

Állatorvostudományi Egyetem

Zoológiai Tanszék

**A Rubus sárga érhálósodás vírus detektálása és magyarországi
variánsainak vizsgálata**

Grób Adél Borbála

Témavezető: Dr. Várallyay Éva

Tudományos tanácsadó

**MATE Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszék, Genomikai
Kutatócsoport**

Belső konzulens: Dr. Pásztory-Kovács Szilvia

Tudományos munkatárs

Állatorvostudományi Egyetem, Biológiai Intézet, Zoológiai Tanszék

2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	5
Növényi vírusok	5
RNS interferencia.....	6
Növényi vírusdiagnosztika.....	6
Málna és vírusai	9
Badnavírusok.....	11
Rubus sárga érhálósodás vírus	13
Célkitűzés.....	16
Módszerek.....	17
Mintagyűjtés.....	17
Nukleinsav tisztítás	18
DNS tisztítás	18
RNS tisztítás.....	18
Nagy-áteresztőképességű szekvenálás és a kapott szekvenciák bioinformatikai elemzése .	19
A HTS eredmények független módszerrel való visszaigazolása	19
cDNS szintézis.....	19
A cDNS minőségének ellenőrzése (aktin teszt)	20
Primerek tervezése.....	21
Gradiens PCR	21
PCR termékek tisztítása.....	22
Klónozás	23
Szekvenciák elemzése és filogenetikai fa készítése	24
A vírus episzomális jelenlétének ellenőrzése.....	25
Eredmények	26
Bioinformatikai elemzés	26

siRNS HTS eredményének elemzése	26
A ribodepleted RNS szekvenálás eredményének elemzése	26
RYNV jelenlétének visszaigazolása a mintákban független módszerrel	27
Filogenetikai elemzés.....	31
A vírus episzomális előfordulásának ellenőrzése.....	32
Diskusszió	33
Összefoglalás	36
Abstract	37
Köszönetnyilvánítás	38
Irodalomjegyzék	39
Mellékletek	43

Rövidítések jegyzéke

DNS	dezoxi-ribonukleinsav
RNS	ribonukleinsav
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
RNSi	RNS interferencia
siRNS	kis interferáló RNS
RT-PCR	reverz transzkripció PCR
qPCR	valós idejű PCR
HTS	nagy áteresztőképességű szekvenálás
RpRSV	málna gyűrűsfoltosság vírus (raspberry ringspot virus)
ArMV	Arabis mozaik vírus (Arabis mosaic virus)
RMD	málna mozaikos megbetegedése (Raspberry Mosaic Disease)
RBDV	málna bokros törpülés vírus (raspberry bushy dwarf virus)
BRNV	fekete málna nekrosis vírus (black raspberry necrosis virus)
CMV	uborka mozaik vírus (cucumber mosaic virus)
RLMV	málna levéltarkulás vírus (raspberry leaf mottle virus)
RVCV	málna érklorózis vírus (raspberry vein chlorosis virus)
RYS	málna sárga foltosodás (raspberry yellow spot)
RYNV	Rubus sárga érhálósodás vírus (Rubus yellow net virus)
RVCV	málna érklorózis vírus (raspberry vein chlorosis virus)
CLRV	cseresznye levélsodródás vírus (cherry leaf roll virus)
SLRV	szamóca látens gyűrűsfoltosság vírus (strawberry latent ringspot virus)
TBRV	paradicsom fekete gyűrűs vírus (tomato black ring virus)
APMV	alma mozaik vírus (apple mosaic virus)
ORF	nyitott leolvasási keret
RCA	Rolling circle amplification
SYLSV	Spiraea yellow leafspot virus
NCBI	National Center for Biotechnology Information
dNTP	deoxy-nukleotid trifoszfát

Bevezetés

Növényi vírusok

A virológia mérföldköve a dohánymozaikvírus felfedezése volt 1892-ben, ugyanis ez volt az első olyan kórokozó, amelyet elkülönítettek a baktériumoktól és később a vírus nevet adták neki [1, 2]. Annak ellenére, hogy jelenlétük ismert és az újonnan megjelenő növényi megbetegedéseknek közel felét vírusok okozzák igen keveset tudunk diverzitásukról, ökológiai szerepükről. A vírusok elterjedését ráadásul a mezőgazdasági tevékenységek is befolyásolhatják [3]. Ez napjainkban jelentős kérdés, hiszen a szárazföldi területek közel harmadán mezőgazdasági ültetvényeket, vagy ültetett legelőket találunk és ez várhatóan még inkább bővülni fog, ahogy a humán populáció növekszik [4]. A vadon élő növényekből vírusok kerülhetnek a termesztett növényekbe, de akár fordítva is történhet ez az áramlás és a vadon élő növényeket is fertőzhetik az odahurcolt növényi vírusok. A kutatások főként a vírusok termesztett növényekben betöltött szerepéről szólnak, azonban működésük, terjedésük megértését jelentősen korlátozzák hiányos ismereteink a vírusszerek vadon élő növényi közösségekben való előfordulásáról. Mivel általában a tüneteket okozó vírusokat írták le és kutatták a haszonnövényekben is, így a tünetmentes kórokozókról még kevesebbet lehet tudni. Ezek megismerése azért is fontos, mert bizonyos vírusok egyes növényekben képesek tüneteket előidézni, míg más gazdafajokban nem [5].

Manapság 15037 referencia vírusgenom található meg az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisában, ezek közül 1821 fertőzi a szárazföldi növényeket (Embryophyta klád) [6]. Ez a szám folyamatosan növekszik a metagenomikai kutatásoknak hála. A vírusok a termesztett növényekre igen nagy veszélyt jelenthetnek, a mezőgazdaságban bekövetkező gazdasági veszteségek 10-15%-át okozhatják [7]. A növényi vírusok többféle úton is bejuthatnak a sejtekbe. Terjedhetnek mechanikai sérüléssel, rovar, vagy fonalféreg vektorok segítségével, illetve akár növényparazita gombák révén is [8]. A gazdasejtbe kerülés után megtörténik a vírusgenom transzlációja, replikációja, majd az utódrészecskék összeállítása, végül pedig a gazdaszervezet inváziója a vírusrészecskék, vagy a ribonukleoprotein komplexek sejtközi mozgása révén. Ez után különböző vektorokkal kerülhet át új gazdaszervezetbe a vírus, vagy bizonyos esetekben a gazdanövény következő generációját is fertőzheti a magon keresztül [9].

RNS interferencia

A növények fő védekezési mechanizmusa a vírusok ellen az RNS interferencia (RNSi). Ez az eukarióták között széles körben elterjedt szabályozási mechanizmus, mely során a növény felismeri az idegen RNS-eket és azokat szekvenciaspecifikusan lebontja, vagy meggátolja transzlációjukat a sejtekben [10]. A géncsendesítés igen változatos, történhet poszttranszkripcionálisan a célzott mRNS degradációjával, vagy a transzláció szekvenciaspecifikus gátlásával. Ezen kívül beszélhetünk transzkripció géncsendesítéséről is, mely a hisztonfehérjék metilációját jelenti, így a célgének átíródásának gátlása révén valósul meg [11, 12]. A géncsendesítés folyamatát a duplaszálú RNS molekulák jelenléte indítja el, melyek a vírus replikációja során keletkeznek. Ezeket a citoplazmában jelen levő Dicer enzimek hasítják kis interferáló RNS-ekre (siRNS), melyek 21-24 nukleotid hosszúak. A siRNS-ek egyik szála egy RNS indukált ribonukleoprotein komplexbe, a RISC-be kötődik. A RISC katalizálja a célzott RNS hasítását az RNS interferencia során. A RISC egyik legfontosabb tagja az Argonaute fehérje, mely endonukleotikusan hasítja a siRNS-sel komplementer RNS-eket, és így a célzott RNS-ek represszióját, illetve degradációját okozza [11, 13, 14]. Ezt a mechanizmust felerősíti, hogy az így létrehozott siRNS-ekből RNS-függő RNS-polimerázok duplaszálú RNS-t hoznak létre, melyeket újabb Dicer enzimek hasítanak és újból bekerülnek az RNS csendesítés folyamatába [14]. A géncsendesítés a kórokozóra specifikus immunmechanizmusokat indukál, így ezt a folyamatot a növényi adaptív immunitáshoz sorolják [15].

A növényi védekezés elkerülése érdekében a vírusok is kifejlesztettek különböző mechanizmusokat. Ilyenek az RNS interferenciát gátló virális szupresszorok (VSR), melyek rendkívül sokfélék és az RNSi útvonal többféle effektorának aktivitását képesek gátolni mint például a vírus RNS felismerését, hasítását, vagy a RISC összeszerelődését, vagy az RNS amplifikációt [16].

Növényi vírusdiagnosztika

A vírusokat a baktériumokkal, vagy a gombákkal ellentétben nem lehetséges eltávolítani különböző növényvédő szerekekkel. Esetükben a különböző vírusvektorok elleni védekezés, valamint a vírusok detektálása a legfontosabb, hogy létre lehessen hozni vírusmentes szaporítóanyagot és el lehessen távolítani a fertőzött egyedeket. Számos diagnosztikai módszer rendelkezésünkre áll már a vírusok kimutatásához. [17–19].

A legegyszerűbb diagnosztikai módszer a tüneteken alapuló vizsgálat, mely a beteg növény szemrevételezésével történik. Ez azonban az esetek többségében nem egyértelmű, hiszen a vírustörzs, a gazdanövény faja, vagy fajtája, és a környezet is jelentősen befolyásolhatja a tüneteket. Ezen kívül vírusszerű tünetek is megjelenhetnek a növényeken kedvezőtlen időjárási körülményekre, szennyeződések, peszticidek, és nem vírusos kórokozók általi fertőzések hatására is. Bizonyos vírusok, vagy a vírusok nyugvó formái pedig nem feltétlen okoznak látható tünetet. Ezen kívül különböző vírusok okozhatnak hasonló tüneteket. Tehát ez a módszer az esetek többségében nem elegendő, azonban fontos kiegészítő információkat nyerhetünk vele a diagnosztizáláshoz [17].

Az egyik gyakran használt módszer a vírusok mechanikai, vagy vektoroktranszmisszióval való fertőzése különböző fogékony indikátornövényekre. Ez rendkívül időigényes módszer és számos nehézség adódik ebben az esetben is a vírusok felismerésénél, hiszen szintén a tüneteken alapul a diagnosztika [17].

Elektronmikroszkóp segítségével a vírusrészecskék láthatóvá tehetőek, morfológiájukat lehet meghatározni, ami alapján szintén sok vírust el lehet különíteni egymástól. Ennek a módszernek hátránya, hogy az alacsony koncentrációban jelenlévő vírusok nehezen megtalálhatóak és igen költséges, munkaigényes módszer, amely nagy gyakorlati tapasztalatot igényel [17].

A szerológia módszerek, mint az ELISA tesztek, specifikus, állati antitesteket használnak fel a kórokozó antigénjére reagáltatva. Ezeket a módszereket rutin diagnosztikai eljárásként alkalmazzák. A fertőzés mértékére az ELISA reakció során kialakuló színreakció intenzitása, az optikai sűrűsége alapján lehet következtetni. Előnye, hogy érzékeny módszer és egyszerre sok minta vizsgálható vele, valamint kis mennyiségű antitest elegendő hozzá és félig automatizálható az eljárás. Hátrányai közé tartozik azonban, hogy rendelkezünk kell az adott vírus fehérjéjét felismerő ellenanyaggal. Ezen kívül előfordulhat hamis pozitív eredmény is a nem specifikus reakciók, vagy keresztreaktivitás eredményeképp és közel rokon vírusok nem különíthetőek el használatával [18].

Az utóbbi években azonban egyre inkább a nukleinsavak kimutatásán alapuló molekuláris módszerek kerülnek előtérbe. Ilyenek a különböző PCR-en alapuló technikák. Az ilyen módszerek esetén a különböző vírusszekvenciára specifikus primerek segítségével el lehet különíteni a rokon vírusokat is, valamint reverz-transzkripció PCR (RT-PCR) segítségével az RNS vírusok is kimutathatóak. Multiplex PCR segítségével egyszerre több RNS-t, vagy DNS-

t is ki lehet mutatni egyetlen reakció során, nested PCR-rel, vagy kooperatív amplifikációval (co-operational PCR) pedig a nagyon alacsony koncentrációban jelen levő vírus is kimutatható. Ez utóbbi módszerek lényege, hogy egy cél RNS vagy DNS szakaszból két primer pár segítségével két különböző hosszúságú fragmentumot amplifikálhatunk, melyek szekvenciájukban átfednek egymással, így a PCR reakcióban több templát keletkezik, melyről átíródhat a kívánt termék. A valós idejű PCR (qPCR) segítségével jelentősen redukálhatjuk a detektálásra szánt időt, és a víruskoncentrációt is meghatározhatjuk, az izotermális amplifikációs módszerekkel pedig nem szükséges a PCR reakciók esetében használt három különböző hőmérséklet alkalmazása sem a DNS sokszorozása során [18, 20].

A legtöbb adatot egy növényi viromról nagy áteresztőképességű szekvenálás (HTS) segítségével nyerhetjük. Ez a technológia több minta együttes vizsgálatát is lehetővé teszi, melyekből minden jelenlévő kórokozó kimutatható. ezen kívül jelentősen lecsökkenti a detektálás idejét, mivel több millió nukleotid szekvenciát kapunk rövid időn belül, és új vírusok kimutatása is lehetséges általa. A HTS során kapott hatalmas mennyiségű adat elemzéséhez azonban bioinformatikai módszerekre van szükség. Különböző nukleinsav templátokkal történhet a szekvenálás, ki lehet mutatni mind a siRNS-eket, mind a mintában található összes RNS-t, dupla szálú RNS-t, vagy vírusszerű részecskét (VLP). A leginkább költséghatékony eljárás a jelenlegi HTS technológiák közül az Illumina szekvenálás, melynél optikai detektálással történik a beépített bázisok azonosítása. Ezzel a szekvenáló eljárással érhetjük el a legkisebb hibaarányt. Azonban a HTS önmagában még nem ad elegendő bizonyosságot egy vírus jelenlétéről. Nincs egységes megegyezés arról, hogy hány, az adott vírusgenomra illeszkedő szekvencia szükséges egy növény fertőzöttnak nyilvánításához, így mindenképpen szükséges a talált kórokozó jelenlétének egy független módszerrel való kimutatása is [19, 21].

Rubus fajok és vírusaik



1. ábra Vörös málna (*Rubus idaeus*)

A termesztett málnák (*Rubus idaeus*, *R. occidentalis*) a rózsafélék (Rosaceae) családjának *Rubus* nemzetségébe tartozó növények. A *Rubus* genus 15 alnemzetségből áll, közülük a málnák az *Idaeobatus*ba tartoznak. Jellemzően kisebb és kevésbé erőteljes növények, mint közeli rokonuk a szeder (*Rubus fruticosus*), és a szárukon tüskék találhatóak. A *Rubus* fajokat jellemzően vegetatív úton szaporítják, így fokozottan kitettek vírusfertőzéseknek mind a szaporítás, mind a fejlődés, mind pedig a termésképzés időszakában [22].

Gazdaságilag is igen jelentős növény a málna, 2018-ban a globális termelése meghaladta a 820 000 tonnát, amelyet 125 000 hektáron termesztettek [23]. Egy 2020-ban készített felmérés szerint világpiaci szinten málnatermesztésben a vezető országok Oroszország, Mexikó és harmadikként Szerbia. Ez a három ország termeli a világ teljes málnatermésének közel 50%-át [24]. A vörös málna (*Rubus idaeus*) kereskedelmi célú nemesítése körülbelül 200 évvel ezelőtt kezdődött és a jelenlegi fajták többsége ugyanazzal a csíraplazmával rendelkezik, amely az 1800-as évek végére és az 1900-as évek elejére nyúlik vissza. Tehát a *Rubus* fajok művelésbe vonása a genetikai diverzitás csökkenését okozta és a modern fajták genetikailag nagyon hasonlóak egymáshoz [23]. Az 1980-as években Magyarország is az egyik legjelentősebb málnatermesztő volt, azonban azóta a termőterület mérete és a termelt mennyiség is jelentősen csökkent. Az 1990-ben még 7000 hektárnyi málnatermesztő terület 2014-re mindössze 500 hektárra csökkent, és az éves termelés egy- háromezer tonna körül mozog. Ennek oka többek között, hogy a gyümölcsfajok közül szinte a legmagasabb az egy hektárra jutó termelési költsége [25].

A 2000-es évek előtt teljes, vagy részleges molekuláris adatok a *Rubus* fajokat fertőző vírusokról egyedül a fonalférgek által terjesztett betegségekről voltak, mint például a málna

gyűrűsfoltosság vírus (raspberry ringspot virus – RpRSV) vagy az Arabis mozaik vírus (Arabid mosaic virus – ArMV). Azonban az újabb diagnosztikai módszerek mint a HTS térnyerésével lehetővé vált sok kórokozó kimutatása és szekvenciájának megismerése. Ugyanakkor sok vírus esetében csupán néhány izolátumot vizsgáltak, így ezen vírusok sokféleségéről igen korlátozottak az ismereteink és a diagnosztizálásukhoz használt módszerek megbízhatósága sem tudott [26].

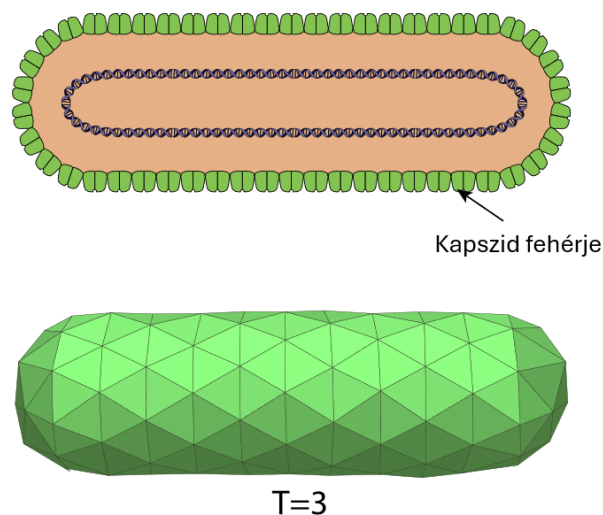
A málna megbetegedéseit főként a különböző víruskomplexek okozzák. Ilyen például a málna mozaikos megbetegedése (Raspberry Mosaic Disease - RMD), amelyet különböző, az *Amphorophora* nemzetségbe tartozó levéltetvek által terjesztett vírusok eredményeznek. A tünetek a jelenlévő vírusoktól és a növénykultúrától is függenek. A legsúlyosabb tüneteket fekete málnán (*Rubus occidentalis*) tapasztalták, ahol jelentős terméseszkökenéshez is vezethet a fertőzés. Vörös málnán kevésbé súlyos megbetegedést okoz, a vadon termő és termesztett szeder növényeknél pedig gyakran tünetmentes, habár a terméshozam és a gyümölcsök minőségének eszkökenéséhez vezethet. Ha a növény emellett málna bokros törpülés vírussal (raspberry bushy dwarf virus - RBDV) is fertőzött, akkor súlyos tüneteket is mutathat, mint például klorózt és fürtelhullást. Egyéb *Rubus* fajok is lehetnek ezen vírusok rezervoárjai, de egyelőre nem ismert a hatásuk más gazdanövényekre [26].

Ahhoz, hogy egy málna növényt vegetatív úton tovább szaporítsanak komoly tanúsítási rendszeren kell végigmennie, hogy a fajtájához hű, és vírusoktól, valamint egyéb betegségektől mentes szaporítóanyagnak minősítsék. Először is ki kell választani a fajtából a megfelelő egyedet vizuális szemrevételezés alapján, majd egy magállomány létrehozásához a növényeket tesztelik. A vírusmentesítés során hőkezelésnek, vagy merisztéma tenyésztésnek vetik alá a növényeket és ezután, ha bizonyítottan mentesek a legfontosabb vírusoktól, akkor használhatóak törzsültetvény alapításához. Az így létrehozott ültetvényt ezután olyan körülmények között tartják fenn, hogy csekély legyen a fertőződés esélye különböző levegőben, vagy talajban terjedő vektorok által. Ehhez minden növényt külön cserepekben, sterilizált termőközegben, szigorú ellenőrzés alatt tartanak, hogy levéltetvek, gombák mint például a koronagomba (*Agrobacterium tumefaciens*), a levélgomba (*Rhodococcus fascians*), és a lisztharmat (*Peronospora rubi*), valamint egyéb rovar kórokozók mint a málnavesszőszúnyog (*Resseliella theobaldi*) ne fertőzhessen meg a növényeket. A málnák állapotát rendszeres szemrevételezéssel ellenőrzik. Ezen kívül minden növényt egyenként tesztelnek a következő kórokozók jelenlétére: ArMV, RpRSV, RBDV, fekete málna nekrosis vírus (black raspberry necrosis virus- BRNV), uborka mozaik vírus (cucumber mosaic virus - CMV), málna

levéltarkulás (raspberry leaf mottle virus - RLMV), málna érklorózis vírus (raspberry vein chlorosis virus - RVCV), málna sárga foltosodás (raspberry yellow spot - RYS), Rubus sárga érhálósodás vírus (Rubus yellow net virus – RYNV), málna érklorózis vírus (raspberry vein chlorosis virus - RVCV), cseresznye levélsodródás vírus (cherry leaf roll virus - CLRV), szamóca látens gyűrűsfoltosság vírus (strawberry latent ringspot virus - SLRV), paradicsom fekete gyűrűs vírus (tomato black ring virus - TBRV), alma mozaik vírus (apple mosaic virus - APMV), *Sphaerulina rubi* és a különböző *Rubus* fajokat fertőző fitoplazmák. Minden olyan növényt, amely a diagnosztikai tesztek alapján negatív volt az előzőleg említett kórokozókra áthelyeznek egy hasonló körülményeket biztosító, de elszeparált helységbe. A szaporítóanyagból vett dugványokat szintén a fertőzéseket minimalizáló körülmények között nevelik, hogy certifikált növényeket hozhassanak létre belőlük [27].

A kórokozók kimutatását több módszer kombinálásával szokták végezni. Ilyen a mechanikus átoltás lágyszárú indikátor növényre, vagy oltás fás szárú indikátorokra, és a tünetek vizuális megfigyelése. A specifikus vírusokat molekuláris vagy szerológiai tesztekkel azonosítják, melyeket általában a lágyszárú indikátorok kivonatain végeznek el [27].

Badnavírusok



2. ábra Badnavírus felépítése [28]

A növényi pararetrovírusok közé, a Caulimoviridae családba tizenegy nemzetség tartozik. Ezek két különböző virion morfológiával rendelkeznek. A *Caulimovirus*, *Soymovirus*, *Solendovirus*, *Cavemovirus*, *Petuvirus*, *Rosadnavirus* és *Vaccinivirus* nemzetségbe tartozó fajok jellemzően 50 nm-es izometrikus (ikosaéderez), míg a *Badnavirus* és *Tungrovirus* genus tagjai bacilliform

(120-150 x 30 nm) részecskékkel rendelkeznek, amelyek köpenyfehérjét és kettős szálú DNS-t tartalmaznak (2. ábra). A részecskéket nem veszi körül membrán. Replikációjuk a retrovírusokhoz hasonlóan RNS intermediéren keresztül történik. A természetben általában rovarvektorok terjesztik ezen vírusokat, a Caulimovírusokat általában levéltetvek, míg a Badnavírusokat jellemzően lisztbogarak [29–31].

A Badnavírusok közé jelenleg 69 vírus tartozik [32]. Ezen vírusokkal fertőzött növények egyik fő tünete, hogy klorotikus elváltozások jelennek meg a növényi részekben. Jellemző továbbá ezekre a vírusokra, hogy cirkuláris, kettős szálú DNS-ük a replikációhoz szükséges reverz transzkriptáz is kódolja. Elsősorban trópusi és szubtrópusi területek növényeinek jellemző vírusai, ahol komoly kórokozói néhány termesztett növénynek is mint például a banán (*Musa* sp.), kakaó (*Theobroma cacao*), citrusfélék (*Citrus* sp.), cukornád (*Saccharum officinarum*), fekete bors (*Piper nigrum*), taro (*Colocasia esculenta*), yam (*Dioscorea* sp.), azonban a mérsékelt éghajlaton is előfordulnak [9, 30].

A tipikus genomi struktúrájuk három nyitott leolvasási keretből (ORF) áll, és az összes gént ugyanazon a szálon, de nem folytonosan kódolják. Az első ORF fajtól függően 399 és 927 bázispár hosszúságú, a második a legkisebb, 312 és 561 bázispár közötti, működésükről pedig nem tudunk sokat. A legtöbb kutatás a harmadik ORF-re irányul, amely hossza 5100 és 6000 bázispár között lehet és egy poliproteint kódol, amelyből az aszparaginsav-proteáz posztranszlációs hasítása révén négy, vagy öt termék keletkezik: mozgási és burokfehérje, aszparaginsav proteáz, RNáz H, valamint reverz transzkriptáz [30, 33].

A Badnavírusokra jellemző, hogy amellet, hogy fertőzőképes, episzomális formában vannak jelen a növényben, képesek inaktív formában, a genomba integrálódni illegitim rekombináció révén [9, 34, 35]. Az endogén forma abiotikus stressz hatására képes újra fertőzőképes, replikálódó formává alakulni [30]. Leggyakrabban azonban csupán kisebb szakaszok épülnek be a gazdafaj genomjába, melyek nem okoznak betegséget, és szerepük lehet a vírusrezisztenciában is [36]. A nemzetség tagjai igen heterogének genetikailag és szerológiaiilag, még ugyanazon faj egyedei is viszonylag alacsony nukleotid azonossággal rendelkeznek [37]. Ez a sokszínűség és az endogén forma lehetséges előfordulása jelentősen megnehezíti mind a szerológiai, mind pedig a nukleinsav-alapú kimutatásukat is [30].

Tehát a Badnavírusokat nem könnyű diagnosztizálni, hiszen nagyon különböző tüneteket idézhetnek elő a gazdafajokon, melyek súlyossága nagymértékben függ abiotikus tényezőktől is mint például a növény tápanyagellátottsága. Ezen kívül szűk gazdaspektrummal

rendelkezik, így az indikátor növényekre való átvitelük is nehézkes. Ezért tehát a tünetek vizuális vizsgálata nem elégséges a vírusdiagnosztikához. Kimutatásukra leggyakrabban PCR-en alapuló módszereket szoktak alkalmazni, azonban ezek sem ideálisak, hiszen a legtöbb esetben nem lehetséges ilyen módon elkülöníteni a vírus endogén és episzomális formáját. Az eddigi ismereteink alapján az egyik legjobb módszer az ilyen cirkuláris genommal rendelkező vírusok kimutatására a Rolling circle amplification (RCA), az in situ hibridizáció, az RT-PCR és az IC-PCR [30, 31, 38].

Rubus sárga érhálósodás vírus

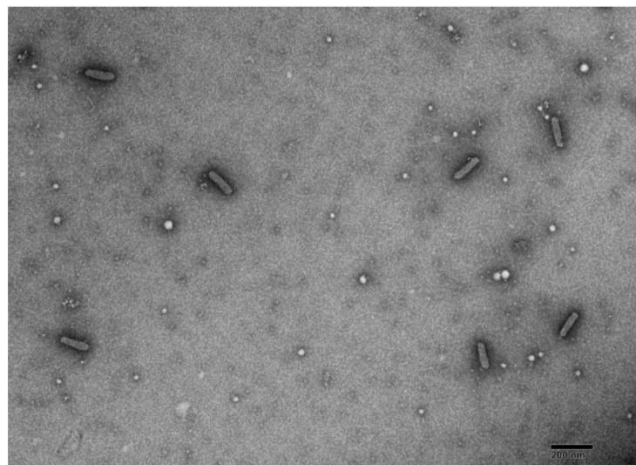
A RYNV a Caulimoviridae családba, a Badnavírusok közé tartozik[39]. Különböző *Rubus* fajokat képes fertőzni, melyeken a levélerezet elszíneződését okozza. Ahogy a neve is utal rá hálózatszerű klorózt okoz leveleken, ami miatt halványzöld színű lesz a növény és néhány levél lehet lefelé görbülő, de sok esetben tünetmentes marad a fertőzés [40]. A BRNV-vel, a RLMV-vel és a raspberry leaf blotch vírus-sal (RLBV) együttesen fertőzve kialakíthatja a málna mozaikos megbetegedését. Ez az esetek túlnyomó részében már különböző tünetekkel jár együtt [41].

Eddig málnában (*Rubus idaeus*) és a szederben (*Rubus fruticosus*) detektálták a jelenlétét Észak-Amerikában és Európában [42, 43]. A hibrid növényekben szintén előfordul [23]. Európában a nagy málnatetű, *Amphorophora idaei*, Észak-Amerikában pedig az *A. agathonica* terjeszti félig perzisztens módon [43]. Ezek a tetvek egyéb málnát fertőző vírust is terjesztenek és igen gyakoriak [44].

A RYNV esetében is bizonyították már, hogy a legtöbb Badnavírushoz hasonlóan képes a gazdagenomba integrálódni [34]. Az endogén RYNV szekvenciák rendkívül sokfélék lehetnek. Akár szinte a teljes vírusgenom szekvenciája, akár csupán kis szekvenciafragmentumként is előfordulhat a vírus a növényi genomban. Thien Ho és munkatársai kutatásuk alapján azt feltételezik, hogy ezen endogén vírusok hiányos genomjuk miatt nem képesek reaktiválódni [23]. Ez igen jelentős lehet a certifikáció során használt növényi vírusdiagnosztika szempontjából, hiszen el kell különíteni, hogy a RYNV-re pozitív teszt egy fertőzésre képes, vagy egy nem veszélyes endogén vírust mutat ki. Egy közelmúltban végzett kutatás Glen Dee málna fajtát tesztelte az eredeti, Jones és munkatársai által tervezett diagnosztikai primerekkel (RYN1F és RYN1R), majd több másik, részben általuk tervezett primerrel [45]. Ez egy kereskedelmi szempontból fontos málnafajta, melyet vírusmentes növényként tartanak fenn. Azt találták, hogy ezen málna genomjában legalább két, különböző RYNV eredetű beépült

szekvencia van és ezeket az eredeti, a vírus diagnosztikai kimutatására használt primerekkel nem lehet kimutatni. Ezen kívül elkülönítettek olyan primereket, amelyek segítségével meg lehet különböztetni az integrált és a funkcionális, fertőző vírusgenomot [45] (fertőző vírust kimutató primerek: RYN1F/RYN1R [43], epiBS-2604F/2715R[23]).

A RYNV részleges szekvenciáját először a 2000-es évek elején derítették fel (GenBank: AF468454). Vizsgálataikban a növényeken víruszerű tünetek jelentkeztek, majd elektronmikroszkóp segítségével bacilliform alakú részecskéket figyeltek meg (3.ábra). A vírusgenom egy erősen konzervált részét degenerált Badnavírusokra specifikus primerek segítségével szekvenálták és az eredményeik megerősítették, hogy a RYNV Badnavírus [43]. Az első genom szekvenciát (RYNV-Ca, GenBank: KF241951) két PCR amplikonból illesztették össze 2008-ban [46], majd 2015-ben vörös málnából szekvenálták RCA módszerrel előállított DNS felhasználásával [39]. Ezek után több RYNV szekvenciát is publikáltak már siRNS [33, 47] vagy teljes genom szekvenálás segítségével (MN245240).



3. ábra "Baumforth's Seedling A" málnából (epiRYNV-BS) származó RYNV bacilliform részecskéi, melyeket a Cukornád bacilliform vírus elleni ellenanyaggal kötöttek meg és foszfotungstinsavval festettek [48].

Az egyik legalaposabban jellemzett RYNV variánst, Kanadában a vírusra jellemző tüneteket mutató málna mintákból szekvenálták (kanadai (Ca) izolátum néven, GenBank azonosító: KF241951.1), melynek genomja 7932 bázispárból áll és hét feltételezett nyitott leolvasási keretet (ORF) tartalmazott, melyek közül öt a sense (pozitív) szálon található. Az ORF1 szekvenciája egy potenciálisan 210 aminosavból álló, 24 kDa-os, az ORF2 egy 17 kDa-os (153 aminosav) fehérjét kódol. Az ORF3 pedig egy 1971 aminosavból felépülő, 210 kDa molekulatömegű, nagy poliproteint kódol, ami a badnavírusok egyik jellemzője, míg a negyedik ORF egy 15 kDa-os (136 aminosav) fehérjét kódol. Az ORF4 átfed az ORF3 kódoló régiójával, míg az ORF5 szekvenciája az ORF 3-mal megegyező leolvasási keretben található

és potenciálisan egy 152 aminosavból álló, 17 kDa-os fehérjét kódol. Az ORF3 elemzéséből kiderült, hogy a RYNV igen hasonlít a Badnavírus nemzetség más tagjaira, melyeknél az ORF3 mozgásfehérjét, köpenyfehérjét, aszparaginsav-proteázt, reverz transzkriptázt és ribonukleáz H-t tartalmazó poliproteint kódol. Az antisense szálon két 10 kDa-nál nagyobb OFR-et feltételeznek, az ORF 6 egy 145 aminosavból álló 16,2 kDa-os, míg az ORF7 egy 143 aminosavból álló, 16,7 kDa-os fehérjét kódolhat, amely egy cinkujjszerű motívumot tartalmaz, mely gyakran a DNS, RNS, fehérje, vagy lipid szubsztrátok megkötésében részt vevő struktúra kialakításában vesz részt. A nem kódoló szakaszok hasonlóak voltak más Caulimoviridae családba tartozó vírus ezen régióihoz, azonosítottak egy TATA box-ot, az ehhez kapcsolódó CAP jelet, egy hexamer motívumot, egy as-1-like szekvenciát és egy GATA box motívumot [33].

Egy másik kutatás Európában gyűjtött málna mintákból igazolta vissza a vírus jelenlétét (Baumforth's Seedling A (BS) izolátum néven, GenBank azonosító: NC_026238.1), azonban több eltérést is tapasztaltak a kanadai mintákhoz képest. Ilyen például, hogy a genom rövidebb volt, 7836 bázispár hosszúságú, és a két variáns szekvenciája csupán 82%-os egyezést mutatott egymással. A BS izolátum genomja csak öt ORF-et tartalmazott, melyből az első 90%-ban, a második csak 81%-ban, a harmadik szintén 90%-ban egyezett meg a kanadai minta azonos számú ORF-jeivel, míg a negyedik 67%-os egyezést mutatott a kanadai minta hatodik ORF-jével. Az antisense szálon itt csupán egy ORF régiót találtak, mely egy 69 aminosavból álló fehérjét kódolhat (7,3 kDa molekulatömeg). Tehát ezen vírusból hiányzott az előzőleg azonosított ORF5 és ORF7. Az ORF5-höz hasonló rövid régiót találtak ugyan, de hiányzott belőle egy start és egy stop kodon, így ez nem valódi ORF és ehhez hasonlóan az ORF7-tel homológiát mutató rövid szakaszok is előfordultak. Azt feltételezik, hogy ez a két variáns a földrajzi elszigeteltségnek köszönhetően alakulhatott így ki [39].

Azóta több teljes RYNV genom szekvencia is elérhető már (GenBank: OK666525, MZ358192, MN245240), amelyek igen hasonlóak a RYNV BS szekvenciájához. A kanadai szekvencia azon régióját megvizsgálva, amely az ORF5-öt és az ORF7-et kódolhatja, feltételezik, hogy ez az ORF3 egy részének 370 bázispárnyi fordított ismétlődését tartalmazza [45].

Thien Ho és munkatársai 2024-ben megjelent cikkükben elkülönítenek hat endogén RYNV vonalat is. Ezeket azon málna fajtákról nevezték el, amelyekben elsőnek megtalálták őket. Mind a hat vonal genomja hiányos volt, és jelentős különbségeket mutattak szekvenciájukban [48].

Célkitűzés

Diplomamunkám célja tüneteket mutató *Rubus* növények viromjának felderítése nagy áteresztőképességű szekvenálás segítségével. További célom volt a HTS segítségével detektált *Rubus* sárga érhálósodás vírus (RYNV) jelenlétének igazolása molekuláris módszerekkel, és annak megállapítása, hogy a RYNV episzomális, fertőző, vagy a genomba épült és csak potenciálisan fertőző alakja van-e jelen.

Módszerek

Mintagyűjtés

Kutatásunk során a NÉBIH velencei Kutatóállomásán és pölöskei fajtakísérleti telepén gyűjtöttünk levélmintákat különböző málna fajtákról és indikátorokról. Az alábbi táblázatban (1.) láthatóak, hogy mely fajtákat vizsgáltuk. A 2018-ból, Velencéről származó minták egy fertődi 'Esterházy' fajta és biotesztjének indikátor növényei: 'Malling', 'Norfolk' fajták, és a fekete málna voltak. A 2021-es minták három tüneteket mutató növény: egy vörös málna (fertődi, ismeretlen fajta), egy szeder ('Theodore Reimers' fajta) és egy fekete málna voltak.

1. táblázat: Tüneteket mutató málnák és azok indikátorai, melyeket kutatásunk során vizsgáltunk.

Helyszín	Év	Faj	Fajta	Darabszám	Gyűjtés helyszíne
Velence	2018	Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Fertődi Esterházy „anyanövény”	2	izolátorház
		Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Malling	2	izolátorház
		Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Norfolk	2	izolátorház
		Fekete málna (<i>Rubus occidentális</i>)	-	2	izolátorház
	2021	Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Fertődi, de nem ismert fajta	1	izolátorház
		Fekete málna (<i>Rubus occidentalis</i>)	Rubus occidentalis RVB12-06	1	izolátorház
		Szeder (<i>Rubus fruticosus</i>)	Theodore Reimers	1	izolátorház
Pölöske	2019	Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Blissy	1	ültetvény (1996)
		Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Himbo queen	1	ültetvény (1996)
		Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Summit	1	ültetvény (1996)
		Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Fertődi narancs	2	ültetvény (2017)
		Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Fertődi 7054/6/1	1	ültetvény (2017)
	2021	Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Fertődi 7054/6/1	1	ültetvény
		Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Fertődi zamatos	1	ültetvény
		Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Esterhazy 2x bőtermő	1	ültetvény
		Vörös málna (<i>Rubus Idaeus</i>)	Fertődi narancs	1	ültetvény

A minták -70 °C-on voltak elhelyezve a további felhasználásig.

Nukleinsav tisztítás

DNS tisztítás

A fagyasztott levélmintákból DNS-t tisztítottam a NucleoSpin Plant II Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific) segítségével. Az izolálás során a gyártó utasításait követtem.

RNS tisztítás

A begyűjtött levél mintákból RNS-t tisztítottunk. Az RN-ázok aktivitásának minimalizálására a folyamat során végig jégen dolgoztam. Először a fagyott leveleket folyékony nitrogénben steril dörzsmozsárban eldörzsöltem, majd hozzáadtam 17 µl β - merkaptotetanol és 850 µl 65 °C-on előmelegített extrakciós puffert. Az így kapott elegyeket 10 percre 65 °C-os vízfürdőbe helyeztem. Ezután 850 µl kloroform : izoamilalkohol (24:1) keverékét adtam a mintákhoz, majd óvatos kevergetés után 10 percig 4 °C-on 10000 rpm-en centrifugáltam őket. Az így elválasztott elegy felülúszóját rámértem 800 µl kloroform : izoamilalkoholra és megismételtem az előző lépést. Ezután a felülúszóból 450 µl-t kimértem és hozzáadtam 250 µl 9M-os LiCl-ot, majd 30 percig jégen tartottam a mintákat. Ezt követően 20 percig 4 °C-on 13000 rpm-en centrifugáltam őket, majd a felülúszót leöntve a csapadékra rámértem 450 µl 65 °C-ra felmelegített SSTE-t. Vortexelés után rámértem még 450 µl kloroform : izoamilalkoholt. Ezután újra centrifugáltam a mintákat 10 percig 4 °C-on 10000 rpm-en, és mintánként 450 µl felülúszót mértem rá a 280 µl izopropanolt és 30 µl 4M-os Na-acetátot tartalmazó elegyre, majd szobahőmérsékleten (20-25 °C) inkubáltam 10 percig. Újra 20 perces centrifugálás következett 4 °C-on 13000 rpm-en. A felülúszót leöntve a csapadékra 1 ml hideg etanol öntöttem, majd centrifugálást (5 perc, 4 °C, 13000 rpm) követően leöntöttem az alkoholt és 10 percen keresztül szárítottam a mintákat. Ezután 30 µl steril vízben oldottam vissza azokat. A felhasználásig -20 °C-on tároltuk a mintákat. Az RNS tisztítás hatékonyságát gélelektroforézissel ellenőriztem. A mintákat FDE-vel (xilene cianol, brómfenolkék, EDTA és deionizált formamid tartalmú festék) kezeltem (2 µl RNS + 5 µl FDE), majd 1,2%-os, Etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélen választottam el. A nukleinsavak integritását UV fényben ellenőriztem.

Nagy-áteresztőképességű szekvenálás és a kapott szekvenciák bioinformatikai elemzése

A minták nagy-áteresztőképességű szekvenálása a korábbi években történt. Munkámat a szekvenciaadatok bioinformatikai elemzésével kezdtem. Azért, hogy több mintát egyszerre tudjunk vizsgálni, az RNS szekvenálás több minta keverékével (pool-okkal) történt. Ezek az egyedi RNS-eket egyenlő arányban tartalmazták. A nagy-áteresztőképességű szekvenálás a 2018-es velencei mintákból a siRNS-ekből, míg a 2021-es velencei mintákból ribodepléciót, vagyis az rRNS-ek eltávolítását követően, az összes RNS-ből történt Illumina HiScan2000 platformon. A szekvenálást a NOVOGEN végezte.

A kapott szekvenciák mind a növényi, mind pedig a vírusból származó siRNS-eket, illetve RNS-eket tartalmazzák. A kis RNS könyvtárat és az RNS könyvtárat is a CLC Genomics Workbench programmal [49] elemeztem. Ennek során a szekvenálás során használt adapter szekvenciákat eltávolítottam a szekvencia végekről, valamint a nem elfogadható minőségű szekvenciákat is trimmeltem, és kigyűjtöttem az egyedi, nem redundáns szekvenciákat. Ezt követően az átfedő szakaszokat illesztettem össze *de novo assembly* módszerrel, hosszabb szakaszokat, úgynevezett kontigokat hozva létre. Az így kapott szekvenciákat az NCBI növényi vírus referencia genomokhoz illesztettem. A kapott lista tartalmazta a mintákban potenciálisan jelenlévő vírusokat, valamint a hozzájuk tartozó E értékeket, amik minél kisebbek annál valószínűbb, hogy az összehasonlítás nem a véletlen műve és a kontig az adott vírusgenom egy szakaszát tartalmazza. Ezek alapján a siRNS könyvtár esetén a 10^{-5} -ennél kisebb, RNS könyvtár estében a 10^{-10} -ennél kisebb E értékekkel rendelkező kontigokat szűrtem le. A vírusokra illeszkedő kontigokból konszenzus szekvenciákat hoztam létre, melyeket az adott vírus referenciagenomjához illesztettem és kiszámoltam, hogy a kapott szekvenciák milyen mértékben fedik le az adott vírusgenomot. A vírusokra illeszkedő kontigokat az NCBI adatbázis nukleotid szekvenciáihoz BLAST analízissel hasonlítottam. Ezután a kapott vírus jelenlétét független módszerrel igazoltam vissza.

A HTS eredmények független módszerrel való visszaigazolása

cDNS szintézis

A mintában található RNS-ek vizsgálatához cDNS-t kell szintetizálni, mivel a PCR reakcióban használt DNS-polimeráz csak DNS templátot ismer fel. A RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Thermo Fisher Scientific) használtam az RNS templátokról történő reverz transzkripcióhoz (RT). Minden eppendorf csőbe 2,75 μ l templátot és 0,25 μ l random hexamer

primert mértem ki, majd centrifugálás után 5 percig 65 °C-on melegítettem a mintákat. Ezután 5 percig jégre helyeztem őket. Az RT-PCR reakció mintánként 1 µl 5x reakciós puffert; 0,5 µl 10 mM-os deoxy-nukleotid trifoszfátot (dNTP); 0,25 µl RiboLock RNase Inhibitor-t; 0,25 µl RevertAid Reverse Transcriptase-t és az előzőleg denaturált, majd jégen tartott mintákat tartalmazta. A reverz transzkripció az alábbi hőmérsékleteken zajlott (2.táblázat).

2.táblázat: A cDNS szintézishez használt PCR beállítások.

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

Végül tízszeresre hígítottam a cDNS-t steril víz (Mili-Q) segítségével.

A cDNS minőségének ellenőrzése (aktin teszt)

A cDNS szintézis sikerességének ellenőrzéséhez aktin tesztet végeztem, melyhez a PCR reakcióhoz az elegy a következőket tartalmazta mintánként:

- 9,5 µl Mili-Q
- 3 µl Phire puffer
- 0,75 µl Mxd_aktin-F (GGAAGTGGGAATGGTGAAGGC) primer
- 0,75 µl Mxd_aktin-R (GCTCCAATTGTGATGACTTG) primer
- 0,3 µl 10mM-os dNTP
- 0,2 µl Phire Hot Start polimeráz
- 0,5 µl templát cDNS

A PCR beállítások az alábbi táblázatban (3.) láthatóak.

3. táblázat: Az aktin teszthez használt PCR beállítások.

98°C	30 másodperc	} 40 X
98°C	10 másodperc	
55°C	10 másodperc	
72°C	20 másodperc	
72°C	1 perc	

Ellenőrzésként 1,2-os agaróz gélen 6 µl-t választottam el a mintákból.

Primerek tervezése

A vírus visszaigazolásához elsőként primereket terveztem a Genious Prime program [50] segítségével. A bioinformatikai elemzés során kapott kontigok és az NCBI adatbázisában található referenciagenomok alapján 21-23 nukleotid hosszúságú primereket terveztem. Ennek során a következő szempontokra figyeltem, hogy a primerek megfelelően kötődjenek és a PCR során az átírás pontos legyen: lehetőleg ne legyen egymás melletti háromszoros nukleotid ismétlődés és citozinra vagy guaninra végződjenek (4.táblázat).

4.Táblázat: A PCR reakciók során használt primerek jellemzői.

Primer név	Primer szekvencia (5'-3')	Elhelyezkedés a referencia genomon (NC_026238)
RYNV_243F	GTACCCTTGTAGCCGTTAGCAG	243 – 264 nt
RYNV_1033R	CCTGCCACCTAGGGTTCATCCG	1033 – 1012 nt
RYNV_3040F	GCATGGAGAAGCTGTTCCCAG	3040 – 3060 nt
RYNV_4283R	GCTGGCTTCATACTCCACTGG	4283 – 4263 nt
RYNV6-F [34]	CGTGATAACGGTTTGGTTTT	6183 – 6202 nt
RYNV6-R [34]	CGTAAGCGCAGATTTCTTCC	6645 – 6626 nt
RYNV_1010F	GACGGATGAACCCTAGGTGGC	1010 -1030 nt
RYNV_1651R	CTGAGAGAGAGCTCGGCATCC	1651 - 1632 nt
RYNV_5004F	CTTTACAACACCATTGTAGAG	5004 - 5020 nt
RYNV_5514R	GCAGCCTATGGTTCTTCAGGCG	5514 - 5496 nt
RYNV_7029F	GTGCAGGAGGAGATCTCCTGT	7029 - 7049 nt
RYNV_7364R	CGTTTACGTCCTTCCACGTGGC	7364 - 7343 nt

Ezen primereket különböző kombinációkban is alkalmaztam, hogy a hiányzó genomi részeket is amplifikálhassam. Ezek a melléklet 1. táblázatában láthatóak.

Gradiens PCR

A tervezett primerek optimalizációjához gradiens PCR-t végeztem. A kontamináció elkerülése érdekében a PCR reakcióelegyet lamináris fülkében mértem össze és steril, szűrős pipettaheggyel dolgoztam.

A reakcióelegy a következőket tartalmazta:

- 10 µl: 5 X Q5 polimeráz puffer
- 1 µl: 10 mM dNTP
- 33 µl: Mili-Q desztillált víz
- 1 µl: Q5 Hot Start DNS-polimeráz
- 1 µl: Templát DNS/ vagy cDNS
- 2,5 µl: Forward primer
- 2,5 µl: Reverse primer

Az így kapott keveréket 5 eppendorf csőbe mértem ki. A PCR reakcióhoz 5 különböző anellálási hőmérsékletet használtam: 56 °C; 59,1°C; 62,5°C; 64,2°C; 66°C és a következő táblázatban (5.) látható beállításokkal dolgoztam.

5.táblázat: Gradiens PCR reakciókhoz használt beállítások.

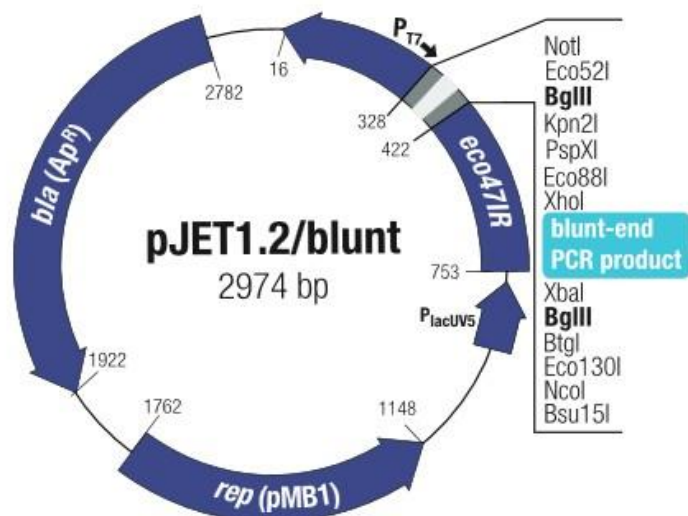
98°C	30 másodperc	} 40 X
98°C	10 másodperc	
56-66 °C	20 másodperc	
72°C	20 másodperc	
72°C	2 perc	

Az anellálási hőmérséklet optimalizálása után, a továbbiakban 66°C-os anellálási hőmérsékletet használtam és 15 µl végtérfogatú PCR reakcióelegyet állítottam össze mintánként.

A PCR termékeket 1,2% Etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélen való elválasztás után UV fényben tettem láthatóvá, melyhez a PCR terméket az elválasztás előtt DNS festékkel kevertem össze. A gélelektroforézisek 1,2-os agaróz gélen, 130 V-on történtek.

PCR termékek tisztítása

A gélelektroforézis után a DNS-t UV fénnel láthatóvá tettem és a megfelelő méretű DNS termékeket steril szikével kivágtam a gélből. A DNS tisztítást a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztem, és a folyamat során a gyártó utasításait követtem. A mintákat 25 µl elúciós pufferben eluáltam. A tisztítás sikerességét gélelektroforézissel ellenőriztem, melyhez 4 µl DNS-t 3 µl DNS festékkel kevertem össze és az elválasztást 1,2%-os Etídium-Bromidot tartalmazó agaróz gélen végeztem.



4. ábra: pJET plazmid felépítése[51]

Ahhoz, hogy az amplifikált termékek szekvenciáját meghatározhassuk, klónoztam őket. Ennek első lépéseként a tisztított PCR terméket ligátam a Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével pJET plazmidba. A reakcióelegyhez a következőket mértem össze mintánként:

- 5 µl: 2X puffer
- 0,5 µl: pJET 1.2/blunt plazmid vektor
- 0,5 µl: ligáz enzim
- 1 µl: Mili-Q desztillált víz
- 3 µl: tisztított PCR termék

Az így kapott 10 µl elegyet 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezután a ligátumot DH5α kompetens baktériumokba transzformáltam. A transzformáláshoz 100 µl kompetens sejthez 5 µl ligátumot adtam és 20 percig jégen inkubáltam. Ezt követően 42°C-on, vízfürdőben, 30 másodpercen keresztül hősokkoltam a baktériumokat. Ezután 500 µl SOC táptalajt mértem hozzá a mintákhoz és 40 percig 37°C-os termosztátban rázattam őket. Végül 100 µl szuszpenziót szélesztettem ampicillin antibiotikumot tartalmazó LB táptalaj tartalmú agar lemezre, melyeket egy éjszakára (12 óra) 37°C-os inkubátorba helyeztem. Mivel az inzert a vektorban egy letális gént expresszáló gén helyére épül be, így csak azok a baktériumok képesek életben maradni, melyek tartalmazzák a ligált plazmidot. A kinőtt telepek közül

másnap kettőt leoltottam és 3 ml folyékony ampicillin tartalmú LB táptalajon 37°C-os rázó termosztátban inkubáltam őket 12 óráig.

A plazmidokat a felszaporított baktériumtenyészetből a Plasmid DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével tisztítottam a kit által írt protokoll szerint. A plazmidot végül 50 µl elúciós pufferben eluáltam. A ligálás sikerességét restrikciós enzimekkel való hasítással ellenőriztem. A reakcióelegy a következőket tartalmazta mintánként:

- 2 µl: 10 X Tango puffer
- 0,2 µl: XhoI (5' C|TCGAG 3') enzim
- 0,4 µl: XbaI (5' T|CTAGA 3') enzim
- 3,4 µl: Mili-Q
- 4 µl: plazmid

Az emésztéshez 30 percig 37 °C-os vízfürdőben tartottam a reakcióelegyet. Az emésztés és a plazmid tisztítás sikerességét gélelektroforézissel ellenőriztem.

Szekvenciák elemzése és filogenetikai fa készítése

A vizsgálni kívánt szakaszok bázissorrendjének meghatározása Sanger-szekvenálással történt, szükség esetén mindkét irányból, a pJET kit forward és reverse primerét használva. A szekvenálást a BIOMI Kft. végezte. A szekvenciák minőségének ellenőrzéséhez a Chromas 2.6.6 programot használtam. A BLAST analízishez az NCBI adatbázist, és az online BLAST programot használtam.

A filogenetikai elemzést a MEGA programmal [52] végeztem, melyben Maximum Likelihood módszert alkalmaztam a törzsfák elkészítéséhez 1000 bootstrap ismétléssel. A filogenetikai fához külcsoportnak egy közeli rokon badnavírust választottam, a *Spiraea yellow leafspot virus-t* (SYLSV) és az általam talált vírus variánsok szekvenciáit az NCBI génbankban található teljes RYNV szekvenciákhoz hasonlítottam.

Az szekvenált részeket szintén BLAST analízissel hasonlítottam az NCBI adatbázisban található nukleinsav szekvenciákhoz, illetve a 'Summit' vörös málna fajta esetében a Ho et al. 2024-es cikkében [48] szereplő szekvenciákhoz.

A vírus episzomális jelenlétének ellenőrzése

Ahhoz, hogy ellenőrizzük, hogy a vírus episzomális formában van-e jelen RCA-t végeztünk a phi29-XT RCA Kit (New England Biolabs) segítségével. A reakcióelegy a következőket tartalmazta mintánként:

- 4 μ l 5X puffer
- 2 μ l dNTP
- 3 μ l Mili-Q desztillált víz
- 2 μ l RYNV_243F primer
- 2 μ l RYNV 3040F primer
- 5 μ l DNS templát

A DNS templát a 'Theodor Reimers' szeder és a 'Fertődi 7054/6/1' málna növényekből származott. 95 °C-on 3 percen keresztül denaturáltam a mintákat, melyeket ezután szobahőmérsékleten, vagy jégre helyezve hagytam kihűlni (15 percig). Ezt követően az 1 μ l phi29-XT DNS-polimerázt adtam hozzájuk, majd 37, illetve 42 °C-on 18 órán keresztül inkubáltam a reakcióelegyet. A reakció befejezéséhez 65 °C-on 10 percig tartottam az elegyet. Ezután 10 μ l Mili-Q vízzel hígítottam a mintákat. Ezek után 5 μ l DNS-t emésztettem 37 °C-on 30 percen keresztül 1 μ l puffer és a következő enzimek hozzáadásával: NdeI I, EcoR I, BamH I (Thermo Fisher Scientific). A reakció sikerességét 1,2%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem.

Eredmények

Bioinformatikai elemzés

siRNS HTS eredményének elemzése

A siRNS HTS során 37.859.690 50 nukleotid hosszúságú szekvenciaolvasatot kaptunk eredményként. Ebből a trimmelés után 34.895.339 olvasatot kaptam, melyből 3.544.779 egyedi (nem redundáns) volt. Ezen olvasatok felhasználásával összesen 6370 kontigot építettem.

Az alábbi táblázatban (6.) láthatóak az elemzés során 10^{-5} -ennél kisebb E value-val rendelkező vírusok:

6. táblázat: siRNS szekvenálás elemzése során kapott vírus találatok jellemző paraméterei.
Jelmagyarázat: RPM - read/million ((vírusra illeszkedő olvasatok ÷ összes olvasat) $\times 10^6$), BVF - Blackberry Virus F, DNAV - Dioscorea nummularia-associated virus, PCSV - Pepper chlorotic spot virus, SiCVV - Sida chlorotic vein virus, SLSV - Soybean latent spherical virus.

Si-RNS könyvtár	BVF	DNAV	PCSV	RYNV	SiCVV	SLSV
Kontigok	1	1	1	13	1	1
Nem-redundáns olvasatok	558	576	952	1119	217	311
Redundáns olvasatok	3500	2721	4669	6036	689	678
RPM	100	77,98	133,8	172,97	19,74	19,43
Virális lefedettség (%)	50,6	53,09	57,41	53,66	48,3	40,12

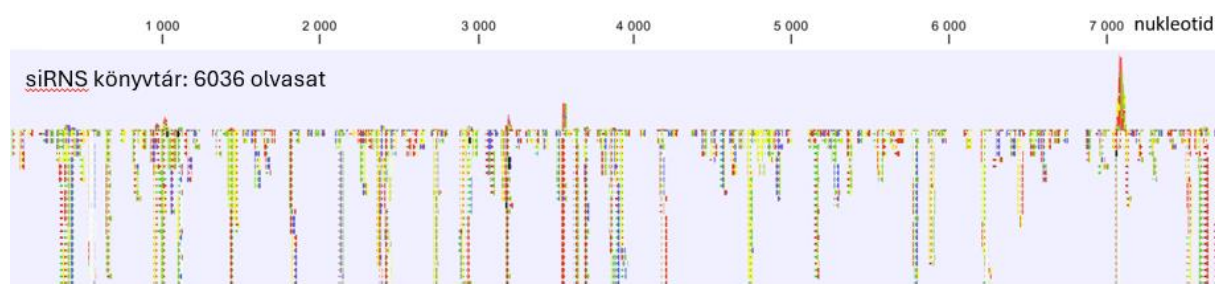
A ribodepleted RNS szekvenálás eredményének elemzése

A teljes RNS szekvenálás eredményeként 21.595.210 150 nukleotid hosszúságú párosított (paired) szekvenciaolvasatot kaptunk, melyből a trimmelés után 21.453.289 olvasat maradt. Ezekből összesen 23721 kontigot tudtam összeilleszteni.

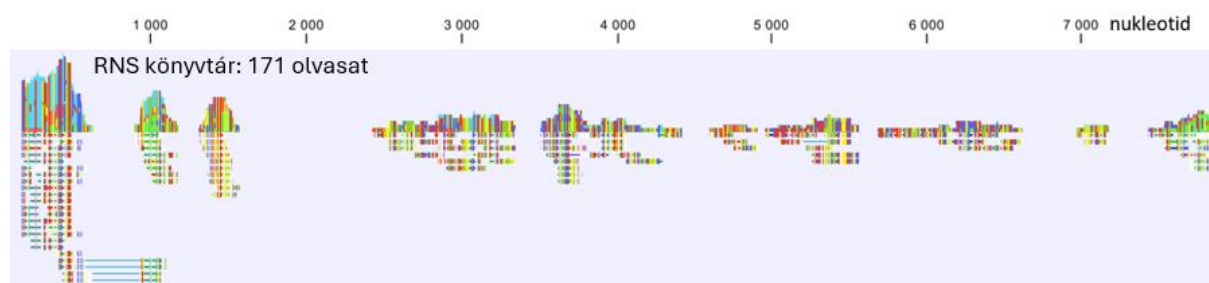
A szekvenciákat az NCBI adatbázisban található vírus referenciagenomokra illesztettem, melynek eredményeként több vírus jelenlétére kaptunk találatot (E érték $<10^{-10}$): Pepper chlorotic spot virus (PCSV), Melon severe mosaic tospovirus (MSMV), Chrysanthemum stem necrosis virus (CNV), Zantedeschia mild mosaic virus (ZaMMV), Rose yellow vein virus (RYVV) és RYNV. Az adott vírusokra illeszkedő szekvenciák azonban igen kis mértékben

fedték le a különböző vírusgenomokat (<5%), kivéve a RYNV esetében, amelyre összesen 171 olvasat és négy kontig illeszkedett, a virális lefedettség pedig 68,1% volt.

Tehát egy vírus, a RYNV esetében mind a siRNS, mind pedig az RNS szekvenálás eredményeképpen találatot kaptam. Ezen vírus NCBI adatbázisban található referenciagenomjához illesztettem a szekvenciaolvasatokat, így az alábbi ábrákon (5-6. ábra) látható, hogy ezek milyen mértékben fedik le a vírusgenomot. A bioinformatikai elemzés során kapott többi vírusra illeszkedő kontigokat BLAST analízissel hasonlítottam az NCBI adatbázisban található nukleotid szekvenciákhoz és azt találtam, hogy növényi genomokhoz, illetve a RYNV-hez közel rokon vírusokhoz hasonlítottak leginkább. Így a mintákból a RYNV jelenlétét igazoltam vissza független módszerrel.



5. ábra: A redundáns olvasatok illesztése a referenciagenomra a siRNS könyvtár esetén



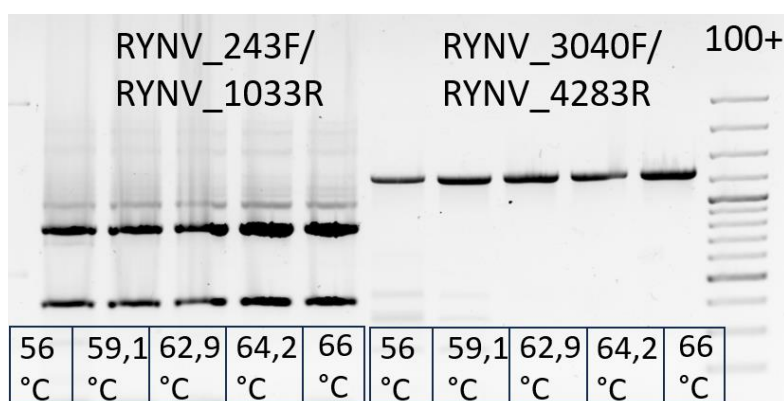
6. ábra: A redundáns olvasatok illesztése a referenciagenomra az RNS könyvtár esetén

RYNV jelenlétének visszaigazolása a mintákban független módszerrel

A nukleinsav tisztítás minden esetben sikeresnek bizonyult, mind a DNS, mind az RNS izolálás esetében.

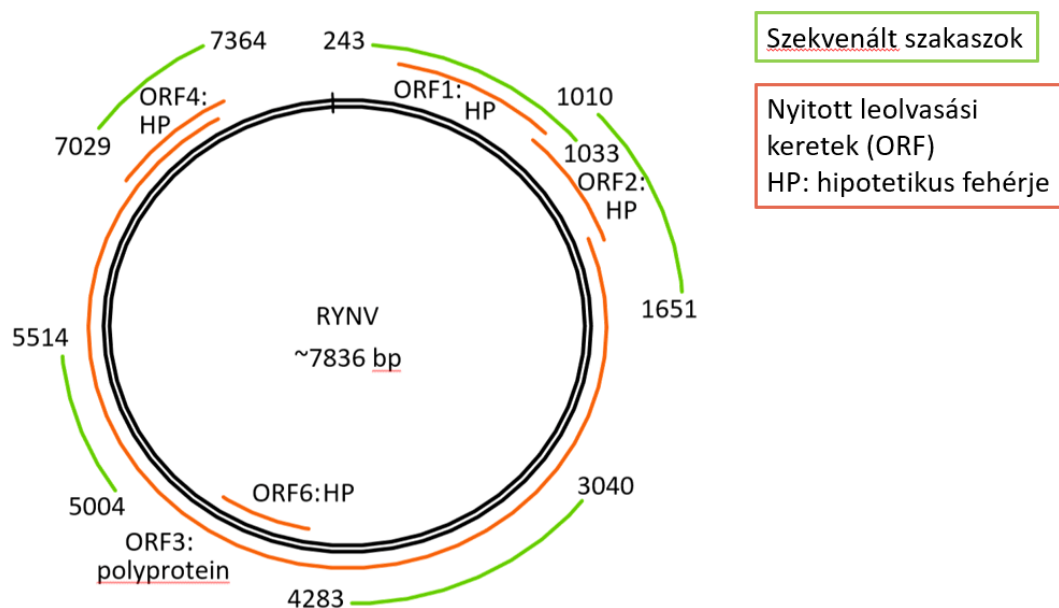
A vírus visszaigazolását a HTS során keletkezett szekvenciákból létrehozott kontigokra tervezett primerekkel kezdtem, amelyek a referenciagenomra is illeszkedtek (RYNV_243F/RYNV1033R és RYNV_3040F/RYNV4283R). A HTS-hez is használt, RNS-ből szintetizált cDNS felhasználásával nem sikerült amplifikálnom a kívánt termékeket ezen

primerek segítségével, semmilyen termék sem keletkezett a PRC során. Azonban a növényi levelekből kinyert DNS keverékből, amely a 2021-es velencei mintákat tartalmazta, sikerült visszaigazolnom a vírust az általam tervezett primerek segítségével. A gradiens PCR sikeresnek bizonyult. Ahogy a 8. ábrán látható minden annellálási hőfok esetében amplifikálódott a megfelelő méretű termék, azonban a legtöbb termék 66 °C-on keletkezett, így a továbbiakban ezen a hőmérsékleten végeztem a PCR reakciók során az annellálást. A RYNV6-F/ RYNV6-R [34] primerpár, nem amplifikált megfelelő méretű termékeket, azonban az összes általam tervezett primer segítségével sikerült a vírus megfelelő részeit felszaporítani.



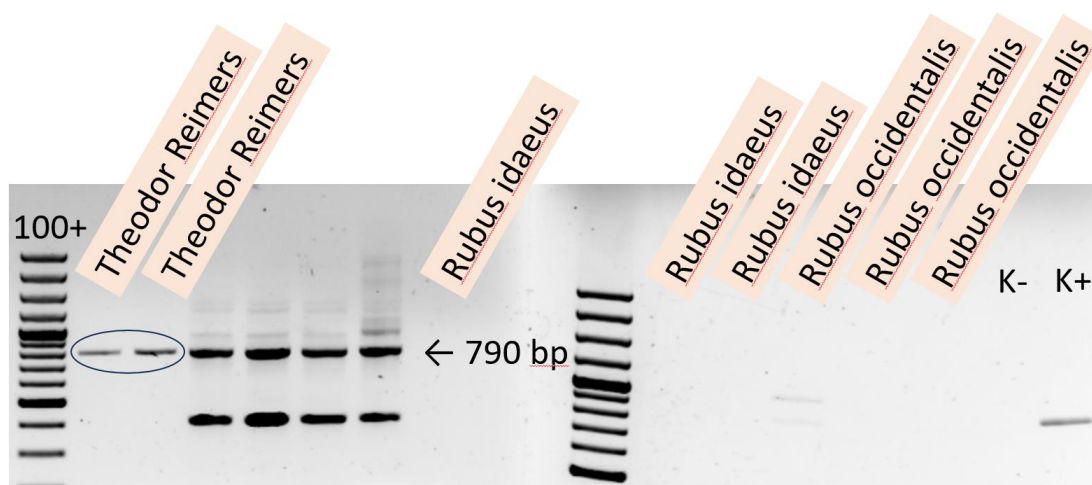
8. ábra: Gradiens PCR a RYNV_243F/RYN_1033R és a RYNV_3040F/RYN_4283R primerpárok optimalizációjához.

Az alábbi képen (9.ábra) látható, hogy a vírusgenom öt különböző részét sikerült a tervezett primerekkel amplifikálni. A primereket különböző kombinációkkal is alkalmaztam, hogy a hiányzó genomi régiók szekvenciáját is megismerhessük, ahogy az a melléklet 1. táblázatában látható, azonban az esetek többségében nem amplifikálták a megfelelő hosszúságú szakaszokat, illetve az amplifikált termékek szekvenciái nem a vírusgenomra, hanem növényi genomrészletekre illeszkedtek. A RYNV_3040F/ RYNV_1033R primerpárral felszaporított termék a vírusgenom különböző részeire illeszkedett, a vírusgenom elején 560 bázispár, a genom közepén 997 bázispár hosszúságú szakaszokra.



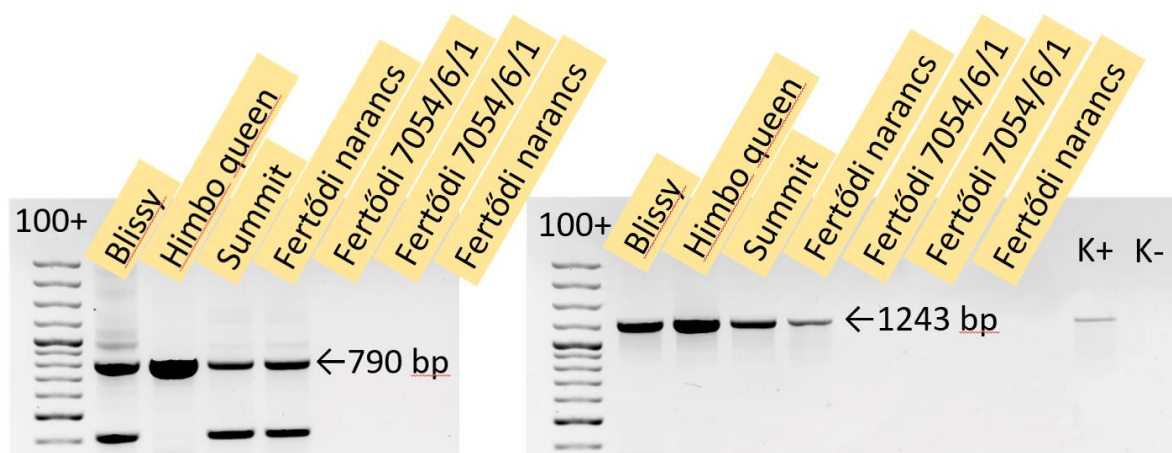
9. ábra: A 'Theodor reimers' szeder fajtából származó vírusgenomból amplifikált, majd szekvenált szakaszok. A számok a referenciagenomon való elhelyezkedést jelölik, hogy hányadik nukleotidnál kezdődik az adott szakasz.

A 2021-es velencei minták keverékéből tehát sikeresen amplifikáltam a vírus különböző részeit, majd a különböző málna fajtákat egyedenként is vizsgáltuk két primerpár segítségével (RYNV_243F/RYNV_1033R és a RYNV_3040F/RYNV_4283R), melyek az ORF 1-2 és az ORF 3 egy részét fogják közre. Az alábbi képen (10.ábra) látható a velencei minták tesztelése a vírus jelenlétére. Ezen minták esetében a 2021-ben gyűjtött növényeket teszteltem. Azt kaptam eredményül, hogy az RNS-szekvenálás esetében a keverék alapját képező növények közül csupán a 'Theodor Reimers' fajta bizonyult fertőzöttnek.



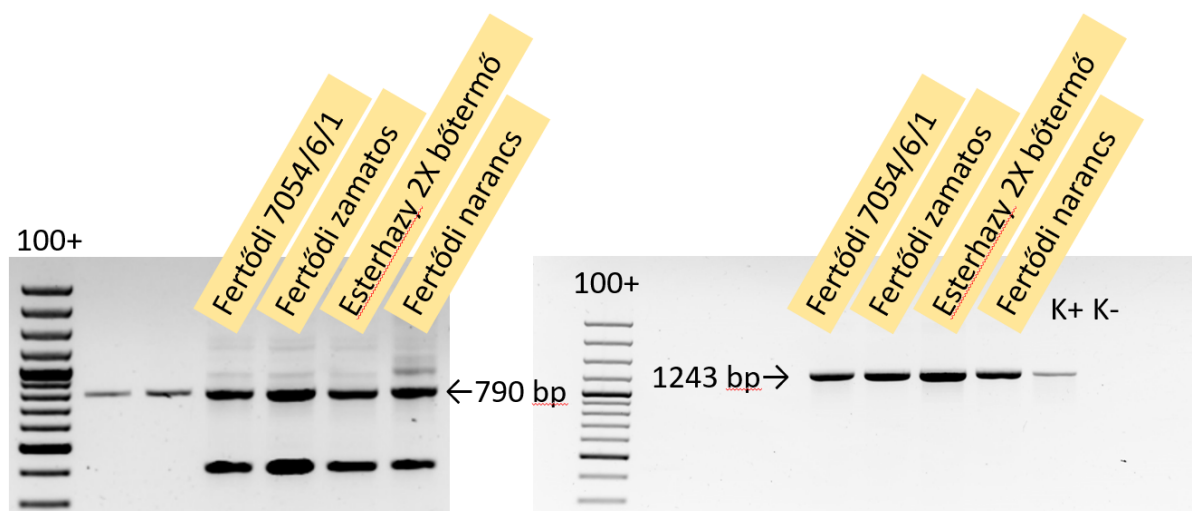
10. ábra: 2021-ben Velencén gyűjtött málna minták RYNV jelenlétére tesztelve a RYNV_243F/RYNV_1033R primerpárral.

A következő képen a Pölöskén 2018-ban gyűjtött egyedek vírusesztje látható (11. ábra). Az ábrán látható, hogy ezen egyedek közül négy növény volt fertőzött.



11. ábra: 2019-ben Pölöskén gyűjtött málna minták RYNV jelenlétére tesztelve a RYNV_243F/RYNV_1033R és a RYNV_3040F/RYNV_4283R primerpárokkal.

A 2021-ben gyűjtött málna növények tesztje látható a következő képen (12. ábra), mely növények közül mind a négy fertőzöttnek bizonyult. Ezen növények között a 'Fertődi 7054/6/1' fajta ugyanazon növény, mint amit 2019-ben is mintáztak, és az ismételt mintagyűjtés alkalmával a 2018-ban még negatívnak mutatkozó mintában is kimutattuk a RYNV jelenlétét.



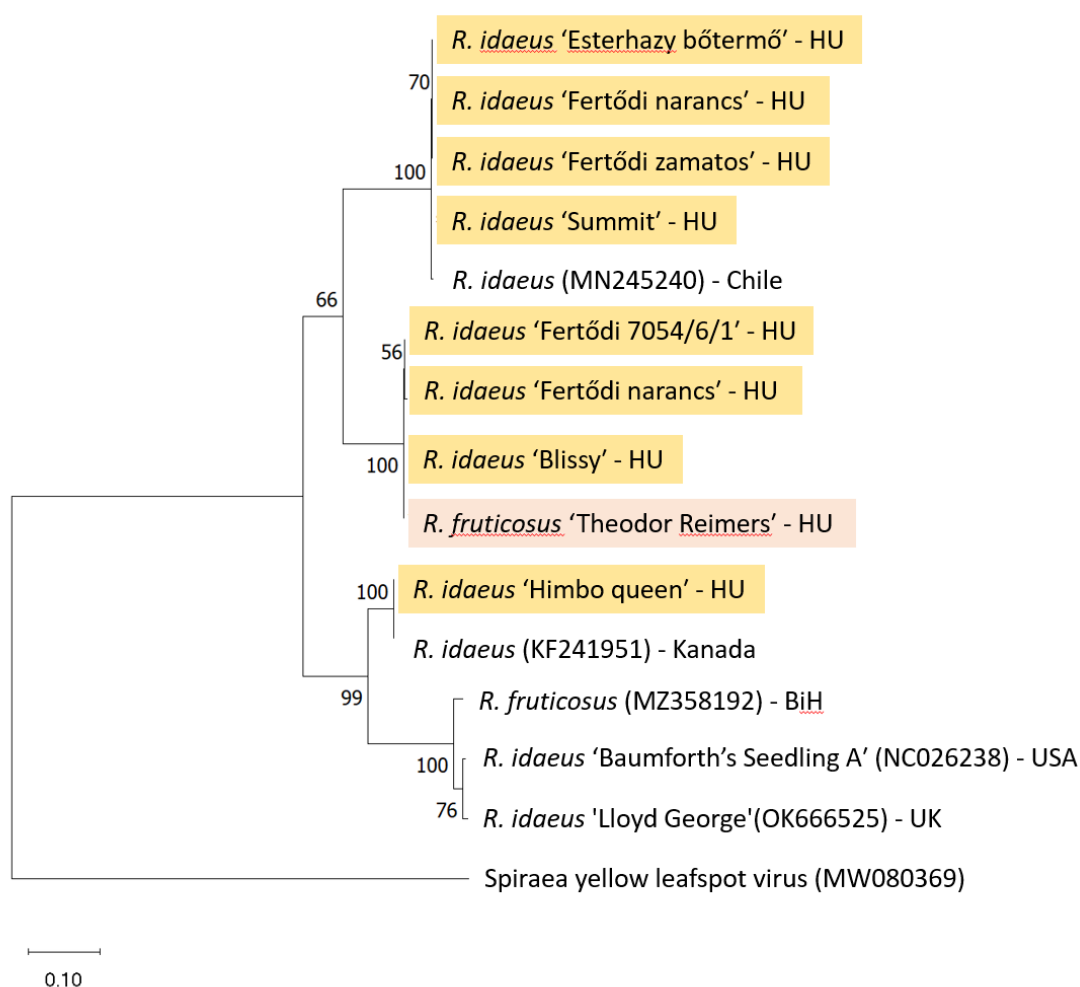
12. ábra: 2021-ben Pölöskén gyűjtött málna minták RYNV jelenlétére tesztelve a RYNV_243F/RYNV_1033R és a RYNV_3040F/RYNV_4283R primerpárokkal.

A PCR termékek tisztítása, illetve a klónozása minden esetben sikeres volt. Ezután a plazmid tisztítás, majd a klónozott termékek szekvenálása is sikeresnek bizonyult, így az összes RYNV-et tartalmazó mintából egy 790 bázispár, és egy 1200 bázispár hosszúságú szakasz

szekvenciáját határoztam meg. Ezen kívül a 'Theodor Reimers' szeder fajtából további három régióról is nyertünk szekvenciaadatokat. Ezek hossza 641, 510 és 335 bázispárnyi volt (9.ábra).

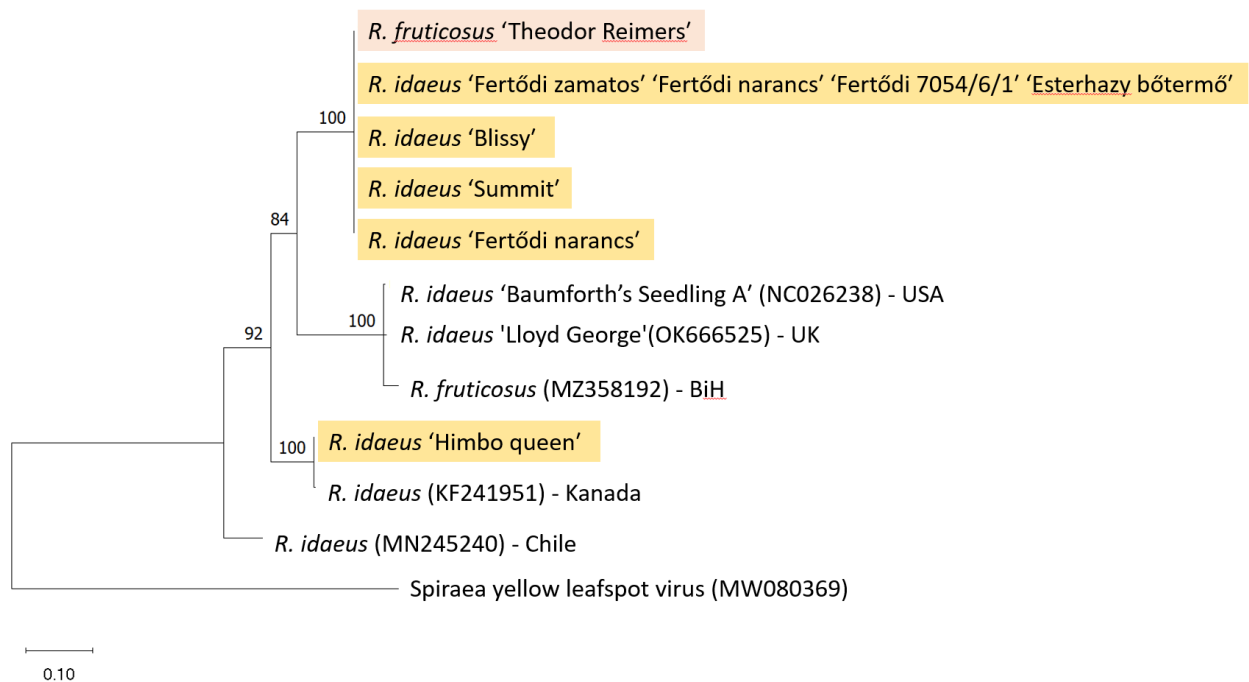
Filogenetikai elemzés

A RYNV_243F/RYNV_1033R és a RYNV_3040F/RYNV_4283R primerpárokkal kilenc minta esetében sikerült amplifikálni a vírus részeit. Az alábbi ábrán (13. ábra) látható az ORF1-ből és kisebb részben az ORF2-ből származó 790 bázispár hosszúságú szakasszal készített törzsfá. Megfigyelhető, hogy a magyar minták nagyjából együtt klasztereződnek, leginkább egy észak-amerikai variánsra hasonlítanak. A legtávolabb a 'Himbo queen' vörös málna fajtából származó variáns látható a törzsfán, mely a kanadai izolátummal klasztereződik.



13. ábra: ORF1-ből és ORF2-ből szekvenált szakasszal készített filogenetikai törzsfá.

Az 14. ábra a vírusgenom ORF3-as részéből szekvenált 1243 bázispár hosszúságú szakaszból készített filogenetikai fát mutatja. Ezen régió esetében négy vörös málna fajtából ('Fertődi zamatos', Fertődi narancs', 'Fertődi 7054/6/1', Esterhazy bőtermő') származó vírusszekvencia teljes mértékben megegyezett egymással. Ezen a törzsfán is együtt helyezkednek el a magyar minták, azonban a chilei mintától távolabb. A 'Himbo queen' világfajtából származó vírus pedig ezen fa alapján is külön klasztereződik a magyar nemesítésű mintáktól.



14. ábra: ORF3-ból szekvenált szakasszal készített filogenetikai törzsfá.

A százalékos hasonlóságokat, melyben az általunk kapott szekvenciákat hasonlítottam össze egymással, valamint az NCBI adatbázisban lévő teljes RYNV szekvenciákkal a melléklet 2. és 3. táblázatában tüntettem fel.

A vírus episzomális előfordulásának ellenőrzése

Ahhoz, hogy megbizonyodhassunk arról, hogy a vírus episzomális formában is jelen van a mintákban RCA-t végeztünk, amely azonban nem igazolta vissza a vírus jelenlétét, mivel kisebb termékek keletkeztek, mint amit az irodalomban leírtak alapján vártunk, illetve az emésztés során sem hasította a terméket az NdeI enzim a várt nagyjából 8 kilobázis hosszú, az EcoRI enzim pedig a várt 4200, 1400, 1250 és 900 nuleotid hosszúságú szakaszokra [45].

Diszkusszió

A diplomamunkám során *Rubus* fajokat vizsgáltam kétféle HTS módszerrel. A két szekvenálás eredménye nem összevethető, mivel különböző mintákból származó RNS-ből indultak ki. Mindkét HTS segítségével nyert szekvencia adatok egy vírus jelenlétére utaltak bizonyosan. A többi vírusra (6. táblázatban láthatóak) illeszkedő kontigok szekvenciáját az NCBI adatbázisával összehasonlítva nagyrészt növényi genom részleteket, illetve a *Rubus* sárga érhalósodás vírushoz rokon badnavírusokat kaptam eredményül, így ezen vírusok jelenléte erősen megkérdőjelezhető a gyűjtött málna mintákban. A HTS habár jelentős mértékben felgyorsítja a vírusok detektálását és a növényi viromok megismerését, azonban mindenképpen szükséges utólag, független módszerrel visszaigazolni a kapott eredményeket, hiszen a bioinformatikai elemzés során is előfordulhatnak hamis pozitív találatok. Ezt a hibát a vírusok jobb megismerésével, a különböző variánsok szekvenciaadataival és ezáltal a génbank folyamatos kiegészítésével, pontosításával lehetne kiküszöbölni [53, 54].

A RYNV jelenlétét sikeresen visszaigazoltam a HTS-től független módszerrel is. A filogenetikai elemzés során kapott eredmények alapján elmondható, hogy a magyar fajták együtt klasztereződnek, és elkülönülnek az NCBI adatbázisában talált eddigi teljes RYNV szekvenciáktól. Kivétel ebből a szempontból a 'Himbo queen' vörös málna fajta, amely mindkét törzsfajta alapján egy kanadai variánshoz hasonlít inkább. Ez egy világfajta, mely ez alapján valószínűleg már a vírussal fertőzötten érkezhetett az országba. A leszármazás pontosabb megértéséhez azonban szükséges volna a teljes genom szekvenciáját ismernünk a magyar minták esetében is.

A RYNV, mivel más badnavírusokhoz hasonlóan képes integrálódni a gazdanövény genomjába, így az általunk talált vírusszekvencia sem egyértelmű, hogy az episzomális, vagy az endogén formából származik-e [34]. Ennek kiderítése érdekében RCA-t végeztünk, mely módszerrel lehetséges legegyszerűbben igazolni, hogy az aktív forma van jelen a növényben, hiszen így csupán körkörös DNS-t lehet amplifikálni, amely a vírus episzomális formájára jellemző [38]. Az RCA negatív eredményt mutatott, amely arra utal, hogy endogén formában van jelen a vizsgált magyar mintákban a vírus. Azonban fontos megemlíteni, hogy az RCA kit, amivel dolgoztam még új módszer volt a kutatócsoportunk számára, és nem volt megfelelő pozitív kontroll a működésének megerősítéséhez, így az ezzel kapott eredményeket fenntartásokkal érdemes kezelni.

McGavin és munkatársai kutatásuk során elkülönítettek diagnosztikai primereket, amelyek a fertőzőképes formát képesek kimutatni. Ezeket a primereket nem tudtuk a kutatásunk során használni, mert a RYNV genom célzott részén a mi variánsaink szekvenciája eltért az általuk tesztelt variánsokétól, így ezek nem illeszkedtek a HTS során kapott kontigok szekvenciáira. A szakirodalomban használt diagnosztikai primerpár (RYNV6F/RYNV6R) sem amplifikált megfelelő hosszúságú szakaszokat, amely szintén megerősíti azt az elképzelést, hogy a vizsgált mintákban csupán endogén formában van jelen a vírus [45]. Erre utal az is, hogy a primerek kombinálásával sem kaptunk megfelelő termékeket a PCR során, így lehet, hogy töredékes formában van jelen a növényi genomban és összefüggő szakaszokat ezért nem sikerült felszoroznunk.

A szekvenált vírusrészletek igen nagy eltérést mutattak egymáshoz képest, több variáns csupán 80-85%-os hasonlóságot mutatott egymással, ami utalhat arra, hogy a gazdagenomba épülve jelentősen megváltoztak ezen részek, hiszen a növény szempontjából nem bírtak funkcióval. A Badnavírusok esetében azonban előfordulnak fajon belül is igen nagy eltérések, az ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) a konzervatív reverz transzkriptáz és ribonukleáz H kódoló régióban 80%-nál kevesebb egyezésnél határol el egy új fajt [30].

Ho et al. 2024-es cikkében vizsgált 'Summit' vörös málna fajtában találtak két különböző endogén RYNV szekvenciát, amelyek több, mint 99%-os egyezést mutattak az általunk vizsgált 'Summit' málnából származó RYNV szekvenciákkal, tehát ezen fajta esetén igen valószínű, hogy a szaporítás során mindig továbbadódik a beépült vírusszekvencia is [48]. Ezzel a fajtával együtt klasztereződnek a magyar fajták is, így lehetséges, hogy ezek genomjába is a nemesítés során kerültek a vírusrészek, habár nem sokat tudunk a nemesítésükről, hogy mely fajták felhasználásával hozták létre ezeket.

Az előbbi eredményeknek ellentmond, hogy a 2018-ban még nem fertőzött 'Fertődi 7054/6/1' fajta 2021-ben már fertőzöttnek bizonyult a víruseszt alapján, illetve a 'Fertődi narancs' fajta nem minden egyedéből sikerült amplifikálnunk a vírus részeit. Így az egész fajtát valószínűleg nem érintik az integrálódott RYNV szekvenciák, vagy lehetséges, hogy a vírus mégis episzomális formában volt jelen ezen esetekben a növényekben. Ezen kívül a vírusgenom igen különböző régióiról is sikerült amplifikálnunk részeket, amely szintén inkább az episzomális jelenlétre utalhat, azonban az is lehetséges, hogy a vírusgenom jelentős része integrálódott a növényi genomba.

Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a vírus endogén formában van jelen és felderítsük, hogy a növényi genom mely részén helyezkedik el és mekkora része található meg egyben, érdemes lenne inverz PCR segítségével vizsgálni az eddig szekvenált vírusrészeket. Ezzel a módszerrel az ismert vírusrészek körülötte régiókat lehet amplifikálni és akár nested PCR-rel megsokszorozva a PCR termék mennyiségét, szekvenálás segítségével megismerhetnénk az integrálódott vírusgenom környezetét [55]. Ezáltal arra is fény derülne, hogy mekkora részek találhatóak meg intakt állapotban, ami lényeges lehet, abból a szempontból, hogy a vírus képes lehet-e reaktiválódni. Eddigi kutatások során azt találták, hogy olyan mértékben degradálódtak ezek az endogén RYNV formák, hogy valószínűleg nem tud a vírus újra a fertőzőképes állapotba kerülni, azonban más badnavírusoknál előfordul ez utóbbi jelenség, ami miatt diagnosztika szempontból is jelentős lehet a beépült formáit is megismerni [30, 48]. Badnavírus mentes növényeket termo- és kemoterápiák segítségével szoktak előállítani, mely módszereket merisztémacsúcsból szaporított *in vitro* kultúrák esetében kombináltan is szoktak alkalmazni [31]. Más badnavírus estében az integrálódott formák inaktiválását CRISPR/Cas9 rendszer segítségével történő genomszerkesztéssel is végzik [56]. Ezekre a módszerre azonban csupán akkor lenne szükség, hogyha az endogén vírus valóban veszélyt jelent a növényekre. Ezen kívül az integrálódott formának a növényi immunitásban is lehet szerepe, így mindenképpen érdemes tovább vizsgálni az endogén szekvenciákat is [36].

Ezen kívül a vírus vektorokkal való tejedésének útvonalát is lényeges lehet vizsgálni, hiszen eddig csupán málna és szeder növényekről írták le és lehetséges, hogy az *Amphorophora idaei*, valamint az *A. agathonica* levéltetveken kívül egyéb *Rubus* fajokat parazitáló ízeltlábú vektora is létezik a vírusnak [42].

Összességében tehát elmondható, hogy sikeresen visszaigazoltam a vírus jelenlétét mind velencei, mind pedig pölöskei málna, illetve szeder fajtákon. Mivel eddigi ismereteink alapján a vírus nem képes reaktiválódni és fertőzni az integrálódott formában, így lényeges lenne további vizsgálatokban megállapítani, hogy a mintákban a vírus endogén vagy episzomális formában van-e jelen.

Összefoglalás

Diplomamunkám során egy, a *Badnavirus* nemzetségbe tartozó DNS vírussal foglalkoztam, a Rubus sárga érhalósodás vírussal (Rubus yellow net vírus - RYNV). A RYNV málnát (*Rubus idaeus*, *R. occidentalis*), szedret (*Rubus fruticosus*), valamint hibrid növényeket is fertőz, melyeken a szövetek elszíneződését okozza a levélerek mentén. Észak-Amerikában és Európában is leírták jelenlétét, azonban hazai előfordulása még nem volt ismert. Sok esetben tünetmentes maradhat jelenléte, de együttesen fertőzve más vírusokkal a málna mozaikos megbetegedését (RMD) okozhatja. Ez az esetek többségében már tünetekkel jár együtt és természsökkenéshez vezethet.

Kutatásunkban a NÉBIH velencei Kutatóállomásán és pölöskei fajtakísérleti telepén gyűjtött *Rubus* növények viromját vizsgáltuk nagy-áteresztő képességű szekvenálás segítségével. A bioinformatikai elemzés során találatot kaptunk a RYNV-re.

A szakirodalomban közzétett diagnosztikai primerekkel nem tudtuk a megfelelő méretű vírusfragmentumokat amplifikálni, ezért a szekvenálási adatok alapján új primereket terveztünk. A növényi mintákból tisztított DNS-t templátként használva, az általunk tervezett primerek segítségével sikeresen visszaigazoltuk a RYNV jelenlétét. A vírus cirkuláris genomjából, különböző régiókból, öt szakaszt sikerült amplifikálnunk, amelyeket pJET vektorba klónoztunk és Sanger-szekvenálás segítségével meghatároztuk bázissorendjüket. A filogenetikai elemzés során azt találtuk, hogy a magyar minták külön klasztereződnek az NCBI adatbázisban található teljes RYNV szekvenciáktól, kivéve egy világfajtát, a 'Himbo queen' vörös málnából izolált variánst.

Az irodalomból ismert, hogy a RYNV képes beépülni a gazdanövény genomjába. Rolling circle amplification-t (RCA) végeztünk annak megállapítására, hogy jelen van-e a magyar mintákban a vírus episzomális formában. A negatív RCA, illetve más eredmények is arra utalnak, hogy a vírus endogén szekvenciáival van dolgunk. Ez igen fontos lehet diagnosztikai szempontból, hiszen eddigi ismereteink alapján a vírus nem képes reaktiválódni, így lényeges megkülönböztetni a fertőzőképes formát az endogén szekvenciáktól.

Tehát elsőként sikerült detektálnunk a RYNV jelenlétét Magyarországon, amely azonban valószínűleg a növényi genomba integrálódva fordult elő.

Abstract

Detection and study of Rubus yellow net virus variants in Hungary

Rubus species are propagated vegetatively, making them more vulnerable to viral infections, as the virus is passed from the mother plant to the cultivars. So development of diagnostic techniques is important to be able to reliably check the virus-free propagation material.

I studied the presence of a DNA virus of the genus Badnavirus, Rubus yellow net virus (RYNV). RYNV can infect raspberry (*Rubus idaeus*, *R. occidentalis*), blackberry (*Rubus fruticosus*) and hybrid plants, causing chlorosis of tissue along the veins in the leaves. Its presence can be asymptomatic in many cases, but co-infection with other viruses can cause raspberry mosaic disease (RMD), which in the majority of cases is already associated with various symptoms. RYNV occurs in North America and Europe but has not been known to be present in Hungary.

Rubus plants were collected at the Virology Station at Velence and the Variety Experimental Station at Pölöske of NÉBIH (National Food Chain Safety Office). The virome analysis of the samples was performed using high-throughput sequencing and the bioinformatic analyses indicated the presence of RYNV.

Using diagnostic primers published in the literature, we could not amplify product at the expected size, so we designed new primers based on sequencing data. Using DNA, purified from the samples, as a template, we successfully confirmed the presence of RYNV using primers which we designed. From the circular genome of the virus, we were able to amplify five different regions, which were cloned into a pJET vector and their sequence was determined by Sanger sequencing. The virus has been found in nine cultivars, which sequences clustered together, except for one variant isolated from the world variety, red raspberry 'Himbo queen'.

It is known from the literature that RYNV can integrate into the genome of the host plant. RCA was performed to determine whether the virus was present in the Hungarian samples in episomal form. The negative RCA, as well as other results, suggest that in the samples the virus is present in its endogenous form. This could be very important from a diagnostic point of view, since, based on our current knowledge, the virus cannot reactivate from its genome integrated form, so it is important to distinguish the infectious form from the endogenous sequences.

Thus, we first detected the presence of RYNV in Hungary, but it is likely to have occurred integrated into the plant genome.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Várallyay Évának a diplomamunkámhoz nyújtott segítségért, valamint a MATE Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszék Genomikai Kutatócsoport munkatársainak, Nagyné Dr. Galbács Zsuzsannának, Péri Lillának a labormunkában nyújtott segítségéért. Továbbá köszönöm belső konzulensemnek Dr. Pásztor-Kovács Szilviának iránymutatását, tanácsait!

Köszönöm a NÉBIH velencei Kutatóállomásának és pölöskei fajtakísérleti telepének, hogy a kutatáshoz szükséges növényi mintákat rendelkezésemre bocsátották és az NKFIH 2019-2.1.11-TÉT-2020-00124 pályázatának támogatását!

Irodalomjegyzék

1. Bawden FC (1945) Plant Viruses and Virus Diseases*. Nature 155:156–158.
<https://doi.org/10.1038/155156a0>
2. Lecoq H (2001) Découverte du premier virus, le virus de la mosaïque du tabac : 1892 ou 1898 ? Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie 324:929–933.
[https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(01\)01368-3](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(01)01368-3)
3. Bernardo P, Charles-Dominique T, Barakat M, Ortet P, Fernandez E, Filloux D, Hartnady P, Rebelo TA, Cousins SR, Mesleard F, Cohez D, Yavercovski N, Varsani A, Harkins GW, Peterschmitt M, Malmstrom CM, Martin DP, Roumagnac P (2018) Geometagenomics illuminates the impact of agriculture on the distribution and prevalence of plant viruses at the ecosystem scale. ISME J 12:173–184. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.155>
4. Scherr SJ, McNeely JA (2008) Biodiversity conservation and agricultural sustainability: towards a new paradigm of 'ecoagriculture' landscapes. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 363:477–494. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2165>
5. Roossinck MJ, García-Arenal F (2015) Ecosystem simplification, biodiversity loss and plant virus emergence. Curr Opin Virol 10:56–62. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.005>
6. NCBI Virus.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/virus?VirusLineage_ss=Viruses,%20taxid:10239&SeqType_s=Genome. Accessed 7 Apr 2024
7. Mahy, B.W.J. ; Van Regenmortel, M.H.V. (2010) Desk encyclopedia of plant and fungal virology | Wageningen University and Research Library catalog. Oxford : Academic Press
8. Gaur RK, Ali A, Cheng X, Mäkinen K, Agindotan B, Wang X (2021) Editorial: Plant Viruses, Volume II: Molecular Plant Virus Epidemiology and Its Management. Front Microbiol 12:..
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.756807>
9. King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB (2011) Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier
10. Rosa C, Kuo Y-W, Wuriyanghan H, Falk BW (2018) RNA Interference Mechanisms and Applications in Plant Pathology. Annual Review of Phytopathology 56:581–610.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050044>
11. Nicaise V (2014) Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. Front Plant Sci 5:.. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00660>
12. Basu S, Sharma VK, Bhattacharyya D, Chakraborty S (2014) An Overview of Antiviral RNA Silencing in Plant: Biogenesis, Host–Virus Interaction and Potential Applications. In: Gaur RK, Sharma P (eds) Approaches to Plant Stress and their Management. Springer India, New Delhi, pp 317–337
13. Haley B, Zamore PD (2004) Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. Nat Struct Mol Biol 11:599–606. <https://doi.org/10.1038/nsmb780>
14. Akbar S, Wei Y, Zhang M-Q (2022) RNA Interference: Promising Approach to Combat Plant Viruses. International Journal of Molecular Sciences 23:5312.
<https://doi.org/10.3390/ijms23105312>

15. Voinnet O (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* 17:449–459. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02367-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02367-8)
16. Burgyán J, Havelda Z (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* 16:265–272. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.010>
17. Naidu R, Hughes J (2003) Methods for the detection of plant virus diseases. In *Proceedings of a conference on Plant Virology in Sub Saharan Africa, 4-8 June 2001, Ibadan, Nigeria* , (pp. 233-253).
18. Jeong J-J, Ju H-J, Noh J (2014) A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. *Research in Plant Disease* 20:173–181. <https://doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>
19. Villamor DEV, Ho T, Al Rwahnih M, Martin RR, Tzanetakis IE (2019) High Throughput Sequencing For Plant Virus Detection and Discovery. *Phytopathology®* 109:716–725. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0257-RVW>
20. López M, Bertolini E, Olmos A, Caruso P, Gorris M, Llop P, Penyalver R, Cambra M (2004) Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 6:233–43. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0143-y>
21. Maree HJ, Fox A, Al Rwahnih M, Boonham N, Candresse T (2018) Application of HTS for Routine Plant Virus Diagnostics: State of the Art and Challenges. *Front Plant Sci* 9:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01082>
22. Martin RR, MacFarlane S, Sabanadzovic S, Quito D, Poudel B, Tzanetakis IE (2013) Viruses and Virus Diseases of Rubus. *Plant Dis* 97:168–182. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0362-FE>
23. Ho T, Broome JC, Buhler JP, O'Donovan W, Tian T, Diaz-Lara A, Martin RR, Tzanetakis IE (2021) Characterization of endogenous Rubus yellow net virus in raspberries. DOI:10.1101/2021.06.17.448838
24. Bojkovska K, Jankulovski N, Mihajlovski G, Momirceski J (2020) ANALYSIS OF MARKET OPPORTUNITIES FOR RASPBERRY PRODUCTION IN THE REPUBLIC OF NORTH MACEDONIA. *International Journal of Research -GRANTHAALAYAH* 8:149–154. <https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v8.i12.2020.2698>
25. Apáti F (2014) Farm economic evaluation of raspberry production. *International Journal of Horticultural Science* 20:53-56. <https://doi.org/10.31421/IJHS/20/3-4/1135>
26. Viruses and Virus Diseases of Rubus. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PDIS-04-12-0362-FE>. Accessed 20 Oct 2023
27. (2009) PM 4/10(2): Certification scheme for Rubus. *EPPO Bulletin* 39:271–277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2009.02308.x>
28. Badnavirus ~ ViralZone. <https://viralzone.expasy.org/120>. Accessed 14 Mar 2024
29. Hull R, Covey SN (1995) Retroelements: Propagation and adaptation. *Virus Genes* 11:105–118. <https://doi.org/10.1007/BF01728652>
30. Bhat AI, Hohn T, Selvarajan R (2016) Badnaviruses: The Current Global Scenario. *Viruses* 8:177. <https://doi.org/10.3390/v8060177>

31. Ishwara Bhat A, Selvarajan R, Balasubramanian V (2023) Emerging and Re-Emerging Diseases Caused by Badnaviruses. *Pathogens* 12:245. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020245>
32. Genus: Badnavirus | ICTV. <https://ictv.global/report/chapter/caulimoviridae/caulimoviridae/badnavirus>. Accessed 5 Mar 2024
33. Kalischuk ML, Fusaro AF, Waterhouse PM, Pappu HR, Kawchuk LM (2013) Complete genomic sequence of a Rubus yellow net virus isolate and detection of genome-wide pararetrovirus-derived small RNAs. *Virus Research* 178:306–313. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.026>
34. Diaz-Lara A, Mosier NJ, Stevens K, Keller KE, Martin RR (2020) Evidence of Rubus Yellow Net Virus Integration into the Red Raspberry Genome. *Cytogenetic and Genome Research* 160:329–334. <https://doi.org/10.1159/000509845>
35. Laney AG, Hassan M, Tzanetakis IE (2012) An Integrated Badnavirus Is Prevalent in Fig Germplasm. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0351>
36. Mette MF, Kanno T, Aufsatz W, Jakowitsch J, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM (2002) Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants. *The EMBO Journal* 21:461–469. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.461>
37. Borah BK, Sharma S, Kant R, Johnson AMA, Saigopal DVR, Dasgupta I (2013) Bacilliform DNA-containing plant viruses in the tropics: commonalities within a genetically diverse group. *Molecular Plant Pathology* 14:759–771. <https://doi.org/10.1111/mpp.12046>
38. Sukal AC, Kidanemariam DB, Dale JL, Harding RM, James AP (2019) Assessment and optimization of rolling circle amplification protocols for the detection and characterization of badnaviruses. *Virology* 529:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.01.013>
39. Diaz-Lara A, Mosier NJ, Keller KE, Martin RR (2015) A variant of Rubus yellow net virus with altered genomic organization. *Virus Genes* 50:104–110. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1149-6>
40. Stace-Smith R (1955) Studies on rubus virus diseases in british columbia: i. rubus yellow-net. *Can J Bot* 33:269–274. <https://doi.org/10.1139/b55-020>
41. Paunovic S, Jevremovic D (2020) High proportion of mixed virus infections in raspberry plantations in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina* 35:27–37. <https://doi.org/10.2298/PIF2001027P>
42. Vakić M, Stainton D, Delić D, Tzanetakis IE (2022) Characterization of the first Rubus yellow net virus genome from blackberry. *Virus Genes* 58:594–597. <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01926-4>
43. Jones AT, McGAVIN WJ, Geering ADW, Lockhart BEL (2002) Identification of Rubus yellow net virus as a distinct badnavirus and its detection by PCR in Rubus species and in aphids. *Annals of Applied Biology* 141:1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2002.tb00189.x>
44. Quito-Avila DF, Lightle D, Lee J, Martin RR (2012) Transmission Biology of Raspberry latent virus, the First Aphid-Borne Reovirus. *Phytopathology®* 102:547–553. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0331>

45. McGavin W, Jones S, MacFarlane S (2023) Distinguishing integrated sub-viral fragments from infectious Rubus yellow net virus in Scottish commercial red raspberry cultivars. *Plant Biology* <https://doi.org/10.1101/2023.03.07.531471>
46. Kalischuk ML, Kawchuk LM, Leggett F (2008) First Report of Rubus yellow net virus on *Rubus idaeus* in Alberta, Canada. *Plant Disease* 92:974–974. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-6-0974A>
47. Rajamäki M-L, Lemmetty A, Laamanen J, Roininen E, Vishwakarma A, Streng J, Latvala S, Valkonen JPT (2019) Small-RNA analysis of pre-basic mother plants and conserved accessions of plant genetic resources for the presence of viruses. *PLOS ONE* 14:e0220621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220621>
48. Ho T, Broome JC, Buhler JP, O'Donovan W, Tian T, Diaz-Lara A, Martin RR, Tzanetakis IE (2024) Integration of Rubus yellow net virus in the raspberry genome: A story centuries in the making. *Virology* 591:109991. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.109991>
49. QIAGEN CLC Genomics Workbench 23.0.1. <https://digitalinsights.qiagen.com/>
50. Geneious Prime 2023.2.1. <https://www.geneious.com>
51. CloneJET™ PCR Cloning Kit. In: ABO - odczynniki i wyposażenie laboratoryjne. <https://abo.com.pl/klonowanie-i-transformacja/clonejet-pcr-cloning-kit>. Accessed 8 Apr 2024
52. Koichiro T, Glen S, Sudhir K (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027
53. Soltani N, Stevens KA, Klaassen V, Hwang M-S, Golino DA, Al Rwahnih M (2021) Quality Assessment and Validation of High-Throughput Sequencing for Grapevine Virus Diagnostics. *Viruses* 13:1130. <https://doi.org/10.3390/v13061130>
54. Bester R, Cook G, Breytenbach JHJ, Steyn C, De Bruyn R, Maree HJ (2021) Towards the validation of high-throughput sequencing (HTS) for routine plant virus diagnostics: measurement of variation linked to HTS detection of citrus viruses and viroids. *Virol J* 18:61. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01523-1>
55. Green MR, Sambrook J (2019) Inverse Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2019:pdb.prot095166. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095166>
56. Tripathi JN, Ntui VO, Ron M, Muiruri SK, Britt A, Tripathi L (2019) CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. *Commun Biol* 2:1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0288-7>

Mellékletek

1. táblázat: A vírusgenom hiányzó részeit ezen primer kombinációk segítségével próbáltam amplifikálni.

Forward primer	Reverse primer	Siker
RYNV_243F	RYNV_4283R	nem
RYNV_243F	RYNV6R	nem
RYNV_3040F	RYNV_1033R	igen
RYNV6F	RYNV_1033R	nem
RYNV_1010F	RYNV_3283R	nem
RYNV_3040F	RYNV_5514R	igen
RYNV_5004F	RYNV_7364R	nem
RYNV_7029F	RYNV_1033R	nem

2. Százalékos hasonlóságok a RYNV_243F/RYNV_1033R primerpárral amplifikált, 790 bázispár hosszúságú szakaszok szekvenciái, illetve a teljes RYNV genomok ezen része közötti hasonlóság meghatározásához.

	Teodor reimers	Fertődi 7054/6/1	Esterhazy bőtermő	Fertődi narancs	Blissy	Himbo queen	Summit	Fertődi narancs	KF24 1951. 1	MN245 240	MZ358 192	NC026 238	OK666 525
Teodor reimers		99,75	74,24	83,93	99,52	82,12	84,18	99,36	82,12	83,80	78,06	77,91	78,03
Fertődi 7054/6/1	99,75		74,11	83,67	99,27	82,12	83,93	99,36	82,12	83,55	78,06	77,91	78,03
Esterhazy bőtermő	74,24	74,11		88,12	73,79	70,37	88,00	73,89	70,37	87,74	66,07	66,92	66,67
Fertődi narancs	83,93	83,67	88,12		83,47	80,08	99,75	83,57	80,08	99,36	75,00	75,86	75,61
Blissy	99,52	99,27	73,79	83,47		81,67	83,73	98,89	81,67	83,34	77,61	77,46	77,58
Himbo queen	82,12	82,12	70,37	80,08	81,67		80,33	81,76	100,0	80,20	86,85	86,96	86,57
Summit	84,18	83,93	88,00	99,75	83,73	80,33		83,82	80,33	99,62	75,13	75,99	75,73
Fertődi narancs	99,36	99,36	73,89	83,57	98,89	81,76	83,82		81,76	83,44	77,83	77,68	77,81
KF241951	82,12	82,12	70,37	80,08	81,67	100,00	80,33	81,76		80,20	86,85	86,96	86,57
MN245240	83,80	83,55	87,74	99,36	83,34	80,20	99,62	83,44	80,20		75,00	75,86	75,61
MZ358192	78,06	78,06	66,07	75,00	77,61	86,85	75,13	77,83	86,85	75,00		97,32	97,06
NC026238	77,91	77,91	66,92	75,86	77,46	86,96	75,99	77,68	86,96	75,86	97,32		98,72
OK666525	78,03	78,03	66,67	75,61	77,58	86,57	75,73	77,81	86,57	75,61	97,06	98,72	

3. Százalékos hasonlóságok a RYNV_3040F/RYNV_4283R primerpárral amplifikált, 1243 bázispár hosszúságú szakaszok szekvenciái, illetve a teljes RYNV genomok ezen része közötti hasonlóság meghatározásához.

	Blis- sy	Fertodi_705 4_6_1/ zamos/ narancs, E_botermo	Fertodi narancs	Himbo queen	KF2419 51.1	MN245 240.1	MW0 80369 .1	MZ35 8192. 2	NC_0 26238 .1	OK66 6525. 1	Sum- mit	Teo- dor Rei- mers
Blissy		99,94	99,72	86,66	86,64	83,50	68,10	83,78	84,51	84,51	99,76	99,70
Fertodi_7054_6_1/ zamos/narancs, E_botermo	99,94		99,78	86,72	86,70	83,56	68,10	83,84	84,57	84,57	99,82	99,76
Fertodi_narancs	99,72	99,78		86,49	86,48	83,34	68,10	83,70	84,35	84,35	99,60	99,70
Himbo_queen	86,66	86,72	86,49		99,52	85,38	68,95	83,89	84,62	84,22	86,61	86,47
KF241951.1	86,64	86,70	86,48	99,52		85,29	68,76	83,72	84,44	84,04	86,52	86,46
MN245240.1	83,50	83,56	83,34	85,38	85,29		69,71	81,48	82,04	81,88	83,38	83,32
MW080369.1	68,10	68,10	68,10	68,95	68,76	69,71		68,29	68,38	68,00	68,10	68,10
MZ358192.2	83,78	83,84	83,70	83,89	83,72	81,48	68,29		97,43	97,35	83,66	83,60
NC_026238.1	84,51	84,57	84,35	84,62	84,44	82,04	68,38	97,43		99,12	84,39	84,33
OK666525.1	84,51	84,57	84,35	84,22	84,04	81,88	68,00	97,35	99,12		84,39	84,33
Summit	99,76	99,82	99,60	86,61	86,52	83,38	68,10	83,66	84,39	84,39		99,58
Teodor Reimers	99,70	99,76	99,70	86,47	86,46	83,32	68,10	83,60	84,33	84,33	99,58	