

SZENT ISTVÁN EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BUDAPEST

A Furmint szőlőfajta dűlönkénti virológiai vizsgálata Tokaj-Hegyalján

Czakó Éva Kamilla

Szőlész-borász mérnök alapképzési szak

Készült a Szőlészeti Tanszéken

Közreműködő tanszék(ek): NAIK-Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet,
Diagnosztika Csoport

Tanszéki konzulens: **Deák Tamás**, Egyetemi docens

Konzulens(ek): **Dr. Várallyay Éva**, Tudományos főmunkatárs

Bírálok: _____

Budapest, 2017

tanszékvezető/szakirányfelelős

konzulens

Tartalom

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	4
1. BEVEZETÉS	5
1.1. CÉLKITŰZÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. A BORVIDÉK JELLEMZÉSE SZŐLÉSZETI ÉS NÖVÉNY-EGÉSZSÉGÜGYI SZEMPONTBÓL	7
2.2. A FURMINT SZŐLŐFAJTA LEÍRÁSA ÉS KÓROKOZÓKRA VALÓ ÉRZÉKENYSÉGE	8
2.3. NÖVÉNYI VÍRUSOK- ÉS VÍRUS OKOZTA MEGBETEGEDÉSEK	9
2.3.1. VÍRUSOK JELLEMZÉSE	9
2.3.2. NÖVÉNYI VÍRUSOK TERJEDÉSE ÉS TŰNETEIK	10
2.3.3. A VÍRUSFERTŐZÉS MOLEKULÁRIS HÁTTERE	12
2.3.4. MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ SZŐLŐVÍRUSOK	15
2.4. VÍRUSDIAGNOSZTIKAI VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK	18
2.4.1. VÍRUSDIAGNOSZTIKA A MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK ELŐTT	18
2.4.2. SZEROLÓGIAI MÓDSZEREK	18
2.4.3. PCR ALAPÚ MÓDSZEREK	19
2.4.4. NUKLEINSAV HIBRIDIZÁCIÓN ALAPULÓ MÓDSZEREK	21
2.4.5. ÚJ-GENERÁCIÓS HIBRIDIZÁCIÓS MÓDSZEREK	21
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	23
3.1. A KUTATÓMUNKA HELYSZÍNE	23
3.2. A KÍSÉRLET MEGTERVEZÉSE	23
3.3. MINTAVÉTEL	24
3.3.1. A MINTAVÉTEL MÓDSZERE	24
3.3.2. A MINTAVÉTEL HELYE	25
3.4. RNS-EXTRAKCIÓ	27
3.5. VÍRUS-SPECIFIKUS PRIMEREK	28
3.6. cDNS KÉSZÍTÉSE REVERZ TRANSZKRIPCIÓVAL	29
3.7. A cDNS MINŐSÉGÉNEK ELLENŐRZÉSE	29

3.8. PCR VÍRUSSPECIFIKUS OLIGÓKKAL	30
4. EREDMÉNYEK	31
4.1. RNS-EXTRAKCIÓ	31
4.2. POOLOK KÉSZÍTÉSE	32
4.3. PCR AKTIN TESZT	33
4.4. PCR VÍRUS SPECIFIKUS OLIGÓKKAL	33
4.5. AZ DIAGNOSZTIKA ELEMZÉSE ÜLTETVÉNYPOOLOKON	34
4.5.1. ARMV DIAGNOSZTIKA EREDMÉNYE	34
4.5.2. GVB-RSPAV DIAGNOSZTIKA EREDMÉNYE	34
4.5.3. GFkV DIAGNOSZTIKA EREDMÉNYE	34
4.5.4. GFLV-GLRAV-1 DIAGNOSZTIKA EREDMÉNYE	35
4.5.5. GPGV DIAGNOSZTIKA EREDMÉNYE	35
4.5.6. GSYV-1 DIAGNOSZTIKA EREDMÉNYE	35
4.5.7. GVA-GLRAV-2 DIAGNOSZTIKA EREDMÉNYE	36
4.5.8. GLRAV-3 DIAGNOSZTIKA EREDMÉNYE	36
4.5.9. NEPOB DIAGNOSZTIKA EREDMÉNYE	36
4.6. AZ ÜLTETVÉNYEK VÍRUSÖSSZETÉTELE	37
5. KÖVETKEZTETÉS	38
6. ÖSSZEFOGLALÁS	40
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	41
8. IRODALOMJEGYZÉK	42

Rövidítésjegyzék

<i>Rövidítés</i>	<i>Jelentése</i>
<i>ArMV</i>	Arabis mosaic virus
<i>cDNS</i>	kópia-DNS
<i>CTAB</i>	Trimentilammónium-bromid
<i>DCL</i>	Dicer-like proteins (Dicer-szerű fehérjék)
<i>dNTP</i>	dezoxiribonukleotid
<i>EDTA</i>	Etilén-diamin-tetraecetsav
<i>ELISA</i>	Enzyme-linked immunosorbant assay
<i>GFkV</i>	Grapevine fleck virus
<i>GFLV</i>	Grapevine fanleaf virus
<i>GFLV-VB</i>	Grapevine fanleaf virus-
<i>GFLV-YM</i>	Grapevine fanleaf virus-Yellow Mosaic
<i>GLRaV-1,2,3</i>	Grapevine leafroll.associated virus-1,2,3
<i>PGPV</i>	Grapevine Pinot Gris virus
<i>GSyV-1</i>	Grapevine Syrah virus-1
<i>GVA</i>	Grapevine virus A
<i>GVB</i>	Grapevine virus B
<i>NGS</i>	Next-Generation sequencing (Új-generációs szekvenálás)
<i>PCR</i>	Polimerase chain reaction (Polimeráz láncreakció)
<i>PVP</i>	Polivinil-pirrolidon
<i>RISC</i>	RNA-induced Silencing Complex (RNS indukálta csendesítésért felelős fehérjekomplex)
<i>RSPaV</i>	Rupestris stem pitting-associated virus
<i>Tris-HCl</i>	2-amino-2-hidroximethyl-1,3-propánediol-hidrogénklorid

1. Bevezetés

Manapság szinte közhelynek számít az a kijelentés, miszerint a bor minősége 80%-ban a szőlőben dől el, pedig közel áll a valósághoz. Ez a szám több tényezőtől tevődik össze. Egyrészt a megfelelő szőlészeti döntések meghozatalából, például egy adott fajta megfelelő termőhelyre való telepítésével, megfelelő művelésmód megválasztásával, vagy talaj összetételének ismeretéből, és a megfelelő tápanyag-utánpótlásából. Az alábbi felsorolás csak néhányat tartalmaz a számtalan szőlészeti feladatból, amelyek önmagukban is nagy szakértelmet igényelnek.

A másik fontos tényező a szőlőültetvény egészségének a fenntartása, hiszen tudjuk, hogy hibátlan, harmonikus, akár kiemelkedő bor csak egészséges, megfelelően érett alapanyagból készülhet. Ez igen összetett feladat, mert számos kártevő és kórokozó támadhatja meg a szőlőt. A jó szakembernek tudnia kell azonosítani ezeket és kidolgozni a megfelelő védekezési stratégiát, úgy hogy a lehető legkisebb ökológiai lábnyomot hagyja a védekezés nyomán. Napjainkban a növényvédelem újabb és újabb kihívásokkal szembesül. A globális éghajlatváltozás és a gyors nemzetközi transzfernek köszönhetően új, akár rezisztens kártevők és kórokozók jelentenek veszélyt hazánkban. Ezek közül is dolgozatomban a Magyarországon jelenleg kissé kevésbé a figyelem középpontjában lévő, de a jövőben várhatóan egyre nagyobb veszélyt jelentő vírusokkal foglalkozom. Véleményem szerint azért sincsenek ezek a kórokozók olyan szinten a köztudatban, mert az állati kártevők és a gombás fertőzések sokszor túlságosan lefoglalják a gazdákat. A szakmai gyakorlatomat az Egyesült Államokban járva döbbsentem rá, hogy mekkora kárt is tudnak okozni a vírusok a szőlőültetvényekben, ha a lisztharmat és a rothadás nincs jelen. Voltak olyan területek, ahol a vírusfertőzés tüneteit mutató tőkék tömege már messziről látható volt. Egyes parcellákban 5-10 évente kell újratelepítést végezni, mert ez idő alatt a tőkék nagy hányada rendszerint kipusztul. A szakemberek elmondása szerint a talajok nagy része fertőzött. Leginkább a tökesatnyulás és a levélsodródási komplex tünetei mutatkoznak, de számos más betegség neve is felmerült. A látottak ráébresztettek a téma relevanciájára, hiszen az a nagymértékű eszmei és gazdasági kár, amit a szőlővírusok az amerikai kontinensen okoznak, mindenképp elgondolkodtató. Hiszem, hogy megfelelő edukációval és prevencióval elkerülhetjük, hogy Magyarországon is hasonló képet mutassanak a szőlőterületeink.

A növényvírusok azon kórokozók közé tartoznak, melyek a mindennapi termesztésben csak akkor hívják fel magukra a figyelmet, ha már a növények egyértelmű tüneteket mutatnak. Maga a kórokozó csak elektronmikroszkóp segítségével látható, és szakavatott szemmel sem lehetséges a pontos azonosítása. A növényen csak tünetek alapján azonosíthatóak, de egy tünet megjelenése nem zárja ki a többi kórokozó jelenlétét. Az egyidejű fertőzések száma igen nagy, szinte minden esetben előfordul. A vírusok elleni védekezés is igen nehéz, hiszen a fertőzött növény jelenlegi tudásunk szerint nem gyógyítható, így az ellenük való védelem kimerül a prevencióban, a szaporítóanyag vírusmentesítésében és a vektorok elleni védekezésben. Egy növény fertőzöttségének mértéke molekuláris biológiai módszerekkel határozható meg a legbiztosabban.

1.1. Célkitűzés

Dolgozatomban azt a szőlőtermesztésben fellépő, kérdést vizsgálom, hogy adott szőlőültetvényeken milyen gyakorisággal, illetve tömegességben fordulnak elő, tipikusan a szőlőre jellemző növényvírusok. Szeretnék szót ejteni a vírusok biológiájáról és Magyarországon okozott betegségekről. A kísérleti részben pedig egy komplex, 5 dűlőre kiterjedő PCR technológián alapuló vírusdiagnosztikát mutatok be.

Figyelembe véve, hogy egyes fajták érzékenyebben reagálnak bizonyos vírusokra, illetve tünetaik jobban kifejeződnek, a kísérletet egyetlen fajtán, a Tokaj-Hegyalján legnagyobb mértékben termesztett Furminton végeztük, de a fajtán belül, a különböző klónokat nem különböztettük meg.

A mintavétel tervezésénél a cél az volt, hogy különböző, egyedi tulajdonságokkal rendelkező dűlőkből, de lehetőleg hasonló termesztési körülmények közül vegyük a nukleinsav-kivonásra szánt növényi mintákat. Azt is szerettem volna vizsgálni, hogy ezek a körülmények lehetnek-e befolyással a vírus fertőzöttségre.

Alapvetően tüneteket nem mutató, látszólag egészséges tőkét, de ezek mellett vírusos fertőzés jeleit mutató tőkét is vizsgáltunk. A látható vírusos betegségek tüneteinek túl egyéb betegségek tüneteit, illetve speciális körülményeket kerestünk. Az egyik ültetvényben egy vas-hiány jeleit mutató táblából vettünk mintát, míg egy másik ültetvényben, ahol az átlagosnál több ESCA megbetegedés volt jelen, igyekeztünk ESCA tünetes tőkét is mintázni. Egy harmadik ültetvényről a mintavétel közben megtudtuk, hogy a szőlőtelepítés előtt a területen szeder nagy egyedszámban volt jelen, és a sorközök takarónövényzetének jelenleg is tagja, így itt szederről is gyűjtöttünk mintát.

A célkitűzések között szerepelt az is, hogy a Magyarországon nemrégiben kimutatott Grapevine Pinot Gris Virus tokaji jelenlétét feltérképezzük és keressünk olyan faktorokat, amelyek az elterjedését befolyásolják.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A borvidék jellemzése szőlészeti és növény-egészségügyi szempontból

A Tokaji borvidék Magyarország észak-keleti csücskében, a Zempléni hegység lábánál helyezkedik el. A hegység vonulatai mentén, a völgyekben és medencékben helyezkednek el a legkiválóbb területek. A Miocén korszak-béli vulkáni tevékenység és gejzírek aktív működése alakította ki a jelenlegi rendkívül változatos talajszerkezetet. Az alapkőzet legjellemzőbb alkotói többek között az andezit, riolit, riolit-tufa, és a dácit, egyes helyeken pedig a lösz az uralkodó talajféleség. A települések dűlői közötti különbségnek ez az egyik meghatározója. Például Tokaj és Tarcas körzetében löszös a talaj, míg Mádon, Rátkán, vagy Tállyán a vulkanikus kőzet a jellemző. A klíma száraz kontinentális, az átlagos évi középhőmérséklet 9.5°C. Az évi csapadékmennyiség kicsivel több, mint a Magyarországon átlagos, 590 mm. Jellemzően északi, észak-keleti szelek fújnak. A napsütéses órák száma 1950 óra körül van.

Az átlagosnak tűnő adatok ellenére a borvidék klímája igen speciális, ami csak bizonyos évjáratokban, az őszi beköszöntével nyilvánul meg. A vidéket számos folyó szeli át, a legnagyobbak a Tisza és a Bodrog. A folyók közelsége miatt állandó jelenséggé vált a köd, és a sűrű, kesztyűujj-szerű hegy-völgy tagolódás miatt a pára nagyon sokszor bent ragad a területeket magába foglaló völgyekben. Ha ez meleg, napsütéses őszi időjárással párosul, nemesrothadás lép fel. Ez egyben hátrányt is jelenthet, hiszen ha a meleg, száraz periódus elmarad, és a páratartalom hosszú ideig magas, kombinálva az őszi esőzésekkel, komoly károkat okozhat a szürke- és fakórothadás. Az egyéb gombás megbetegedések jelenléte évjáratfüggő. Talán a szőlőorbáncot lehet kiemelni, ami a borvidék magasabban fekvő területein évről-évre megjelenhet.



1. ábra. Jellemző őszi látvány Tokaj-hegyalján, melyen jól látszik a völgyekben megülő köd

Kórtani betegségek szempontjából általánosnak mondható a kép. Elvértve lehet találkozni olyan fás betegségek tüneteivel, mint az *Eutypás elhalás*, vagy a *Botrioszfériás karelhalás*. Viszont a Magyarországon a 2000-es évektől rohamosan terjedő ESCA a Tokaji borvidéken is egyre nagyobb számban van jelen. 2003 és 2005 között folyó vizsgálatban a vizsgált tökéek 1,4%-a mutatott tüneteket. Ezt a betegség komplexet számos különböző gombafaj együttes fertőzése okozza, és egyes feltételezések szerint vírusfertőzés is közrejátszódhat az Esca kialakulásában. (Rábai et al. 2008)

A másik hazánkban nagy fenyegetést okozó kórokozó a *Flavescence dorée* fitoplazma, amely a Szőlő arany színű sárgaság betegséget okozza. Egyetlen ismert vektora, az amerikai szőlőkabóca (*Scaphoideus titanus*) a keleti országrészben, a Tisza vonalán nagyszámú populációkban van jelen. Ennek ellenére a Nébih legfrissebb adatai szerint fertőzött tökét a borvidéken még nem írtak le.

2.2. A Furmint szőlőfajta leírása és kórokozókra való érzékenysége

A Furmint már a Csepregi Pál professzor, 50-es évek béli leírása alapján is az egyik legértékesebb és legkiválóbb, feltételezhetően magyar eredetű szőlőfajta. Akkor már kivétel nélkül minden borvidéken termesztették, a legnagyobb mértékben és egyben legjobb minőségben Tokaj-hegyalján, Somlón, Mecsek-alján és Badacsonyan.

Az újabb leírások a Balkán-félszigetről, vagy a Szerémségből eredeztetik és a pontuszi változatcsoportba sorolják. A fajtakörbe számos fajta tartozik, mi leggyakoribbat, a Fehér furmintot vizsgáltuk. Termesztésben ennek 7 klónja lelhető fel. A fürtje középnagy, hengeres és tömött. Mivel rosszul termékenyül, gyakran előfordul, hogy madárkás a fürt, a bogyói nem egyszerre érnek be. Ennek következtében az érés későbbi fázisában is felléphet az éretlenebb bogyókon lisztharmat fertőzés, ami a bogyók felrepedésének esetében rothadást indíthatnak a fürt belsejéből. Hosszú tenyészidejű fajta, korán fakad, közepes időben virágzik, zsendül, és későn ér. A biológiai érettséget október közepén éri el. Közepes termőképességű, bogyópergésre nem hajlamos. Tőkéje hosszú élettartamú (Hajdú, 2003).

Az ellenállását tekintve fagyérzékeny, de szárazságtűrő. Azt tudjuk, hogy a gombás fertőzésekre, különösen a rothadásra fogékony. Bogyói könnyen rothadnak, illetve nemesrothadnak. Viszonylag szellős lombzatot nevel, így megfelelő zöldmunkával és az ültetvény fekvésének optimális megválasztásával számos gombás fertőzéssel szemben könnyedén megvédhető.

Bora jellegzetes illatú és zamatú, sajátos fanyar ízvilággal. Mivel sokáig megtartja a savakat, de jó cukorgyűjtő is egyben, bora igen harmonikus lehet, és hosszan eltartható. Nincs különleges környezeti igénye, és minden talajhoz jól alkalmazkodik, bora remekül képes kifejezni a termőhely egyediségét. Tokaj-hegyalján nemes-rothadásra való hajlama és intenzív ízanyagai miatt a botritiszes édes borok fő alapanyaga.



2. ábra. A Furmint szőlőfajta morfológiai felépítése (Hajdú, 2003)

2.3. Növényi vírusok- és vírus okozta megbetegedések

2.3.1. Vírusok jellemzése

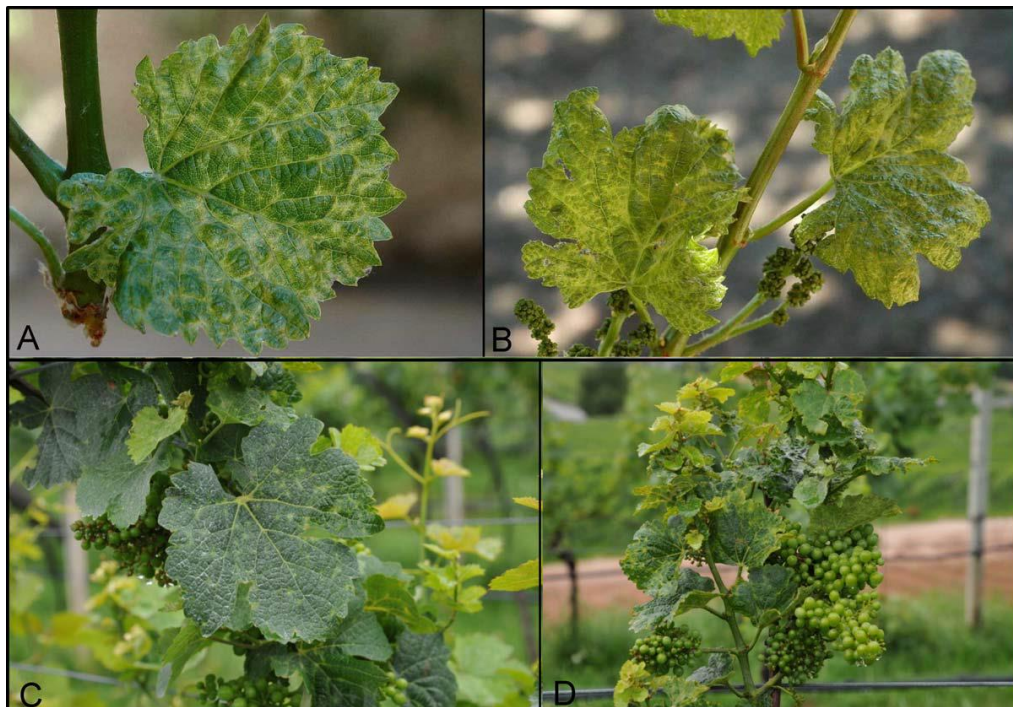
A vírusok legegyszerűbben úgy írhatóak le, hogy olyan fertőző, megbetegedést okozó kórokozók, amelyek csupán genetikai anyagból és az azt körülvevő fehérjeburokból állnak, egyedi gazdaspecifitással rendelkeznek (Lázár, 2011). Önálló metabolikus folyamatokra nem képesek, ezért a gazdasajt mechanizmusait használják, mind a genom, mind a fehérjeburok szintéziséhez, azaz új vírusok termeléséhez. Gazdasejten kívül virion formában vannak jelen, amely kitaróképletnek felel meg. Minden élő formát képesek megfertőzni, többek között, állati, növényi és bakteriális szervezeteket, de még gombákat és fitoplazmákat is. Apró méretük miatt fénymikroszkóppal nem láthatóak, 30-tól 450 nm-es mérettartományba esnek, amely érték 100-szor kisebb, mint egy átlagos baktériumé.

2.3.2. Növényi vírusok terjedése és tünetei

Más vírusokhoz hasonlóan a növényi vírusok is obligát, intracelluláris paraziták, amelyek gazdasejt nélkül nem képesek önálló replikációs és reprodukciós mechanizmusokra. Mivel a gazdanövény génkészletét és enzimszisztémáját is felhasználják a szaporodáshoz, előnyösebb számukra, ha ezt fejlettebb szervezetekben teszik, éppen ezért, számos növényvírus magasabb rendű, edényes növények patogénje. Ebbe sajnálatos módon beletartozik szinte az összes, ember által termesztett haszon-, kultúr-, és dísnövény, amelyeket nagyon nagy számban meg is fertőznek ezek a kórokozók. Csupán Európában közel 1000 növényi vírusbetegséget írtak le, világszerte pedig, egyes becslések szerint akár 40 millió Euró kárt okoznak egyetlen év lefolyása alatt (Herranz et al. 2005). A termesztett növényeket is nagyon nagyszámú és gazdaságilag jelentős vírus és viroid fertőzi. Ha egy vírus, vagy viroid megfertőz egy növényt, annak sem a megfékezése, sem az ellene való védekezés nem lehetséges. Ezért a területen történő terjedésének lelassítása érdekében nagyon fontos a korai stádiumban való azonosítása, és a fertőzött növény eltávolítása.

2.3.2.1. Növényi vírusok tünetei

A vírus-növény interakció következtében megjelenhetnek a növényen morfológiai, fiziológiai, és strukturális elváltozások. Ezeket összefoglalóan tüneteknek vagy szimptomáknak hívjuk. Észlelésük még a laikus szemnek sem nehéz feladat, mivel legtöbbször a normálistól igen eltérő színben és mintázatban, illetve beteges megjelenésben nyilvánul meg. Két csoportra különíthetjük a tüneteket. Lokális vagy primer és szisztémikus vagy szekunder szimptomákra. A primer tünetek klorózis, vagy nekrosis formájában jelentkeznek és nem specifikusak a kártevőre. A szekunder szimptomák tünetcsoportként jelentkeznek, jellegzetesek, akár a kórokozó azonosítására is lehetőséget nyújtanak (Ghoshal & Sanfaçon 2015).



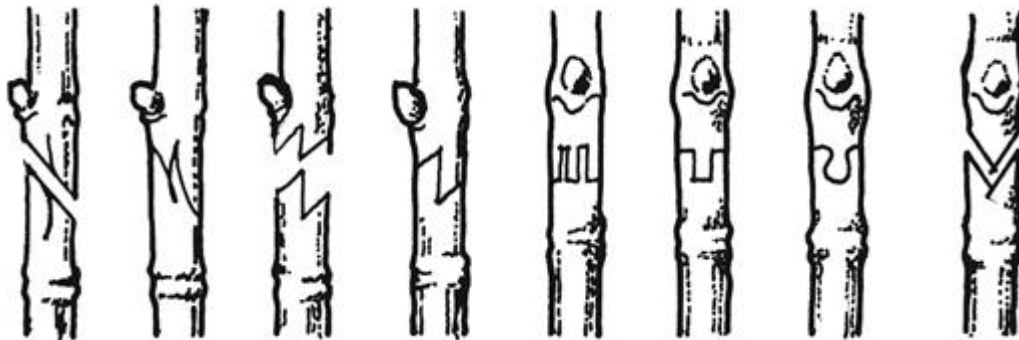
3. ábra. A Grapevine Pinot Gris vírus tünetcsoportja; deformált levelek (A), rövidülő ízközök (B) klorotikus foltok (C), és egyenlőtlenül termékenyült fürtök (D).

2.3.2.2. *Növényi vírusok terjedése*

A növényvírusok virion formájában képtelenek az önálló mozgásra, infekciójuk hatékonysága csakis a terjesztését végző vektoroktól és szaporítóanyagtól függ. Növényről növényre, vagy egyik sejtől a másikba történő transzmissziójuk egészen más stratégián alapul, mint az állati vírusoké. Ennek oka a növényi sejtek, állati- és bakteriális sejtektől eltérő felépítése, a sejtfal jelenléte, és az nyilvánvaló tény, hogy a növények nem képesek aktív mozgásra. Az akadályok ellenére mégis igen hatékony módszereket fejlesztettek ki az infekcióra. Ezek a néhány 100 nm-es vírusok képesek sejtről sejtre akár 4-80 $\mu\text{m}/\text{óra}$, illetve szállítónyaláiban 0,1-0,2 $\text{cm}/\text{óra}$ sebességgel terjedni. (Érsek T, 1998)

2.3.2.3. *Mechanikai transzmisszió*

Mechanikai átviteli formák közé tartozik az oltás, a szemzés, a sebzés, dugványozás és egyéb vegetatív szaporítószervekkel történő átvitel. Ezek mind olyan vírusfertőzéseknek a kiindulópontjai, amelyek emberi beavatkozásból származnak, és a nem elég körültekintő, illetve a szakszerű vírusdiagnosztikát mellőző szaporításból erednek. A szőlőszaporításban ez különösen nagy veszélyt jelent, hiszen a termelési célra előállított szaporítóanyag szinte minden esetben oltványként kerül a piacra. Az oltvány iskolák sokszor már eleve vírussal fertőzött növényi anyaggal dolgoznak, nem alkalmaznak vírusmentesítési technológiákat, sokszor tudatában sincsenek a veszélyeztető tényezőknek.



4. ábra. A szőlő legelterjedtebb vegetatív szaporítási módjának, az oltásnak különböző formái (Bényei, 1999).

2.3.2.4. *Vektor-mediált transzmisszió*

A gomba-, vagy állatvektor általi terjedési mód a legdifferenciáltabb. A vektorok lehetnek többek között a tripszek, a levéltetvek, a fátylek, a poloskák és a kabócák. Az ízeltlábúak általi terjesztés általában négy dologtól függ. Egyrészt, hogy növényen táplálkozó állatnak mennyi ideig tart annak nedveiből kinyerni a fertőzőképes vírust, majd ez a fertőzőképesség meddig áll fenn, ehhez kapcsolódva pedig mennyi időbe telik a rovarnak egy másik növényre való átjutása, együttesen mennyi a vírus „életideje”. Végül pedig vannak olyan speciális vírusok, amelyek a vektort köztigazdának használják, egyes elemeik replikációját állati sejtekben hajtják végre (Roossinck 2015).

A szőlő esetében a rezisztencianemesítés, különösen a Nematoda rezisztencia erősítése egyes alanyfajoknál remek fegyvert adhat a kezünkbe a fonálféreg-fajokkal terjedő vírusok ellen. A Magyarországon használt fajták közül a Teleki 5C, az Amerikában kedvelt Salt Creek, vagy Freedom (*V. champinii*, vagy annak keresztezései) magas rezisztenciát mutatnak a fonálférekkel szemben (Keller 2015).

2.3.3. A vírusfertőzés molekuláris háttere

2.3.3.1. A gazda és a vírus genom szerveződése

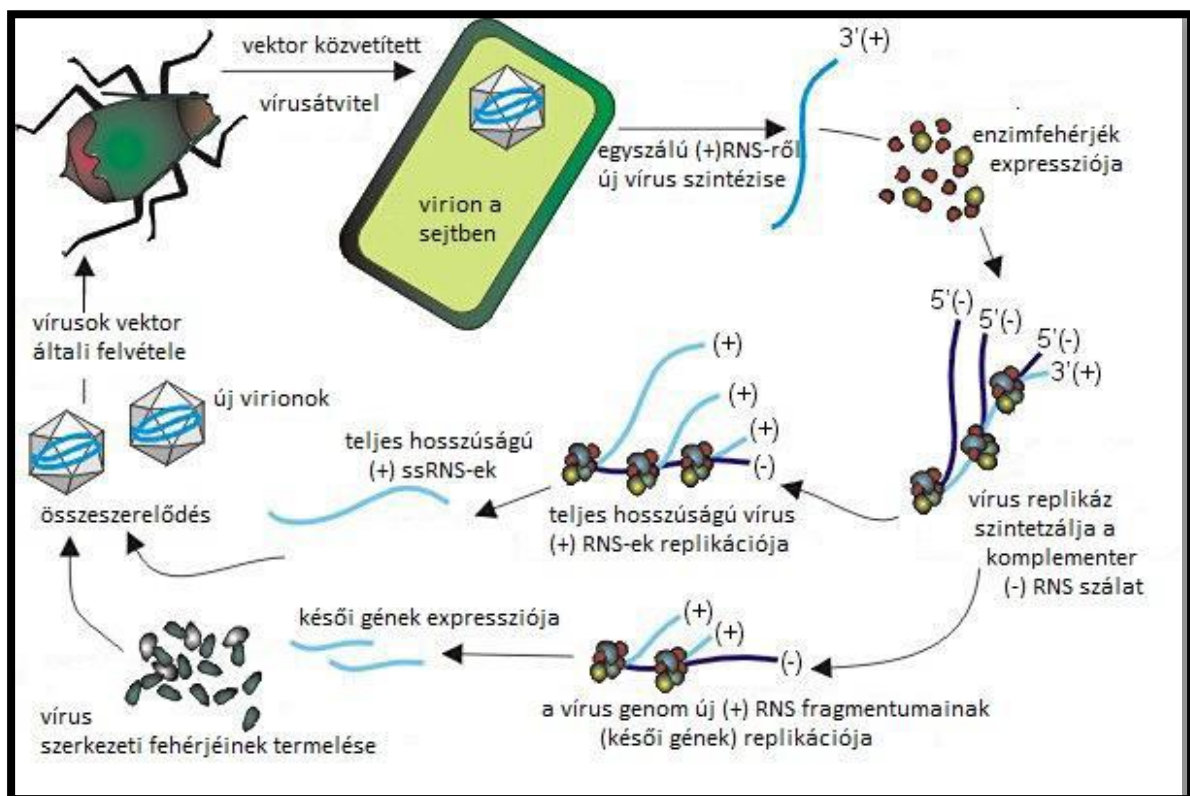
A vírusokat önmagukban felfoghatjuk fertőzést okozó nukleinsavaknak. A genom egy organizmus örökítőanyagának teljes információtartalmát jelenti. A virális genom felépítése nagyon sokféle lehet, az RNS, vagy DNS molekulák szerkezetét, szerveződését és irányultságát tekintve. Tartalmaz kódoló (a növényi gazdában fehérjévé átíródó) és nem kódoló szekvenciákat is. (Horváth, 1999).

A vírusgenomok az összes élőlény genomjával összehasonlítva a legkisebb méretűnek számítanak. Méretük átlagosan 20000 nukleotid hosszúságú. A növényi vírusok átlagosan 5-10 génnel rendelkeznek, ezek pedig általában 4 különböző funkciójú fehérjét kódolnak. Az első csoportba a replikáz komplex enzimei tartoznak, amelyek polimeráz és helikáz funkciójukkal biztosítják a genom gazdasejten belüli átírását. A második csoport tagjai speciális, plazmodezmákon keresztüli mozgást segítő fehérjéket kódolnak. Harmadikként beszélhetünk a köpenyfehérjéket kódoló génekről, amelyek a kapszidot alkotó polipeptidek termeléséhez szükségesek. Utolsóként említhetők proteináz típusú enzimfehérjék, amelyek egyes vírusoknál segítik a vírusfehérjék termelését és virionná alakulását. Ez olyan vírusokban van jelen, amelyekben a fehérjék poliproteinként termelődnek (Érsek T., 1998).

2.3.3.2. Replikáció és transzkripció, vírusfertőzés folyamata

Replikációnak a DNS molekula megkettőződését hívjuk. Tágabb értelemben a genetikai információ áramlásának folyamata, ami sokféle módon megvalósulhat. A lényege, hogy az információ úgy kerül át egyik molekuláról a másikra, hogy az egyik monomersorrendje alapján alakul ki a másik monomersorrendje. A vírusok nem rendelkeznek saját nukleinsav-, és fehérjeszintetizáló képességgel. Anyagaik előállításához a gazdasejt enzimmérszletét használják fel, olyan módon, hogy átprogramozzák annak működését. A virionok bioszintéziséhez vezető folyamatok összességét produktív infekciónak hívjuk, amely 5 szakaszra osztható: adszorpció, penetráció, dekapzidáció, eklipszis, maturáció, kiszabadulás (Horváth, 1999).

Az első az adszorpciós fázis, melynek során a virion és a gazdasejt között stabil kötődés alakul ki. A növénypatogén vírusok passzív módon, valamilyen vektor közvetítésével jutnak el a még egészséges gazdasejtbe. Ezt követő lépés a penetráció a teljes virion, vagy annak genetikai anyagának bejutása a gazdasejtbe. Különböző mechanizmusokkal történhet, a nukleinsav belövellésétől kezdve a fagocitózison át, olyan vektor használatáig, ami egyenesen a sejtbe hatol. Harmadik lépésként dekapszidáció történik, ami egyet jelent a vírus fehérjeburkának elemésztésével, egy speciális kapszidbontó enzim segítségével történik a deproteinizálódás. Erre azért van szükség, hogy az új vírusok keletkezéséhez szükséges nukleinsav teljes egészében hozzáférhető legyen az enzimek számára. A negyedik fázis az eklipszis. Ekkor zajlanak a leglényegesebb szintetikus folyamatok. A vírus nukleinsavban tárolt információja alapján, a gazda polimeráz enzimjeinek segítségével szintetizálódnak az új vírus elemei. Ez különböző módokon történhet. A leggyakoribb, amikor a pozitív szárlól először egy negatív szál szintetizálódik, majd arról nagyszámú új pozitív szál képződik, így történik a nukleinsav megsokszorozódása. Az ötödik szakasz, a maturáció során a szintetizálódott nukleinsav és fehérje virionná épülnek össze. Ez a növényvírusok esetében nem mindig meg végbe, mivel a plazmodezmákon át történő terjedéshez nem feltétlenül szükséges a virion létrehozása. Az utolsó fázis a kiszabadulás, amikor megtörténik a fertőzőképes vírus, vagy virion kijutása a sejtből (D'Arcy, 2000).



5. ábra **A produktív replikáció folyamata.** A (+) RNS vírus vektor közvetített módon bejut sejtbe, majd ott megkezdődik replikációját. Elsőként az enzimek expressziója történik, majd azok elvégzik a (-), majd arról a (+) szálak replikációját. Ezt követően a késői gének termékeként előállítódik a szerkezeti fehérjék is, amelyek a (+) ssRNS-ekkel összeszerelődve fogják alkotni az új virionokat. (D'Arcy, 2000 alapján).

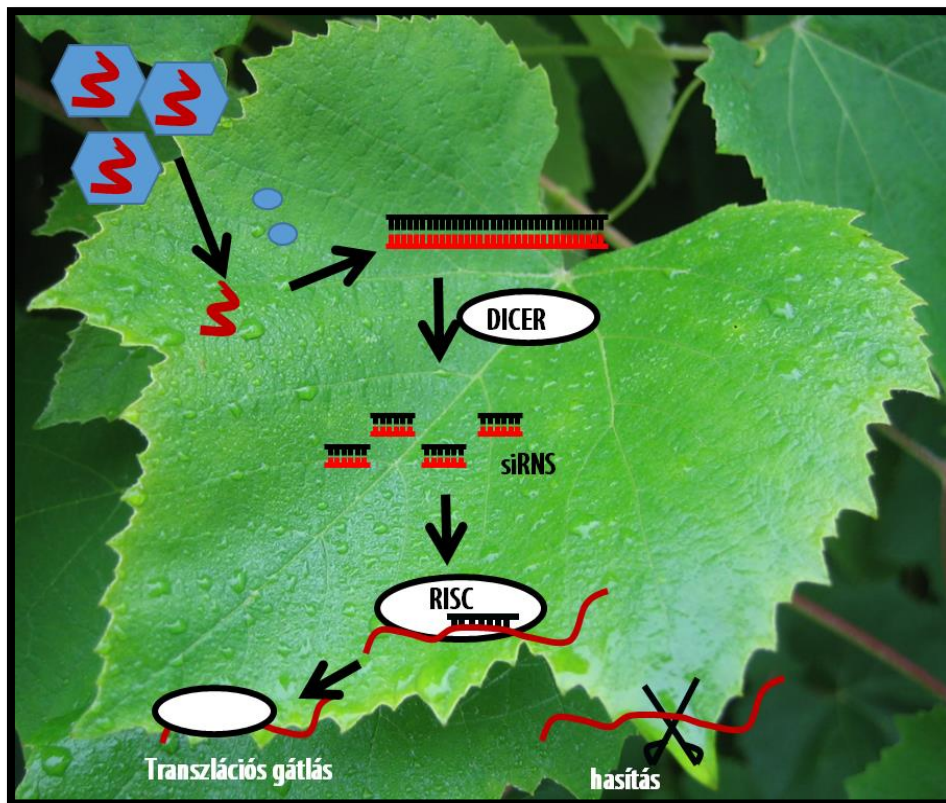
2.3.3.3. *Növényi védekező reakció*

A növényi szervezetek életében számos abiotikus és biotikus stresszfaktor van jelen, amelyek szignifikánsan csökkentik a növény produktivitását és életben maradási esélyét. Az előbbiekre közé számos környezeti tényezőt sorolhatunk, mint a szárazság, a magas só tartalom, vagy a túl alacsony- vagy túl magas hőmérséklet. A biotikus stresszek között számos patogén hatása mellett a vírusos fertőzések is előkelő helyet foglalnak el. Mint a legtöbb stresszhatás, a vírusinfekció is molekuláris biológiai folyamatokat indít el a gazda szervezetében. Számos növény hiperszenzitív reakciónak nevezett mechanizmust fejlesztett ki az ellenük való védekezésre. Ennek során sejtfal összetételbeli és fizikai tulajdonságainak megváltoztatásával, valamint szekunder metabolitok termelésével képes a kórokozó terjedését meggátolni. Az infekció során pathogenesis-related proteinek képződnek, amelyek a kórokozó által termelt proteolitikus enzimek inhibitoraként, valamint katalitikus enzimként működnek (Kumar 2014).

2.3.3.4. *RNS interferencia, géncsendesítés*

Az RNS interferencia (RNSi) jelensége magába foglalja a szekvencia-specifikus génregulációt, dsRNS-ek képzését, ez által pedig a transzkripció vagy transláció gátlását. Ez egy evolúciósan stabil védekező mechanizmus, melynek során rövid kétszálú RNS (dsRNS) darabok a citoplazmában jelen lévő specifikus mRNS-ek szekvencia degradációját eredményezik. A kétszálú RNS-eket a Dicer-like (DCL) és dsRNS-kötő proteinek (DRB) felismerik, majd feldarabolják, és 21-24 nt hosszúságú kisRNSek (mikroRNS vagy siRNS duplexek) keletkeznek. Vírusfertőzés során az utóbbiak a vírus RNS-ről képződnek, majd interakcióba lépnek az Argonautával (AGO) és a hozzá kapcsolódó fehérjékkel, amelyek az RNS-indukált csendesítő komplexet (RISC) alkotják. Egyik száluk beépül a komplexbe és specifitást ad annak. A kisRNS-sel „töltött” RISC fel fog ismerni minden a kisRNS-sel komplementer szekvenciájú RNS-t a sejtben és azt elhasítja, vagy translációsan gátolja, (Kamthan et al. 2015)..

Az RNSi és annak szabályozásban betöltött kulcsszerepének felfedezése óta alapvetővé vált, hogy óriási jelentősége van a vírusdiagnosztika fejlesztésében és a növényvédelem lehetőségeinek kiterjesztésében (Saurabh et al. 2014). A vírus és gazda között koevolúciós folyamat zajlik, a vírusok különböző módokon reagálnak a növény védekező mechanizmusára, próbálják azt gátolni. Ez a fegyverkezési verseny vagy a növény teljes rezisztenciájához, vagy szisztematikus fertőzéshez vezet, és a gazdanövény pusztulását okozza.



6. ábra. **A géncsendesítés egyszerűsített folyamatábrája.** A folyamatot a sejtmagból kijutó dsRNA indítja meg, amely a Dicer enzim közreműködésével darabolódik fel. Az így képződött siRNA fragmenteket a RISC-komplexben résztvevő Argonuta fehérje ez által megtörténik a géncsendesítés (Várallyay 2015 nyomán).

2.3.4. Magyarországon előforduló szőlővírusok

2.3.4.1. **Nepovírusok okozta megbetegedések**

Ebbe a csoportba számos, változatos megbetegedés tartozik.

Többek között:

- Szőlő fertőző leromlás
- Sárga mozaik törzs
- Ér menti szalagosodás törzs
- Szőlő tőkesatnyulás A típus
- Szőlő tőkesatnyulás T típus
- Szőlő króm-mozaik
- Szőlő bolgár látens foltosság

Közülük is leggyakoribb és legnagyobb gazdasági jelentőségű a *Szőlő fertőző leromlás* és annak két törzse, a Sárga mozaik és az Ér menti szalagosodás. Az egész világon elterjedt. Kórokozói a GFLV valamint, a GFLV-YM és a GFLV-VB. Tüneteik között szerepelnek olyan atipikus jegyek, mint a rövid ízközök, az összenövéses vagy a dupla nóduszok, de a legjellemzőbb tünete az erőteljes levéldeformáció. Fajtaérzékenységtől is függ a megjelenése. Ahogy a vírus angol nyelvű elnevezése is utal rá, legyezőszerű levélalak, és rendellenesen fejlődő ereket jellemző rá, amelyen sárgulás is felléphet. Könnyen összetéveszthető a gyomirtószer hatására fellépő levéldeformációval! A fürtök rosszul termékenyülnek és a terméshozam nagyon alacsony. Gazdanövényei szinte kizárólag a *Vitis* nemzetségbe tartozó fajok, terjedése fonálféreg-fajokkal történik (Boonham et al. 2014).

A másik jelentős nepovirus az ArMV, amely közeli rokonságban van a GFLV-vel. Tünete is hasonlóak, de a sárgás elszíneződés jellegzetes ennél a betegségnél. A főerek és a kisebb erek mentén élénksárga hálózatos elszíneződést mutat, ami előrehaladott állapotban nagyobb foltokká növekszik. A szőlő fajokon kívül sok más növényt is fertőz, lág- és fás szárúakat egyaránt. Mivel a szőlősorok közötti gyomflóra gyakori fertőzője, így terjedése azok magjával gyorsan végbemehet. Egy *Xiphinema diversicaudatum* nevű fonálféreg a vektora.

2.3.4.2. *Levélsodródás tünetcsoport*

Ez az USA-ban nagyon gyakori betegség több vírussal is kapcsolatba hozható. 9 féle GLRaV, (Grapevine leafroll-associated virus), magyarul Szőlő levélsodródás vírus játszik közre a betegség létrejöttében, egyenként, vagy kombináltan hozzák létre a tüneteket. Az elsődleges tünet a levéllemez fonáki rész felé történő besodródása. Fehér fajtákon sárga-szürkészöld elszíneződést, vörös fajtákon a levélerek menti részt leszámítva az egész levélre kiterjedő vörös elszíneződést okoz. A termés minőségi és mennyiségi csökkenése is jellemzi. Kizárólag a *Vitis* nemzetség fajait károsítja, az egész világon elterjedt. A tünetek expressziója függ a fajtától és a környezeti feltételektől, a talaj tápanyagtartalma erősen befolyásolja.

2.3.4.3. *Faszöveti barázdáltság komplex*

Ez egy olyan komplex betegség, amely 4 különböző tünetcsoportra osztható;

- *Rupestris* faszöveti barázdáltság
- *Parakérgűség*
- *Kober* faszöveti barázdáltság
- *LN-33* faszöveti barázdáltság.

A tünetcsoportok mindegyikével összefüggésbe hozható egy-egy vírus. A *Rupestris* faszöveti barázdáltságnak feltételezhetően a GRSPaV vírushoz lehet köze. A *Kober* faszöveti barázdáltság és a *Parakérgűség* okozói két egymáshoz szerológiai közel álló vitivirus, a GVA és a GVB. A tünetek közé tartozik a vitalitás romlása, a tőkék pusztulása telepítést követő néhány évben. Bizonyos fajtáknál a tipikus tünetek az oltás helyén észlelhetőek, a kéreg megvastagszik, parás, szivacsos állományú lesz, a felülete pedig durva és egyenetlen. Egyes fajokon a levéltünetek a levélsodródás komplexre emlékeztetőek. Kevesebb és kisebb méretű fürtöt

teremnek. Ez a betegség szintén a szőlő fajok károsítója, és világszerte elterjedt. Leginkább az amerikai alanyfajok érzékenyek (Maliogka et al. 2015).

2.3.4.4. *Látens foltosság komplex*

Ezt a betegségkomplexet szintén több vírus okozhatja, de Magyarországon eddig csak az egyik fajt, a GFkV vírust sikerült kimutatni. Az európai Vitis fajok esetében jelenléte tünetmentes. Az amerikai alanyfajtaik közül eddig csak a Vitis rupestris, „St. George” nevű változatán észlelték a tüneteit, amik a levélfelszín felé történő sodródás és a levelek deformációja. Mechanikai átvitelrel igen, de maggal nem terjed.

2.3.4.5. *Grapevine Pinot Gris vírus*

A Szőlő Pinot Gris vírus 2012-ben Olaszországban írták le, Szürkebarát ültetvényeken talált tünetes tőkékről végzett kisRNS szekvenálással. A tünetei hasonlítanak a Fertőző leromlás tüneteire, a levelek klorotikusak lesznek és deformálódnak, az ízközők rövidülnek, hatással csökken a termés mennyisége és minősége, valamint korai tőkeelhalás következik be. Azt még nem tudjuk pontosan, hogy milyen vektorok játszanak közre a terjedésében, de az bizonyos, hogy több növényfaj rezervoárja. Hazánkban több borvidéken és világszerte igazolták már a jelenlétét (Giampetruzzi et al. 2012).

2.3.4.6. *Grapevine Syrah vírus-1*

A Szőlő Syrah vírus-1 egy leromlást okozó kórokozó, ami feltételezhetően a Marafivirus nemzetségbe tartozik. A tüneteit az idősebb tőkéken figyelték meg, nekrotikus foltokat a leveleken, az oltásforradás helyének duzzadását, a fás részek repedését és hólyagosodását. A tünetek észlelését követően a növény hamar elpusztul. Szinte egyszerre írták le a betegséget Kaliforniában és Franciaországban, és a későbbi kutatások számos országban mutatták az elterjedését.(Al Rwahnih et al. 2009).

2.4. Vírusdiagnosztikai vizsgáló módszerek

Kezdetben a vírusok diagnosztikája a tünetek megfigyelésén alapult, de ez többek között a többszörös, illetve látens fertőzések miatt sem vezetett hiteles eredményekhez. A legmegbízhatóbb adatokhoz objektív diagnosztikai eljárások alkalmazásával jutunk. Ilyenek például a szerológiai, vagy hibridizációs módszerek, vagy a technika fejlődésével az örökítőanyaguk nukleinsav sorrendjének, genomjuknak a meghatározása. A sikeres azonosítást követően a megfelelő védekezési eljárást szükséges végrehajtani a fertőzés megállításának érdekében. A növényvírusok elleni védekezés, nagyon nehézkes. A már kialakult betegség megfékezése egyelőre nem lehetséges. Az egyetlen megoldás a megelőzés, amelynek végrehajtása meglehetősen költséges és munkaigényes folyamat. Vegetatív szaporítás során szigorúan ellenőrzött vírusmentes, illetve vírusrezisztens fajták használatát, meglévő ültetvényeken pedig a vektorokat megfékező inszekticidek és fungicidek használatát igényli (Mauck, De Moraes, & Mescher, 2014).

2.4.1. Vírusdiagnosztika a molekuláris biológiai módszerek előtt

Az 1960-as évekre már számos módszert sikeresen használtak a vírusok laboratóriumi kimutatására. A rutinszerűen alkalmazott krisztallográfia és elektronmikroszkópia mellett már az enzimatis és immunológiai tesztek kidolgozását is megkezdték. A legelterjedtebb módszernek mégis a tesztnövények alkalmazása számított. Ennek oka, hogy a vírusok izolálása még elsősorban centrifugációs szeparációs technikával történt, amivel csupán annak jelenlétét tudták igazolni, azonosítására már alkalmatlan volt (Burnet, 1959).

2.4.2. Szerológiai módszerek

A szerológiai módszerek alapja, hogy az immunológiában ismert antigén-antitest reakciót hasznosítják. A vírus különböző fehérjéi, elsősorban a köpenyfehérje alkalmas antigénként való azonosításra. Állatok vérebe, (legtöbbször nyúlba), tisztított növényi patogént juttatnak, amit annak immunrendszere testidegen anyagnak érzékel, és reakcióba lép vele. Ezt követően vírus proteinjeire specifikus antitestek termelődnek. Az így létrehozott antitestek a véréből kivonva alkalmassá válnak az adott patogén jelenlétének igazolására. Az antigén-antitest kapcsolat reverzibilis, erőssége függ a pH-tól, hőmérséklettől és egyéb környezeti, és oldhatósági viszonyoktól. Ez a szerológiai módszerek egyik hátránya is, hiszen az eltérő körülmények eltérő eredményhez vezetnek.

A vírusdiagnosztikában áttörés Clark és Adams 1977-es publikációja, amelyben a *Szilva himlő vírus* (PPV) és az *Arabis mozaik vírus* (ArMV) ELISA-val történő kimutatását részletezték, ezzel egy új korszak megteremtőivé váltak (Clark & Adams, 1977). Az általuk használt módszer meghatározza a modern növénydiagnosztikát. Az ELISA előtt is használtak különböző szerológiai eljárásokat diagnosztikai célokra, például az immunspecifikus elektronmikroszkópiát, vagy a gél-diffúziós próbákat, de ezek főként a taxonómiai kapcsolatok felkutatására voltak alkalmasak. Ezek a módszerek számos hátránnyal rendelkeztek. Nagy

menyiségű nyers antiszérumot igényelnek, egy adott formátumban pedig nagyon limitált a számuk, így nagyon kisszámú minta tesztelhető általuk. Az ELISA bevezetése, egyszerűbb végrehajthatósága és a hiteles eredmény elérése érdekében szükséges idő lerövidítésének eredményeképp forradalmasította a vírusdiagnosztikát. További fejlesztések a monoklonális antitestek használatának bevezetésével folytatódtak, amelyek a próba érzékenységét és specifitását növelték és a tesztelési formátum sokoldalúságát eredményezték. Az ELISA nagyon gyorsan a laboratóriumi tesztek fő eszközévé vált (Boonham et al., 2014).

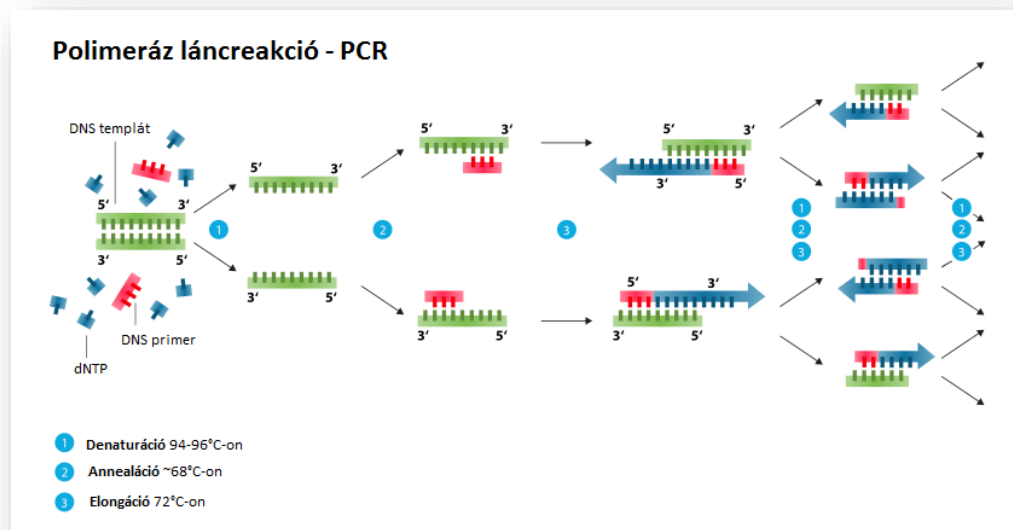


7. ábra **Az ELISA teszt végeredménye.** A műanyag hordozó pozitív eredményt mutató bemélyedéseiben színreakció játszódott le. Jól látható, hogy egyes cellákban eltérő a színerősség, így a vírusok koncentrációjáról is információt kaphatunk (<http://virology-online.com/general/Test5.htm>).

2.4.3. PCR alapú módszerek

A PCR, azaz a polimeráz láncreakción alapuló technológia jelenleg az egyik legelterjedtebb diagnosztikai módszerek közé tartozik. Közvetlenül a DNS kimutatására alkalmas, annak nukleinsav hibridizációs képességét kihasználva. Működéséhez feltétlenül szükséges egy DNS templát. Az RNS vírusok esetében elsőként a kivont RNS-ről kell cDNS-t készíteni, reverz transzkripcióval. cDNS mellett szükséges még megfelelő mennyiségű dNTP és polimeráz enzim. A laboratóriumoknak széleskörű hőstabil DNS polimeráz enzim választék áll rendelkezésére, amit a vizsgálat tárgyának megfelelően választhatnak meg (pl. Taq, vagy Pfu). Végül szükséges egy oligonukleotid primer pár (forward és reverse), amit a kimutatni szándékozott vírusgenom konzervált régiójából terveztek. Az így készített elegyet egy három lépéses cirkulációs folyamatban (denaturációra, annellálásra és extenzióra megfelelő hőmérsékleten) inkubálnak, előre megtervezett időtartamig. A folyamat során a patogén genom darabjainak szelektív amplifikációja történik,

aminek köszönhetően a kis mennyiségben jelen lévő nukleinsav is kimutatható lesz a mintából. Az így kapott elegyet agaróz gélen méret szerint szeparálják, amelyben a molekulaméret alapján szétvált DNS fragmentek a vírusok vizsgálata során kapott korábbi adatok alapján azonosíthatóak. (8. ábra), (Bunikis & Barbour, 2002).



8. ábra. **A PCR reakció alapsémája.** Első lépésben megtörténik a DNS templát denaturációja. Ezt követően a primerek hozzákötődnek a megfelelő szekvenciákhoz (annealálás), majd az elongáció során megtörténik a polimeráz enzim általi dNTP összeszerelés. A folyamat ciklusosan ismétlődik. (<http://en.wikipedia.org>)

2.4.3.1. **multiplex RT-PCR**

Ez a módszer azért különösen nagy előrelépést jelent a diagnosztikában, mert amellet, hogy a PCR minden előnyével rendelkezik, számos vírus egyidejű kimutatására is alkalmas. Gambino és mtsi. egy tanulmány során 9 szőlővírus egyidejű azonosítását végezték, összehasonlítva a különböző RT-PCR procedúrák érzékenységét. Az érintett vírusfajok a következők voltak: *Arabis mozaik vírus* (ARMV), *Szőlő páfránylevelűség vírus* (GFLV), *Szőlő A-vírus* (GVA), *Szőlő B-vírus* (GVB), *Rupestris faszöveti barázdáltság vírus* (RSPsV), *Szőlő foltosodás vírus* (GFkV), *Szőlő levélsodródás vírus-1,-2.-és 3* (GLRaV), kombinálva a belső növényi RNS kontrollal, amelyet indikátorként használtak az RNS extrakció és RT-PCR hatékonyságához. A primerek minden egyes vírusok konzervált régióira specifikusan lettek tervezve, az egyediségük pedig PCR termékek szekvenálásával lett alátámasztva. Két növény totál RNS extrakciós eljárást (szilika-leválasztás és módosított RNeasy módszer) értékelték ki a megbízható mRT-PCR protokoll kidolgozásához. Mind a kilenc vírus specifikus fragmentet egyidejűleg amplifikálták fertőzött mintákból és azonosították a specifikus molekuláris méretük szerint agaróz gélelektroforézissel. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az multiplex RT-PCR egy megbízható és gyors módszer a szőlővírusok detektálásához, nagy mintaszám mellett (Gambino & Gribaudo, 2006).

2.4.4. Nukleinsav hibridizáción alapuló módszerek

A hibridizációs technikák lényege, hogy valamilyen ismert szekvenciájú RNS vagy DNS szakaszt szeretnénk kimutatni egy ismeretlen biológiai mintából. A vírusdiagnosztika esetében ezáltal azt a feltevést szeretnénk igazolni, hogy a vizsgált szekvenciával rendelkező vírus jelen van a mintánkban, és ha sikerül ezt igazolni, arról is meggyőződhetünk, hogy milyen mennyiségben és minőségben van jelen. A molekuláris háttérét az biztosítja, hogy a nukleinsav molekulák reverzibilisen denaturálhatóak, a H-híd kötések mentén. Így megfelelően magas hőmérsékleten szétválaszthatjuk a kettősszálú DNS-t, vagy RNS-t, és ha az a feltételezett patogénből származik, a vele komplementer oligonukleotid próba (amelyet korábban sokszor fluoreszcensen, vagy egyéb módon jelöltek) a megfelelő szakaszon anélkül az eredeti szálhoz. Ezt a jelenséget nevezzük hibridizációnak, amikor a különböző eredetű, de komplementer szekvenciával rendelkező szálak hidrogénkötéssel kettős szálú formát hoznak létre.

A rekombináns DNS technológia fejlődése az 1960-as évek elején indult meg, amikor elkezdték vizsgálni és sikerült is igazolni a DNS renaturációs képességét. Az új felfedezést kihasználva Edwin Southern 1975-ben kidolgozta a Southern-blot (lenyomat) módszert, ami egy speciális DNS szakasz kimutatására alkalmas egy komplex DNS mintában. Ez lehet például egy konkrét gén jelenlétének kimutatása egy faj teljes genomjából, ami abban a korszakban átütő sikernek számított, de még nagyobb jelentőséget tulajdonít a módszernek, az hogy elindította a hibridizációs technológiák nagy ütemű fejlődését, ami egyre pontosabb, gyorsabb, és nagyobb mintaszámmal dolgozó módszerek megjelenéséhez vezetett. Ennek köszönhetően ma már számtalan eljárás közül választhatnak a diagnosztikával foglalkozó laboratóriumok. Ide sorolhatjuk a Southern-blot elvén alapuló, RNS kimutatására alkalmas Northern-blottot, a legkülönbözőbb *in situ* hibridizációs módszereket, a macro-, és microarray technikákat (Southern, 2006).

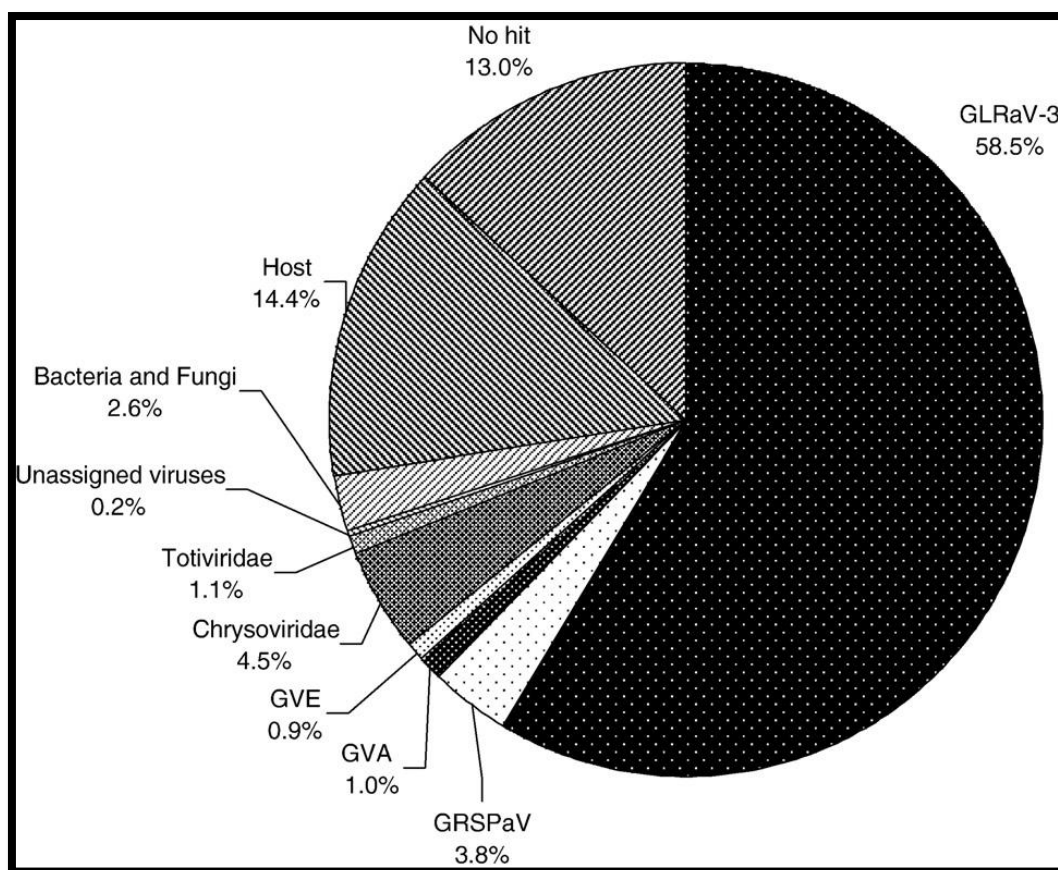
2.4.5. Új-generációs hibridizációs módszerek

Az új generációs szekvenálásnak (Next-Generation Sequencing) köszönhetően az elmúlt években félelmetes fejlődésen ment keresztül a virológia tudományterülete. Nagy hatékonyságú, gyors módszert dolgoztak ki, amely a nukleinsav szekvenálásán, azaz nukleotid sorrendjének meghatározásán és azok bioinformatikai analízisén alapul. Az eddigi módszerek legnagyobb hátránya és korlátozó tényezője abból eredt, hogy csak a megfelelően karakterizált, vírusrészecskék kimutatására alkalmasak. Ehhez szükséges a köpenyfehérjét felismerő szerológiai reagens, és/vagy a keresett szekvencia pontos ismerete. Ezzel szemben a mélyszekvenálás során akár egyetlen mintából meghatározható az adott gazdában megtalálható összes kórokozó jelenléte (Massart et al. 2014).

A hagyományos nukleotid sorrend meghatározásra 1977-ben két eljárást is kidolgoztak párhuzamosan. Az egyik a Sanger-féle enzimatisz lánctermináción alapuló módszer, a másik pedig a Maxam-Gilbert-féle kémia degradációval történő DNS szekvenálás. A kettő közül az előbbi vált egyeduralmódóvá, nagyobb teljesítménye, automatizáltsága, és fluoreszcens detektálhatósága révén. Első generációs

szekvenálás néven is emlegetik. A 2000-es években megjelenő, teljesen más mechanizmuson alapuló, még nagyobb hatékonyságú és új-generációs szekvenálási módszerek új szintre hozták a Sanger-féle eljárást. Ezeket más néven nagy áteresztőképességű (high-throughput) technológiának is hívjuk, mert egy adott mintából több millió szekvenciát (read-et) olvasnak le. Ide tartoznak többek között az Illumina, a SOLiD, a Helicos technológiák. A növényvírus diagnosztika során az első kettőt alkalmazzák a leggyakrabban (Barba et al. 2014).

A szekvenálás kiindulási anyja lehet kétszálú RNS, vagy akár a védekezési folyamatok során keletkező kisRNS is. Épp ezért egyszerre alkalmas a vírusok jelenlétének igazolására, és eddig ismeretlen vírusok szekvenciájának azonosítására. Egyik hátránya, hogy a tetemes mennyiségű szekvencia adat között nagyon alacsony a vírus szekvenciák mennyisége. A legnagyobb része a gazdanövény genomjából származik, ami a vírusdiagnosztika szempontjából gyakorlatilag kárba vesztett információ, azonban a módszerek kombinálásával, tisztítással, vagy jelöléssel specializálható (Adams et al. 2009).



9. ábra. **A szekvencia találatok százalékos összehasonlítása.** Látható, hogy a kisRNS-ek analízisét célzó módszerek milyen nagy hatékonysággal mutatják ki a vírusokat, arányaiban jól kiszűrve a gazdához és egyéb organizmusokhoz tartozó szekvenciákat (Coetzee et al. 2010).

3. Anyag és módszer

3.1. A kutatómunka helyszíne

A kísérletben felhasznált szőlőmintákat Szepsy István segítségével és vezetésével gyűjtöttük. Szepsy István mádi szőlőtermesztő és borász szakember igen fontos szaktekintély hazánk és a borvidék történetében. Azért is fordultam hozzá, mert behatóan ismeri a területeit, tapasztalatra és tudományos kutatásokra is alapozva. A tőle kapott információk igen értékesek, mind a kutatás, mind a tanulmányaim és a szakma szempontjából. A minták másik részét nagyapám Czákó József, tarcali ültetvényeiről gyűjtöttük. A nagyapám már 30 éve szőlőtermesztő és borkészítő a borvidéken. Az elvei és módszerei hasonlatosak Szepsy Istvánéhoz, tarcali szőlőterületeik pedig szomszédosak, így kézenfekvő volt az ő segítségét kérni.

A kutatómunkát a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetben (NAIK-MBK) végeztem. A Diagnosztikai Csoporthoz csatlakozhattam szakdolgozóként, rengeteg segítséget kapva az ottani munkatársaktól és hozzáférést a molekuláris biológiai labor eszközökhöz. A szőlővírusokkal foglalkozó kutatók RT-PCR és hibridizációs technológiákkal dolgoznak, célok között szerepel a magyarországi ültetvények vizsgálata, a különös tekintettel a Magyarországon újonnan leírt Grapevine Pinot Gris Virus-ra.

3.2. A kísérlet megtervezése

A kísérlet célja a GPGV vírus tokaj-hegyaljai jelenlétének feltérképezése volt. Annak érdekében, hogy a vizsgálat teljes legyen, az összes meglévő vírus jelenlétére teszteltük a mintákat. A mintavétel ideje július hónap volt, amikor még a hajtásnövekedés kellőképpen intenzív. Annak érdekében, hogy reprezentatív legyen a mintavétel, arra kértük a termelőket, hogy több területet is átvizsgálhassunk. Végül többet kaptunk, mint amire számítottunk, hiszen 5 első osztályú, egyedi tulajdonságokkal rendelkező dűlőben végezhetjük a kutatást.

3.3. Mintavétel

3.3.1. A mintavétel módszere

A szőlőmintákat 2015 június 29-én szedtük, a szőlő vírusdiagnosztikájához létrehozott mintaszedési protokoll alapján. A protokoll tartalmazza a fontosabb adatokat az ültetvényről, a termelő nevét és elérhetőségeit, valamint a mintázott tőke pontos helyét az ültetvényben. Az adatok mellett rövid leírást is tartalmaz a mintavétel módjáról. Röviden, hogy tőkénként 1 db, 3-4 leveles, kacsot és hajtáscsúcsot is tartalmazó hajtást mintáztunk. Esetenként tüneteket mutató alsóbb helyzetű levelet. Utóbbiak mintázása nem ajánlott, mivel rendszerint alacsonyabb mennyiségű RNS-t tudunk kivonni belőlük. A kutatás szempontjából a legelőnyösebbek ebben az időszakban a hajtáscsúcs és a frissen kiterült, felső helyzetű levél.

Mintaszedési protokoll: szőlő vírusdiagnosztikájához

termesztő/kapcsolattartó:	<i>Grábó István</i>	telefonszám		email:	
mintavétel helye:	<i>Társas Szőlő</i>	GPS koordináták	Ész: <i>48.108035</i>	Kh: <i>21.364553</i>	
mintavétel ideje:	<i>2015.06.29.</i>				
az ültetvény fajtája:	<i>Pinot</i>				
az ültetvény kora:	<i>negyedik</i>				

Tőkénként 1 db 3-4 leveles (kacsot is tartalmazó) hajtáscsúcs + 1 alsóbb levél nedves papírtörlővel számmal ellátott zacskó, gyümölcsfánként 3-5 levél, ha tünetes esetleg több (ezeket bescanneljük), FOTÓK

(uzsonnás zacskó tökéletesen megfelel), a begyűjtésig lehetőleg hűtőben (4 fokon tárolva).

K29

mintázott tőkék:	sor	tőke
1	<i>12</i>	<i>8</i>
2	<i>20</i>	<i>29</i>
3	<i>24</i>	<i>1</i>
4	<i>31</i>	<i>10</i>
5	<i>40</i>	<i>8</i>
6	<i>2/2 sa'n ga</i>	<i>tünetes</i>

Ezekből mi tőkénként alsó levél, felső levél, hajtáscsúcs, kacs RNS kivonást végzünk, ezekből egyed, majd ez egyedekből ültetvénypoolt készítünk és ebből végezzük el a PCR alapú vírusdiagnosztikát.

A segítséget előre is nagyon köszönjük: Várallyay Éva (2015 júni 26)

10. ábra. A mintavétel napján használt mintaszedési protokoll egyik példánya.

Alapvetően 5, látszólag egészséges, tüneteket nem mutató tőkéről vettünk mintát dőlőnként. A 6. és 7. mintavétel speciális volt, az ültetvény egyediségétől függően. Egyes területeken ez vírusfertőzési tünetet, máshol élettani, vagy más kórtani betegséget mutató növényeket mintáztunk. A Betsek dőlőről kiderült, hogy a telepítés előtt a szeder volt az aljnövényzet egyik uralkodó faja, és mivel gyakori vírushordozó, így a jelenleg is nagyon gyakori fajból mintát vettünk és lefuttattuk rajta a szokásos víruseszteket.



11. ábra. A szeder minta fotója.



12. ábra. **Tünetes tőkék képei**, Vas-hiány miatt jellegzetes klorózist mutató hajtások a Thurzó dűlőből (balra) és Esca-tünetes levelek a Király dűlőben (jobbra)

A növényi szöveteket hűtőtáskában szállítottuk, gondosan elkülönítve és címkézve és amint lehetséges volt, - 70°C-ra helyeztük. Ez azért szükséges, mert a vizsgálatok tárgyát képező RNS molekulák rendkívül érzékenyek, könnyen bomlanak, így a minta könnyen alkalmatlanná válik a vírusok kimutatására. Sérülékenységük miatt, maguk a diagnosztikai módszerek alkalmazása során is végig ügyelni kell a megfelelő hőmérsékletre és a szennyeződések elkerülésére.

3.3.2. A mintavétel helye

	Szent-Tamás		Király		Betsek		Úrágya	Thurzó
Telepítés éve	1954		1991		2002		1982	1986
Talajtípus, alapkőzet	vörös mállott kemény tufa	agyag, zeolit, riolit és	sárga és vörös agyag, mállott zeolit, kemény tufa		sárga agyag, puha fehér tufa		kvarftufit, vörös agyag	lössz, dácittufa
Fekvés	D-K-DK		D-DNY		D-ENY		DK-D-DNY	D
Lejtőszög	10-30%		5-20%		5-20%		5-15%	15-20%
Bor karakter	komplex, savas, illatos, különlegesen ásványos		gazdag és elegáns		nagyon gazdag		ásványos, komplex	komplex, illatos

1. táblázat. Az öt vizsgált Tokaj-hegyaljai ültetvény jellemzés (<http://szepsy.hu> nyomán)

A mintavétel 5 különböző, egyedi adottságokkal rendelkező dűlőből történt. Mivel minden esetben a Furmint fajtáról vettük a mintákat, így az ültetvény tulajdonságait párhuzamba állíthatjuk a kapott eredményekkel. A jellemző tulajdonság elméletileg befolyásolhatja a vírusfertőzés kimenetelét. A kitettség például azért fontos, mert egyes abiotikus stressz faktorok növelhetik a tünetek expresszióját. A talajtípus a lehetséges vektorok terjedése miatt számba vehető szempont. A tőkék kora abból a szempontból releváns, hogy a korábbi, 80-as évek előtti telepítések során az elmondások alapján egészségesebben. Habár modern vírusdiagnosztika akkoriban még nem létezett, mégis sokkal kevesebb volt az ellenőrizetlen forrásokból származó szaporítóanyag a borvidéken, a zártabb működéskövetkeztében. A művelésmód minden esetben középmagas kordonművelés volt.



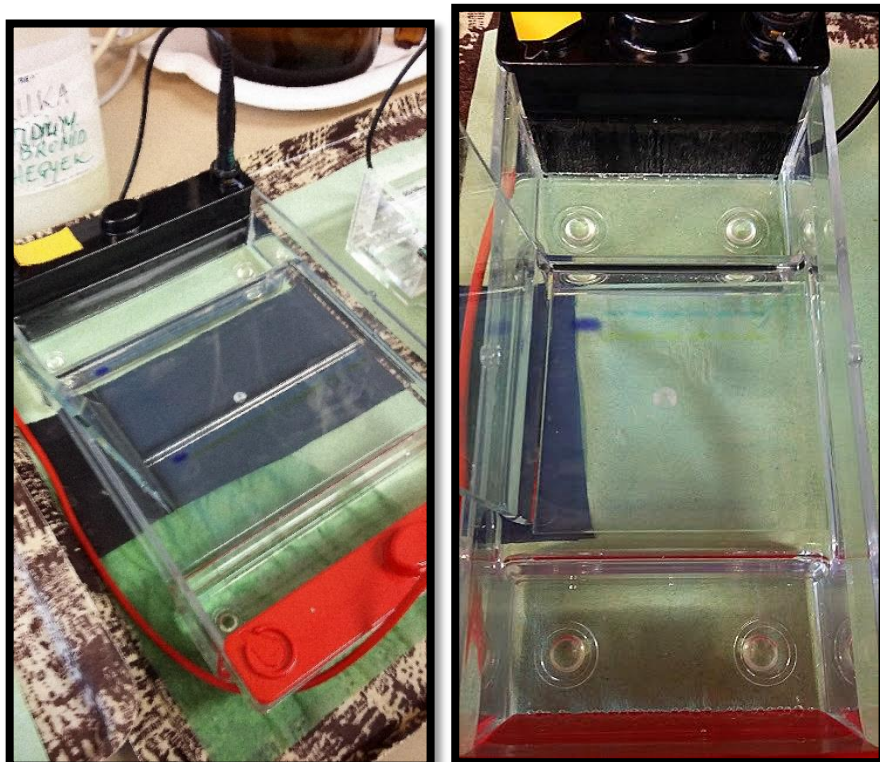
13. ábra. Az 5 vizsgált dűlőben készített fényképek. Balról jobbra és le: Király, Szent Tamás, Betsek, Úrágya, Thurzó

3.4. RNS-extrakció

Az első nagyobb laboratóriumi művelet a teljes RNS kivonás, minden mintából. A Gambino és mtsi. által leírt protokollt követtük. Az első lépés a minták előkészítése volt. Az előzetesen porciózott, 0,2 g körüli tömegű, 1,5 ml-es Eppenforf csövekben tárolt szőlőszövetminták -70°C -os tárolási hőmérsékletéről azonnal folyékony nitrogénbe kerültek. A feldolgozásig ebben is tárolódtak, hogy a rendkívül érzékeny RNS tartalmat megóvjuk a lebomlástól. A dörzsmozsárban homogenizált mintához $17\mu\text{l}$ β -merkaptotanol és $850\mu\text{l}$ extrakciós puffer (2% CTAB, 2,5% PVP, 100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 25 mM EDTA, 2 M NaCl) került, majd 10 percig 65°C -on homogenizálódott. Ezt követte egy kicsapási fázis, kloroform-izoamilalkohol hozzáadásával, majd centrifugálást követően újabb kicsapási fázisok következtek. Elsőkén 9M-os LiCl oldattal, majd 30 perc jégben macerálást követően SSTE és kloroform-izoamilalkohol oldatokban. Az utolsó kicsapási lépést izopropanollal és NaAc-val végeztünk, amit 20 perces centrifugálás és etanolos átmosás követett.

A szárítás után a Milli-Q vízben visszaoldott mintánk már kész volt a kivonás sikerességének- és a kapott RNS mennyiségének pontos meghatározására. Azt, hogy az RNS mennyire maradt intakt a kivonáskor 1,2%-os agaróz gélen gélelektroforézissel ellenőriztük. Az RNS tisztaságát és koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg (NanoDrop 1000). A minták abszorbanciája 260 nm-en volt meghatározva. Az RNS mennyiséget ng/ μl mértékegységben határoztuk meg (Gambino & Gribaudo 2006).

Összesen 62 szőlő szövetdarabból végeztünk kivonást. Dülönként 10-14 darabból. Az eljárás végén ültetvényenként poolok is készültek.



14. ábra. Gélelektroforézis folyamatáról készült képek. A képen látható, ahogy a töltéssel rendelkező részecskék festékkel megjelölve elindultak lefelé, a pozitív pólus irányába. 16- és 8 fogú fésűvel is készített 1,2%-os agaróz gélen, etídium-bromid hozzáadásával történt a futtatás.

3.5. Vírus-specifikus primerek

Ahhoz, hogy a PCR teszteket el tudjuk végezni, minden vizsgált vírushoz szükség van az arra, specifikus primerre. Jelen kutatás során e primerek mindegyike a rendelkezésemre állt. Forrásuként az NCBI adatbázis és korábbi publikációk szolgáltak.

Target	Primer	Primer szekvenciák 5' -3'	Elhelyezkedés	Méter (bp)	Gén
18S rRNS	Forward	CGCATCATTCAAATTCTGC	215–234 1039–1058	844	Internal control
	Reverse	TTCAGCCTTGCGACCATACT			
GLRaV-2	Forward	GGTGATAACCGACGCCTCTA	6745–6764 7268–7287	543	Köpeny fehérje
	Reverse	CCTAGCTGACGCAGATTGCT			
GVB _b	Forward	GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC	6980–7001 7418–7439	460	RNS kötő fehérje
	Reverse	ATCAGCAAACACGCTTGAACCG			
ArMV	Forward	TGACAACATGGTATGAAGCACA	6127–6148 6507–6528	402	RNS függő RNS polimeráz
	Reverse	TATAGGGCCTTTCATCACGAAT			
GLRaV-3	Forward	TACGTTAAGGACGGGACACAGG	13383–13404 13699–13718	336	Köpeny fehérje
	Reverse	TGCGGCATTAATCTTCATTG			
GVA _c	Forward	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA	6591–6612 6843–6862	272	Köpeny fehérje
	Reverse	TCGAACATAACCTGTGGCTC			
GLRaV-1	Forward	TCTTTACCAACCCCGAGATGAA	7245–7266 7455–7476	232	Köpeny fehérje
	Reverse	GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG			
GFkV	Forward	TGACCAGCCTGCTGTCTCTA	6453–6472 6612–6631	179	Köpeny fehérje
	Reverse	TGGACAGGGAGGTGTAGGAG			
RSPaV	Forward	GGGTGGGATGTAGTAACCTTTGA	4298–4320 4430–4452	155	RNS függő RNS polimeráz
	Reverse	GCAAGTGAAATGAAAGCATCACT			
GFLV	Forward	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT	5506–5527 5602–5623	118	RNS függő RNS polimeráz
	Reverse	GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG			
GSyV-1	Forward	CAAGCCATCCGTGCATCTGG		296	Metiltranszferáz
	Reverse	GCCGATTGGAACCCGATGG			
GPGV	Forward	GTGTAGTGCTTTAAAACACG			Köpeny fehérje
	Reverse	GTTACGTGCTCCTATGAGAC			

2. táblázat. A vírus specifikus primerek jellemzőinek összefoglaló táblázata.

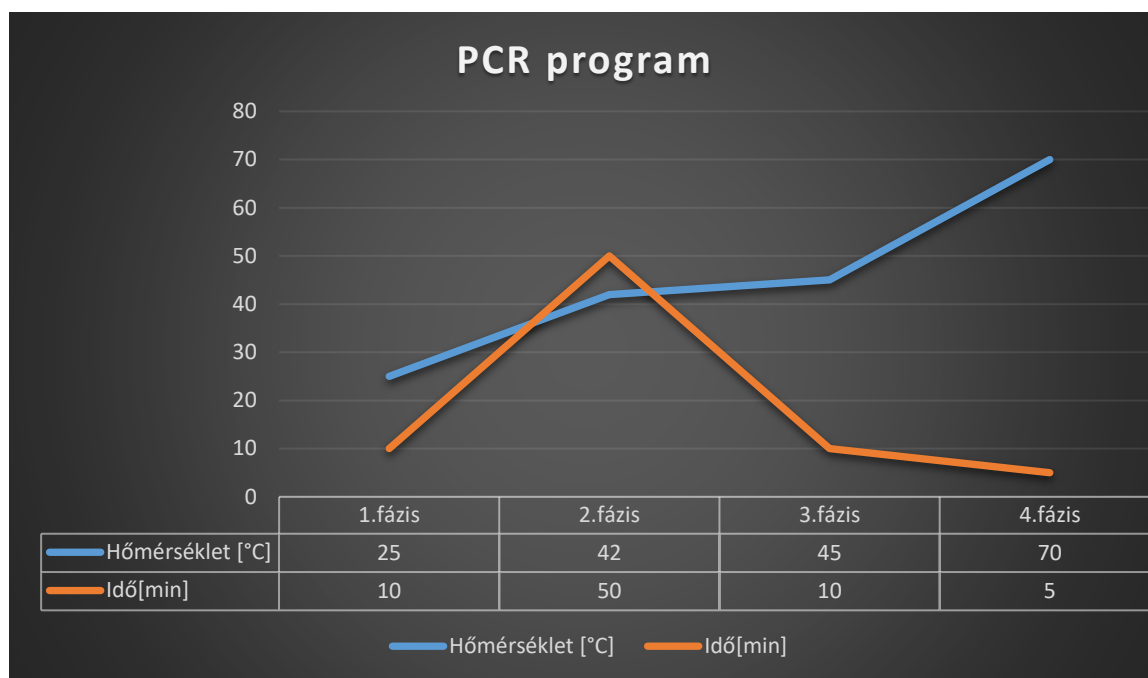
18S rRNS-.GFLV (Gambino & Gribaudo 2006)

GSyV-1 (Al Rwahnih et al. 2009)

GPGV (Giampetruzzi et al. 2012)

3.6. cDNS készítése reverz transzkripcióval

A cDNS, azaz kópia DNS. Konkrétan a kivont RNS szekvenciákról készült komplementert jelenti. A reakcióhoz hozzáadott reverz transzkriptáz enzim egy random hexamerprimer segítségével elkészíti a DNS-t. A tőke- és ültetvény-poolból készített cDNS RevertAid kit (RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit-Thermo Scientific) segítségével készült. A mix tartalmazott 5x Reaction puffert, 5mM dNTP-t, Ribolock- és Revert Aid enzimet. A kapott cDNS-t MiliQ vízzel 10x-re hígítottuk és felhasználásig -20°C-on tároltuk.



15. ábra. A reverz transzkripcióhoz használt PCR program fázisai.

3.7. A cDNS minőségének ellenőrzése

Ahhoz, hogy a kapott cDNS minőségét ellenőrizzük, a vírus specifikus oligókkal való tesztelés előtt, egy endogén génre, aktinra specifikus primerekkel készítettünk PCR reakciót (aktin tesztet). Az aktin az eukarióta sejtekben nagy mennyiségben előforduló fehérje. A teszt során az endogén *Vitis Vinifera* aktint amplifikáltuk. A PCR program megegyezett a vírustesztek programjával. A teszt sikerességének eredményét szintén agaróz gélelektroforézissel teszteltük.

Komponens	Mennyiség
MQ víz	9,4 µl
5x Phire Puffer	3 µl
Primer A (Vv actin 601 s)	0,75 µl
Primer B (Vv actin 1200 as)	0,75 µl
10 mM dNTP	0,3 µl
Phire Hot Start DNS Polimeráz	0,3 µl
Templát (10x RT)	0,5 µl
Végtérfogat (csövenként)	15 µl

3. táblázat Az aktin teszthez szükséges PCR mix komponenseit és azok mennyiségét összefoglaló táblázat.

3.8. PCR vírusspecifikus oligókkal

Az elkészített és 10x-re hígított cDNS mintákat a bázispár-hossznak megfelelően önmagában, vagy szimultán párban teszteltük vírus-specifikus primerekkel. 0,5µl templáthoz 14,5µl mixet készítettünk, így 15µl-es végtérfogatú oldattal futott a PCR reakció. A mix készítésének módja, mintánként 9,4 µl MQ vízhez 3µl 10x-es töménységű Phire puffert,, majd ehhez 0,75 µl reverse és forward primert, 0,3 µl 10mM dNTP-t és 0,3 µl Phire enzimet adtunk. A vírus specifikus primerek szekvenciájának jellemzői a 2. táblázatban láthatóak (Gambino & Gribaudo 2006).

A PCR reakció lépései a következők voltak, a 2-4 lépést 35 ciklusban ismételtük:

1.	Iniciálás	98°C	30 sec
2.	Denaturálás	98°C	10 sec
3.	Annealing	55°C	10 sec
4.	Elongáció	72°C	20 sec

4. . táblázat. A PCR protokoll egyes lépései és azok kondíciói.

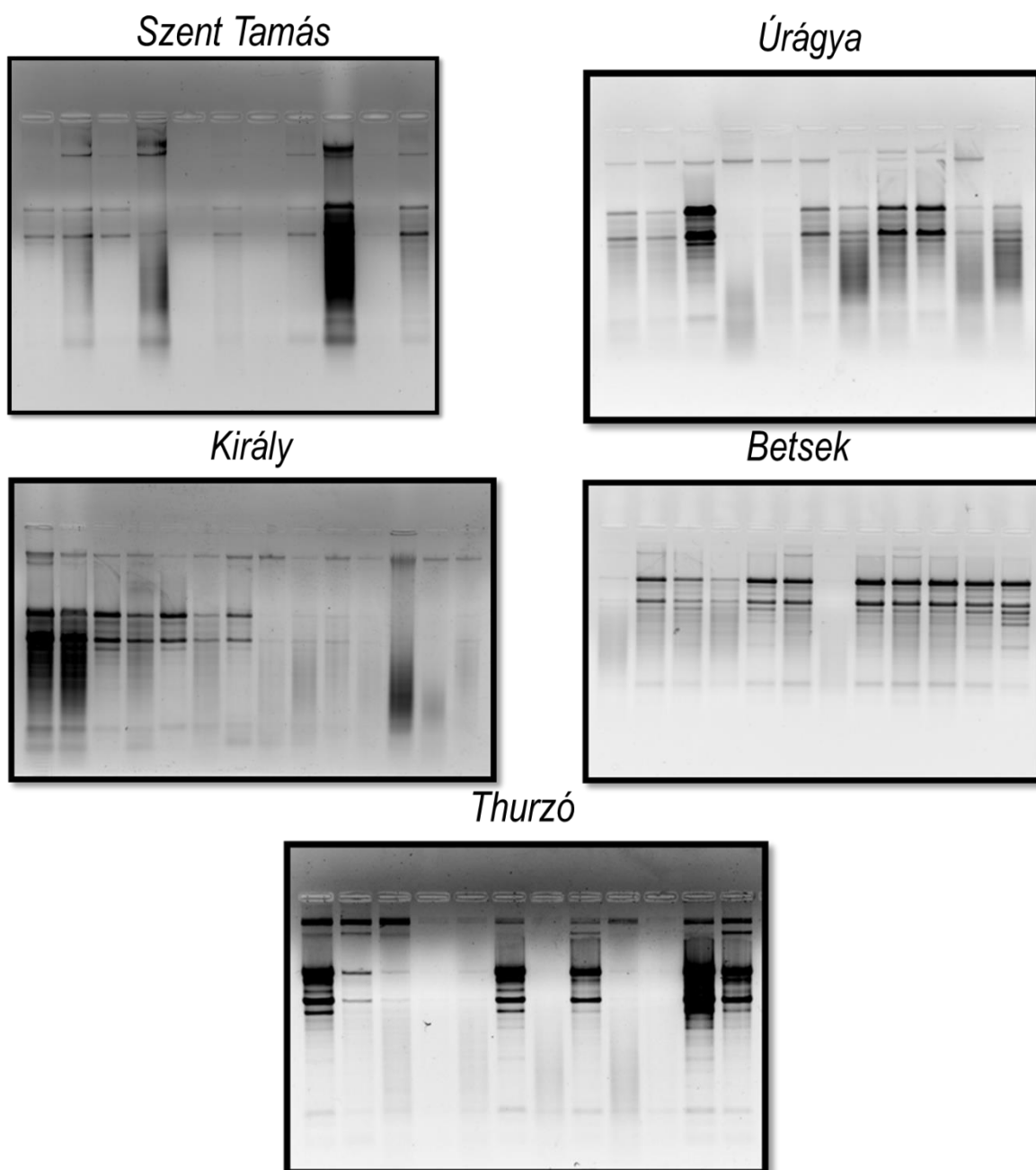
A protokoll egy 1 perces 72°C-os fázissal zárult, majd a műszer felhasználásig 4°C-on tartotta a termékeket. Az eredményeket az előzőekhez hasonlóan gél-elektroforézissel vizsgáltuk.

Egyes oligonukleotidok esetében 62°C-os anellálási hőmérsékletet alkalmaztunk.

4. Eredmények

4.1. RNS-extrakció

Az RNS kivonást dűlönkénti felosztásban végeztem és ellenőrizem gél-elektroforézissel és spektrofotometriásan is. A gélképeken megmutatkozó jel erőssége általában egyenes arányban volt az RNS mennyiségével. A kapott RNS koncentráció igen nagy szórást mutatott 30 és 1000 ng/μl között, amit a poolok készítésével igyekeztem kiegyenlíteni, ennek ellenére a kivonás sikeresnek tekinthető és alkalmas volt további felhasználásra.



16. ábra. A gélelektroforézis eredménye dűlönként 10-14 mintával. A képeken jól láthatóak a különböző méretű RNS fragmentumok.

4.2. Poolok készítése

A vírusokdiagnosztikát szolgáló PCR reakcióhoz poolokat, azaz egyenlő arányú RNS keverékeket készítettünk. Ezt megtettük növényenként, a hajtáscsúcsból és a fellevélből kapott RNS mintákkal, így kaptuk a tőkepoolokat, és az egy ültetvényről származó összes mintát, amit innentől ültetvénytől néven említek. Ezekre egyrészt azért volt szükség, mert, ahogy az RNS kivonás eredményéből is láthatjuk, nem lehet szignifikánsan levonni a következtetést, hogy a hajtáscsúcs, vagy a fellevél a jobb RNS forrás. Másrészt így, hogy egy mintaként a teljes ültetvény állapotát jellemezhetem, leegyszerűsíthető a diagnózis és általánosabban értelmezhető egy-egy ültetvényre.

Szent Tamás			
Mintaszám	Fellevél összes RNS [ng/μl]	Hajtáscsúcs összes RNS [ng/μl]	Tőkepool összes RNS [ng/μl]
25/1	75,5	57,7	59,9
25/2	77,7	90,9	84,8
25/3	49,6	84,2	60,1
25/4	29,6	70,9	53,1
25/5	127,2	218,8	136,1

Úrágya			
Mintaszám	Fellevél összes RNS [ng/μl]	Hajtáscsúcs összes RNS [ng/μl]	Tőkepool összes RNS [ng/μl]
26/1	339,8	329	327,9
26/2	1002,8	456	727,6
26/3	221,8	485,3	401,2
26/4	483,3	460	471,3
26/5	423	49,1	478,8
26/6	444,1	22,4	250,2

Király			
Mintaszám	Fellevél összes RNS [ng/μl]	Hajtáscsúcs összes RNS [ng/μl]	Tőkepool összes RNS [ng/μl]
27/1	849,2	864,3	533,8
27/2	381,6	479,6	431,4
27/3	311,8	329	270,7
27/4	190,4	306,5	120,2
27/5	157	472,7	97,3
27/6	108,3	247,5	63,5
27/7	261,9	259,2	204,1

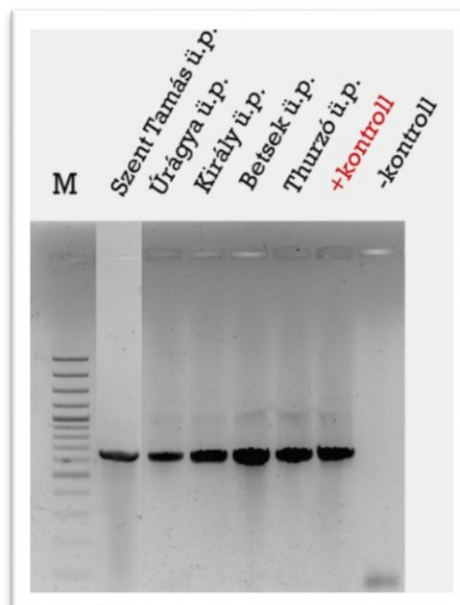
Betsek			
Mintaszám	Fellevél összes RNS [ng/μl]	Hajtáscsúcs összes RNS [ng/μl]	Tőkepool összes RNS [ng/μl]
28/1	266,8	606,6	460,6
28/2	480	313,9	429,4
28/3	817,1	806,3	788,9
28/4	156,5	802,4	573,2
28/5	716,8	801,2	813,7
28/6	658,6	629,4	632,4

Thurzó			
Mintaszám	Fellevél összes RNS [ng/μl]	Hajtáscsúcs összes RNS [ng/μl]	Tőkepool összes RNS [ng/μl]
29/1	136,1	149,4	143,8
29/2	13,9	18	80,5
29/3	118,7	238,9	183,2
29/4	218,9	211,2	213,3
29/5	211,2	46,9	140,9
29/6	383,8	204,6	273,4

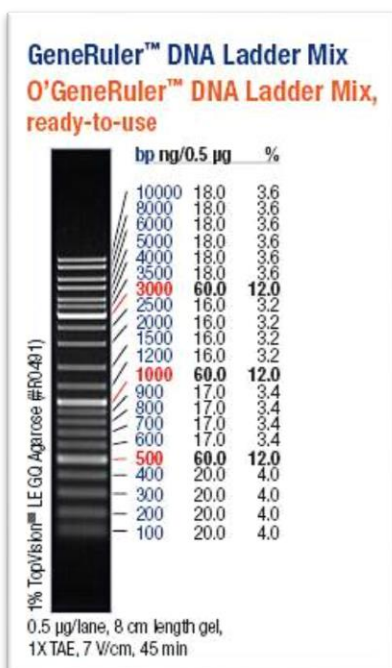
5. táblázat. A mintánkénti és a keverékek (=poolok) RNS koncentrációja.

4.3. PCR aktin teszt

A cDNS előállítás sikerességének ellenőrzésére szolgáló aktin tesztet 35 mintával hajtottam végre. A teszt minden esetben pozitív lett, ami alátámasztja az RNS kivonás és a reverz transzkripció sikerességét és lehetővé tette, hogy tovább dolgozzak a mintákkal.



17. ábra Az aktin teszt ültetvénypoolokat összesítő gélképe. Minden mintából egyértelmű pozitív eredményt kaptam. Az 599 bázispár méretű pozitív kontroll és a tisztán maradt negatív kontroll is alátámasztja a fenti megállapítást.



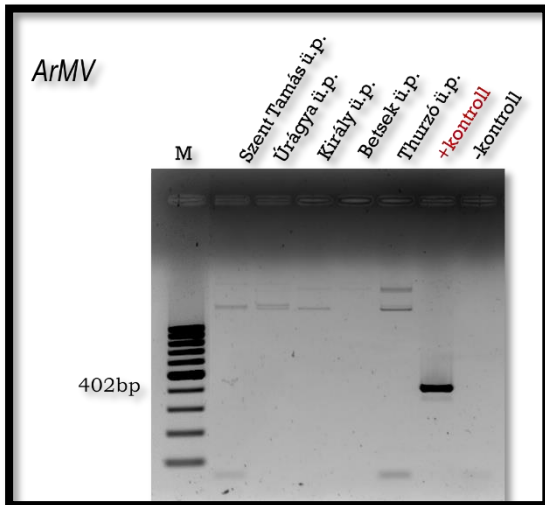
4.4. PCR vírus specifikus oligókkal

Az aktin teszt elvégzése után megkezdtem a vírusesztelést, sorban a töke- és ültetvény poolokkal. A minták sorrendje a poolok számozásának felel meg. A táblázatban is bemutatott értékek alapján, adott vírus diagnosztikája során a megfelelő méretű terméket vártam, a bázispár mérete alapján. Az eredményt annak függvényében tekintettem pozitívnak, illetve negatívnak, hogy az első zsebben futtatott, GeneRuler DNS létrához viszonyítva a fragmentek hol helyezkednek el a gélen. A nagy mintaszám miatt csak az ültetvénypoolok eredményeit ábrázolom.

18. ábra. 10000 bázispár hosszúságú DNS létra.

4.5. Az diagnosztika elemzése ültetvénypoolokon

4.5.1. ArMV diagnosztika eredménye

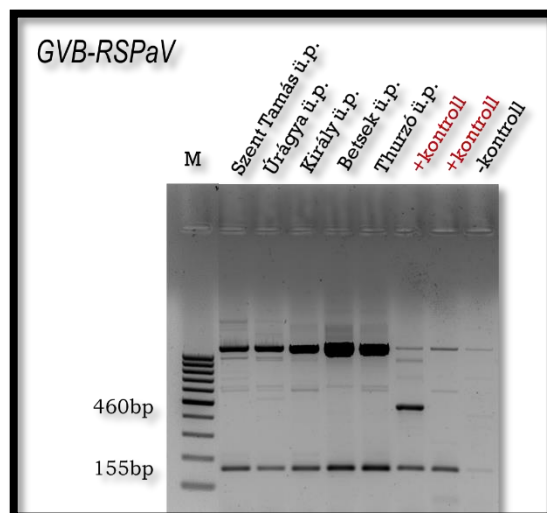


Az ArMV-t (Arabis mosaic virus) nem tudtuk kimutatni a tokaji ültetvényeken. A képen látható a 402 bp méretű pozitív kontroll igazolja, hogy a teszt elvégzése sikeres volt, és valóban nem volt jelen a vírus.

18. ábra. Az ArMV gélelektroforézis képe az ültetvénypoolokról.

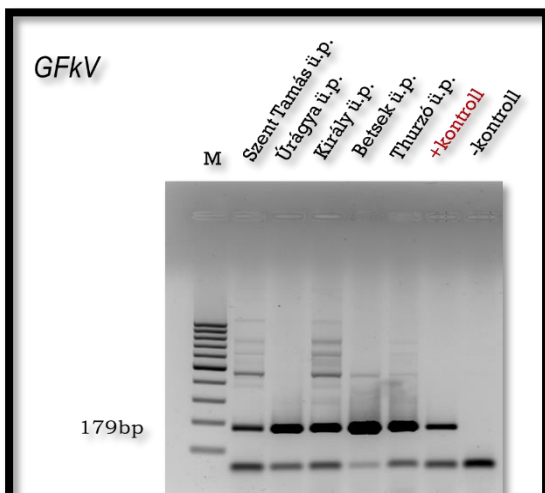
4.5.2. GVB-RSPaV diagnosztika eredménye

A GVB (Grapevine virus B) és az RSPaV (Rupestris stem pitting-associated virus) a méretkülönbségnek köszönhetően szimultán futtatható és egyértelműen azonosítható egymás mellett. Az első számú pozitív kontroll a 460 bp hosszúságú GVB, amely egy ültetvényben sem volt jelen, ellentétben a 155 bp hosszú RSPaV-val, amely csaknem minden vizsgált tőkében jelen volt.



19. ábra. A GBV és RSPaV gélelektroforézis képe az ültetvénypoolokról.

4.5.3. GFkV diagnosztika eredménye

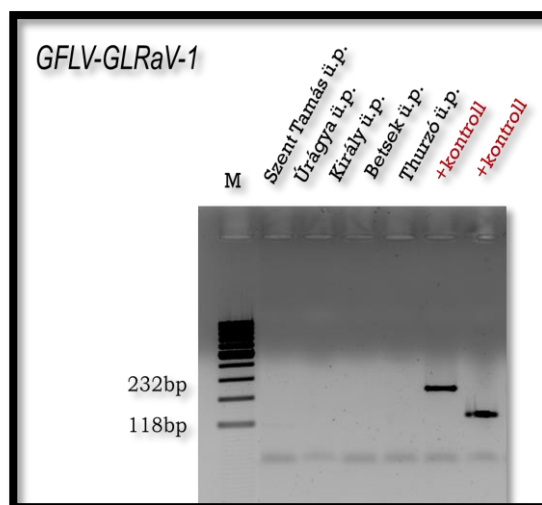


A GFkV (Grapevine fleck virus) minden ültetvényen igen nagy számban, erős jelet adott. Ez alól csak a Szent Tamás dűlő a kivétel, az onnan származó mintákból csak kettőben tudtuk kimutatni. A reakció végén 179 bázispáros termékeket vártam.

20. ábra. A GFkV gélelektroforézis képe az ültetvénypoolokról.

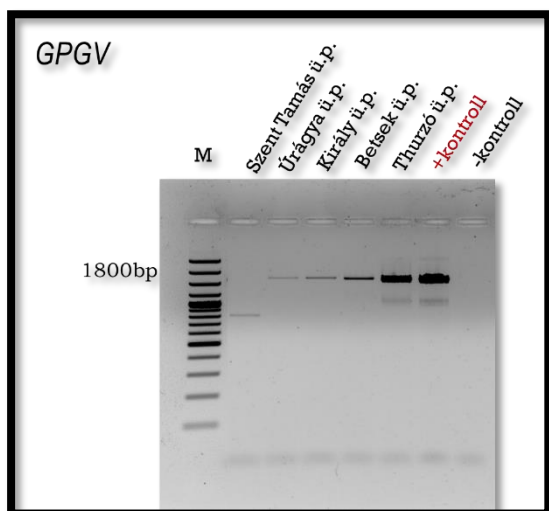
4.5.4. GFLV-GLRaV-1 diagnosztika eredménye

A GFLV (Grapevine fanleaf virus) és a GLRaV-1 (Grapevine leafroll-associated virus-1) vírusok szintén egyszerre futtathatóak, tekintve az egyértelműen elkülönülő méretet és a 62°C-os anellálási hőmérsékletet. A 232 bp-nál várt GFLV-ből nem kaptunk pozitív eredményt, ellenben a GLRaV-1 2 tőkénél gyenge jelet mutatott, az Úrágya dűlőben, a mi az ültetvénypool esetében nem volt látható.



21. ábra. A GFLV-GLRaV-1 gélelektroforézis képe az ültetvénypoolokról.

4.5.5. GPGV diagnosztika eredménye

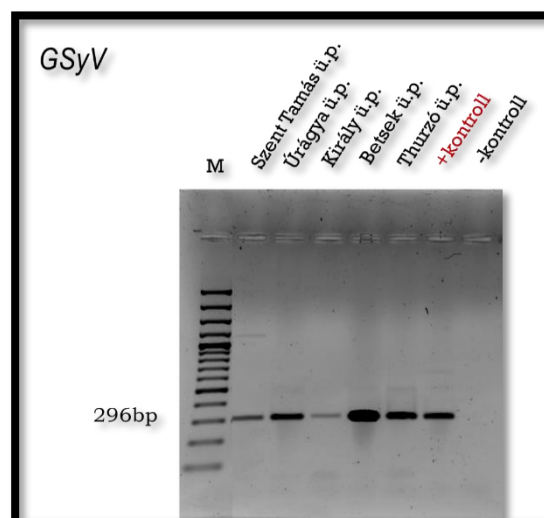


A GPGV (Grapevine Pinot Gris virus) az ültetvények mindegyikében jelen volt. A legerősebb jelet a Betsek- és Thurzó dűlőkben kaptuk, a leggyengébbet, és csupán 2 tőkénél pedig a Szent Tamásban. Külön érdekesség, hogy a Betsekben szedett szeder levélben is ki tudtuk mutatni.

22. ábra. A GPGV gélelektroforézis képe az ültetvénypoolokról.

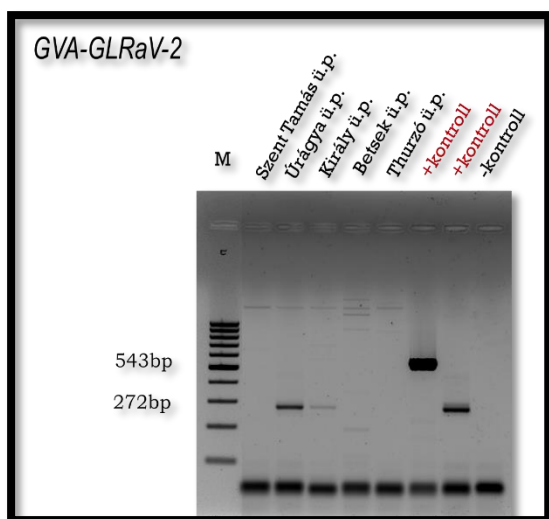
4.5.6. GSYV-1 diagnosztika eredménye

A GSYV-1 (Grapevine Syrah Virus-1) szintén minden ültetvényben, igen nagy számban jelen volt. A legerősebb jelet itt is a Betsek dűlőből kaptam, míg a Király dűlőben viszonylag gyenge volt a jelenléte. A gélképen a létrához viszonyítva a 300 bp méretet igazoló fokkal egy szintben kellett keresni a 296 bázispár méretű terméket.



23. ábra. A GSYV gélelektroforézis képe az ültetvénypoolokról.

4.5.7. GVA-GLRaV-2 diagnosztika eredménye

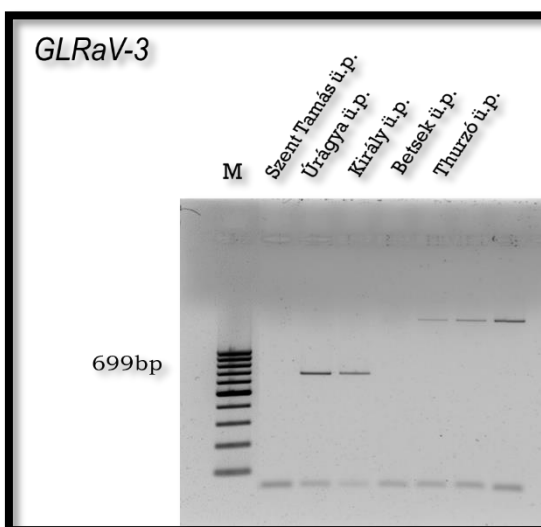


A GVA (Grapevine virus A) és a GLRaV-2 (Grapevine leafroll-associated virus-2) is szimultán tesztelhető. Az 543 bp hosszúságú GLRaV-2 vírusból egyetlen pozitív eredményt sem kaptunk, a GVA-t viszont két ültetvényben, az Úrágyában és a Királyban is sikerült azonosítani.

24.. ábra. A GVA-GLRaV-2 gélelektroforézis képe az ültetvénytől.

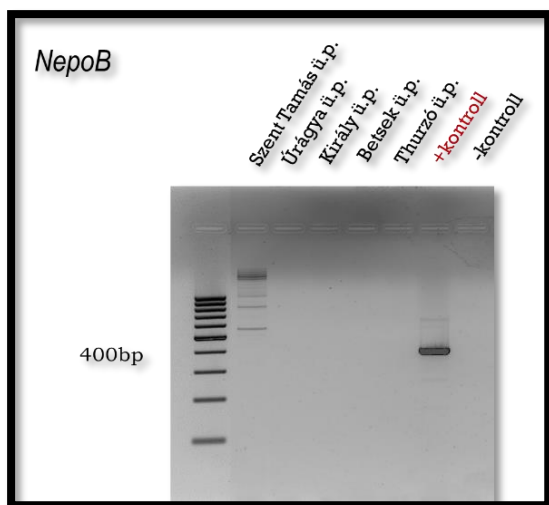
4.5.8. GLRaV-3 diagnosztika eredménye

A GLRaV-3 (Grapevine leafroll-associated virus-3) két ültetvényben is jelen volt. A Szent Tamásban erősebb, az Úrágyában gyengébb jelet mutatva. Ez esetben egy 699bp méretű terméket produkáló oligót használtam, viszont elkövettem azt a hibát, hogy a +kontrollt kifelejtettem a sorból. Ennek ellenére az egyértelmű jelek a várt mérettartományban helyezkednek el, így pozitívnak tekintettem őket.



25. ábra. A GPGV gélelektroforézis képe az ültetvénytől.

NepoB diagnosztika eredménye



26. ábra. A Nepo B gélelektroforézis képe az ültetvénytől.

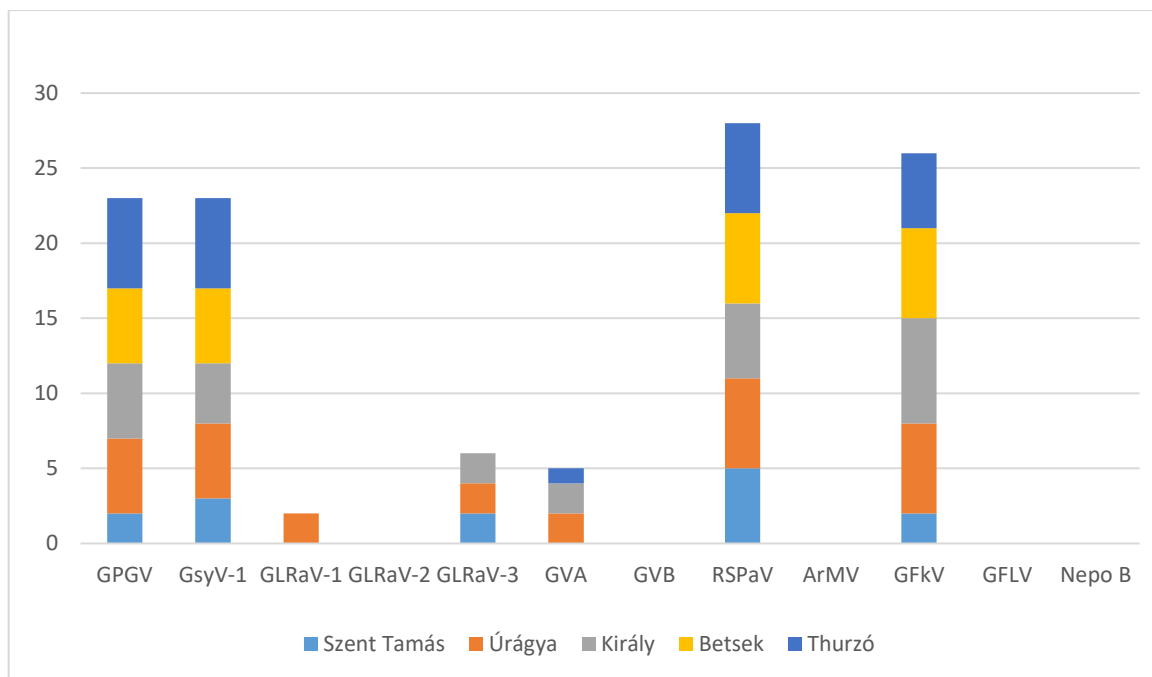
A Nepo B hazánk területén már régóta nem azonosított vírus. Az általánosan elvégzendő tesztek között már ritkábban használják, de ezúttal még érdemesnek láttam vizsgálni. A tesztek igazolták a fenti állítást, mivel egyetlen jelet sem kaptam a 400 bp méretű termékből a mintáimban.

4.6. Az ültetvények vírusösszetétele

2015. június 29. Mád_Tarcal				PCR vírus specifikus oligókkal											
Mintavétel helye		Minta	RNS [ng/µl]	GPv	GSv1	GLRaV-2 GVAc	GVbb	RSPaV	GLRaV-3 GPKV	APMV	GLRaV-1 GFLV	Nepo B			
Szent Tamás díűlő	Ültetvénypool	K30/31	77,8												
3. sor 3. tőke		K30/1	59,9												
20. sor 20. tőke		K30/2	84,8												
ajutól 2. sor 31. tőke		K30/3	60,1												
70. klónjelölt		K30/4	53,1												
73. klónjelölt		K30/5	136,1												
Ürögva díűlő	Ültetvénypool	K30/32	450,1												
9. sor 8. tőke		K30/29	327,9												
5. sor 4. tőke		K30/7	727,6												
14. sor 14. tőke		K30/8	401,2												
20. sor 20. tőke		K30/9	471,3												
25. sor 25. tőke		K30/10	478,8												
Tünetes		K30/11	250,2												
Király díűlő	Ültetvénypool	K30/33	389,9												
F3/2 11. tőke		K30/12	533,8												
F3/2 20. tőke		K30/13	431,4												
F3/2 30. tőke		K30/14	270,7												
F3/2 40. tőke		K30/15	120,2												
F3/2 50. tőke		K30/16	97,3												
Tünetes		K30/17	63,5												
Esca egyanus	(Esca)	K30/18	204,1												
Betsek díűlő	Ültetvénypool	K30/34	553,9												
2. sor 2. tőke		K30/19	456,6												
2. sor 22. tőke		K30/20	429,4												
4. sor 4. tőke		K30/21	788,9												
4. sor 24. tőke		K30/22	573,2												
6. sor 11. tőke		K30/23	813,7												
Szeder		K30/24	632,4												
Thurzó díűlő	Ültetvénypool	K30/35	173												
12. sor 8. tőke		K30/25	143,8												
20. sor 29. tőke		K30/26	80,5												
24. sor 1. tőke (Tünetes)		K30/27	183,2												
31. sor 10. tőke		K30/28	233,3												
40. sor 4. tőke		K30/6	140,9												
2. sor 2. tőke sárga, tápanyaghiányos	2/2 sárga	K30/30	273,4												

6. táblázat. A vírusdiagnosztikai eredmények összesítője.

Vírusmentes
Enyhe
Közepes
Erős



13. ábra. Az ültetvényenkénti vírusok számát bemutató diagram.

5. Következtetés

Az eredmények alapján több következtetést is levonhatunk, ám a visszaigazolás és a további vizsgálatok hiányában ezek többnyire csak feltételezések. Azt lehet egyértelműen kijelenteni, hogy a telepítés évének, azaz a tőkék korának köze van vírusfertőzöttséghez. A fiatalabb ültetvényekben nagyobb volt a kimutatott vírusok száma és a multiplex fertőzések is gyakoribbak voltak.

Általánosan elmondható, hogy négy vírus, a GSYV1 és GPGV, valamint két, hazánkban és Tokaj-Hegyalján is nagymértékben elterjedt RSPaV és a GFkV sajnos mindenhol jelen volt. A GLRaV-2, GVB, ArMV, GFLV és Nepo B vírusokat nem sikerült kimutatni. Ennek tudatában elmondható, hogy a Tokaji ültetvények világviszonylatban egészségesnek mondhatók, hiszen a legnagyobb gazdasági kárt okozó kórokozók nem voltak jelen a mintákban.

Az ültetvények összehasonlításával kezdve látható, hogy a legegészségesebb az egyben legidősebb, Szent Tamás dűlőbeli szőlő. Az újonnan vizsgált GPGV és GSYV-1 itt volt a legkisebb számban jelen. Ebből a szempontból is kiválóan mondható a terület.

A vírusösszetétel tekintetében a legfertőzöttebbnek az Úrágya II bizonyult. Itt összesen 7 különböző vírus volt jelen. Köztük a ritkábbnak mondható GLRaV-1 is megjelent (Szőlő levélsodródás vírus-1), amelyet egy vírusfertőzés tüneteit mutató tőkéből izoláltam, viszont komplexen más Levélsodródási betegséget okozó vírussal nem volt jelen.

A Király dűlő is elég vegyes képet mutat a tőkék fertőzöttségében, de a vírusok tekintetében jó az egészségi állapota. Mintavételkor ebben a dűlőben találtuk a legtöbb esca tünetes tőkét. Az egyik tünetes tőkéről vett minta eredményei nem mutattak kiugró értékeket, sőt, a Faszöveti barázdáltságot okozó vírusra negatív lett. Ez persze nem zárja ki, hogy az esca betegségnek köze lehet vírusokhoz, de mindenképp érdemes lenne tovább vizsgálni a témát.

A Betsek dűlőből kapott eredmények szignifikánsak. Csúpn a fent említett 4 vírus van jelen, de azok a tőkék mindegyikében, egyenletesen, erős jelet mutattak. Ez is alátámasztja, a feltételezést, hogy lehetséges, hogy a szaporítóanyaggal kerültek be a kórokozók az ültetvényre. A szederben diagnosztizált vírúsfertőzöttség különösen érdekes és további kérdéseket vet fel. Mind a négy vírust ki tudtuk belőle mutatni, ezért érdemesnek láttuk arra, hogy tovább dolgozzunk a mintával.

A Thurzó dűlő kivételes a sorban, hiszen első sorban egy löszös altalajú, igen nagy lejtőszögű területről beszélünk, ami hajlamosabb az erózióra. Valószínűleg e miatt is találtunk több vas deficit tüneteit mutató tőkét. Az ezekről vett minták érdekes eredményt mutattak, mivel minden diagnosztizált vírusra nagyon erős pozitív jelet mutattak. A tünetes tőkék további vizsgálata alátámaszthatja azt a feltevést, miszerint köze van a vírus tünetek expressziójához és az esetleges fertőzés gyorsabb lefolyásához a tápanyag-deficitnek.

6. Összefoglalás

A bortermő szőlő (*Vitis vinifera*) az egyik legnagyobb gazdasági jelentőségű és kulturális értékű haszonnövény Magyarországon. A kórokozók és kártevők elleni védelem kidolgozása, valamint a szaporítóanyag egészségének a fenntartása kiemelt fontosságú. A vírusok megfékezése, és az ellenük való védekezés még rengeteg munkát kutatást igénylő területe a szőlő növényvédelmének. Egyelőre a vírusbetegségek gyógyítására nincs eszköz a kezünkben, ezért a diagnosztika és a betegség terjedésének megakadályozása az elsődleges feladat. Az ELISA és a PCR módszerek már nagyon gyors és pontos eredményt adhatnak az ismert vírusok kimutatásának céljából. A metagenomika és az újgenerációs szekvenálási módszereknek köszönhetően pedig ugrásszerű fejlődés következett be a növényegészségügyi diagnosztika területén.

A célom az volt, hogy RT-PCR módszer segítségével felmérjem az ismert szekvenciájú vírusok jelenlétét öt Tokaj-hegyaljai dűlőben. Ültetvényenként 5-7 tőkéről, illetve egy szeder növényről vett mintákat dolgoztam fel. RNS kivonás és reverz transzkripcióval előállított cDNS minőségének ellenőrzése után megkezdtem a vírustesztelést 12 szőlőt fertőző vírusra. A vírusteszteket egyesével, vagy szimultán kettessel végeztem, a PCR program és a kapott termék mérete alapján.

Az eredményeket az 1,2%-os agaróz gélelektroforézis alapján határoztam meg, melyek megmutatják, hogy az ültetvények széleskörű és változatos vírusösszetétellel rendelkeznek. A legérdekesebb eredményeket a tünetes szőlőmintákból és a szederből kivont mintákból kaptuk. Az utóbbival további kutatást is folytattunk, valamint tervezünk, többek között kisRNS könyvtár készítését és szekvencia analízist.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Várallyay Évának, a témavezetőmnek, akihez bármikor fordulhattam segítségért, lelkesedésével és szakértelmével inspirációt nyújtott és szakmai támogatásával hozzásegített szakdolgozatom elkészítéséhez, valamint hogy levezényelte a közös Tokaj-hegyaljai mintavételt!

Külön köszönet Szepsy Istvánnak, aki lehetővé tette, hogy az ültetvényeiben végezzük a mintavételt, sőt, pótolhatatlan információkkal, személyes jelenlétével, és borkóstolóval ajándékozott meg minket! Odaadását és szakértelmét látva a dűlők, a szőlő és a borok iránt örök emlékké tette számomra azt a napot.

Köszönöm a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézete, Genomika Főosztály, Diagnosztikai Csoportjának, hogy segítették szakmai fejlődésemet, és lehetőséget biztosítottak számomra, hogy egyes módszereket a gyakorlatban is megismerjek, elsősorban Carmen Iliescu-nak, aki megtanított a gyakorlati fogások alkalmazására!

Szeretnék köszönetet mondani Deák Tamásnak, a SZIE Szőlészeti tanszék egyetemi docensének, aki volt olyan szíves és elvállalta a belső konzulens szerepét és minden felmerülő kérdésben segítségemre volt!

Köszönöm mindenkinek!

8. Irodalomjegyzék

- Adams, I.P. et al., 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), pp.537–545.
- Barba, M., Czosnek, H. & Hadidi, A., 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6(1), pp.106–36. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3917434&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Boonham, N. et al., 2014. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186, pp.20–31. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>.
- Coetzee, B. et al., 2010. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, 400(2), pp.157–163. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.023>.
- Gambino, G. & Gribaudo, I., 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology*, 96(11), pp.1223–1229.
- Ghoshal, B. & Sanfaçon, H., 2015. Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology*, pp.1–12. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682215000094>.
- Giampetruzzi, A. et al., 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Research*, 163(1), pp.262–268.
- Herranz, M.C. et al., 2005. Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or “polyprobe.” *Journal of Virological Methods*, 124(1–2), pp.49–55.
- Kamthan, A. et al., 2015. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 6(April), pp.1–17. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00208>.
- Keller, M., 2015. *Botany and Anatomy*, Elsevier Inc. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124199873000017>.
- Kumar, R., 2014. Role of MicroRNAs in Biotic and Abiotic Stress Responses in Crop Plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp.93–115.
- Maliogka, V.I. et al., 2015. *Control of viruses infecting grapevine* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.002>.
- Massart, S. et al., 2014. Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research*, 188, pp.90–96. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.029>.
- Rábai, A., Dula, T. & Mugnai, L., 2008. Distribution of esca disease in Hungary and the pathogens causing the syndrome. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 43(1), pp.45–54. Available at: <http://www.akademiai.com/doi/abs/10.1556/APhyt.43.2008.1.6>.
- Roossinck, M.J., 2015. Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology*. Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682215001816>.

Al Rwahnih, M. et al., 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, 387(2), pp.395–401. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.028>.

Saurabh, S., Vidyarthi, A.S. & Prasad, D., 2014. RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*, pp.1–22.