 ATGGCTTTCCAAGGTACCAGTAGGACTTTAACTCAACAGTCCTCAGCGGCTACGTCTGAC 179
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 201 ATGGCTTTTCAAGGTACCAGTAGGACGTTAACTCAACAGTCCTCGGCGGCGTCGTCTGAC 142

Query 180 GATCTTCAAAAGATATTATTTAGCCCTGAAGCCATTAAGAAAATGGCTACTGAGTGTGAC 239
          ||  |  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 141 GACTTACAGAAGATATTATTCAGCCCCGATGCCATCAAGAAGATGGCTACTGAGTGTGAC 82

Query 240 CTAGGCCGGCATCATTGGATGCGCGCTGATAATGCTATTTAGTCCGCGCCCTCGTTCCC 299
          |||||  ||  |||||  |||||  |||||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
Sbjct 81 CTAGGTCGACATCATTGGATGCGCGCGGATAACGCCATCTCTGTCAGACCTCTCGTTCCC 22

Query 300 GAAG 303
          |||
Sbjct 21 CAAG 18

Query 1 GTAATCTTACCACt 14
          |||||  |||||
Sbjct 297 GTAATCTTACCACt 284

```

16. ábra: A contig 34-en a primer jelölése van szemléltetve kék kiemeléssel

Contig222

```

Query 1698 TCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCCGCATCTGGAGTCCAAGCCAACAACAACTGTTG 1757
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 432 TCACCGGTTTGGTTTATCAGTATGCTGCGTCCGGAGTTCAGGCCAACAATAAGTTACTT 373

Query 1758 TATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTGATATAGGTGACATGAGAAAGTACGCCGTCCTCGTG 1817
          |||||  ||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 372 TATGACCTGTCCGAGATGCGTGCTGATATCGGCGACATGCGTAAGTACGCCGTCCTGGTT 313

Query 1818 TATTCAAAGACGATGCGCTCGAGACGGACGAGCTAGTACTTCATGTTGACATCGAGCAC 1877
          ||  ||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 312 TACTCGAAAGACGATAAACTAGAGAAGGACGAGATTGTACTTCATGTGACGTCGAGCAT 253

Query 1878 CAACGCATTCCACATCTGGAGTGCTCCAGTCTGATTCCGTG---TTCCCAGAATCC-- 1932
          |||||  |||||  ||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 252 CAACGAATTCTCTATCTCACGGATGCTCCC-GACTTAGTCCGTGTGTTTACCGGCGTCCGA 194

Query 1933 -----TCCCTCCGATCTCTGTGGCGGGACGTGAGTTGGCAGTTCTGCTATAAACTGTC 1985
          ||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 193 AGACGTTAAACTACACTCTCAATCGCGAGTGCTGAGTTGGTAGTATTGCTTCAAACCTGCC 134

Query 1986 TGAAGTCACTAAACGTTTTTT---ACGGTGAACGGGTTGTCCATCCAGCTTACGGCTAAA 2042
          |||||  |||||  ||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 133 TGAAGTCCCTAAACGTTGTTGCTCGGGGAACGGGTGTCCATCCAGCTTACGGCTAAA 74

Query 2043 ATGGTCAGTCGTGGAGAAATC-CACGCCAGCAGATTTACAA-ATCTCTGAGGCGCCTTTG 2100
          |||||  |||||  ||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 73 ATGGTCAGTCGTG--TCTTTCACACGCC-GATGTCTTACAAGATGTC-GAGGTACCCTTG 18

Query 2101 AAACCATCTCCTAGGTT 2117
          |||  |||||  |||||  ||
Sbjct 17 AAATCATCTCCTAGATT 1

```

17. ábra: A contig 222-ön a primer jelölése van szemléltetve kék kiemeléssel

A tervezés során az előzőekben ismertetett szabályokat követve, a (9. táblázatban) szemléltetett primer szekvenciákat terveztük meg.

9. táblázat: A mogyoródi selyemkóró mintában feltételezetten jelenlevő CMV három RNS-ére tervezett primerek kódja és szekvenciái

1	Primer Name	Primer Sequence (5'-3')
2	CMV_RNA1_720F	GGACGATGATGTTCGACGGTGC
3	CMV_RNA1_2565R	GTCGAACGAAGCGTCACGAGAGG
4	CMV_RNA2_178F	GTGAACAACGCGAAGATGCTG
5	CMV_RNA2_2005R	GGTTCCATCACCTTAGCTTCC
6	CMV_RNA3_207F	GATGCCATCAAGAAGATGGCTAC
7	CMV_RNA3_2038R	GCCGTAAGCTGGATGGACAACC

A reverz primerek esetében a CMV RNS1,2 és 3 esetében is a reverz szálak komplementerét használtuk primerként.

3.9.Gradiens PCR Q5 enzimmel CMV primer kombinációkkal

Az új CMV primerek megtervezése után, el kellett végeznem egy gradiens PCR-t, hogy a használatuk során az annealálási hőmérsékletet optimalizáljam. Ebben az esetben is a Q5 Hot Start DNS polimerázt használtam, mely egy speciális, rendkívül pontos, hibajavítási funkcióval is rendelkező polimeráz. A Q5 enzim működésének pontos körülményeit optimalizálnunk kell a CMV primer kombinációkra.

Reakció MIX:

- 96 µl MQ
- 30 µl 5x puffer
- 3 µl 10mM dNTP
- 3 µl Q5 enzim

A vizsgálat a továbbiakban szétesztva, három Eppendorf csőben történt, melyek végtérfogata 50 µl volt. Az Eppendorf csövek tartalmát a (10. táblázat) szemlélteti.

10. táblázat: Gradiens PCR összemérése

44 µl Q5 mix	44 µl Q5 mix	44 µl Q5 mix
1 µl templát (mogyoródi pool)	1 µl templát (mogyoródi pool)	1 µl templát (mogyoródi pool)
2,5 µl CMV-RNA1- 720F primer	2,5 µl CMV-RNA2 -178F primer	2,5 µl CMV-RNA3 -207F primer
2,5 µl CMV-RNA1- 2565R primer	2,5 µl CMV-RNA2- 2005R primer	2,5 µl CMV-RNA3- 2038R primer

Az 50-50-50 µl végtérfogatot, 5-5-5 csőre osztottam, melyeket a PCR készülékben különböző hőmérsékletet biztosító helyre helyeztem, így tudtam vizsgálni a CMV minták esetében optimális annealing hőmérsékletet. A vizsgált annealing hőmérsékletek a következők voltak: 58 °C, 60,5 °C, 62,5 °C, 64,5°C, 66°C.

PCR ciklusok:

- 98 °C – 30 sec
- 98 °C – 30 sec
- (58 °C, 60,5 °C, 62,5 °C, 64,5°C, 66°C) – 30 sec
- 72 °C – 1 min
- 72 °C – 2 min

A kapott PCR termékeket agaróz gélen elválasztottam és gélből tisztítottam, majd klónoztam a 3.4- 3.7 pontban leírtak alapján.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése

A munkám során, mind a keszthelyi és mind a mogyoródi minták kis RNS HTS-ének bioinformatikai elemzését elvégeztem. A szekvenált olvasatok (read-jei)-ből épített kontigok vírusreferenciagenomok között való keresésével (BLAST) kaptam egy vírus találati listát. Ezután a szekvenált readeket közvetlenül illesztettem a contig találatokat, adott vírusok referencia genomjára. A kapott eredményeket a (11 és 12. táblázatokban) szemléltetem.

11. táblázat: Mogyoródi minták bioinformatikai elemzésének eredménye

Könyvtári kód	Az analízis típusa		CMV RNS 1	CMV RNS 2	CMV RNS 3	GPGV	SVBV	HSVd
			NC_002034	NC_002035	NC_001440	NC_015782	NC_001725	NC_001351
171	Vírus hit	Contig-ok száma	21	21	15	5	7	8
		Redundáns read-ek száma	4336	1410	9484	629	1179	364
		RPM	274,4	89,2	600,3	39,8	74,6	23,0
		Vírus genom lefedettsége (%)	48%	37%	48,00%	50%	39%	91%

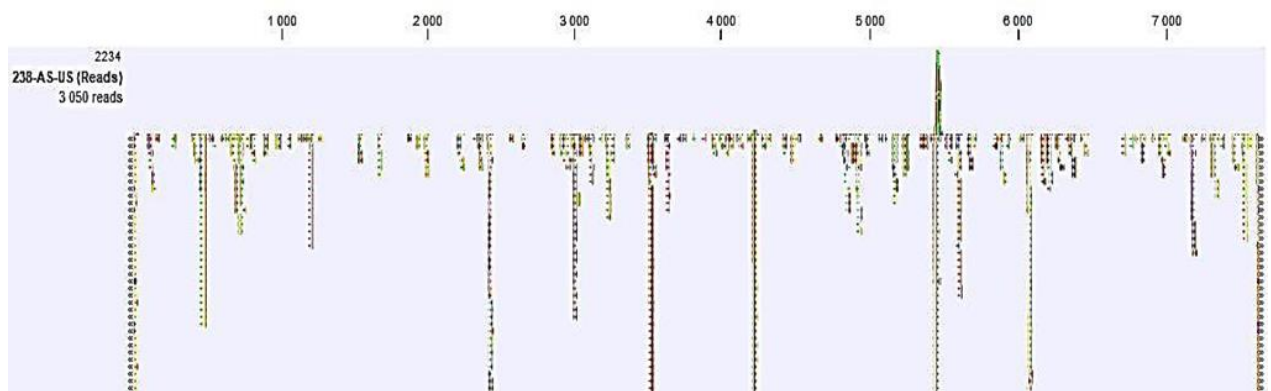
jelmagyarázat: CMV - Uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*); GPGV - Szőlő Pinot gris vírus (*Grapevine Pinot gris virus*); SVBV - Levélér sárgulás vírus (*Strawberry vein banding virus*); HSVd - Komló törpülés viroid (*Hop stunt viroid*)

12. táblázat: Keszthelyi minták bioinformatikai elemzésének eredménye

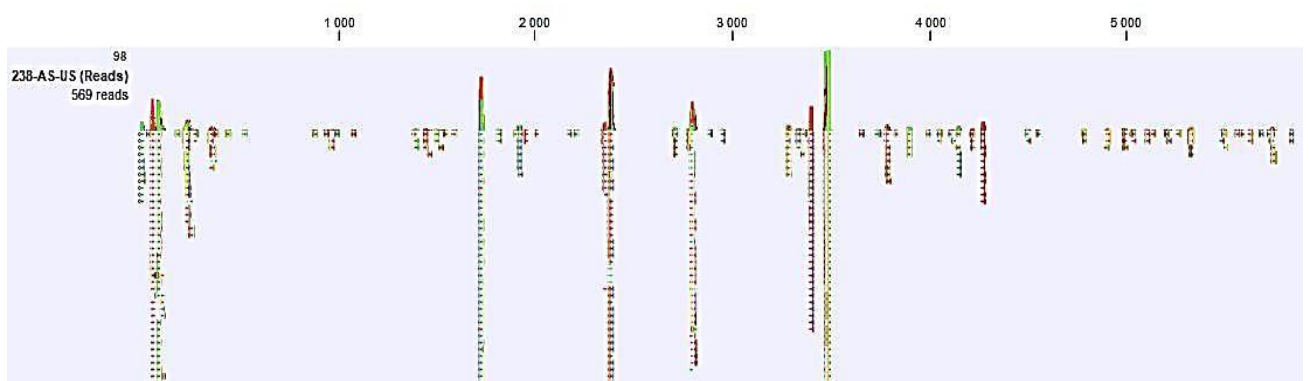
Könyvtári kód	Az analízis típusa		PLRV	DBALV	PVCV	TaBCHV	BRRV	SPCSV
			NC_001747	NC_038381	NC_001839	NC_026819	NC_003138	NC_004124
171	Vírus hit	Contig-ok száma	1	1	1	1	1	1
		Redundáns read-ek száma	569	3050	1210	628	2667	14814
		RPM	37,9	203,3	80,7	41,9	177,8	987,6
		Vírus genom lefedettsége (%)	32%	46%	61,00%	50%	64%	53%

jelmagyarázat: PLRV- Burgonya levélsodródás vírus (*Potato leafroll virus*); DBALV - Dioscorea bacillus alakú vírus (*Dioscorea bacilliform AL virus isolate*); PVCV - Petunia érkivilágosodás vírus (*Petunia vein clearing virus*); TaBCHV - Táró bacillus alakú vírus (*Taro bacilliform CH virus isolate*); BRRV - Áfonya vörös gyűrűsfoltosság vírus (*Blueberry red ringspot virus*); SPCSV - Édesburgonya klorotikus satnyulás vírus (*Sweet potato chlorotic stunt virus*)

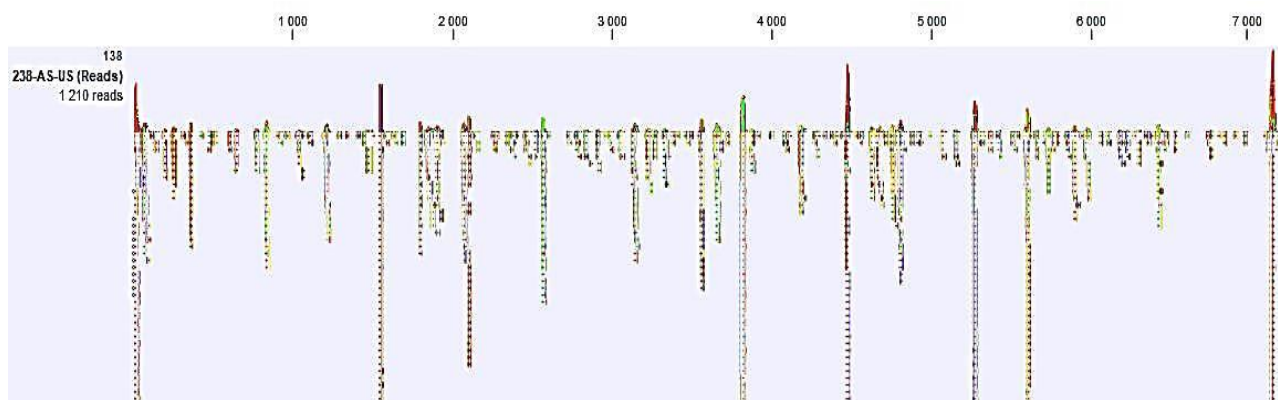
A kimutatott vírusok referencia genomjait az NCBI GenBankból kikerestem, és letöltöttem, majd az előzőekben trimmelt szekvenciákat ezekhez illesztettem. Eredményül pedig megkaptam, a referencia genomra illeszkedő read-eket. A (18-23. ábrákon) látható a Keszthelyi RNS könyvtárban szekvenált kisRNS-ek PLRV, DBALV, PVCV, TaBCHV, BRRV, SPCSV vírusok nem redundáns readjeinek illeszkedései a referencia genomokra. Minél több read illeszkedik a referenciára, annál nagyobb lefedettséget kapunk és ezáltal következtethetünk arra, hogy ezek az illeszkedő read-ek valóban virális eredetűek.



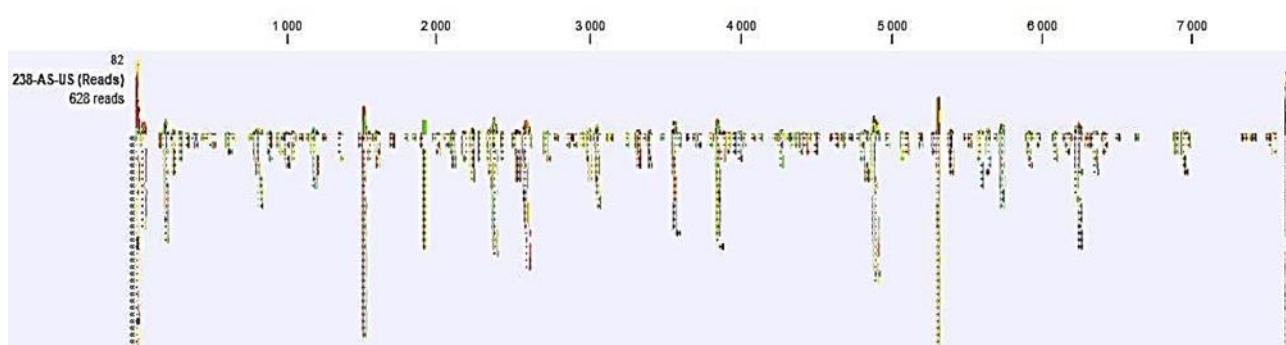
18. ábra: PLRV referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése. (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)



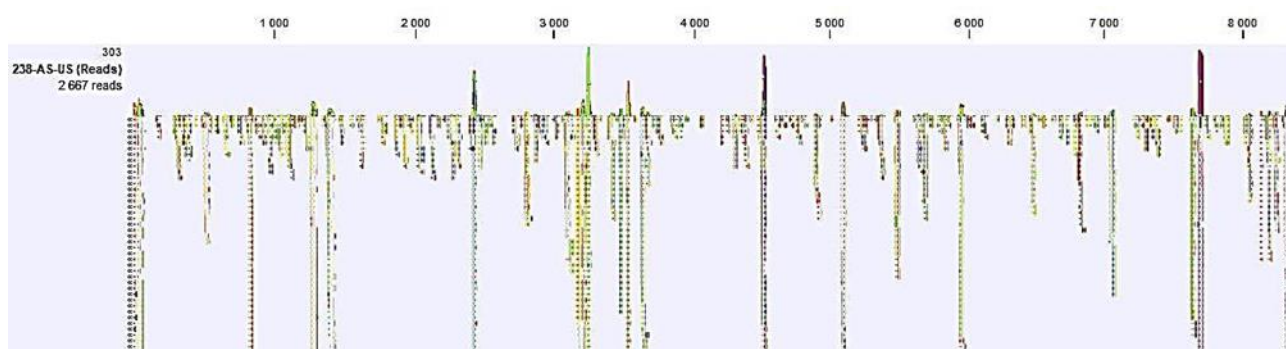
19. ábra: DBALV referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)



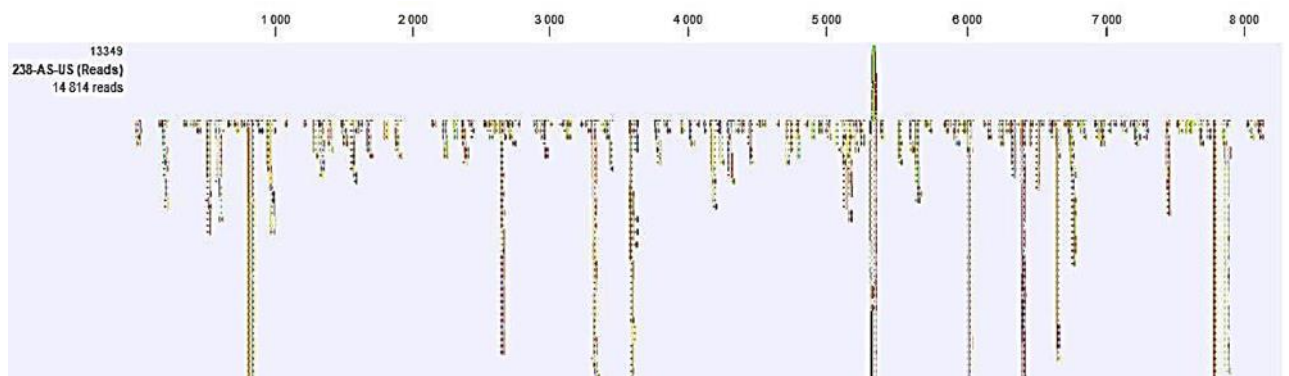
20. ábra: PVCV referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)



21. ábra: TaBCHV referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)

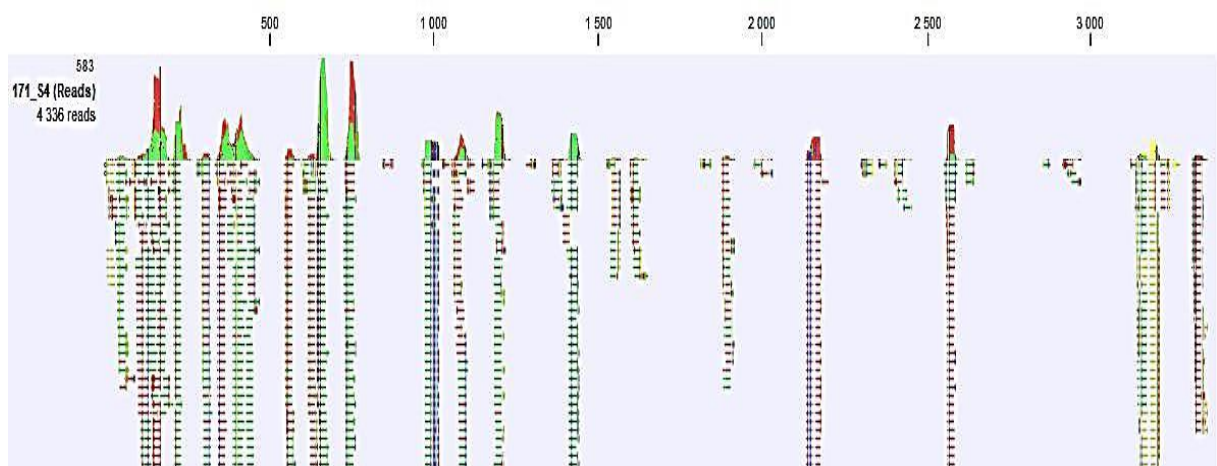


22. ábra: BRRV referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)

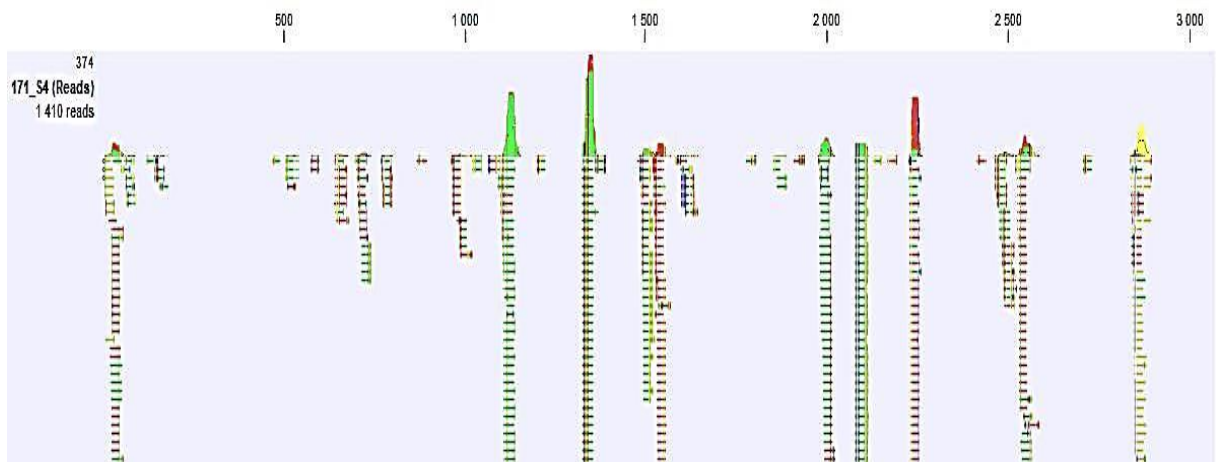


23. ábra: SPCSV vírus referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)

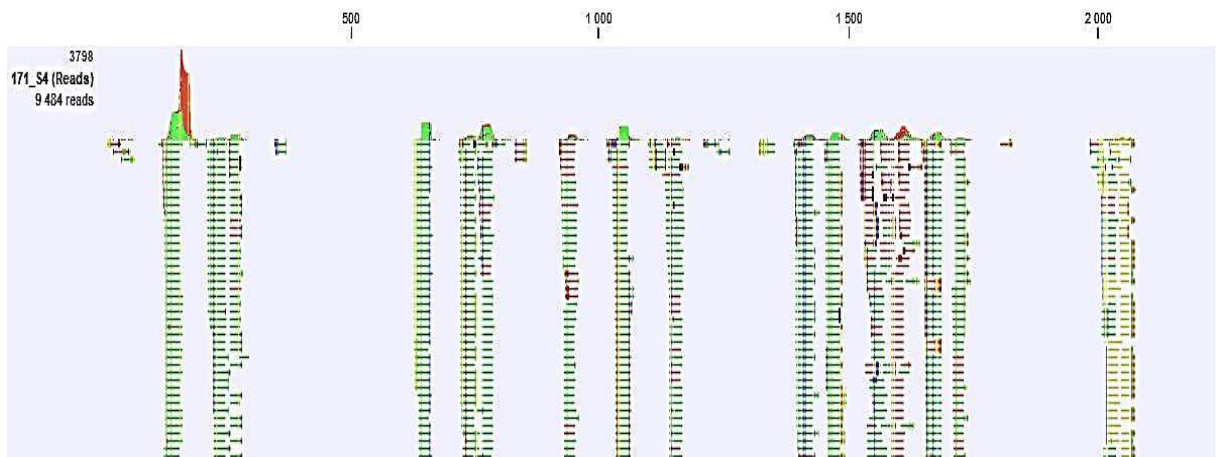
A (24-29. ábrákon) a Mogyoródi RNS könyvtárban szekvenált kisRNS-ek a CMV három RNS-ére, a GPGV, SVBV, és a HSVd genomok illeszkedései kerülnek bemutatásra.



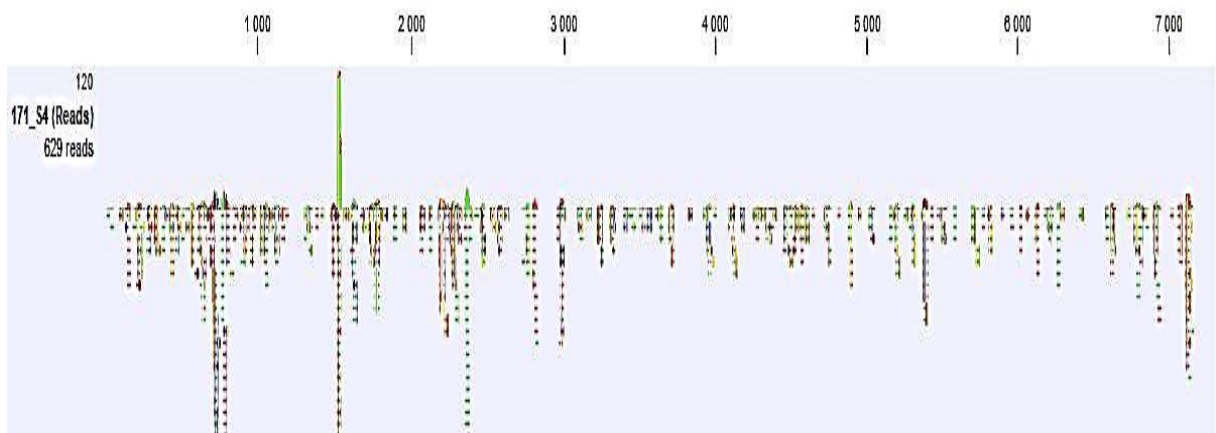
24. ábra: CMV RNS 1 vírus referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)



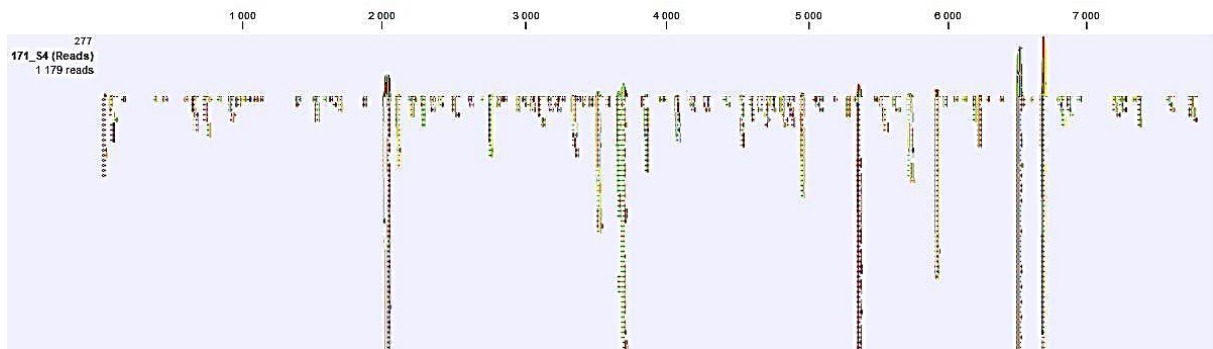
25. ábra: CMV RNS 2 vírus referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)



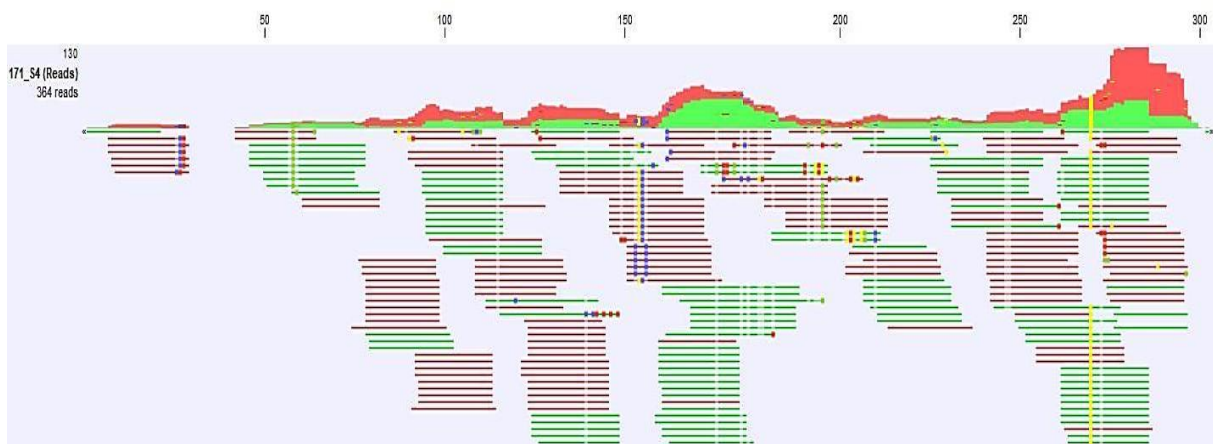
26. ábra: CMV RNS 3 vírus referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)



27. ábra: GPGV referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)



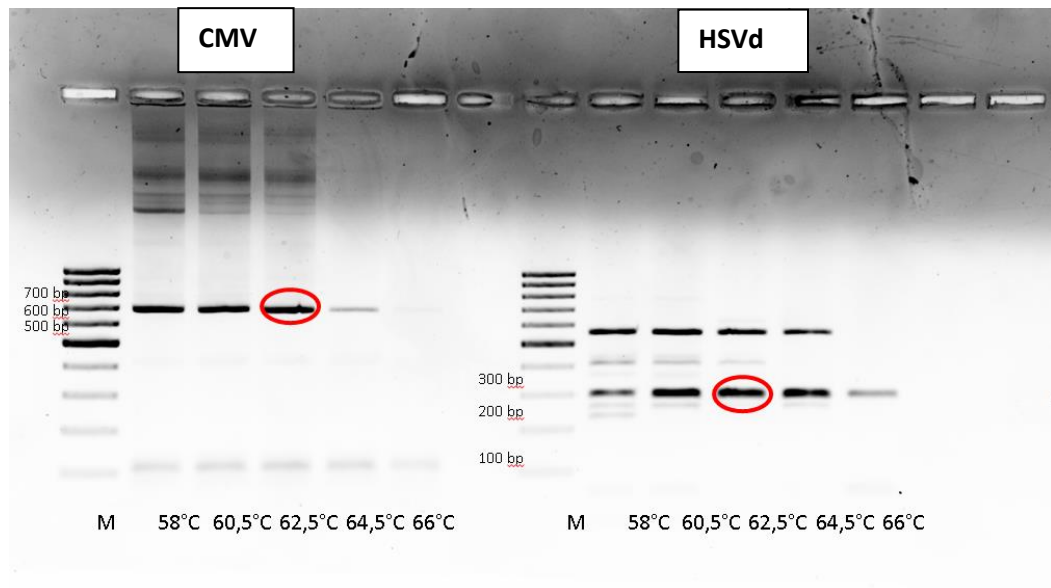
28. ábra: SVBV referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)



29. ábra: HSVd referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése (Az ábra felső részén található számok a nukleotidokat jelölik.)

4.2.HSVd és CMV primerekkel anellálási hőmérsékletének optimalizálása gradiens PCR-rel, Q5 enzim esetén

A Q5 enzimmel végzett hőmérsékleti optimalizálás után, a gélelektroforézissel elválasztott PCR termékek mérete CMV esetében 660 bp körül, a HSVd termék esetében pedig 280 bp körül volt várható. A kísérlet eredményeképpen 63 °C-on mindkét primer esetében kaptunk a megfelelő mérettartományban terméket, a várt mérettartományokban (30. ábra).



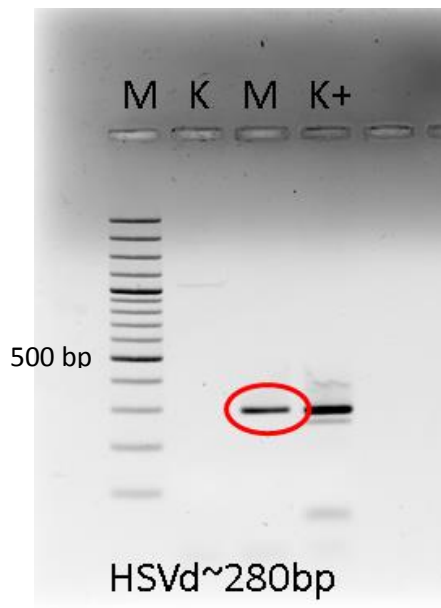
30. ábra: CMV és HSVd primerek annealálási hőmérsékletének optimalizálása Q5 enzimmel történő PCR reakció során

4.3. RT- PCR amplifikálás

A megfelelő primerekkel elvégzett RT-PCR amplifikáció után kapott termékeket agaróz gélelektroforézissel elválasztottam. Az RT-PCR során a HSVd, GPGV, és CMV vírusok jelenlétét szeretnénk volna igazolni, melyek visszaigazolásait egyenként a következő képeken fogom szemléltetni.

4.3.1. HSVd RT-PCR amplifikálás

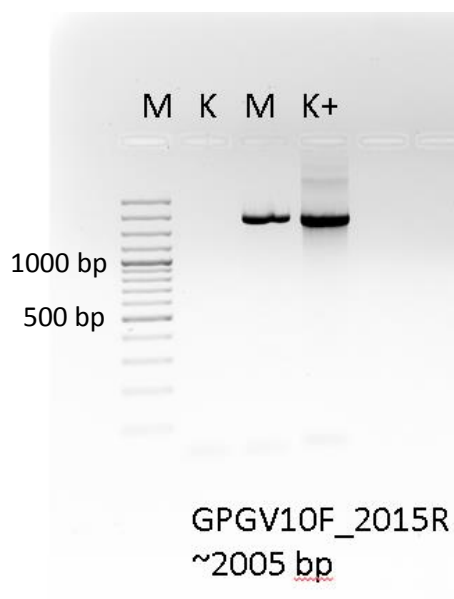
A HSVd esetében a PCR terméket 280 bp környékén vártuk, az alkalmazott primerekkel a mogyoródi mintában sikerült amplifikálni ebben a mérettartományban, és visszaigazolnunk a jelenlétét (31. ábra).



31. ábra: HSVd PCR reakció eredményességének vizsgálata a reakciótermékek gélelektroforézissel történő elválasztásával

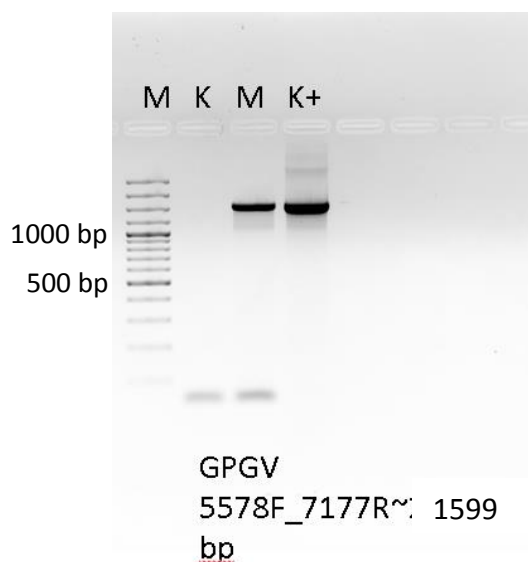
4.3.2. GPGV RT-PCR amplifikálása

A GPGV esetében a GPGV10F és GPGV2015R primerekkel elvégzett RT-PCR eredményeképpen, a PCR terméket 2005 bp környékén vártuk. Az alkalmazott primerekkel az adott mérettartományban kaptunk PCR terméket a mogyoródi mintában, visszaigazolvva ezzel a vírus jelenlétét (32. ábra).



32. ábra: GPGV PCR reakció eredményességének vizsgálata a reakciótermékek gélelektroforézissel történő elválasztásával

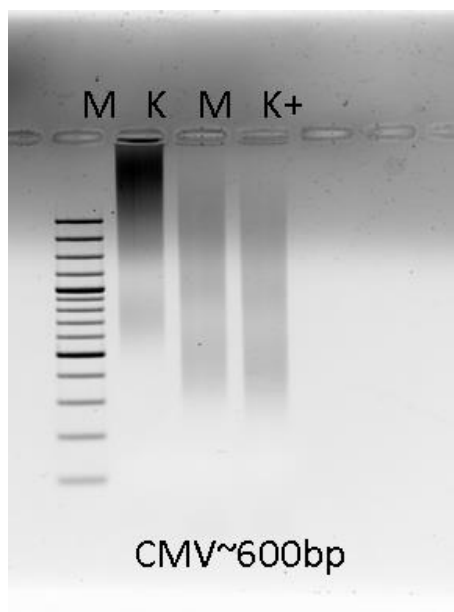
A GPGV esetében a GPGV5578F és GPGV7177R primerekkel elvégzett RT-PCR eredményeképpen, a PCR terméket 1599 bp környékén vártuk. Az alkalmazott primerekkel az adott mérettartományban kaptunk PCR terméket, amely alátámasztja a vírus jelenlétét a mogyoródimintában (33. ábra).



33. ábra: GPGV PCR reakció eredményességének vizsgálata a reakciótermékek gélelektroforézissel történő elválasztásával

4.3.3. CMV RT-PCR amplifikálása

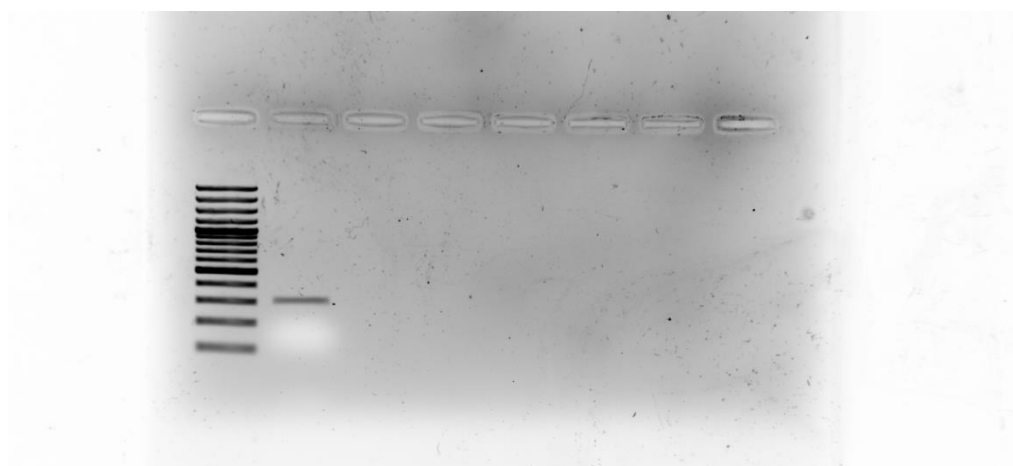
A CMV esetében a CMVFny primerek használatával vártuk a PCR terméket 600 bp mérettartományban, azonban eredményt nem kaptunk (34. ábra). Ennek oka az lehetett, hogy a mintánkban található CMV nem közeli rokona a CMV Fny variánsának, az arra tervezett primerek nem amplifikálják a mintában található variánst. Ezért figyelembe véve a mintában található CMV specifikus kis RNS olvasatokat, új CMV primerek tervezésére vált szükségessé. Mivel a CMV-nek háromsztatú genomja van, szerettünk volna a selyemkóróban található vírus mindhárom RNS-éről szekvenciainformációt szerezni. Ehhez olyan primereket terveztem, melyek specifikusak a variánsukra.



34. ábra: CMV PCR reakció eredményességének vizsgálata a reakciótermékek gélelektroforézissel történő elválasztásával

4.4.PCR termék tisztítása

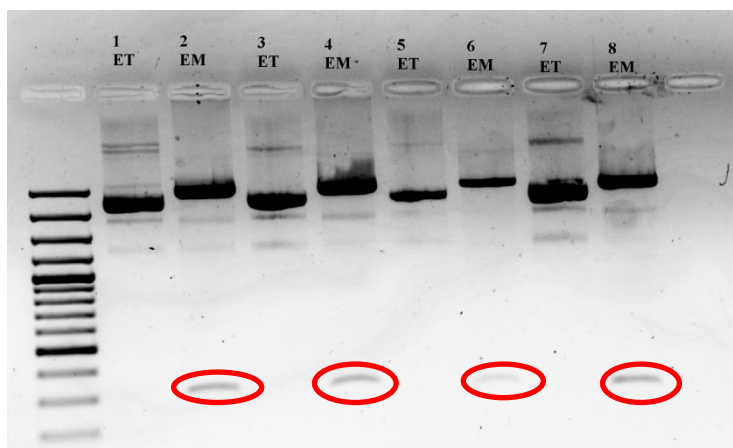
Az (35. ábrán) bemutatott, agaróz gélen elválasztott HSVd specifikus PCR terméket a gélből kivágtam, visszaizoláltam Gene Jet Gel Extraction Kit segítségével, majd ezt újra elválasztottam agaróz gélen, ezt szemlélteti a fenti ábrán. A visszaizolált terméket klónoztam.



35. ábra: HSVd specifikus PCR termék tisztításának ellenőrzése

4.5. HSVd klónozása

A HSVd PCR termékeket gélből tisztítottam és klónoztam a 3.4-3.7 fejezetben leírtak alapján. A klónozás ellenőrzése céljából XbaI és XhoI enzimekkel emésztettem a PJET konstrukciót. Majd agaróz gélben megfuttattam, mind az emésztett és emésztetlen termékeket is. A gélben, a zsebekben az emésztett és emésztetlen minták váltják egymást. Az emésztetlen termékeket 3000 bp körül vártuk, az emésztetteket pedig kisebb mérettartományban kb. 200-300 bp körül. Az agaróz gélben történő elválasztás eredményét a (36. ábra) szemlélteti.



36. ábra: Emésztett PJET konstrukció vizsgálata emésztett és emésztetlen plazmid gélelektroforézissel történő elválasztásával

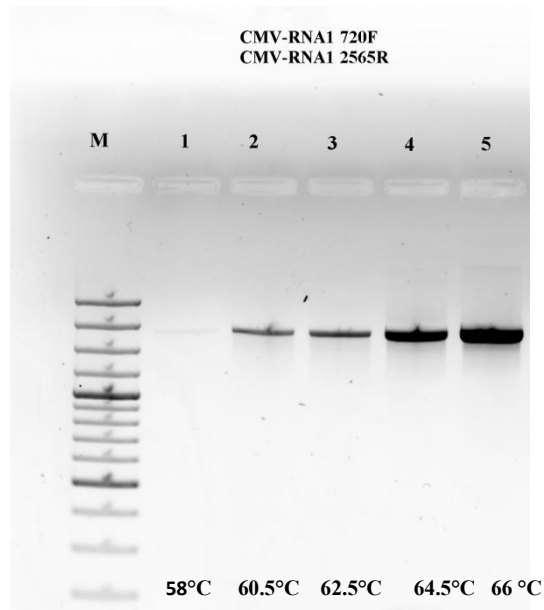
(Az emésztetlen zsebeket ET-vel jelöltem, az emésztetett pedig EM-el. A piros karikák pedig a beépült, vektorból kihasított plazmidokat jelzik)

4.6. Gradiens PCR Q5 enzimmel CMV primer kombinációkkal

A CMV genom mindhárom RNS-ére tervezett primerek kapcsolódási hőmérsékletének optimalizálására gradiens PCR reakciót indítottunk. A kapott PCR termékek méretének ellenőrzését agaróz gélelektroforézissel végeztem.

4.6.1 CMV RNS 1

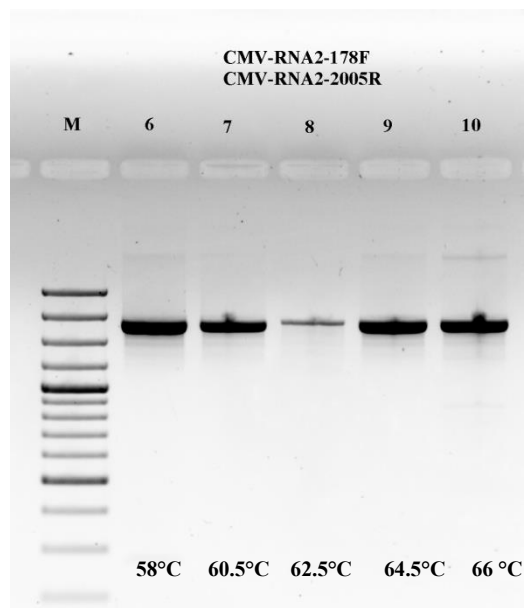
A CMV RNS 1 esetében a gradiens PCR során, 58 °C annealási hőmérsékleten nem kaptunk PCR terméket, a többi hőmérséklet optimálisnak bizonyult (37. ábra).



37. ábra: CMV RNS1 gradiens PCR eredménye

4.6.2. CMV RNS 2

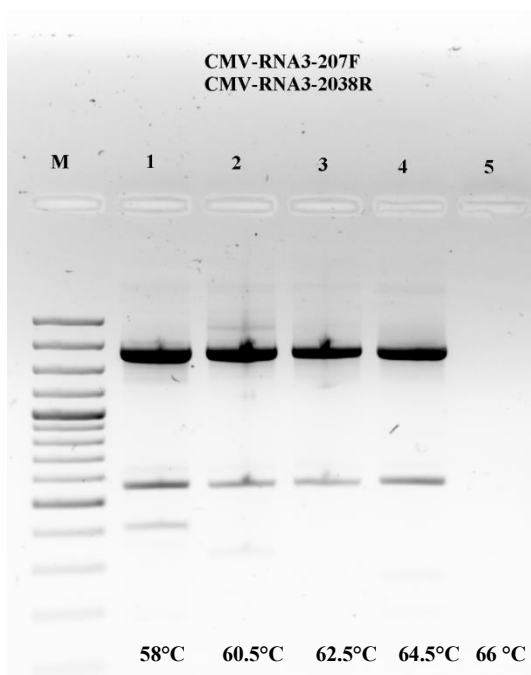
A CMV RNS 2 esetében a gradiens PCR során, minden vizsgált hőmérsékleten kaptunk PCR terméket (38. ábra).



38. ábra: CMV RNS 2 PCR termékek

4.6.3. CMV RNS3

A CMV RNS 3 esetében a gradiens PCR során, 66°C anellálási hőmérsékleten nem kaptunk PCR terméket, a többi hőmérséklet optimálisnak bizonyult (39. ábra).

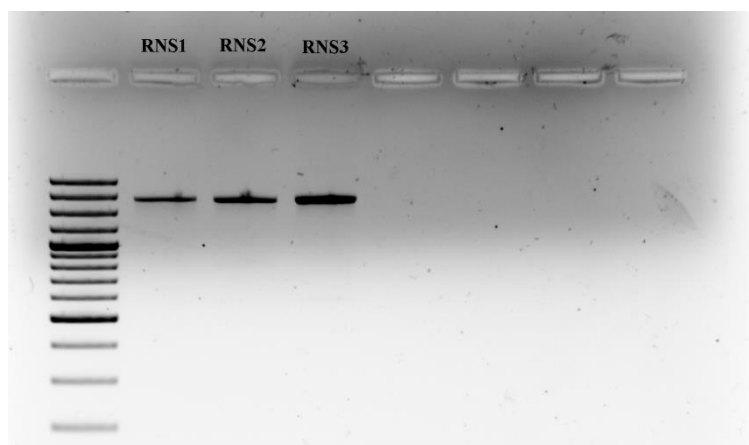


39. ábra: CMV RNS 3 gradiens PCR eredménye

A CMV RNS1, RNS2 és RNS 3 esetében is a 63 °C-ot állapítottuk meg optimális anellálási hőmérsékletnek.

4.7. Plazmid tisztítás

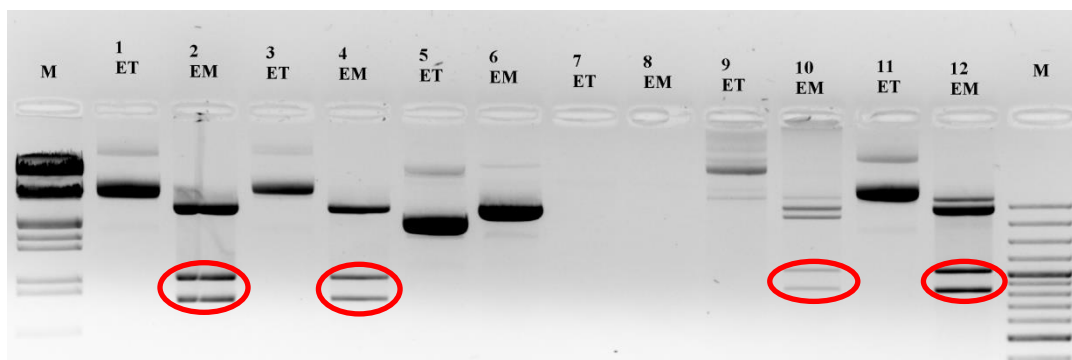
Mivel a primerek számára szinte valamennyi vizsgált hőmérsékleti érték optimálisnak bizonyult, valamint egy kiindulási PCR mixből indultunk ki, ezért RNS-enként a legerősebb jelet adó PCR termékeket gélből kitisztítottuk, majd a tisztított PCR terméket agaróz gélen megfuttatva ellenőriztük a géltisztítás eredményét (40. ábra).



40. ábra: Kitisztított CMV RNS1,2,3 PCR termékek vizsgálata a reakciótermékek gélelektroforézissel történő elválasztásával

4.8. Restriktációs emésztés

A kitisztított CMV PCR termékeket, klónoztam, majd a PJET konstrukciót emésztettem, és ellenőrzésként agaróz gélen történő elválasztást is elvégeztem. A gélben, a zsebekben az emésztett és emésztetlen minták itt is váltják egymást (41. ábra). A CMV RNS 2 esetében nem kaptunk eredményt a folyamat ismételése után sem, ezért a PCR termék szekvenálása mellett döntöttünk (BIOMI Kft.)



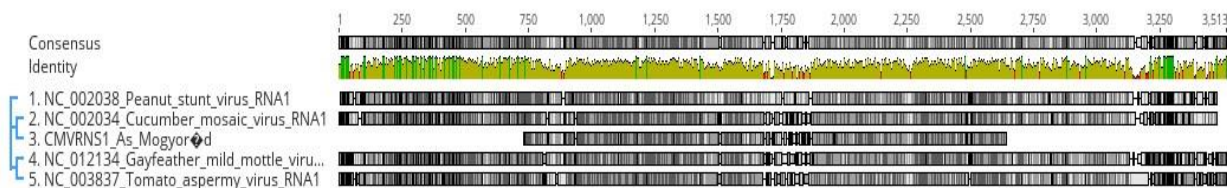
41. ábra: Emésztett PJET konstrukció vizsgálata emésztett és emésztetlen plazmid gélelektroforézissel történő elválasztásával. A piros karikák pedig a beépült, vektorból kihasított plazmidokat jelzik). Az 1,2,3,4 minták a CMV RNS1 plazmidot, az 5,6,7,8 minták a CMV RNS 2 plazmidot, a 9,10,11,12 minták pedig a CMV RNS 3 plazmidot tartalmazzák.

4.9.Szekvencia elemzés

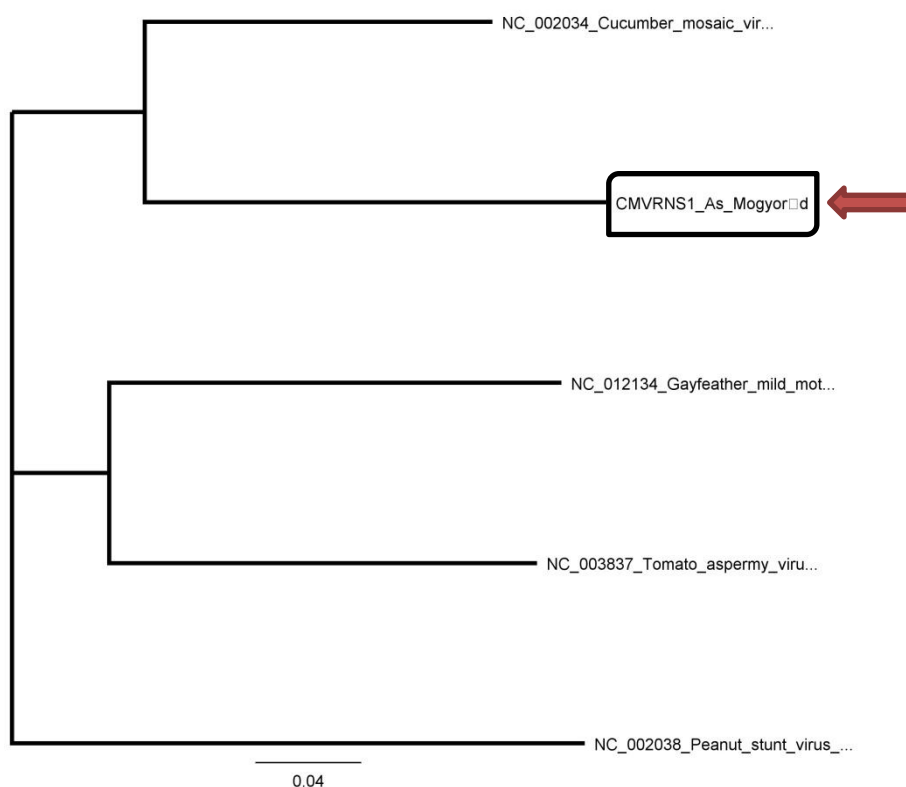
A kapott klónok szekvenciáját hagyományos Sanger szekvenálással a BIOMI Kft határozta meg. A szekvenciák elemzése alátámasztotta, hogy a vizsgált mintáinkban valóban a CMV vírus és a HSVd viroid van jelen.

4.9.1. CMV RNS 1

A szekvencia elemzés során a Genius Prime programot használtam. Az elemzés során a megkapott mogyoródi *Asclepias syriaca* mintából származó CMV RNS1 genomot hasonlítottam össze NCBI-ből származó CMV RNS1, a *Tomato aspermy virus* RNS1, *Peanut stunt virus* RNS1, és *Gayfeather mild mottle virus* RNS1 referencia genomokkal. A (42. ábra) bemutatja a genomok közötti hasonlóságokat.



42. ábra: Különböző vírusok (CMV, Mogyoródi As CMV, *Tomato aspermy virus*, *Gayfeather mild mottle virus*, *Peanut stunt virus*) RNS 1 genom összehasonlítások



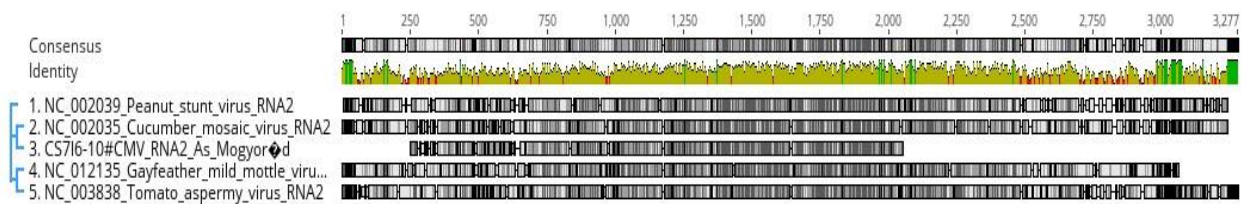
43. ábra: Filogenetikai fa segítségével vizsgált vírusok RNS 1 genomjainak rokonsági viszonyai

A Genius Prime program segítségével filogenetikai fa megrajzolására is lehetőségem volt, mellyel szemléltethetem, hogy a vizsgált CMV RNS1 Mogyoródi As minta legközelebbi rokonságban a CMV RNS1 genommal áll (43. ábra).

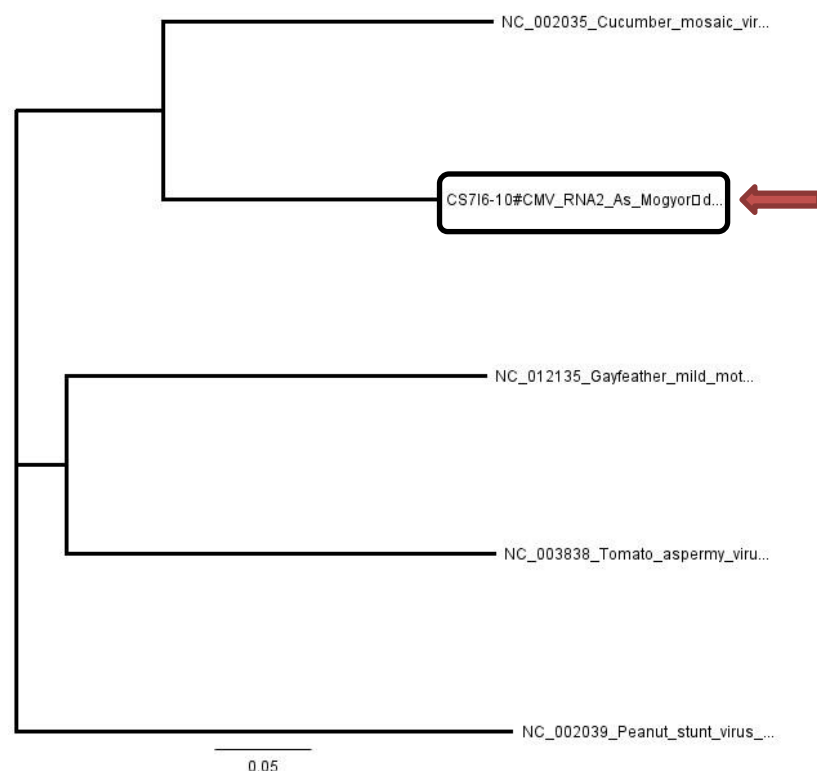
4.9.2. CMV RNS2

Az elemzés során a megkapott Mogyoródi *Asclepias syriaca* mintából származó CMV RNS 2 genomokat is összehasonlítottam az NCBI-ből származó CMV RNS2, a *Tomato aspermy*

virus RNS2, *Peanut stunt virus* RNS2, és a *Gayfeather mild mottle virus* RNS2 referencia genomokkal. A (44. ábra) a genomok közötti hasonlóságokat szemlélteti.



44. ábra: Különböző vírusok (CMV, Mogyoródi As CMV, *Tomato aspermy virus*, *Gayfeather mild mottle virus*, *Peanut stunt virus*) RNS 2 genom összehasonlítások

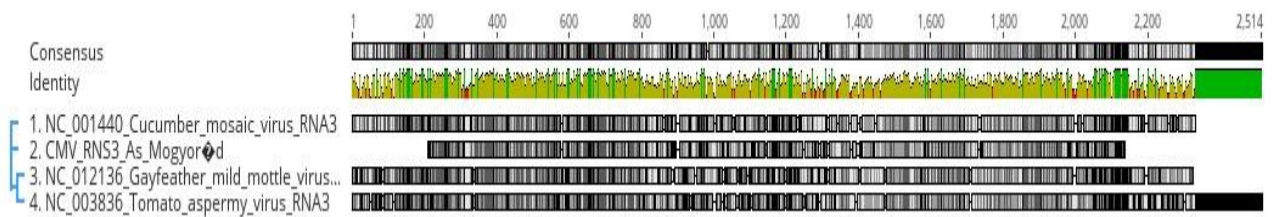


45. ábra: Filogenetikai fa segítségével vizsgált vírusok RNS 2 genomok rokonsági viszonyai
A Genious Prime program segítségével rajzolt filogenetikai fa felhasználásával szemléltetem, hogy a vizsgált Mogyoródi As CMV RNS2 mintám a legközelebbi rokonságban a CMV RNS 2 genommal áll (45. ábra).

4.9.3. CMV RNS3

Az elemzés során a megkapott mogyoródi *Asclepias syriaca* mintából származó CMV RNS3 genomokat is összehasonlítottam az NCBI-ből származó CMV RNS3, a *Tomato*

aspermy virus RNS3, *Peanut stunt virus* RNS3, és *Gayfeather mild mottle virus* RNS3 referencia genomokkal. A (46. ábra) bemutatja a genomok közötti hasonlóságokat.



46. ábra: Különböző vírusok (CMV, Mogyoródi As CMV, *Tomato aspermy virus*, *Gayfeather mild mottle virus*, *Peanut stunt virus*) RNS 3 genom összehasonlítások



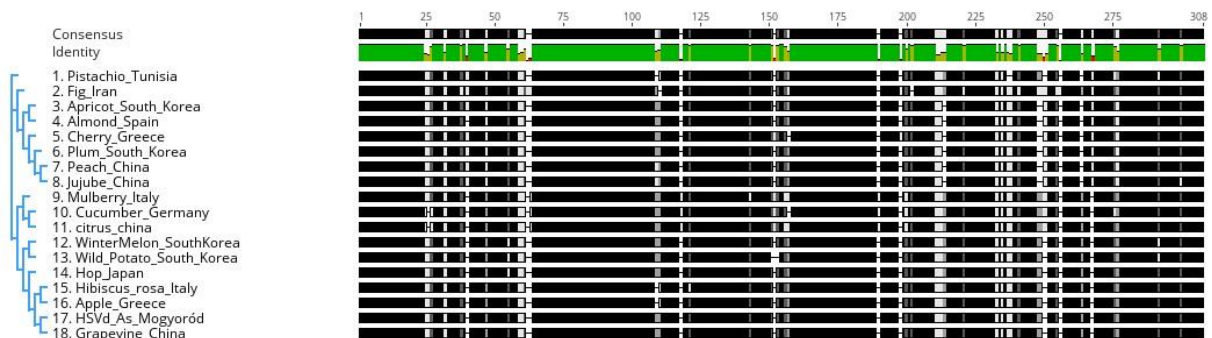
47. ábra: Filogenetikai fa segítségével vizsgált vírusok RNS 3 genomjainak rokonsági viszonyai

A Genious Prime program által elkészített filogenetikai fa szemlélteti, hogy a vizsgált CMV RNS3 Mogyoródi selyemkóróban jelenlevő CMV is legközelebbi rokonságban a CMV RNS3 genommal áll (47. ábra).

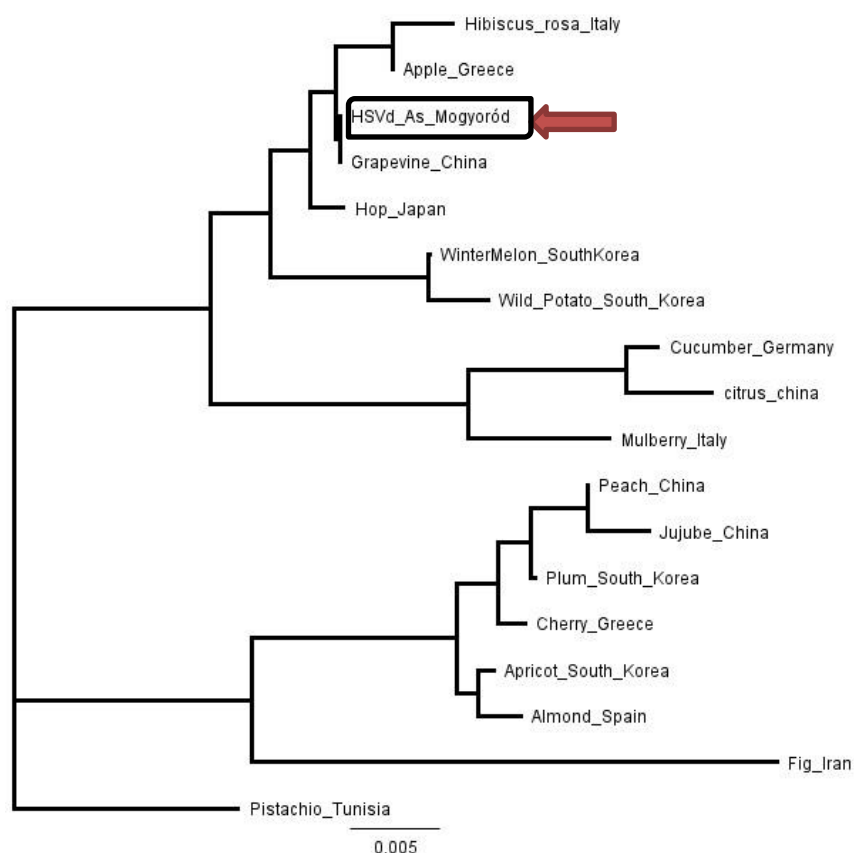
4.9.4. HSVd

Az elemzés során a mogyoródi *Asclepias syriaca* mintából származó HSVd genomot is összehasonlítottam más HSVd genomokkal, hogy meg tudjam vizsgálni a közöttük lévő hasonlóságokat. Az összehasonlítás során használt HSVd genomok szekvenciáit

kültúrnövényenként a (Jo 2017) cikkből gyűjtöttem ki. A szekvenciák citromból (Citrus), szőlőből (Grapevine), szilvából (Plum), kajszibarackból (Apricot), őszibarackból (Peach), meggyből (Cherry), almából (Apple), komlóból (Hop), görögdinnyéből (W.Melon), uborkából (Cucumber), hibiszkusból (Hibiscus), szederből (Mulberry), pisztáciából (Pistachio), fügéből (Fig), datolyából (Jujube), burgonyából (Potato), mandulából (Almond) származnak. A (48. ábra) szemlélteti a különböző genomok közötti hasonlóságokat.



48. ábra: Különböző kultúrnövényekből származó HSVd genomok összehasonlítása



49. ábra: Filogenetikai fa segítségével vizsgált különböző HSVd genomok rokonsági viszonyainak bemutatása

A Genious Prime program segítségével megkapott filogenetikai fa jól szemlélteti, hogy a keresett HSVd Mogyoródi genom legközelebbi rokonságban egy szőlőből származó HSVd genommal áll (49. ábra). A kapott eredményt alátámaszthatja az is, hogy a mogyoródi minta szőlő ültetvény mellől lett begyűjtve.

5. Következtetések és javaslatok

A termények hozamát direkt módon minőségi és mennyiségi szempontok alapján is befolyásolják a gyomnövények, mivel versenyeznek velük a vízért, tápanyagokért stb. Indirekt módon is azonban képesek azt befolyásolni, azáltal, hogy a növényi patogének gazdanövényei, vagy rezervoárai lehetnek illetve köztesgazdái vagy nyári tápnövényei lehetnek vírus vektoroknak. Abban az esetben, amikor a megfelelő tápnövények nincsenek jelen, akkor a növénypatogének képesek a gyomnövényeket rezervoárként használni.

A gyomnövények is számos rovarvektor tápnövényei lehetnek. A levéltetvek például életciklusuk során átvándorolhatnak különböző növény családokra, fajokra is, amelyek egyaránt lehetnek kultúrnövények vagy gyomnövények, és ez a tulajdonságuk hozzásegíti a vírusok könnyű terjedését egyik növényről a másikra (Kazinczi et al. 2001; Wisler és Norris 2005; Alexander et al. 2014).

A selyemkóróban CMV fertőzéseket már leírtak évekkel ezelőtt is, de az irodalomban utalás eddig még soha nem történt selyemkórót fertőző szőlő vírusról (GPGV), vagy viroid fertőzésről. Kutatásaim során selyemkóró gyomnövényből mégis számos jelentős vírust (CMV, HSVd, GPGV, SVBV) is sikerült kimutatnom vírusdiagnosztikai eljárások segítségével. Kis RNS HTS módszerét hazánkban nem sok helyen alkalmazzák, csak a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Diagnosztikai csoportja végez ilyen jellegű kimutatásokat Magyarországon. Az említett kutatócsoport egyik jelentős publikációja is bizonyította gabonátlában gyomnövényként jelenlevő köles, vírus rezervoár szerepét, szintén kis RNS HTS módszerrel (Pasztor et al. 2020).

A vírusok, viroidok reprodukciója, a gazdanövény normális sejtműködéseire vannak utalva, ráadásul nem rendelkezünk olyan módszerrel, mellyel a vírusokat az ültetvényekből képesek lennénk eltávolítani. A vírusos megbetegedések elleni védekezési stratégiák a növényi vírusok és viroidok esetén a megelőző kezelésekre irányulnak, és csak ezek kombinációjával várhatunk el megfelelő hatást. Fontos szempontok lehetnek a rezisztenciára nemesítés, vektorok elleni megfelelő védekezési módszerek alkalmazása, és mechanikai gyomszabályozás.

Kutatásaim során bizonyítottuk, hogy a gyomok fertőzöttek lehetnek vírusokkal, és mivel át tudnak telelni bennük, potenciális fertőzési forrásai a vírusoknak, vagyis vírusrezervoárként is működhetnek. Növényvédelmi és gazdasági szempontból is tehát fontos megelőző védekezésnek bizonyul a gyomnövények megfékezése a művelt területeken, és a közeli ruderális területeken egyaránt (Byron et al. 2019).

6. Összefoglalás

A vírusok képesek megfertőzni a termesztett és vadon élő növények minden fajtát, az általuk okozott megbetegedések pedig hatalmas károkat (alacsonyabb hozam, gyengébb termékminőség, gazdasági veszteség) okozhatnak hazánkban, és az egész világon egyaránt. Rendkívül fontos feladatunk tehát, hogy megismerjük, és megértsük viselkedésüket, tulajdonságaikat, valamint, hogy felismerjük a jelenlétüket. A vírusos megbetegedések helyes diagnosztizálása általában laboratóriumi vizsgálatokat igényel.

A selyemkóró (*Asclepias syriaca*), egy olyan invazív gyom, mely ma már kultúrnövényeink egyik jellemző gyomnövénye, és a vektor szervezetek is előszeretettel fogyasztják, illetve köztesgazdaként vagy nyári tápnövényként használják fel. Felmerül bennünk a kérdés tehát, hogy gyomnövényeink is tartalmaznak-e gazdasági kárt okozó vírusokat, vagyis a selyemkórónak lehet-e szerepe, mint vírus rezervoár.

Munkám során mogyoródi szőlőültetvény mellett található selyemkóró mintákat, és keszthelyi gabonatábla mellől gyűjtött selyemkóró mintákat vizsgáltam vírusdiagnosztikai módszerekkel. A mintákból először is kis RNS könyvtárak nagyáteresztő képességű szekvenálásával nagymennyiségű szekvencia adathoz jutottunk, amelynek bioinformatikai elemzését végeztem el. Az elemzés során mindkét helyről érkező minták esetében contigokat (átfedő szekvenciákat tartalmazó kis RNS olvasatok összeépítése hosszabb olvasatokká) építettünk, és ezeket az ismert referencia genomokhoz illesztve számos vírustalálatot kaptunk, melyek közül a legjelentősebbeket választottuk ki. A bioinformatikai elemzéssel kapott vírustalálatok visszaigazolásához RT-PCR-t alkalmaztam, a PCR termékek tisztítása és klónozása utáni szekvenálását a BIOMI Kft. végezte el. A visszaigazolást csak a mogyoródi minták esetében végeztem el, a bioinformatikai elemzés és az RT PCR reakció eredményei egymással korrelációban voltak. A keszthelyi minták esetében további vizsgálatok szükségesek a vírusok visszaigazolására. A Genius Prime program segítségével elvégeztem a mintáim szekvencia elemzéseit úgy, hogy más vírusok referencia genomjaival hasonlítottam össze, majd filogenetikai fa segítségével szemléltetem a vizsgált rokonsági kapcsolatokat.

A HSVd viroid detektálása különösen jelentős találatnak bizonyult, ugyanis eddig kevés információ állt rendelkezésünkre a jelenlétéről, illetve egy szőlőskertből származó vírussal mutatott legközelebbi rokonsági kapcsolatot, mely összefüggésben lehet azzal a ténnyel, hogy a mi mintánk is egy szőlő terület mellől származik.

Összességében elmondható, hogy a kutatásaim során igazoltam számos vírus és egy viroid jelenlétét gyomnövényben, mely vírusrezervoárként is szolgálhat szőlő ültetvényeken, vagy

szántóföldi kultúrákban, növelve ezáltal a kultúrnövények növényi vírusokkal és viroidokkal történő megfertőződésének kockázatát.

Irodalomjegyzék

1. Alexander, H. M., Mauck, K. E., Whitfield, A. E., Garrett, K. A., és Malmstrom, C. M., (2014). Plant-virus interactions and the agro-ecological interface. *European Journal of Plant Pathology*, 138 (3): 529–547.
2. Bagi I. (1999) A selyemkóró (*Asclepias syriaca* L.)- Egy invazív faj biológiája, a védekezés lehetőségei. *Kitaibelia*, 4.évf.2.szám.pp289-295
3. Barba, M., Czosnek, H., és Hadidi, A. (2014). Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses*, 6 (1): 106–136.
4. Bálint M.. (2006) *Molekuláris biológia I-II.* Műszaki Kiadó, Budapest, 414p.
5. Behjati, S., és Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition*, 98 (6): 236–238.
6. Bertazzon, N., Filippin, L., Forte, V., és Angelini, E. (2015). Grapevine Pinot gris virus seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy. *Archives of Virology*, 161 (3): 711–714.
7. Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186: 20–31.
8. Byron, M., Treadwell, D., és Dittmar P.(2019). Weeds as reservoirs of plant pathogenes affecting economically important crops. *Horticultural Sciences Department.Publication: HS1335*
9. Campbell, R.N. (1996) Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 34:87-108.
10. Cann, A.J, (2016) *Principles of Molecular Virology*. 6th ed., Elsevier, 308p.
11. Day, M.F., Irzykiewicz, H. (1954) On the Mechanism of Transmission of Non-Persistent Phytopathogenic Viruses by Aphids. *Australian Journal of Biological Sciences* 7 (3): 251 - 273.
12. Dimmock, N.J., Easton, A.J., Leppard, K.N. (2007): *Introduction to Modern Virology*.6th ed., Blackwell Publishing, 536 p.
13. Fajardo, T. V. M., Eiras, M., és Nickel, O. (2017). First report of Grapevine Pinot gris virus infecting grapevine in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 12 (1)
14. Flores, R., Delgado, S., Gas, M.-E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S., & De la Peña, M. (2004). Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Letters*, 567 (1): 42–48.
15. Flores, R., Serra, P., Minoia, S., Di Serio, F., és Navarro, B.(2012). Viroids: from genotype to phenotype just relying on RNA sequence and structural motifs. *Frontiers in Microbiology*, 3.
16. Hataya, T., Tsushima, T., Sano T. (2017): Hop stunt viroid. *Viroids and Satellites*, Pages 199-210
17. Horváth J. és Gáborjányi R. (2000): *Növényvírusok és virológia vizsgálati módszerek.* Mezőgazda Kiadó, Budapest, 426 p
18. Hull, R (2002). *Matthews' Plant Virology*. (San Diego, California, USA: Academic Press),1029 p
19. Jo, Y., Chu, H., Kim, H., Cho, J. K., Lian, S., Choi, H., Kim, S.M., Kim, S.L., Lee B.C., és Cho, W. K. (2016). Comprehensive analysis of genomic variation of Hop stunt viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 148 (1): 119–127.

20. Jones, R.A.C. (2009): Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research*, 141 (2): 113-130.
21. Kazinczi G., Horváth J., és Lesemann, D.E. (2002) Perennial plants as new natural hosts of three viruses. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Journal of Plant Diseases and Protection* 109 (3): 301-310.
22. Kucsera J. és Kevei F. (2010): *Mikrobiológia I.* JATEPress, Szeged, 302 p.
23. Lecoq H., és Desbiez C. (2012) Viruses and Virus Diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin. in *Advances in Virus Research*, 592 p
24. Lu, Y., Shen, Y., Warren, W., & Walter, R. (2016). Next Generation Sequencing in Aquatic Models. *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*, 173 p
25. Marquez-Molins, J., Gomez, G., és Pallas, V. (2020). Hop stunt viroid: A polyphagous pathogenic RNA that has shed light on viroid–host interactions. *Molecular Plant Pathology*, 22 (2): 153–162.
26. Massart, S., Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnikar, M., Reynard, J.S., Rumbou, A., Saldarelli, P., Škorić, D., Vainio, E.J., Valkonen, J.P.T., Vanderschuren, H., Varveri, C., Wetzels, T. (2017). A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies. *Frontiers in Microbiology*, 8.
27. Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H., Candresse, T. (2014). Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research*, 188:90-96.
28. Mochizuki, T., Ohki, S.T. (2012): Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants. *Molecular plant pathology* 13 (3): 217-225.
29. Ng, J.C.K. és Falk, B. W. (2006). Virus-Vector Interactions Mediating Nonpersistent and Semipersistent Transmission of Plant Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 44 (1): 183–212.
30. Ohno, T., Takamatsu, N., Meshi, T., és Okada, Y. (1983). Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. *Nucleic Acids Research*, 11 (18): 6185-6197.
31. Pasztor Gy., Galbacs Zs.N., Kossuth T., Demian E., Nadasy E., Takács A.P., Varallyay É. (2020). Millet Could Be both a Weed and Serve as a Virus Reservoir in Crop Fields. *Plants*, 9 (8): 954.
32. Riesner, D. és Gross, H. J. (1985). Viroids. *Annual Review of Biochemistry*, 54 (1): 531–564.
33. Salamon P.(1986) *Asclepias syriaca* L., az uborka mozaik vírus (cucumber mosaic vírus) rezervoár gazdája Magyarországon. *Kertgazdaság*, 1986, XVIII (2): 45-59.
34. Saldarelli, P., Gualandri, V., Malossini, U., és Glasa, M. (2017) Grapevine Pinot gris virus. Springer International Publishing AG 2017 351. B. Meng et al. (eds.), *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management.*, pp.351-363
35. Sano, T. (2013). History, origin, and diversity of hop stunt disease and Hop stunt viroid. *Acta Horticulturae*, 101087-101096.
36. Sastry, K.S. (2013): *Seed-borne plant virus diseases.* Springer India, 328 p.
37. Stackhouse, T., Waliullah, S., Oliver, J. E., Williams-Woodward, J. L., & Ali, M. E. (2021). First Report of Hop Stunt Viroid Infecting Citrus Trees in Georgia, USA. *Plant Disease*, 105 (2): 515–515..

38. Stevens, W.A. (1983) Transmission of Plant Viruses. In: Stevens, W.A. (ed.) Virology of Flowering Plants. Tertiary Level Biology. Springer, Boston, 41-68 p., 183 p.
39. Tarquini, G., Zaina, G., Ermacora, P., De Amicis, F., Franco-Orozco, B., Loi, N., Martini, M., Bianchi, G. L., Pagliari, L., Firrao, G., Paoli, E.,D., Musetti, R. (2019). Agroinoculation of Grapevine Pinot Gris Virus in tobacco and grapevine provides insights on *viral pathogenesis*. Plos one, 14 (3): e0214010.
40. Trebicki, P. (2020). Climate change and plant virus epidemiology. Virus Research, 198059.
41. Tzfira, T., Rhee, Y., Chen, MH., Kunik, T., Citovsky, V. (2000) Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. Annu Rev Microbiol 54: 187-219.
42. Wisler, G. C., és Norris, R. F., (2005). Interactions between weeds and cultivated plants as related to management of plant pathogens. Weed Science, 53 (6): 914–917.
43. Zaitlin, M. (1998). The discovery of the causal agent of tobacco mosaic disease. Discoveries in Plant Biology. S.D. Kung and S.F. Yang, eds. World Publishing Co. Ltd. Hong Kong, p 105-110

Internetes források

- http1:** https://viralzone.expasy.org/135?outline=all_by_species
- http2:** http://eta.bibl.u-szeged.hu/3048/5/3A_A%20v%C3%ADrusok%20%C3%A1ltal%C3%A1nos%20jellemz%C3%A9se%2C%20szervez%C5%91d%C3%A9s%C3%BCK%2C%20a%20v%C3%ADrusfert%C5%91z%C3%A9s%20%C3%A9s%20a%20vegetat%C3%ADv%20f%C3%A1zis%20lefoly%C3%A1sa.pdf
- http3:** https://www.researchgate.net/figure/6-Comparison-of-reference-assembly-and-de-novo-assembly-A-Reference-assembly-maps_fig4_321179957
- http4:** https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-57706-7_17
- http5:** [https://hu.wikipedia.org/wiki/Selyemk%C3%B3r%C3%B3_\(n%C3%B6v%C3%A9nyfaj\)](https://hu.wikipedia.org/wiki/Selyemk%C3%B3r%C3%B3_(n%C3%B6v%C3%A9nyfaj))
- http6:** <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-cloning/clonejet-pcr-cloning-kit.html>
- http7:** <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/pdlessons/Pages/Cucumbermosaic.aspx>
- http8:** <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/introduction/Pages/PlantViruses.aspx>

Köszönetnyilvánítás

Legelsőként szeretnék köszönetet mondani Dr. Várallyay Évának és Nagyné Dr. Galbács Zsuzsannának a munkám során nyújtott szakmai vezetését és a kutatás elvégzéséhez szükséges körülmények biztosításáért.

Köszönettel tartozom továbbá, a munkámba fektetett bizalomért, a rengeteg tanácsért és a dolgozatom lelkiismeretes javításáért.

Köszönettel tartozom Dr. Bán Ritának a munkám során nyújtott segítségért és javaslatokért.

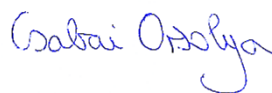
Köszönettel tartozom az intézet összes dolgozójának, akik valamilyen formában segítették munkámat.

NYILATKOZAT

Alulírott Csabai Orsolya, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus, Nővényorvos szak nappali/levelező* tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy Záródolgozatom/Szakdolgozatom/Diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön az Egyetem honlapjára és hogy a digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető Tanszéken/Intézetben, illetve az Egyetem központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

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

Kelt: 2022. 04. 24.



Hallgató

NYILATKOZAT

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom*.

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

Kelt: 2022. 04. 24.



Belső konzulens

***Kérjük a megfelelőt aláhúzni!**