

Újonnan leírt szőlővírusok lehetséges előfordulásának vizsgálata hazánk szőlőültetvényeit reprezentáló kis RNS könyvtárak elemzésével

Szakdolgozat
biológia alapszak

készítette:
Holczbauer Aliz

témavezető:
Pál Gábor
egyetemi docens
Biokémiai Tanszék

külső konzulensek:
Dr. Várallyay Éva
tudományos főmunkatárs

Demián Emese
PhD hallgató
NAIK Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet,
Molekuláris Növénykórtan Csoport

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2020

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1 Bevezetés	5
2 HTS.....	11
2.1 Minták előkészítése.....	12
2.2 Szekvenálás.....	13
2.3 Bioinformatika	15
2.4 Növényi vírusok nem célzott felfedezése	16
2.5 Virom vizsgálat.....	19
2.6 TNA.....	22
2.7 dsRNS.....	25
2.8 VANA	29
2.9 Kis RNS.....	32
3 GVT.....	36
3.1 Anyagok és módszerek	36
3.2 Eredmények	40
4 Konklúzió.....	47
Összefoglalás.....	49
Summary.....	50
Hivatkozások	51
Köszönetnyilvánítás	57
Melléklet	58

Rövidítésjegyzék

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay - enzimkött immunszorbens módszer

LFIA - lateral flow immunoassay - laterális áramlási immuneszt

PCR - polymerase chain reaction - polimeráz láncreakció

RT-PCR - reverse transcription PCR - reverz transzkripció követő PCR

HTS - high-throughput sequencing - nagy áteresztőképességű szekvenálás

GVT - Grapevine virus T- szőlő T vírus

dsRNS - double stranded RNA - duplaszálú DNS

siRNS - small interfering RNA - kis (interferáló) RNS

cDNS - complementary DNA - komplementer DNS

SBS - sequencing by synthesis - szintézissel történő szekvenálás

CMOS - complementary metal-oxide-semiconductor - komplementer fém-oxid-félvezető

SMS - single-molecule sequencing - egymolekulás szekvenálás

SMRT - single-molecule real-time sequencing - egymolekulás valós idejű szekvenálás

NCBI - National Center for Biotechnology Information

nt - nukleotid

bp - bázispár

GRSPaV - grapevine rupestris stem pitting-associated virus - szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus

HSVd - hop stunt viroid - komlótörpülés viroid

GYSVd-1 - grapevine yellow speckle viroid-1 - szőlő sárgafoltosság viroid-1

GPGV - grapevine Pinot gris virus – szőlő Pinot gris vírus

TNA - total nucleic acid- teljes nukleinsav

ORF - open reading frame - nyitott leolvasási keret

GLRaV-3 - grapevine leafroll-associated virus 3 - szőlő levélsodródás vírus-3

GVA - grapevine virus A - szőlő A vírus

GVE - grapevine virus E – szőlő E vírus

ssDNS - single stranded DNA - egyszálú DNS

AVF- Alfalfa virus F

OTU - operational taxonomic unit - operatív taxonómiai egységek

RISC - RNA induced silencing complex - RNS indukálta géncsendesítési komplex

DCL - DICER like - DICER-szerű (fehérje)

RTD - Roditis leaf discoloration - Roditis levél elszíneződés

GRLDaV - grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus

1 Bevezetés

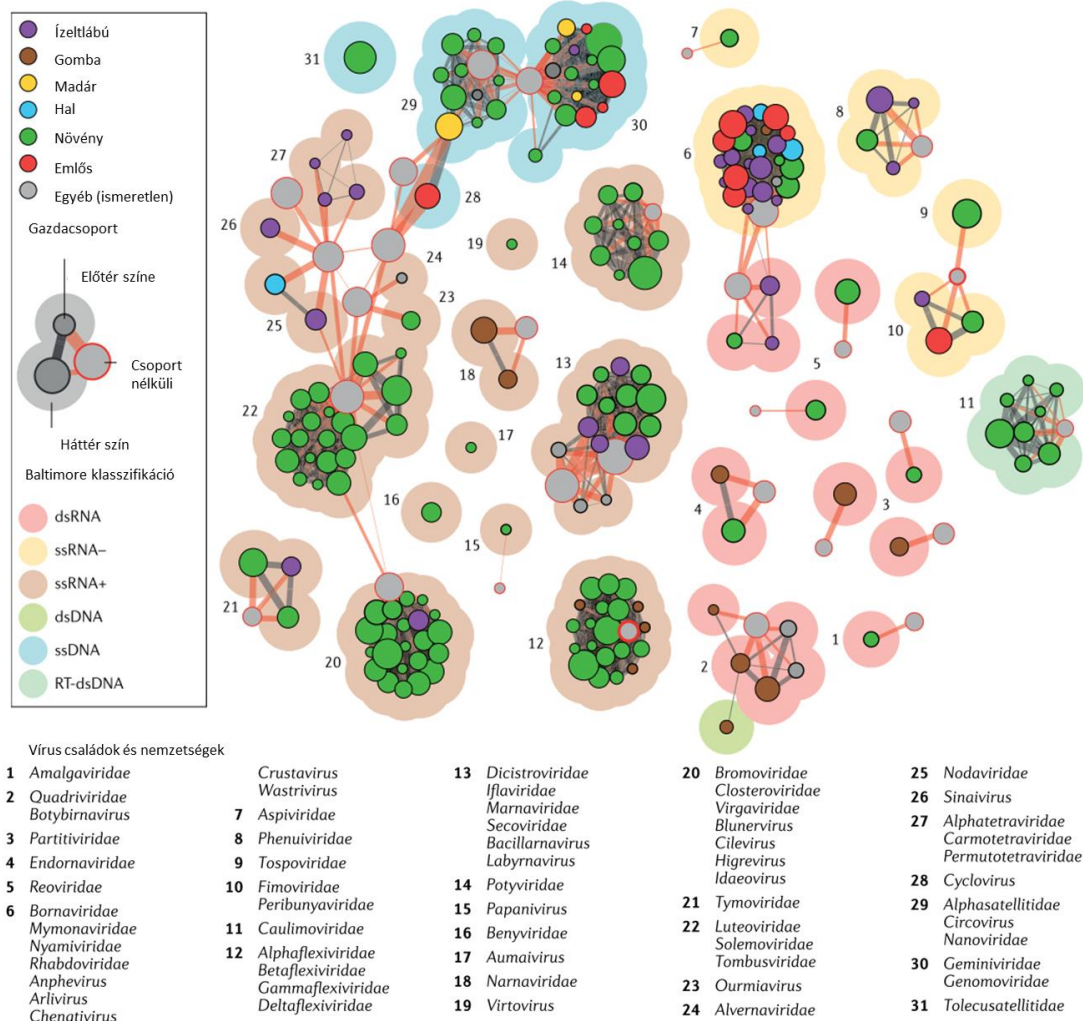
A szőlő (*Vitis vinifera* L.) egyik legrégebbi termesztett gyümölcsünk, amit regeneráló képessége miatt az élet szimbólumának tekintettek, ezért gyakran nevezik az élet fájának. A szőlő termesztése és háziasítása i.e. a hetedik és a negyedik évezred között történt a Fekete-tenger és Irán közötti régióban. Manapság körülbelül 7,5 millió hektárra tehető (a 2013-as OIV-becslés 7,518 millió hektár) a világ szőlőültetvényeinek területe (Maliogka és mtsai., 2015). Magyarországon a szőlő fontos gazdasági és kultúrnövény. Országunkban 22 borvidéken, összesen 71,5 ezer hektáron (KSH, 2018. június 1.) folyik szőlőművelés.

A szőlőt és gyümölcsfáinkat a fajtafenntartás miatt vegetatívan szaporítjuk, hogy a már ismert, jó tulajdonságok változatlanul jelentkezzenek az utódokon. A fás szárú növényeket igen sokféle kórokozó betegítheti meg, viroidok és vírusok (ezek száma szőlő esetén több mint 80) (Martelli és mtsai., 2014), fitoplazmák, baktériumok és gombák. E kórokozók, melyek közül több látens formában van jelen, komoly gazdasági károkat okozhatnak az ültetvényekben. A vírusok elleni védekezés során a megelőzésre kell törekednünk, mivel ültetvényeinket hagyományos növényvédelmi technikákkal nem óvhatjuk meg a vírusfertőzéstől. A fertőzések megelőzésében kulcsszerepe van a kiváló minőségű, patogénmentes szaporítóanyagnak.

Bár a növényi virológia tudományága csak közel 120 éves, a történeti irodalom rámutat arra, hogy az emberiség már évezredekkel ezelőtt észlelt olyan növénybetegségeket, amelyeket tipikusan vírusok okoznak. Koken japán császárnő 752-ben írt versében egy lenyűgöző sárga levélmintát ír le, amely tünetet mai ismereteink alapján egy geminivírusos fertőzésnek tulajdoníthatunk (Lefeuvre és mtsai., 2019).

A növényvírusok (1. melléklet, 2. melléklet) vizsgálata elsősorban a fertőzés látható jeleit mutató háziasított növényekre összpontosított. Ez ahhoz a téves értelmezéshez vezetett, amely szerint a legtöbb vírus tüneteket vált ki a gazdaszervezetben (Wylie és mtsai., 2013). Mai tudásunk szerint a vírusok

nemcsak kórokozók, hanem a globális ökoszisztéma nélkülözhetetlen elemei is. Mivel a növények a földi biotomassza több mint 80%-át teszik ki, a növényi vírusok valószínűleg nagyobb hatással vannak az ökoszisztéma stabilitására és működésére, mint más élőlények vírusai. A genetikailag homogén növénypopulációk túlnövekedésének megakadályozása mellett néhány növényvírus akár elő is segítheti gazdasejtjeik alkalmazkodását a változó környezethez. Az ilyen kedvező kölcsönhatások mértékére és gyakoriságára vonatkozó becslések azonban igen ellentmondásosak. A vírusok vizsgálatából nyert egyre bővülő tudásanyagunk olyan mélyebb, evolúciós kapcsolatokat is feltár, amik arra utalnak, hogy a növény-, gomba- és ízeltlábúvírusok jelentős részének közös eredete lehet (1. ábra). További kutatások szükségesek annak felderítésére, hogy a közös eredet milyen hatással van a vírus-vektor kapcsolatokra és a növények, gombák és ízeltlábúak közötti járványok terjedésének térbeli és időbeli dinamikájára (Lefeuve és mtsai., 2019).



1. ábra: A növényi vírusok eredete. Az előter színe a gazdaszervezetet jelzi, a háttér színe a víruscsalád/nemzetség örökítőanyagának jellegét (Lefeuvre és mtsai., 2019).

A viroidok kisméretű, fehérjét nem kódoló, egyszálú, köralakú RNS-ből állnak, autonóm módon képesek replikálódni, és egyedi szerkezeti, funkcionális és evolúciós tulajdonságokkal rendelkeznek.

A viroidokat és a vírusokat nehéz megkülönböztetni pusztán a gazdanövényben indukált fenotípusos hatások alapján. Ezek a hatások a súlyos tünetektől a látens fertőzésig terjednek (Flores és mtsai., 2005).

A szőlőbetegségeket okozó vírusok többnyire egyszálú RNS-genommal rendelkeznek, míg néhányukban kettős szálú RNS-genom van. Az utóbbi években DNS-genommal rendelkező szőlő patogén vírusokat is felfedeztek (1. táblázat) (Zherdev és mtsai., 2018).

Betegség	Vírus neve	Rövidítése	Rendszertani helye	Fő tünetei
Szőlő fertőző vírusos leromlás (Infectious degeneration and decline)	Grapevine fanleafvirus	GFLV	Secoviridae, Nepovirus	Csökkent életképesség, fokozott hajtásképződés (elágazás), kettős nóduszok, rövid internódiumok, cikcakkos növekedés; a levelek legyező alakúak és aszimmetrikusak,
Faszöveti barázdáltság (Rugose wood)	Grapevine virus A	GVA	Betaflexiviridae, Vitivirus	Duzzadt és parafaszerű vessző az oltás helyén; a szár és törzs eltérő átmérőjű; szemölcsös, vagy barázdált törzs; a levelek hullámosodhatnak; a levelek pirossá vagy sárgává válhatnak
	Grapevine virus B	GVB		
	Grapevine virus D	GVD		
	Grapevine Rupestris stem pitting-associated virus	GRSPaV	Betaflexiviridae, Foveavirus	
Levélsodródás (Leafroll)	Grapevine leafroll-associated virus 1	GLRaV-1	Closteroviridae, Ampelovirus	A sötét fajtáknál a levelek vörösdönek; fehér fajták esetén a levelek sárgára vagy klorotikusra válnak; az erek zöldek maradnak; levelek göndörnek.
	Grapevine leafroll-associated virus 3	GLRaV-3		
Látens foltosság (Grapevine fleck)	Grapevine fleck virus	GFKV	Tymoviridae, Maculavirus	Levélek halványodása és foltosodása a vegetációs időszak végére; fényes levelek; a levelek felfelé göndörhetnek
Piros foltosság (Red blotch)	Grapevine red blotch-associated virus	GRBaV	Geminiviridae, Grabovirus	A levelek pirulása a vörös bogyós gyümölcsökben (klorotikus területek a fehér bogyós fajtákban) a növekedési időszak elején; a bogyókérésének késése.
Levélér halványodás és vessző hanyatlás (Vein-clearing and vine decline)	Grapevine vein clearing virus	GVCV	Caulimoviridae, Badnavirus	Másodlagos vagy harmadlagos levélerek halványodása fiatal leveleken; mozaikosodás és foltok érett leveleken; cikcakkolt és rövid internódiumok a fiatal hajtáson; barnás, deformált, szabálytalan alakú és apró bogyók

1. táblázat: A szőlőben betegségeket okozó fő vírusok és fertőzésük tünetei (Zherdev és mtsai., 2018).

A szőlőbetegségek diagnosztizálásakor a vizuális diagnózis volt az első és a mai napig leggyakrabban alkalmazott módszer. A diagnózis csak a vizsgáló személy tapasztalatán alapul, ezért elkerülhetetlenül önkényes, ami pontatlan kórokozó-azonosítást eredményezhet. A vizuális diagnózis felállításának nehézsége, hogy a szőlőlevél morfológiájának és színének változásait sokféle tényező okozhatja. A tüneteket befolyásolják az időjárási körülmények, a vírus mennyisége, a törzsek agresszivitása, a fertőzés időpontja és a betegség időtartama is. Ráadásul a tünetmentes vírusok természetesen nem észlelhetők vizuálisan.

A biotesztek használata során érzékeny indikátornövényeket fertőznek / szemeznek a fertőzött növény nedveivel / rügyeivel. Ezek a tesztek ugyan érzékenyek, de rendkívül idő-, hely- és munkaigényesek, és ezért nagyon költségesek is. A gyorsabb és pontosabb diagnosztikai technikák fejlesztésével mára lecsökkent a biológiai tesztelés alkalmazása.

A vírusdiagnosztikára használt fő szerológiai módszerek az enzimköthet immunszorbens módszer (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA és a laterális áramlási immuntesztek (lateral flow immunoassay LFIA). Az ELISA

módszer lényege, hogy a specifikus antigén-antitest immunkomplexet enzimjelzés segítségével detektálhatjuk mikrotitráló lemezek mintahelyeiben. Az ELISA alkalmazásának azonban több hátránya is van. Egyrészt kiváló minőségű antiszérumot igényel, amely lehetővé teszi a vírus antigénekhez való érzékeny és specifikus kötődést. Antiszérum hiányában nem detektálható új vírus, sőt a közeli rokon, de más fenotípussal rendelkező vírusok kimutatására sem használható. Másrészt az ELISA teszt rugalmatlan, többféle kórokozó egyidejű kimutatására nem alkalmas. A szerológiai diagnosztikai módszerek másik fő iránya a laterális áramlási immunteszteken (LFIA) alapul. Ez a vizsgálat egy többmembrános kompozit tesztcsík használatán alapul, amelynek alkotóelemeit előzetesen kezelik az összes, a szelektív immunkomplexek kialakításához és megjelenítéséhez szükséges reagenssel. A tesztcsík színváltozásai utalnak a különböző kórokozók jelenlétére (Zherdev és mtsai., 2018).

A nukleinsav-alapú módszerek egyetlen növényi kivonatból több vizsgálat elvégzését teszik lehetővé; akár külön mintákban, azaz párhuzamosan, akár egyetlen mintából, azaz multiplex vizsgálattal. Polimeráz láncreakciót (Polymerase Chain Reaction - PCR) használunk DNS vírusok kimutatására és reverz transzkripciót (RT) követő PCR-t (RT-PCR) RNS vírusokra. A PCR technikák az ELISA vizsgálatoknál nagyságrendekkel érzékenyebben képesek kimutatni növényi vírusokat, azonban itt a vizsgálathoz szükséges primerek tervezéséhez előzetesen ismerni kell a vírusgenom szekvenciáját (Boonham és mtsai., 2014).

A vírus nukleinsavak kimutatásán alapuló további diagnosztikai módszer a DNS-chip (DNA microarray). A DNS-chiphez kovalensen kapcsolnak olyan próbákat, amelyek összességével egyidejűleg akár több ezer eltérő vírus azonosítható. A növények vírusdetektálására irányuló kísérletekben a DNS-chipek általában nagyobb érzékenységet mutatnak, mint az ELISA, de kevésbé érzékenyek, mint az RT-PCR.

A nagy áteresztőképességű szekvenálás (high throughput sequencing - HTS), másnéven újgenerációs szekvenálás (next-generation sequencing - NGS) forradalmasította a növényi vírusok kimutatását. A PCR-en és immuntechnikán alapuló módszerek csak akkor alkalmazhatók, ha vannak már előzetes információk a kérdéses vírus genomjáról vagy elérhetők már vírusfehérjékre

specifikus ellenanyagok, ezért új betegséget okozó vírusok nem detektálhatók ezekkel a módszerekkel. Ezzel szemben a HTS módszerek segítségével nemcsak a keresett-, hanem a mintánkban fellelhető (közel) összes vírust kimutathatjuk, és szekvenciainformációt is nyerhetünk róluk (2. táblázat) (Zherdev és mtsai., 2018).

Módszer	Szükséges szakértelem	A berendezésekre és az adatfeldolgozásra vonatkozó követelmények	Vizsgálat időtartama	Vizsgálat helye, használata
Vizuális diagnosztika	Jelentős gyakorlati ismeretek	Nincs speciális szükséglet	Több perc	Terep
Biotesztek	Jelentős gyakorlati ismeretek	Indikátornövények gyűjteménye, felszerelések hosszú távú használata	Több hétig, vagy akár 2-3 évig is tarthat	Kutatás, eredmények igazolása
ELISA	Mérsékelt	Specializált szériás berendezés, aránylag alacsony áron	Több óra	Kutatás, eredmények igazolása, rutin labor diagnosztika
LFIA	Alacsony	Egyszerű felszerelés, a vizuális eredmények kiértékelésének lehetősége	10-20 perc	Terepi diagnosztika
PCR	Mérsékelt	Speciális felszerelés, a berendezés ára meglehetősen magas lehet	Több perc vagy néhány óra	Kutatás, eredmények igazolása, rutin labor diagnosztika, terepi diagnosztika
DNS-chip	Magas	Speciális berendezés	Több óra	Kutatás
HTS	Magas	Speciális, magas költségű berendezések, speciális adatfeldolgozás	Több óra	Kutatás

2. táblázat: A növényi (szőlő) vírusdiagnosztikára használt módszerek jellemzői (Zherdev és mtsai., 2018).

A dolgozat célja a HTS módszerek szőlővírus-diagnosztikára való felhasználásának bemutatása, összehasonlítása és egy saját kutatás leírása, melynek során Magyarország szőlőültetvényeit reprezentáló kis RNS szekvenciák segítségével hazánkban először került azonosításra a szőlő T vírus (grapevine virus T- GVT).

2 HTS

A nagy áteresztőképességű szekvenálási technikák forradalmasították a genomikát. A hatalmas genomok gyakran összehasonlító jellegű kutatására a hagyományos Sanger szekvenálás nem bizonyult elég hatékornak. Éppen az ilyen kutatások igénye vezetett a HTS technikák kifejlesztéséhez, amelyek e kérdések vizsgálatára mára már alapvető kutatási eszközzé váltak.

Az első HTS módszerek a Sanger módszer DNS-szintézisen keresztüli szekvenálási alapelvét követték, majd később más eljárásokat is kifejlesztettek. A hagyományos Sanger módszerrel ellentétben azonban a HTS módszerek közös jellemzője, hogy párhuzamosan több millió (vagy több száz millió) nukleinsav szekvenciáját határozzák meg, amivel akár több ezer gén szekvenálható egyidejűleg.

A HTS módszer nagy előnye, hogy nem igényli a szekvenciainformációk előzetes ismereteit, (nem szükséges specifikus primer), egy hipotézistől mentes megközelítés, amely így alkalmas új gének és ritka variánsok felfedezésére és nagy érzékenységet nyújt ezek számszerűsítésére.

Nem is olyan régen a növényvírusok felfedezése még időigényes folyamat volt, és a nem ismert eredetű betegségek kialakításában betöltött szerepük megállapítása is sok nehézségbe ütközött. Az utóbbi években a HTS megjelenése forradalmasította a növényi vírusok tanulmányozását és a gyakorlati vírusdiagnosztikát. Ennek oka, hogy a HTS nemcsak a vírusok kimutatására, a vírusgenomok jellemzésére és a gazda-patogén kölcsönhatások tanulmányozására használható, hanem akár előzetes ismeretek nélkül is lehetővé teszi az ismert vírusvariánsok egyre növekvő változatosságának jellemzését. Az újonnan felfedezett vírusok közül sok tünetmentesen bújhat meg a termesztett és vadon élő növényekben. Ezek a megfigyelések, valamint az egyre több növény-vírus mutualista kapcsolat leírása megdöntheti a hagyományos dogmát, miszerint minden vírus kórokozó (Massart és mtsai., 2017).

A HTS alkalmazható víruspopulációk tanulmányozására, használatával vizsgálható egyetlen izolált gazdasejt, szerv, teljes gazdanövény, vagy akár növényközösségek is egy adott ökoszisztémán belül. Ennek eredménye lehet akár egy növény-, vagy ökoszisztéma fitovírus metagenom, ami igen érdekes vizsgálatokat tesz lehetővé például a vírusökológiában. A gazdanövények genomjának ismeretében a HTS adatok elemzésekor lehetőség nyílik, az emberi patogének esetén már sikeresen alkalmazott *in silico* szűrésre, amely során a szekvenálási olvasatokból először eltávolítják a gazdaszervezet genomjával homológ szekvenciákat, így a továbbiakban már csak a nem gazdaszervezet eredetű szekvenciákat elemzik (Massart és mtsai., 2014).

Fontos gazdasági növényünk, a szőlő vírusainak felderítésében is nagy segítséget nyújt a HTS alkalmazása, mivel igen hatékony eszköz, és lehetővé teszi a szőlőmintákban található vírusok részletes leírását. A vizsgálat során használt HTS módszertől függően nemcsak a mintában található összes vírus deríthető fel, de akár teljes vírusgenomok is összeállíthatók. Az elmúlt években a HTS használatával a világ minden táján számos új szőlővírust azonosítottak, amelyek különféle családokba tartoznak, mint például a *Betaflexiviridae*, *Caulimoviridae*, *Luteoviridae*, *Secoviridae* vagy *Tymoviridae* (Hily és mtsai., 2018).

A HTS-sel történő vírusdiagnosztika három főbb lépésen alapul: (i) a nukleinsavminták előkészítése a szekvenálásra, (ii) az előkészített minták szekvenálása egyetlen kísérletben, (iii) a kapott szekvencia olvasatok bioinformatikai analízise.

2.1 Minták előkészítése

A HTS módszerek elsősorban abban különböznek egymástól, hogy a DNS vagy RNS mintákat hogyan készítik elő. Az előkészítés módját a vizsgálni kívánt kérdés alapján kell megválasztani. A nukleinsavminták előkészítése magába foglalja a mintagyűjtést, a nukleinsav dúsítását és a könyvtárkészítést.

A mintagyűjtés szőlő esetén történhet az ültetvényeken, üvegházakban, laborban nevelt növényekről; tünetmentes, tünetes, vagy véletlenszerűen választott növényről, bármelyik szervből: hajtáscsúcsból, fiatalabb és idősebb levelekből, kacsából (Czotter és mtsai., 2018), gyümölcshúsból, héjből és magból is (Jo és mtsai., 2015).

A szekvenálás alapjául szolgáló nukleinsav jellegétől függően eltérő HTS módszerek léteznek, amelyeknél a mintaelőkészítés módja is alapvetően eltér. A szekvenálásra alkalmas DNS-könyvtár elkészítéséhez számos különböző eljárás létezik, amelyek különböző nukleinsav kivonatok esetében használhatók. A növényi vírusok kimutatására a duplaszálú (double stranded – ds) RNS, a kis interferáló (small interfering – si) RNS és teljes RNS módszert használják a leggyakrabban (Ruiz-García és mtsai., 2019). A VANA megközelítés, mely esetben a tisztított virionokból származó nukleinsavat használják, szintén alkalmas növényi vírusok jelenlétének feltérképezésére (Bernardo és mtsai., 2018).

A könyvtárkészítés során az RNS molekuláról reverz transzkripcióval cDNS-t állítunk elő. A cDNS molekulák mindkét végéhez adaptereket ligálunk, amelyek többek között a molekulák szekvenáló platformhoz történő kapcsolódására szolgálnak. Mivel a szekvenálás viszonylag drága, és egy szekvenálási egység igen sok, akár 250 millió olvasatot is képes készíteni egy reakcióban, időt és költséget takaríthatunk meg, ha egyszerre több mintát szekvenáltatunk. Az ilyen multiplex eljárás során több könyvtárat keverünk össze. Ekkor az adapterek ligálása során egyedi, DNS szekvenciába írt „vonalkódok” kerülnek hozzáadásra minden egyes könyvtárhoz. Ezeket a vonalkódokat használják a könyvtárak megkülönböztetésére az adatelemzés során (<https://www.illumina.com/>).

2.2 Szekvenálás

Az elmúlt években hatalmas verseny alakult ki a nagy kapacitású, rövid olvasású szekvenciák előállítására képes készülékeket fejlesztő cégek között, melyek közül két gyártó bizonyult a legsikeresebbnek: az Illumina (szekvenálás szintézis útján, sequencing by synthesis, SBS) és a Thermo Fisher Scientific Ion Torrent (félvezető szekvenálási technológia, semi-conductor sequencing) (Marine és mtsai., 2020).

Az első HTS platformok olyan eszközök voltak, amelyek, a Sanger szekvenáláshoz hasonlóan szintézissel hajtottak végre szekvenálást (sequencing by synthesis, SBS). A szintézis során minden nukleotid hozzáadásakor digitális felvétel készül, amelyen fluoreszcencia alapján azonosítható a beépült nukleotid. Minden olvasott szekvenálás egyetlen könyvtári fragmentumról származik, és az SBS adatok digitálisak (<https://www.illumina.com/>).

Az Ion Torrent az első úgynevezett „fény utáni szekvenálás” technológia, mivel nem használ sem fluoreszcenciát, sem lumineszcenciát. A nukleotidok beépülésekor a nukleotid lánc polimerizációja során felszabaduló protonok által okozott pH változást detektálják, amely a mikroprocesszor-chipek gyártásánál alkalmazott komplementer fém-oxid-félvezető (complementary metal-oxide-semiconductor, CMOS) technológiával lehetséges (Heather és Chain, 2015).

A közvetlen egymolekulás szekvenálás (single-molecule sequencing, SMS) egy viszonylag új technológia, amely számos előnyt kínál az előző, rövid olvasási szekvenálási módszerekkel szemben. Jelenleg két különböző SMS technológia érhető el a kereskedelemben: az egymolekulás valós idejű szekvenálás (single-molecule real-time sequencing, SMRT; Pacific Biosciences) és a nanopore (Oxford Nanopore Technologies). Mindkét megközelítés nagyon hosszú leolvasásokat eredményez (10–250 kb) (Salk és Kennedy 2020). Az SMS módszerek esetén az egyes leolvasásoknak viszonylag magas a hiba aránya, viszont a hosszú olvasatok miatt az előállított konszenzus szekvencia pontossága hasonló lehet, mint a Sanger szekvenálásnál és az SBS módszereknél (Mardis, 2017).

A SMRT-alapú platformon a vizsgált cirkularizált DNS-molekulákat többször szekvenálhatjuk egy erősen processzív DNS-polimerázzal és az egyes mintákhoz készíthetünk egy-egy köralakú konszenzusszekvenciát, több nagyságrenddel javítva a vizsgálat pontosságát. A nanopore technológiák ezzel szemben még nem képesek alkalmazni a jelentős konszenzus-alapú hibajavítást ugyanazon molekula ismételt szekvenálásával. Jelenleg egyfajta kettős szálú konszenzust lehet létrehozni hajtű alakú adapterek segítségével, amelyet kétirányú (two-directional) szekvenálásnak neveznek. Két újabb módszer, a gördülő kör a konkatamerikus konszenzushoz (Rolling-Circle to Concatameric Consensus) és az intramolekuláris-ligált nanopore konszenzus szekvenálás (Intramolecular-ligated Nanopore Consensus Sequencing), lehetőséget kínál a nanopore-alapú platformok pontosságának növelésére egy köralakú konszenzus-szekvenálásszerű megközelítés megvalósításával (Salk és Kennedy 2020).

A szekvenálások hatékonyságát növelhetjük, ha az adott templát mindkét végét szekvenáljuk. Az egyvégű szekvenálás (single-end sequencing) során a

szekvenálást csak a nukleinsav egyik végéről indulva végezzük. A minta két végének szekvenálása (paired-end sequencing) során viszont mindkét végből indulva szekvenálunk, ami így kétszer annyi olvasást generál ugyanabban az időben és ugyanabból a könyvtárból. Ha a templát fragmentumok viszonylag rövidek, az olvasási párok akár át is fedhetnek egymással, ami megkönnyíti a genomi átrendeződések felfedezését, az ismétlődő szekvenciaelemek és az átíródo szakaszok kimutatását (Ruiz-García és mstai., 2019).

2.3 Bioinformatika

A bioinformatikai vizsgálatok során először a szekvenálás minőségellenőrzését és a könyvtárkészítés során felhasznált adapterek eltávolítását végezzük el. Vírusok vizsgálatakor ezután két módszert alkalmazhatunk. Az egyik lehetőség, hogy szekvencia olvasatokból *de novo* összeszereléssel hosszabb, összefüggő szekvencia szakaszokat, úgynevezett kontigokat építünk és ezekre az NCBI GenBank adatbázisából találati listákat generálunk. A másik lehetőség, hogy a szekvenciákat közvetlenül illesztjük a keresett vírus referenciagenomra és lefedettséget vizsgálunk.

A bioinformatikai vizsgálatok elvégzéséhez ma már olyan felhasználóbarát programokat is használhatunk, mint a CLC Genomics Workbench (Qiagen), vagy a Geneious Prime (Geneious).

2.4 Növényi vírusok nem célzott felfedezése

A HTS vizsgálatok nagymennyiségű genomi adatot szolgáltatnak előzetes szekvencia ismeret nélkül. A módszernek ebből a tulajdonságából adódik, hogy a vizsgálat „melléktermékeként” nem várt, új genomi információkat is találhatunk.

Vírusok számos környezetből történő nem célzott felfedezésére is használható tehát a HTS, melynek köszönhetően egy új tudományág van kialakulóban, a vírusmetagenomika vagy más néven viromika. A növényi vírusokat célzó metagenomikai vizsgálatokat a gazdanövényen és vektorokon kívül más környezetben ritkán használják, ezekről igen kevés információ áll rendelkezésre (Massart és mtsai., 2014).

A növényi minták vizsgálata során nem csak növényi eredetű vírusok kerülnek felfedezésre: szőlőmintákban például nagy számban találhatók mikovírusok is, amelyek a szőlő gombás fertőzését okozó gombákban találhatók (Nerva és mtsai., 2019).

Érdekesség, hogy sok esetben, bár nem szándékosan célozták meg a növényi vírusokat, mégis több, elsősorban a fágokra vagy állati / emberi vírusokra irányuló kutatás számos ismert vagy új növényvírust azonosított különféle környezetekben. Növényi vírusokat mutattak ki különböző vizekből vagy állati / emberi székletből is (Massart és mtsai., 2014).

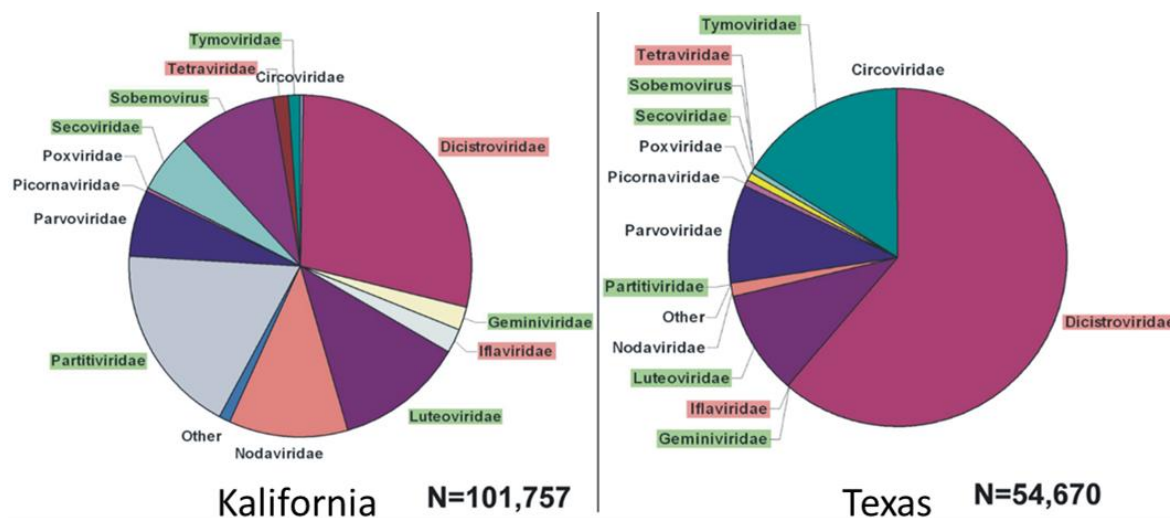
Egy Floridában végzett tanulmány kapcsán ivóvízből és tisztított szennyvízből, úgynevezett szürke vízből kinyert DNS és RNS molekulákat szekvenáltak. A vizsgálat eredményeképpen a fág, emberi és állati vírusok mellett rengeteg növényi DNS és RNS vírust tártak fel (*Comoviridae*, *Potyviridae*, *Sequiviridae*, *Tombusviridae*, *Reoviridae*, *Geminiviridae* családokból). A legtöbb vírus újszerű volt, mivel aminosavsorrendjük kevesebb, mint 60%-ban volt azonos ismert vírusfehérjék szekvenciájával.

A *Tombusviridae* családból származó *Tobamovirus* nemzetségbe tartozó összes vírus és a melon necrotic spot virus (MNSV) aminosav szinten nagy hasonlóságot (>90%) mutatott már ismert növényi kórokozókhoz. Az ezekből a csoportokból származó vírusokról ismert, hogy rendkívül stabilak, ellenállnak a magas

hőmérsékleteknek, valamint érzéketlenek a szerves oldószerekre és a nem ionos mosószerekre.

A vizsgálat azt mutatta, hogy a tisztított szennyvíz mezőgazdasági használata segíti az erősen stabil, főképp DNS örökítőanyagú növényi kórokozók terjedését. További vizsgálatok szükségesek ezen növényvírusok fertőzőképességének meghatározására, és annak megítélésére, hogy a szürke víz használata potenciális problémát jelent-e a mezőgazdaság számára (Rosario és mtsai., 2009).

Eddig több mint 80 vírushajt izoláltak vagy detektáltak denevérekben nukleinsav alapú módszerekkel. A denevérekre jellemző genetikai sokféleség, széles földtani eloszlás, magas népsűrűség, vándorlási szokások és hosszú élettartam fogékonnyá teszi őket különböző vírusok hordozására. A denevérek súlyos emberi betegségeket okozó vírusok terjesztői, mint például a koronavírus és az ebola vírus, ezért vizsgálatuk vírusdiagnosztikai szempontból is fontos. Az alábbi kísérletben Texasban és Kaliforniában gyűjtött több denevérfaj guanóját vizsgálták HTS-sel.



2. ábra: Denevérguanóból kimutatott leggyakoribb eukarióta vírusok megoszlása víruscsaládok szerint osztályozva. A növényi vírusok zöld színnel, a rovarvírusok piros színnel vannak kiemelve, a kiemelés nélküliek emlős vírusok (Li és mtsai., 2010).

Az állat életmódját tükrözve, a guanó viromja legnagyobbbrészt rovar-, illetve növényi vírusokat tartalmazott (2. ábra). A kaliforniai denevérektől származó vírusszekvenciák 46%-a, míg a texasi denevérek esetén 27%-a növényi

víruscsaládokhoz kapcsolódik. Ismert és újonnan azonosított növényvírusokat is kimutattak a guanó mintákból (Li és mtsai., 2010).

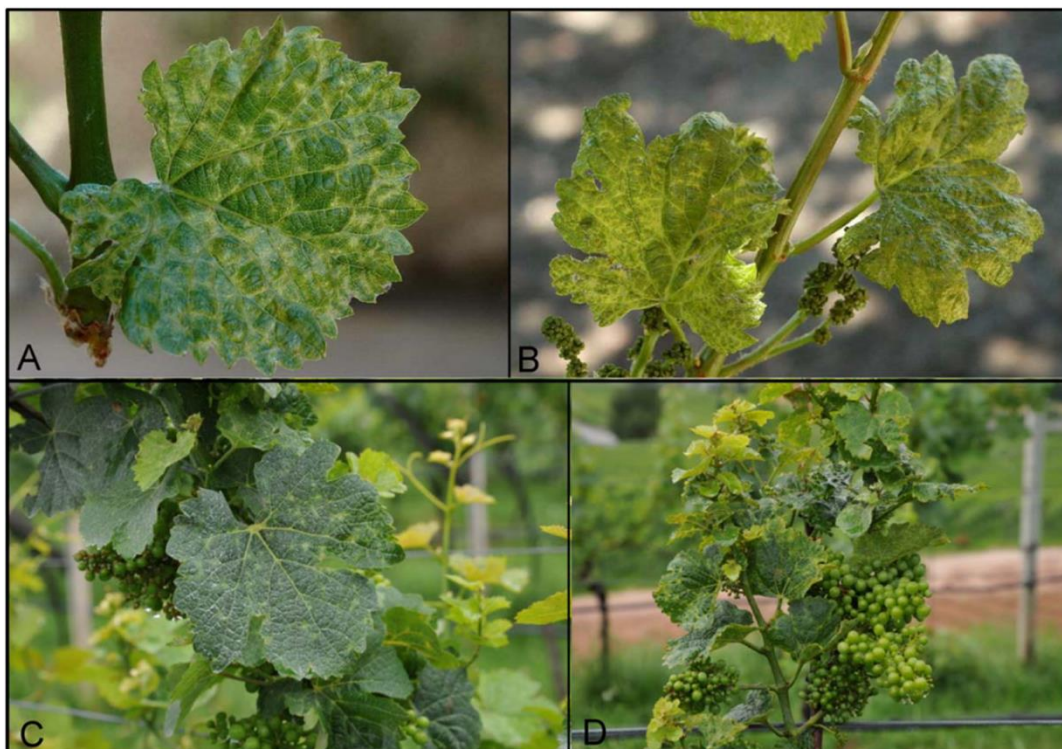
A fenti példákból láthatjuk, hogy a növényi vírusok kimutatása nem csak a gazdanövényekből lehetséges. Ismert és új vírusok egyaránt azonosíthatóak nem célzott vizsgálatokkal is. További vizsgálatokra van szükség ezen vírusok fertőzőképességének és környezeti hatásainak feltárására.

2.5 Virom vizsgálat

A nagy áteresztőképességű szekvenálási vizsgálatok segítségével kiválóan reprezentálható egy növény, ültetvény vagy egy nagyobb régió teljes víruspopulációja, a virom. A HTS megközelítések hajnalán virom elemzésekkel kimutatták, hogy a szőlő az egyik legtöbb vírusfaj által fertőzött növények közé tartozik. Jelenleg több mint 70 szőlővel kapcsolatos vírusfajt azonosítottak és ezek száma továbbra is folyamatosan növekszik (Hily és mtsai., 2020).

A vírusgenomokról bővülő szekvencia információink és a víruscsaládok jellegzetességeinek megismerése hatalmas segítséget nyújt újabb vírusok azonosításához. Ezen információk segítségével újabb és újabb vírusok írhatók le, akár a korábban teljes virom vizsgálaton átesett növényekről is. Népszerű és igen gazdaságos módja az új- és nemrégiben leírt vírusok tanulmányozásának a már meglévő szekvenálási eredmények újraelemzése. Ezek a szekvenálási eredmények származhatnak a kutató korábbi vizsgálataiból (Glasa és mtsai., 2018) vagy szabadon letölthetők az NCBI adatbázisából (Debat és mtsai., 2019, Jo és mtsai., 2017).

2010-ben az olaszországi Trentino régióban termesztett szürkebarát (Pinot gris) szőlőültetvények számos egyede klorotikus foltosodásos és levéldeformációs tüneteket mutatott (3. ábra). Hasonló tüneteket észleltek tramini és Pinot noir ültetvényeken is. A betegség a termés csökkenését és a bogyók minőségének romlását eredményezte.



3. ábra: Klorotikus foltosodásos és levéldeformációs tüneteket mutató Pinot gris (A, B) és tramini (C, D) szőlőnövények (Giampetruzzi és mtsai., 2012).

Tünetes és tünetmentes Pinor gris levelekből vettek mintát és ezeket kis RNS HTS-sel vizsgálták. A mintákból polietilén-glikolos kicsapással izoláltak alacsony molekulatömegű RNS frakciót, majd a kis RNS frakciókat poliakrilamid gélelektroforézissel választották el. A szekvenálást Illumina platformon végezték. A kis, 18 és 26 nt közötti RNS szekvenciákra vírustalálati listákat hoztak létre BLASTN algoritmussal és SOAP-al (Short Oligonucleotide Alignment Program). A szekvenciákból Velvet program segítségével kontigokat építettek.

DNA Strider programmal a kontigokból a szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus (grapevine rupestris stem pitting-associated virus - GRSPaV), a komlótörpülés viroid (hop stunt viroid - HSVd) és a szőlő sárgafoltosság viroid (grapevine yellow speckle viroid 1 - GYSVd-1) genomokat azonosították.

A Velvet program segítségével készített kontigok a hasonló tüneteket mutató japán ültetvényekben leírt szőlő bogyó belső elhalás vírussal (grapevine berry inner necrosis virus - GINV) mutattak alacsony fokú hasonlóságot, de a szekvencia új vírushoz tartozónak bizonyult. Az új vírus a szőlő Pinot gris vírus (grapevine Pinot gris virus - GPGV) nevet kapta. További vizsgálatokat igényel

annak megállapítása, hogy a GPGV milyen összefüggésben áll a klorotikus foltosodásos és levéldeformációs tünetekkel (Giampetruzzi és mtsai., 2012).

2.6 TNA

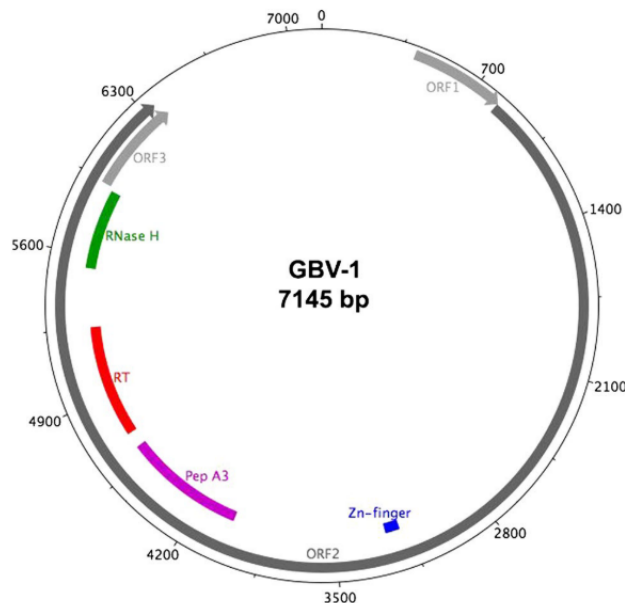
A HTS vírusdiagnosztika legkézenfekvőbb módszere a teljes nukleinsav (total nucleic acid, TNA) megközelítés, amely során a mintánk teljes DNS vagy RNS állományát szekvenáljuk. A TNA módszer alkalmazásával átfogó, nagy mennyiségű és jó minőségű szekvenciaadatot állíthatunk elő.

A növényi vírusok felderítésére főként a teljes RNS HTS módszert alkalmazzák. A növényi mintából izolált teljes RNS tartalomban megtalálhatók az esetleges RNS és DNS vírusokról átíródó szakaszok. Opcionális lépésként az adatmennyiség csökkentése és a vizsgálat pontossága érdekében a teljes RNS mintákból eltávolítható a riboszómális RNS (Al Rwahnih és mtsai., 2009).

A horvát Kaštela (Közép-Dalmácia) térségben hosszú ideje folytatnak szőlőművelést, számos őshonos szőlőfajtaival rendelkeznek. A tanulmányban négy Kaštela térségben őshonos fajta (Babica, Dobričić, Ljutun és Vlaška) víruspopulációját vizsgálták teljes RNS HTS-sel.

Levélnyélből RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Németország) segítségével izolálták a teljes RNS-t, majd Illumina Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Plant) (Illumina, USA) használatával eltávolították a mintákból az rRNS tartalmat. Az RNS mintákból reverz transzkripcióval könyvtárakat készítettek és indexelték őket. A 100 páros végű leolvasást HiSeq4000 platformon (Illumina, USA) végezték el. A kezdeti minőségellenőrzést FastQC programmal (Babraham Bioinformatics, UK) hajtották végre, majd a szekvenciákat Sickle programmal trimmelték (azaz eltávolították a molekulák végeihez ligált adapterek szekvenciáit) és szűrték. A szekvenciákat illesztették szőlő genomra Bowtie 2 programmal. A SPAdes program segítségével a nem illeszkedő szekvenciákból *de novo* kontigokat építettek. Ezekre a kontigokra BLAST algoritmussal vírustalálati listát hoztak létre.

Azokat a kontigokat, amelyekhez nem volt szignifikáns találat, a MEGA programmal igazították egymáshoz. A konzervált tartományok és ORF-ek (nyitott leolvasási keret, open reading frame) kereséséhez az NCBI Conserved Domain Database és ORF Finder eszközt használták. Ezen eszközök segítségével fedeztek fel egy új vírust, grapevine badnavirus 1-et (GBV-1) (GenBank: MF781082). A GBV-1 duplaszálú DNS vírus, mely a badnavírusokra jellemző konzervált motívumokat tartalmaz (4. ábra).



4. ábra: A grapevine badnavirus 1 (GBV-1) genom felépítése: 7145 nukleotidból áll, három leolvasási keretet tartalmaz (ORF1-3). Konzervált funkcionális motívumok színessel kiemelve: ribonukleáz H (RNase H), karfiol mozaik vírus peptidáz (Pep A3), Cink ujj (Zn-finger) (Vončina és Almeida, 2018).

E mellett számos ismert vírust és viroidot, köztük a szőlő G vírust (GVG), a szőlő K vírust (GVK), a szőlő D vírust (GVD), a szőlő T vírust (GVT), a grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus-t (GRLDaV), a szőlő sárgafoltosság viroid 1 és 2-t (GYSVd-1,2) valamint a komlótörpülés viroidot (HSVd) első alkalommal azonosították a horvát szőlőkben a vizsgálat során. Az eredményeket a szekvenciákhoz tervezett primerek segítségével RT-PCR-rel, illetve a PCR termékek Sanger szekvenálásával igazolták vissza (Vončina és Almeida, 2018).

A teljes RNS megközelítésnek a legnagyobb hátránya, hogy a potenciális vírusszekvenciák előállítása mellett a gazdanövény összes transzkriptumát és az esetleges további mikroorganizmusokat is egyaránt szekvenáljuk, ami jelentősen csökkentheti a vizsgálni kívánt vírus szekvencia lefedettségét (Read és Pietersen, 2019).

Mivel a növényeket fertőző vírusok nagy része RNS vírus, és a teljes DNS megközelítés az egy- vagy kétszálú DNS vírusokat célozza meg, ezért a növényi vírusdiagnosztikában kevésbé széles körben alkalmazott módszer. A teljes DNS mintákban a keresett vírus vagy virion DNS-e erősen hígítva van a gazdanövény

valamint az endo- és epifita mikroorganizmusok genomjával, így a szekvenálás során arányaiban nagyon alacsony lesz a vírusspecifikus olvasatok száma.

Tüneteket mutató növény esetén érdemes kikérni növénypatológus szakember véleményét annak eldöntésére, hogy melyik TNA módszert alkalmazzák a betegség vizsgálatára, milyen patogén fertőzheti a növényt. Ha a tünet gomba-, baktérium- vagy DNS vírus fertőzésre utal, teljes DNS szekvenálás javasolt, ha pedig egyéb vírus- vagy virion fertőzést feltételeznek, teljes RNS HTS-t célszerű alkalmazni. Ha a betegség tünetei ismeretlenek és nem utalnak konkrét kórokozóra, akkor a DNS izolálását és szekvenálását érdemes először elvégezni. Amennyiben ez nem mutat ki kórokozót, az RNS szekvenálással kell folytatni a vizsgálatot. Ha ezzel a módszerrel is negatív eredményhez jutunk, akkor ez azt is jelezheti, hogy a tüneteket abiotikus stressz vagy olyan új kórokozó okozza, amely nem áll leszármazási kapcsolatban ismert betegséget okozó ágensekkel (Chalupowicz és mtsai., 2019).

A TNA módszerek használatával, egyetlen vizsgálattal hatalmas mennyiségű nukleinsav adatot nyerhetünk ki a mintánkból, (közel) teljes lefedettségű virális szekvenciákat azonosíthatunk és elemezhetünk. Az előnyök mellett azonban a módszer fő hátránya is maga a nagy adatmennyiség. A TNA szekvenciák kezelése komolyabb informatikai háttérrel igényel, illetve a rengeteg olvasat közt a kis számban jelenlévő vírusok szekvenciáira nehezebb rátalálni, mint tőre a szénakazalban.

2.7 dsRNS

Az ismert növényi vírusok háromnegyede pozitív egyszálú RNS genomú, azaz a genom a fertőzött sejtben mRNS-ként is funkcionál. A legtöbb RNS vírus örökítőanyaga replikáció során kétszálú RNS (double-stranded RNS, dsRNS) formát ölt. Mivel a növényekből kinyert hosszabb, kétszálú RNS molekulák nagy része virális eredetű, így ezek dúsításával növelhetjük a mintánk vírusspecifikusságát (Blouin és mtsai., 2016).

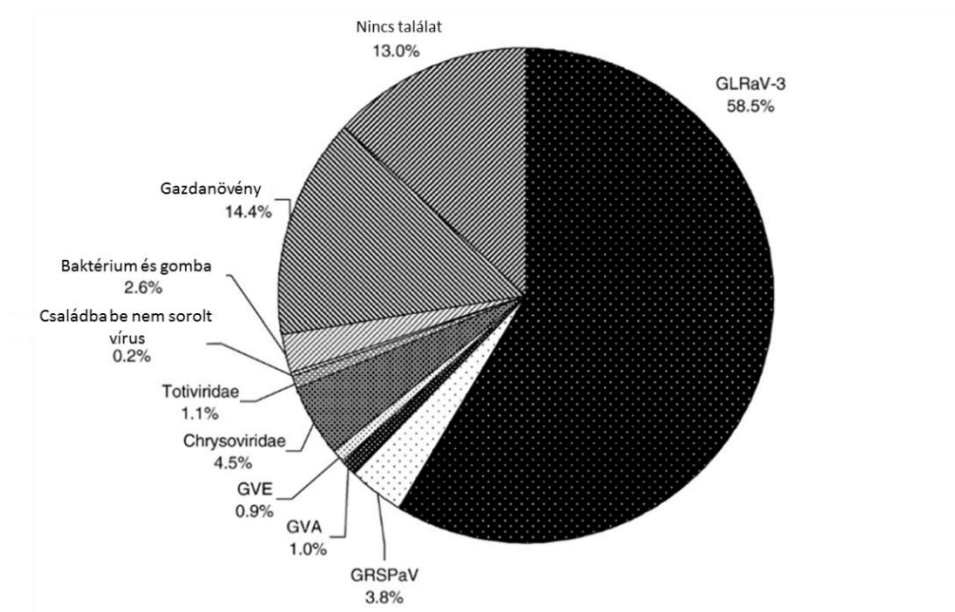
A dsRNS-t legtöbb esetben Morris és Dodds (1979) protokollja alapján szűrik cellulózkromatográfiával. A dsRNS magas etanol koncentrációnál kötődik a cellulózhoz, így eltávolítható az előzetesen tisztított RNS mintából a nem kötődött, egyszálú RNS. Opcionális lépésként a riboszómális RNS is eltávolítható, mely lépés növeli a virális eredetű RNS molekulák dúsulását (García és mtsai., 2020).

A fent említett hagyományos dsRNS kivonás rendkívül idő- és munkaigényes folyamat. Alternatív módszerként alkalmazható a dsRNS-ek ellen termeltetett antitestek segítségével történő dúsítás. Anti-dsRNS monoklonális antitestek felhasználásával pull-down assay-t végeznek, amit reverz transzkripció és PCR-el történő amplifikálás követ. A módszert eredetileg szerológiai tesztekhez használták, de alkalmas a nagy áteresztőképességű vizsgálatoknál a minták előkészítésére is és detektálhatók is vele növényi vírusok (Blouin és mtsai., 2016).

A dsRNS dúsítás hatékonyságát jól mutatja, hogy egy vizsgálat során a dsRNS szekvenciáknak véletlenszerűen kiválasztották a 10%-át, amelyek segítségével ugyan kevésbé teljes genom lefedettséggel, de képesek voltak kimutatni az eredeti vizsgálatban azonosított víruspopuláció 96,5%-át. Ez a rendkívül hatékony dúsítás lehetővé teszi a minták multiplexelését és számának növelését egy adott szekvenálási egységben, ami drasztikusan csökkenti a vizsgálat költségét (Beuve és mtsai., 2018).

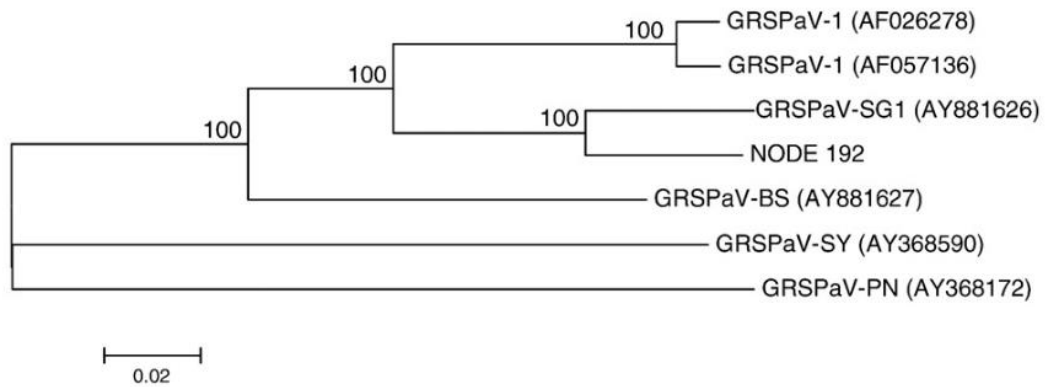
Egy dél-afrikai Stellenbosch régióban lévő beteg merlot szőlőültetvényt vizsgáltak dsRNS HTS-sel. Télen, mikor a tünetek nem látszóttak, véletlenszerűen kiválasztottak 44 egyedet és floém mintákat vettek belőlük. A mintákból dsRNS-t izoláltak cellulóz extrakcióval, melyekről reverz transzkripcióval cDNS-t készítettek. A ~200 bp hosszú cDNS molekulákat PCR-rel sokszorozították és Illumina platformon szekvenálták. Az elemzés során a szekvenciából Velvet

program kontigokat építettek, melyekre a Blastn és Blastx algoritmussal vírustalálati listát hoztak létre (Coetzee és mstai, 2010).



5. ábra: A szekvenciák találat szerinti százalékos megoszlása. GLRaV-3: szőlő levélsodródás vírus 3 (grapevine leafroll-associated virus 3), GRSPaV: szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus (grapevine rupestris stem pitting-associated virus), GVA: szőlő A-vírus (Grapevine virus A) és GVE: szőlő E-vírus (Grapevine virus E) (Coetzee és mtsai., 2010).

Összesen 4 ismert vírust detektáltak (GLRaV-3, GRSPaV, GVA és GVE) és 3 addig ismeretlen vírust is azonosítottak, melyből kettő a *Chrysoviridae* és a *Totiviridae* családba tartozik, egy pedig még be nem sorolt. A szekvenciák 59%-a a GLRaV-3 vírushoz tartozik (5. ábra). A tanulmány szerint a beteg szőlőültetvény vírushoz tartozik (5. ábra). A tanulmány szerint a beteg szőlőültetvény vírushoz tartozik (5. ábra). A tanulmány szerint a beteg szőlőültetvény vírushoz tartozik (5. ábra). A tanulmány szerint a beteg szőlőültetvény vírushoz tartozik (5. ábra).



6. ábra: Bootstrap módszerrel készült filogenetikai fa, melyen az izolált szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus (GRSPaV) variáns (NODE192) és hat teljes GRSPaV genomszekvencia van feltüntetve GenBank azonosító számokkal ellátva. A bootstrap értékek (500 ismétlés) az ágakon vannak feltüntetve. A skála a helyettesítések számát jelzi bázishelyenként (Coetzee és mtsai., 2010).

Ugyanebben a tanulmányban dsRNS HTS-sel közel teljes hosszúságú (90%-os lefedettségű) GRSPaV kontigot állítottak elő, amelyet több GRSPaV variánssal összehasonlítva végeztek filogenetikai vizsgálatokat (6. ábra). A BLASTN algoritmus segítségével kimutatták, hogy ez a vírusvariáns 92,3%-os nukleinsav szekvencia-azonosságot mutat az SG1 GRSPaV variánssal (GenBank: AY881626.1). Az SG1 variánst az indikátornövényként használt sziklai szőlőből (*Vitis rupestris*) izolálták (Meng és mtsai., 2005). Az izolált GRSPaV variáns hasonló, de nem volt azonos az SG1 variánssal (Coetzee és mtsai., 2010).

A dsRNS HTS használata a módszer jellegéből adódóan előnyökkel de bizonyos korlátokkal is jár. A hatékony vírusgenom dúsítás érdekében le kell mondanunk a teljes metagenom vizsgálatáról.

Összehasonlítva: a teljes RNS módszer a dsRNS módszerhez képest nagyobb lefedettséget biztosít, segítségével teljesebb vírusgenomot nyerhetünk vele. A teljes RNS szekvenciák mRNS-ekben gazdagabbak, egyenletesebb GC profillal rendelkeznek és változatosabbak, ezzel szemben a dsRNS szekvenálás olvasatai hasonló mennyiségben tartalmaznak kódoló és nem kódoló szakaszokat és szekvenciái sokkal kisebb változatossággal rendelkeznek (García és mtsai., 2020).

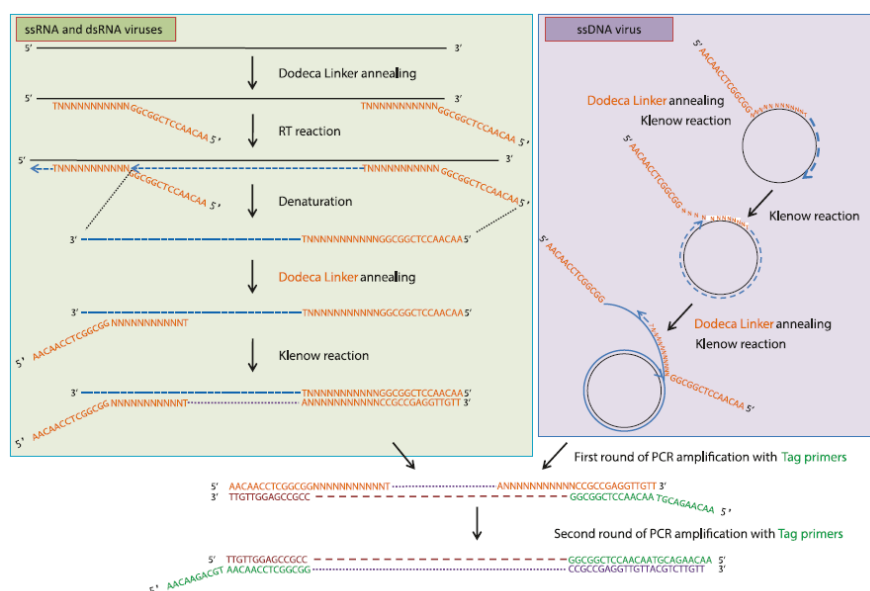
A dsRNS HTS egyik fő előnye, hogy kisebb számban jelenlévő vírusokat is hatékonyan tud detektálni, mivel a dsRNS olvasatok arányaiban 30-100-szor több vírus eredetű szekvenciát tartalmazhatnak, mint teljes RNS esetén. A teljes RNS HTS alkalmazásakor ezek a ritkább szekvenciák kevésbé jól detektálhatóak a nagymértékű felhígulás miatt (Bevue és mtsai., 2018).

A dsRNS HTS önmagában alkalmazva is igen hatékony vírusdiagnosztikai eszköz, de kombinálva a teljes RNS HTS-sel vagy más nukleinsavdúsítási megközelítéseken alapuló nagy áteresztőképességű módszerekkel még átfogóbb képet kaphatunk a növényt fertőző vírusokról.

2.8 VANA

A HTS módszerek növényi vírusdiagnosztikára széles körben alkalmazott alfaja a virion-kötött nukleinsav (virion-associated nucleic acids –VANA) megközelítés. A VANA módszer lényege, mint ahogy a neve is mutatja, hogy a vírusrészecskéket szűri ki. Ehhez a víruskapszid ellenállóképességét használja ki a virális nukleinsav dúsítására és tisztítására, és így lehetővé teszi mind az RNS, mind a DNS vírusok kimutatását.

A növényi mintákból kiindulva a vírusrészecskéket szűréssel és centrifugálással koncentrálnak, majd a kapsziddal nem borított nukleinsav darabokat DNáz és RNáz emésztéssel távolítják el (7. ábra) (François és mtsai, 2018).



7. ábra: A VANA módszer sematikus vázlata. Bal felső rész: A virális ssRNS vagy dsRNS random primer segítségével történő reverz transzkripciója (amit egy Klenow reakció követ) szekvenálásra kész cDNS-sé. Jobb felső rész: A virális DNS (PI.: cirkuláris ssDNS) random primerrel történő konvertálása szekvenálásra kész cDNS-sé, beleértve egy Klenow reakciót is (száletolósos amplifikáció). Alsó rész: A kétszálú DNS mindkét végét azonos multiplex azonosító primerrel látjuk el (François és mtsai, 2018).

A VANA módszer alkalmas új vírusok felfedezésére is. VANA segítségével írták le először lucernában (*Medicago sativa* L.) a *Marafivirus* nemzetségbe tartozó alfalfa vírus F-et (AVF), amely két elterjedt szőlővírusnak, a szőlő rupestris érgyengülés vírusnak (grapevine rupestris vein feathering virus – GRV-FV) és a szőlő Syrah vírus 1-nek (grapevine Syrah virus 1 – GSyV-1) is közeli rokona. Eddig ugyan nem

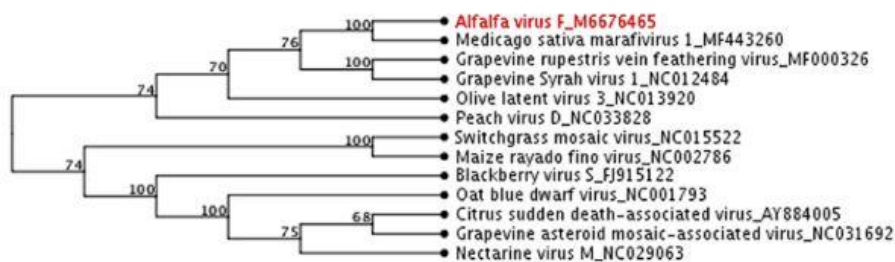
készült tanulmány VANA módszerrel kimutatott új szőlővírusokról, a fentiek szerint a módszer alkalmas lehet erre.

Az AVF felfedezése során dél-franciaországi lucernaültetvényekről véletlenszerűen gyűjtött mintákat vizsgáltak VANA módszerrel illetve teljes RNS kivonással, 5'/3' RACE módszerrel. Harminchárom lucerna mintát dolgoztak fel a VANA megközelítéssel, François és mtsai munkájának alapján (François és mtsai, 2018). A cDNS könyvtárat Illumina MiSeq platformon szekvenálták 2x300 bp hosszúságú páros végű olvasatokként. A bioinformatikai munkák során a szekvenciaolvasatok tisztítását és korrekcióját CutAdapt 1.9-es verziójú programmal (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>) hajtották végre, kontigokat pedig a SPAdes 3.6.2 szoftver segítségével *de novo* építettek (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>).

A kontigok közt marafivírusokra hasonlító teljes vírusszekvenciákat mutattak ki négy lucernamintában, köztük egy Prades-le-Lezből (Montpellier régió) és három növénymintában a Rhône-delta régióból. Érdekes módon, a három Rhône-delta régióból származó növény egyikét a Cirad laboratóriumában tartották fenn, és nem mutat olyan látható tüneteket, amelyek megkülönböztetnék az egészséges növényektől. Ezek a vírusszekvenciák, vagyis az AVF nukleinsav szekvenciái a többi marafivírussal kevesebb, mint 80% szekvenciaazonosságot mutatnak, így különálló vírusfajt képviselnek a *Marafivirus* nemzetség *Tymoviridae* családjában (8. ábra).

Az AVF teljes genomját, amelyet a VANA-alapú, Illumina MiSeq és 5'/3' RACE segítségével határoztak meg, felhasználták primerek tervezéséhez a vírusszekvenciák RT-PCR amplifikációjának megtervezéséhez, melynél templátnak a fertőzött növények teljes RNS mintáit használták, hogy igazolják a vírus jelenlétét és a nukleinsav-szekvencia pontosságát.

A PCR termékeket klónozták és szekvenálták, aminek eredményeképpen arra jutottak, hogy az amplifikált termékek szekvenciái megegyeztek a teljes RNS HTS eredményekkel, így nemcsak a vírus jelenlétét, hanem a bioinformatikai eredmények pontosságát is igazolták (Nemchinov és mtsai, 2018).



8. ábra: Nem gyökereztetett, Neighbor-joining módszerrel készített filogenetikai fa, mely tartalmazza az AVF teljes genomját, illetve 12 szintén *Marafivirus* nemzetségbe tartozó vírusgenomot. Az ábrán megfigyelhetjük az AVF testvércsoportjába tartozó GRV-FV és GSyV-1 jelenlétét (Nemchinov és mtsai, 2018).

A VANA módszer egyik nagy előnye, hogy egyaránt alkalmazható egy- és kétszálú RNS és DNS genomú vírusok kimutatására is. Másik előnye a hatékony nukleinsavdúsításban rejlik. Sok növény esetében (pl. trópusi gumós növények, banán, sós mocsári növényfajok) az összetett másodlagos metabolitok, a fenolvegyületek, a magas viszkozitású poliszacharidok és az endonukleázok megnehezítik az RNS/DNS tisztítást. Ezekben az esetekben a VANA módszer eredményesebb RNS, illetve DNS kinyerést biztosít (Filloux és mtsai., 2015). A módszernek azonban hátránya, hogy nem képes kimutatni azokat a vírusokat, amelyek nem rendelkeznek kapsziddal, vagy instabil víruspartikulumokat hoznak létre (Hily és mtsai, 2018).

Készült egy dsRNS és VANA módszert összehasonlító tanulmány is, mely a két megközelítést használja a vírusok sokféleségének leírására hat őshonos oklahomai növényfajban. A munka során vírus-taxonómiai egységeket (OTU-kat-operational taxonomic unit) írtak le. Összességében megállapítható, hogy bár mindkét módszer alkalmasnak bizonyult az OTU-k feltárására, a dsRNS megközelítés teljesebb, átfogóbb leírást adott az analizált növényi viromokról, a DNS-vírusok kivételével. A VANA módszer érdekessége, hogy kimutathatók vele olyan vírusok is (*Endornaviridae*), melyeknek nincs valódi kapszidjuk, helyett gazda eredetű vezikulumokat termelnek, amely burkolja az örökítőanyagukat, és fágok kimutatására is alkalmas (Ma és mtsai, 2019).

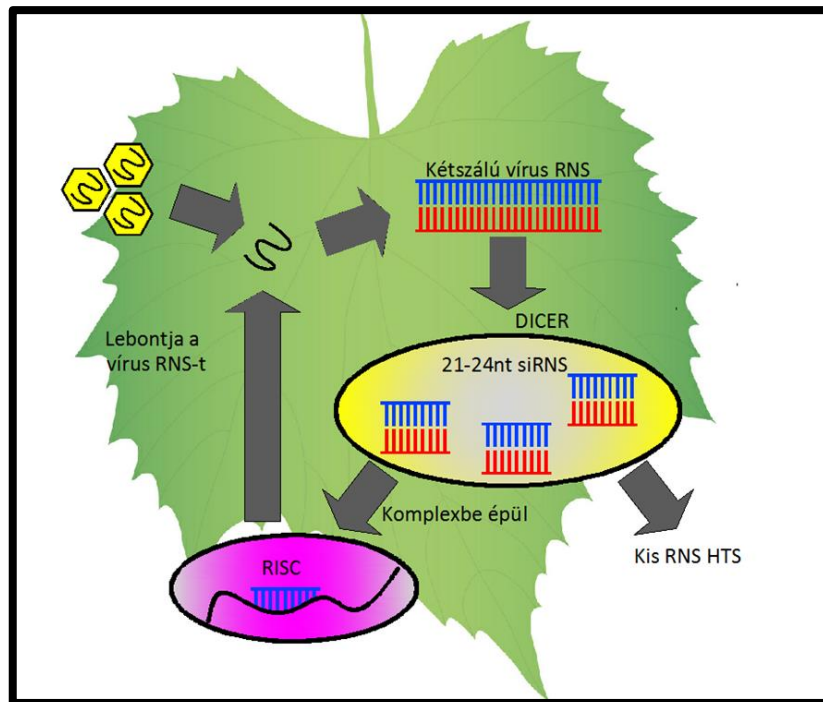
2.9 Kis RNS

Napjainkban a növényi vírusdiagnosztika egyik leggyakrabban alkalmazott módszere a kis RNS (small interfering RNA, siRNA) HTS.

A kis RNS-ek a növényi védekezőrendszer működésének következtében jönnek létre a gazdanövény fertőzött sejtjeinek citoplazmájában. A vírus eredetű duplaszálú RNS-eket a növényekben található RNáz aktivitással rendelkező enzim, a DICER komplex ismeri fel. Egyszálú RNS vírusoknál a kétszálú RNS forma replikáció során jöhet létre, DNS vírusok esetén pedig az egymással komplementer transzkriptumok kapcsolódnak össze kétszálú RNS-sé. A DICER enzim a kétszálú RNS molekulákat 21-24 nukleotid hosszúságú kis RNS-ekre (small interfering RNA – siRNS) hasítja. Az siRNS-ek egyik szála hasítást követően beépül az RNS indukálta géncsendesítési komplexbe (RNA induced silencing complex – RISC). A komplexben lévő kis RNS felismeri a vele komplementer szekvenciájú vírus RNS-t, amit a komplex elhasít, ezzel gátolva a vírus terjedését. Ezt a folyamatot RNS interferenciának vagy géncsendesítésnek nevezzük (Baulcombe, 2004).

A kis RNS szekvenciák méretéből következtethetünk a géncsendesítés folyamatának lezajlására. Növényekben 4 DICER (illetve DICER like, DCL) fehérje létezik, DCL1-4. A DCL3 a transzkripcionális géncsendesítésért felelős, általa 24 nt hosszú kis RNS-ek képződnek, poszttranszkripcionális géncsendesítésnél a DCL 2 és 4 lép működésbe, ezek 21-22 nt hosszú kis RNS-eket eredményeznek (Candresse és mtsai., 2014).

A géncsendesítés nemcsak az invazív patogének ellen működik, hanem fontos génműködést szabályozó funkciója is van. Így a növényben nemcsak a fertőző vírusokról keletkező kis RNS-ek, hanem a saját szabályozó molekulái is jelen vannak. A géncsendesítés következtében létrejött virális kis RNS-ek nagymértékben felhalmozódnak a sejtekben. A kis RNS-ek összetétele és mennyisége tükrözi a növény víruspopulációját és a vírus elleni védekezés aktivitását. A kis RNS-ek dúsítása és tisztítása jelentősen megnöveli az új vírusok felfedezésének esélyét azáltal, hogy csökkenti a szekvenciák komplexitását. A módszer képes felderíteni a vírusgenomok sokféleségét, populációszerkezetét és genetikai összetételét egyetlen növényben (9. ábra) (Zhang és mtsai., 2011).



9. ábra: Az RNS interferencia.

A kis RNS HTS segítségével egyaránt kimutatható RNS- és DNS vírus különféle családokból, különböző szövetekből. Segítségével alacsony számban jelenlévő vírusok tünetmentes növényekből is azonosíthatóak. Átfogó, specifikus és érzékeny vizsgálatot tesz lehetővé növényi vírusok detektálására (Kreuze és mtsai., 2009).

Közép-Görögországból származó, roditis levél elszíneződés (Roditis leaf discoloration, RLD) tünetet mutató, rovarmentes üvegházban, cserépben nevelt roditis szőlőt vizsgáltak kis RNS HTS-sel (10. ábra). A vizsgálatához egy üvegházban termesztett 20 tünetes, 6 tünetmentes és egy tünetes növényvel beoltott, de tünetmentes szőlőt vizsgáltak.



10. ábra: Roditis levél elszíneződés (Roditis leaf discoloration, RLD) tünetet mutató szőlőlevél (Maliogka és mtsai., 2015).

A kis RNS-eket szőlőlevélből vonták ki mirPremier microRNS izolációs kittel (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA). Az izolált kis RNS-ek minőségét NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA) segítségével ellenőrizték, mennyiségét pedig Qubit® 2.0 fluorométerrel (Invitrogen, Grand Island, USA) határozták meg. A szekvenálást Ion Torrent PGM platformon végezték.

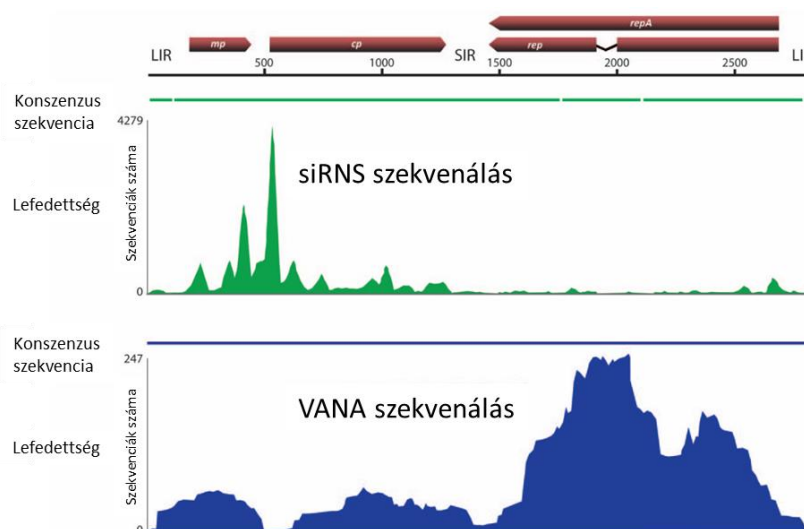
A kapott szekvenciák többségében 21 nt hosszúságúak voltak. A szekvenciák *de novo* összeszerelését a CLC Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Dánia) szoftver segítségével végezték. A kapott kontigokat az NCBI GenBank nukleotid- és fehérje adatbázisaira (Blastn, Blastx, Tblastx) illesztették, illetve a Geneious (Biomatters Ltd., Auckland, Új-Zéland) program segítségével folytonossági feltérképezéseket végeztek róluk.

A kontigok homológiát mutattak három szőlővírus (GVA, GVB és GLRaV-3) és két viroid (HSVd, GYSVd-1) genomszekvenciáival, ezen felül egy új, *Badnavirus* nemzetségbe tartozó DNS vírust is azonosítottak. Az új vírus nagy hasonlóságot mutatott a füge badnavírus 1-el (fig badnavirus 1, FBV-1, JF411989). Az új vírus a Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV) nevet kapta.

A GRLDaV 6988 nukleotid hosszú, cirkuláris DNS genomú vírus, mely négy leolvasási keretet kódol (ORF1-4). Az ORF1, ORF2 és ORF4 ismeretlen funkciójú fehérjéket kódol, míg az ORF3 egy olyan poliprotein génje, amelynek motívumai a vírus replikációjára, beágyazódására és mozgására szolgál. A vírus összefüggésbe hozható a RLD betegséggel.

A GRLDaV a szőlőben felfedezett DNS vírusok harmadik képviselője. Felfedezése felhívja a figyelmet a DNS szőlővírusok vizsgálatának fontosságára (Maliogka és mtsai., 2015).

A növényi vírusok vizsgálatára leggyakrabban használt módszerek a kis RNS és a dsRNS HTS-ek, melyekkel célzottan vizsgálhatóak a virális RNS-ek. A kis RNS HTS esetén a növényi vírussal szembeni védekezés következtében, a gazda enzimei segítségével keletkezett siRNS-eket, a dsRNS-nél pedig az aktív vírusreplikáció során képződött duplaszálú RNS-eket vizsgáljuk. Néhány vírussal szemben a gazdanövény csökkent védekezést mutat, ez megnehezíti a kis RNS HTS-sel történő kimutatást, néhány vírus pedig kevésbé aktívan replikálódik, nehezen kimutatható a dsRNS módszerrel (Ruiz-García és mtsai., 2019).



11. ábra: A sugarcane white streak virus (SWSV) genom lefedettsége. Felül az SWSV genomi szerveződése látható. Míg siRNS szekvenálás után relatív alacsony a lefedési fok (zöld), addig a VANA szekvenálás egyenletesen lefedi az SWSV genomot (kék) (Candresse és mtsai., 2014).

A sugarcane white streak vírust (SWSV) kis RNS és VANA alapú HTS-sel is vizsgálták. Megállapítható, hogy a vírust fedő VANA szekvenciák, bár nagyságrendekkel kevesebben voltak, mégis teljesen lefedték a vírusgenomot. A kis RNS szekvenciák nagy számban voltak jelen, főleg az aktívan átíródó régióknál, nem fedték le teljesen a vírusgenomot és a lefedettség több intergénikus régiónál megszakad (11. ábra) (Candresse és mtsai., 2014).

3 GVT

Munkám során, egy Magyarországon még le nem írt szőlővírus, a szőlő T vírus (grapevine virus T - GVT) jelenlétét vizsgáltam. A NAIK-MBK Diagnosztikai csoportja korábban kis RNS HTS-sel mérte fel a hazai ültetvények vírusfertőzöttségét. A GVT leírása később történt, mint a hazai termőültetvényekből készült kis RNS könyvtárak elemzése. A GVT környező országokban igen elterjedt vírus.

A GVT egy pozitív, egyszálú RNS-vírus. A GVT genomja 8701 nukleotid hosszú, és öt leolvasási keretet kódol. A GVT a *Foveavirus* nemzetség feltételezett tagja a *Betaflexiviridae* családban. A GVT-t egy már meglévő, olasz Terdolego ültetvény RNS szekvenciáinak újraelemzésével írták le (Jo és mtsai., 2017).

NAIK-MBK Diagnosztikai csoportja (ma: Molekuláris Növénykórtan Csoport) vírusdiagnosztikai felmérést végzett magyarországi termő szőlőültetvényeken, amely keretében 9 borvidék 14 szőlőültetvényéről 18 különböző fajtát vizsgáltak. Ültetvényenként 1–10 véletlenszerűen kiválasztott tőke hajtásából vettek mintát. Az RNS-t különféle szervekből, rügyekből, fiatal- és idős levelekből CTAB módszerrel vonták ki. A mintákból fajta szerint 18 kis RNS könyvtárat készítettek és szekvenálták HiScanSQ, UD Genomed platformon (Debrecen, Magyarország) (Czotter és mtsai., 2018).

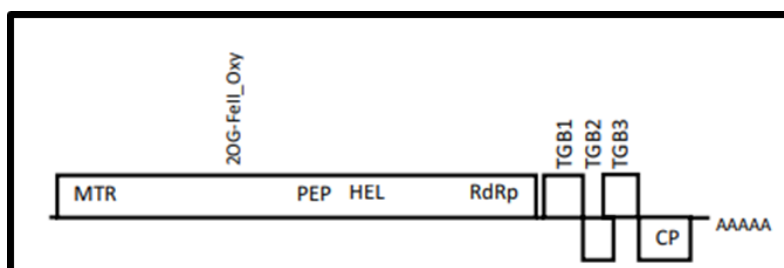
A csoport rendelkezésemre bocsájtotta ezen szekvenciákat, melyek újraelemzésével vizsgáltam a GVT jelenlétét hazánkban.

3.1 Anyagok és módszerek

A 18 hazai szőlőültetvényről származó kis RNS könyvtárat CLC Genomics Workbench programmal elemeztem. A szekvenciákat trimmeltem, vagyis eltávolítottam a könyvtár készítés során a kis RNS-ekhez ligált adaptereket a végekről. A szekvenálás során kapott és trimmelt szekvenciákat statisztikailag elemeztem. A trimmelt szekvenciákból kontigokat építettem. A kontigokat BLAST algoritmussal illesztettem az NCBI adatbázisban fellelhető vírusszekvenciákhoz, illetve a trimmelt szekvenciákat közvetlenül is illesztettem a GVT

referenciagenomra. A kapott eredmények a GVT jelenlétét mutatták egyes szőlőültetvényeken.

A kis RNS szekvenálás bioinformatikai elemzésének eredményét laboratóriumi módszerekkel is igazolni akartam, ezért vírus specifikus primereket terveztem, a vírus jelenlétének RT-PCR-rel való vizsgálatához. A kis RNS olvasatok és az adatbankban hozzáférhető GVT szekvenciák alapján terveztem meg a primereket. A primerek alkalmazására a PCR reakció során használt optimális anellációs hőmérsékletet gradiens PCR-rel állapítottam meg.



12. ábra: A GVT genomszerkezetének sematikus ábrázolása. A téglalapok az egyes leolvasási kereteket (open reading frame-ORF) jelölik. A feltételezett azonosított vírus replikázban (ORF1) enzimatis motívumok találhatók: MT vírus metil-transzferáz, 2OG-FeII-oxi-2-oxoglutarát és Fe (II) függő oxigénáz, PEP peptidáz, HEL szupercsalád 1 vírus RNS-helikáz, RdRp RNS függő RNS-polimeráz. Az ORF2-4 képviseli a TGB fehérjéket (hármás gén blokk), az ORF5 a CP-t (coat protein-köpenyfehérje) kódolja (Glasa és mtsai., 2018).

A GVT kimutatására az irodalomban leírt (Glasa és mtsai., 2018) indítószekvenciákat összevetettem az NCBI-ban található GVT referencia genommal (NC_035203.1) és a saját könyvtáram GVT szekvenciáival (12. ábra, 3.táblázat). Mivel az egyezés nem volt teljes, a leírt primereket a saját szekvenciáimra optimalizáltam. A tervezett primerek a GVT köpenyfehérjét és a 3' nem transzlálódó régiót tartalmazó, 905 bázispár hosszúságú fragmentum amplifikálására alkalmasak.

Vírus	Primer neve	Primer szekvencia (5'-3')	Helye a referenciagenomban	Funkciója az amplifikált régióban	A referenciaként használt genom	Amplifikált régió hossza (bp)
GVT	GVT_7630F	GTGTGGTCCTCGTTAGGTGC	7630-7649	coat protein-3'UTR	NC_035203	905
	GVT_8534R	CGGCAAGAGTTCCAAC TAGC	8534-8515			

3. táblázat: A tervezett GVT_7630F és GVT_8534R primerek jellemzői.

Mivel a GVT pozitív szálú RNS vírus, annak érdekében, hogy a vírusszekvenciákat PCR-rel tudjam amplifikálni, először cDNS-t kellett készítenem

az egyszálú RNS-t tartalmazó növényi RNS kivonatokból a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) használatával. A tisztított RNS mintákból koncentrációjuktól függően, egységesen 500 ng-ot használtam, amit nagy tisztaságú, steril milliQ vízzel (mQ) 2,75 µl-re egészítettem ki, majd 0,25 µl random primert (10 µM) mértem hozzájuk. Denaturáltam az RNS-eket 65°C-on 5 percig, majd legalább 5 percig jégre helyeztem őket. A reverz transzkripcióhoz az így denaturált mintákhoz az alábbi reakció keveréket mértem:

- 1 µl 5x-ös reakciópuffer
- 0,25 µl Ribolock RNáz inhibitor fehérje
- 0,5 µl 10 mM dNTP mix
- 0,25 µl RevertAid reverz transzkriptáz enzim

A mintáimat termosztátba helyeztem a következő protokoll szerint:

- 25°C, 5 perc
- 42°C, 1 óra
- 45°C, 15 perc
- 70°C, 5 perc

A kapott cDNS-eket tízszeresre hígítva a továbbiakban PCR reakciókban templátként használtam. A cDNS-ek minőségi ellenőrzésére aktin-tesztet használtam. Az aktin gén állandóan aktív a legtöbb sejtben, tehát folyamatosan, nagy számban jelen van az aktin mRNS-e. Amennyiben sikeres a reverz transzkripció, nemcsak a vizsgálni kívánt vírus RNS-ről, hanem a növényi mRNS-ek mindegyikéről, így az aktin mRNS-ről is szintetizálódnak cDNS szálak. A minőségellenőrzés során aktin specifikus primerekkel mértem össze a PCR reakcióelegyet és a reakciót a következő protokoll szerint hajtottam végre:

- 0,5 µl 10x RT, cDNS templát
- 0,75 µl 10 µM vv (*Vitis vinifera*) actin 601s (forward) primer
- 0,75 µl 10 µM vv actin 1200as (reverz) primer
- 3 µl 5x Phire II. puffer
- 9,4 µl mQ víz
- 0,3 µl 10 mM dNTP mix
- 0,3 µl Phire II Hot start DNS polimeráz enzim

- 98°C, 30 másodperc

 - 98°C, 10 másodperc
 - 55°C, 10 másodperc
 - 72°C, 20 másodperc

 - 72°C, 1 perc
- 35x

A PCR reakció sikerességét a reakcióelegy 1,2%-os agaróz gélelektroforézissel történő elválasztásával vizsgáltam.

Miután optimalizáltam a GVT kimutatásához tervezett primerek használatához optimális anellációs hőmérsékletet és a cDNS-ek is megfelelő minőségűnek bizonyultak, elvégeztem a segítségükkel a vírusspecifikus PCR-t a következő protokoll szerint:

- 0,8 µl 10x RT, cDNS templát
- 1,25 µl 10 µM GVT7630F primer
- 1,25 µl 10 µM GVT8534R primer
- 5 µl 5x Q5 puffer
- 15,95 µl mQ
- 0,5 µl 10 mM dNTP mix
- 0,25 µl Q5 Hot start DNS polimeráz enzim

- 98°C, 30 másodperc

 - 98°C, 10 másodperc
 - 65°C, 30 másodperc
 - 72°C, 1 perc

 - 72°C, 2 perc
- 40x

A PCR reakció sikerességét a reakcióelegy 1,2%-os agaróz gélen történő elválasztásával ellenőriztem.

Az általam tervezett primerek által a GVT-ből amplifikált szakasz 905 bázispár hosszú, így a PCR reakció során ekkora termékek keletkezését vártam. Az EtBr-ot tartalmazó gélben UV fény segítségével láthatóvá tett PCR termékeket kivágtam a gélből, majd GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Scientific) segítségével tisztítottam, az előírt protokoll szerint. A tisztítás sikerességét szintén 1,2% agaróz gélelektroforézissel teszteltem.

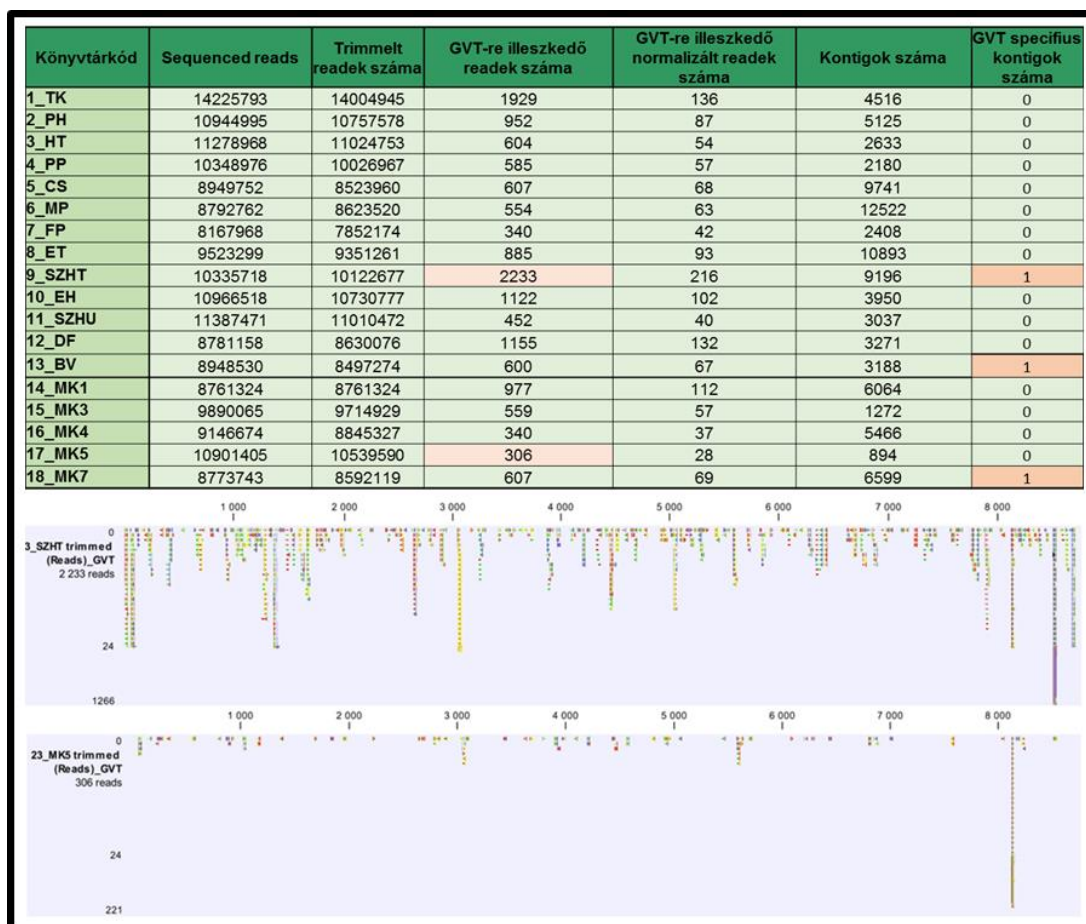
A tisztított PCR termékek nukleinsav sorrendjét a BIOMI KFT. határozta meg hagyományos Sanger szekvenálással. A kapott eredményeket bioinformatikai módszerekkel elemeztem. A szekvenciákat a GVT referenciagenommal és más eddig leírt GVT vírusszekvenciákkal hasonlítottam össze, majd rokonságuk megállapítására filogenetikai összehasonlítást végeztem. A filogenetikai elemzéshez a meglévő hazai szekvenciák mellé a GenBank adatbázisából töltöttem le különböző országokban leírt GVT szekvenciákat, illetve GVT és GRSPaV referenciagenomot. A Clustal Omega program segítségével összerendeztem, majd egyenlő méretre vágtam a szekvenciákat. A MEGA7 program segítségével, Neighbor-Joining módszerrel filogenetikai fát készítettem.

3.2 Eredmények

Ültetvény				
Könyvtárkód	Borvidék	Ültetvény helye	Fajta	Ültetvény kora években
1_TK	Sopron	Sopron	Kékfrankos - Blaufränkisch, Lemberger	20
2_PH	Pannonhalma	Pannonhalma	Olasz rizling - Welschriesling	7
3_HT	Neszmély	Neszmély	Chardonnay	14
4_PP	Villány	Villány	Cabernet Sauvignon	16
5_CS	Balatonboglár	Balatonboglár	Csabagyöngye - Pearl of Csaba	n
6_MP	Szekszárd	Szekszárd	Merlot	6
7_FP	Kunság		Generosa (új fajta)	4
8_ET	Eger	Eger	Kadarka (vírus tesztelt szaporítóanyag)	13
9_SZHT	Tokaj	Szegilong	Furmint	n
10_EH		Erdőbénye	Furmint, idős	100
11_SZHU		Szegilong	Furmint, fiatal	1
12_DF		Erdőbénye	Furmint, idős	100
13_BV		Bodrogkisfalud	Vírusokra sosem tesztelt régi magyar fajták: 1:Purcsin, 2:Balafánt,3:Sárga Ortlieb, 4:Kék Bakator, 5:Fehér Járdovány	6
14_MK1		Mád	Furmint T85	A gyűjtemény gyakran, csak vizuális módszerekkel vizsgált alanyokból áll
15_MK3			Hárslevelű K3	
16_MK4			Sárgamuskotály	
17_MK5			Teleki-Kober 125	
18_MK7			Teleki-Kober 5C	

4. táblázat: Hazai ültetvényeket reprezentáló 18 kis RNS könyvtár származási helye és kora.

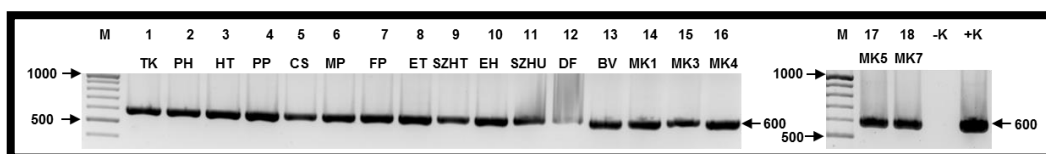
A CLC Genomics Workbench programmal elemeztem a 18 hazai szőlőültetvényről származó kis RNS könyvtárakat (4. táblázat). Először a kis RNS olvasatokat, vagyis readeket trimmeltem, azaz eltávolítottam az adaptereket a végeikről. A trimmelt readek száma 7-14 millió közé esett. Az NCBI adatbázisában fellelhető GVT referenciagenomra illesztettem a trimmelt readeket, majd a CLC program segítségével lefedettségi ábrát hoztam létre, amelyen vizuálisan is ellenőrizhettem az illesztések pontosságát és helyzetét. Szemléltetésként a 13. ábrán a legtöbb, illetve legkevesebb GVT-re illeszkedő read-del rendelkező könyvtár lefedettségi ábráit mutatom be. Megfigyelhetjük, hogy az SZHT könyvtár olvasatai a GVT referencia genomot közel teljes hosszában lefedik, míg az MK5 read-jei csak szórványosan mutatnak illeszkedést (13. ábra alsó része). A trimmelt szekvenciákból a továbbiakban kontigokat építettem.



13. ábra: Összefoglaló táblázat a kis RNS könyvtárak read- és épített kontig számai alapján, valamint az SZHT és az MK5 könyvtárak a GVT-re illeszkedő olvasatainak lefedettségi ábrái.

A kontigokat BLAST algoritmussal illesztettem az NCBI adatbázisban fellelhető vírus referencia szekvenciáihoz és egy víruslistát generáltam. A listából leolvasható volt, hogy melyik vírusra mennyi kis RNS szekvenciából generált kontig illeszkedett (13. ábra felső része). A listából kiválasztottam a GVT-re illeszkedő, 10^{-5} -nél kisebb E-értékkel rendelkező, szignifikáns találatokat.

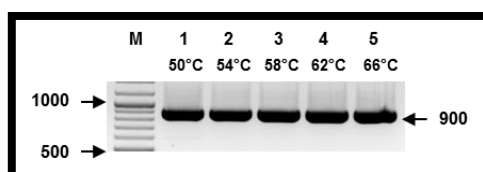
A cDNS-ek minőségének ellenőrzése során aktin specifikus primerekkel mértem össze a PCR reakcióelegyet. A PCR termékeket EtBr tartalmú, 1,2%-os agaróz gélen választottam el (14. ábra).



14. ábra: Az aktin teszt során keletkezett specifikus PCR termékek gélképe. M: GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Scientific), -K: negatív kontroll, +K: pozitív kontroll. Az ábrán feltüntetett értékek bázispárban értendők.

A reverz transzkripció megfelelő volt, mindegyik mintában keletkezett 600 bázispár magasságban termék.

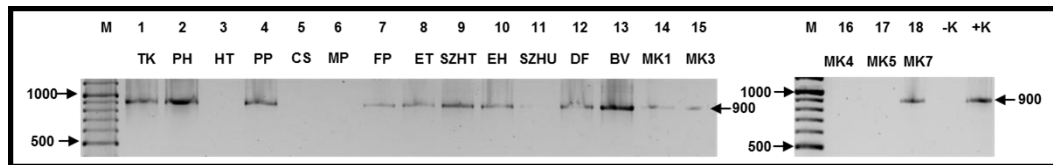
A vírus-specifikus RT-PCR előtt gradiens PCR segítségével állapítottam meg a tervezett primerekkel való reakció anellálási hőmérsékletének optimumát (15. ábra). Az amplifikációt különböző hőmérsékleten 50, 54, 58, 62 illetve 66°C-on történő anellációval teszteltem. A termékeket EtBr tartalmú, 1,2%-os agaróz gélen választottam el.



15. ábra: A gradiens PCR során keletkezett termékek gélképe. M: GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Scientific). A feltüntetett értékek mértékegysége bázispárban értendő.

A tervezett primerek alapján kb. 900 bázispáros terméket vártam és a PCR után valóban ebben a mérettartományban kaptam terméket. Az anelláció mindegyik tesztelt hőfokon megfelelően zajlott, ezért egy közbülső értéket, a 62°C-ot választottam a későbbi reakciók anellálási hőmérsékletének.

A cDNS-ek minőségi ellenőrzése és a primerek optimális anellációs hőmérsékletének megállapítása után elvégeztem a GVT-re specifikus RT-PCR-t.



16. ábra: A GVT specifikus RT-PCR gélképe. Pozitív jelet adott 12 minta: 1_TK, 2_PH, 4_PP, 7_FP, 8_ET, 9_SZHT, 10_EH, 12_DF, 13_BV, 14_MK1, 15_MK3, 18_MK7. M: GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Scientific). -K: negatív kontroll, +K: GVT fertőzött szőlőből származó pozitív kontroll. A feltüntetett értékek bázispárban értendők.

Az általam tervezett primerek által a GVT-ből amplifikált szakasz 905 bázispár hosszú, így a PCR reakció során ekkora termékek keletkezését vártam (16. ábra).

Az EtBr-ot tartalmazó gélben UV fény segítségével láthatóvá tett 12 db jelet adó PCR terméket kivágtam a gélből, majd GeneJET Gel Extraction kit segítségével tisztítottam, amelyek bázissorrendjét a hagyományos Sanger szekvenálással meghatároztattam.

A Sanger szekvenálással kapott vírusrészleteket az NCBI BLASTN algoritmusával összehasonlítottam a GVT referenciagenom azon részével, ami megfeleltethető a tervezett primerek által közrefogott szekvenciának.

Könyvtárkód	GVT szekvencia neve	%-os azonosság a GVT referencia genomhoz képest
1_TK	1_TK_GVT	80
2_PH	2_PH_GVT	84
3_HT		
4_PP	4_PP_GVT	81
5_CS		
6_MP		
7_FP	7_FP_GVT	87
8_ET	8_ET_GVT	83
9_SZHT	9_SZHT_GVT	84
10_EH	10_EH_GVT	80
11_SZHU		
12_DF	12_DF_GVT	79
13_BV	13_BV_GVT	87
14_MK1	14_MK1_GVT	81
15_MK3	15_MK3_GVT	82
16_MK4		
17_MK5		
18_MK7	18_MK7_GVT	88

5. táblázat: A szekvenciák százalékos azonosságának összehasonlítása a GVT referenciagenommal.

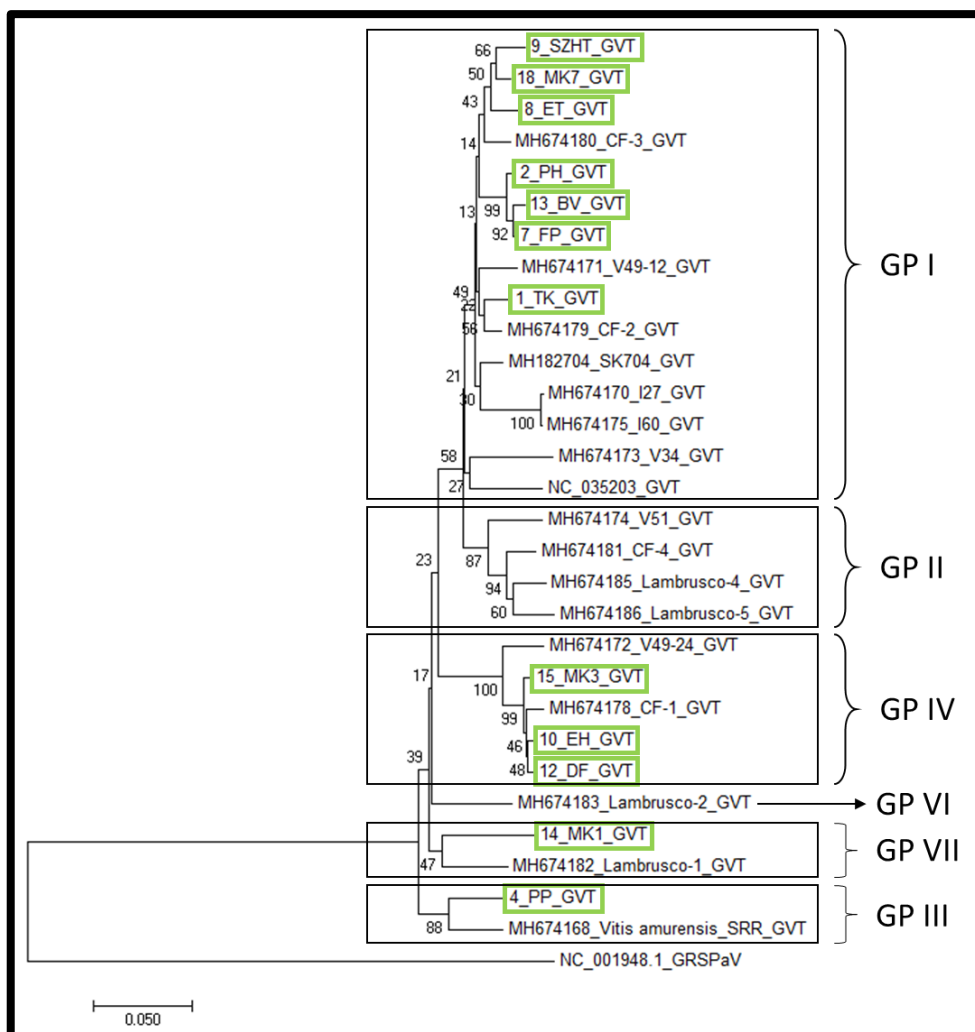
A bioinformatikai elemzés tapasztalatunk szerint akkor jelzi egy vírus jelenlétét, ha találunk vírus specifikus kontigot, illetve, ha a normalizált redundáns readok száma nagyobb, mint 200. A vírus specifikus kontig találat három kis RNS könyvtár: SZHT, BV, MK7 esetében utalt GVT fertőzésre. A GVT-re illeszkedő kis RNS-ek normalizált readjai sem jelezték más könyvtárakban a jelenlétét. Ezekben a könyvtárakban RT-PCR-rel vissza tudtuk igazolni a vírus jelenlétét, de az RT-PCR még kilenc másik könyvtárban: TK, PH, PP, FP, ET, EH, DF, MK1, MK3 is kimutatta GVT jelenlétét (5. táblázat). Ezen jelenség megegyezik azzal a tapasztalattal, amit a GVT közeli rokonának, a szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus (grapevine rupestris stem pitting-associated virus - GRSPaV) esetében korábbi vizsgálataink során találtunk. A GRSPaV az egyik legelterjedtebb szőlővírus, viszont a vírus és a gazdanövény koevolúciója során kialakult együttélés bizonyos mértékben előnyös a gazda számára, mivel a stressz gének enyhén csökkent szabályozását eredményezte (Gambino és mtsai, 2012). Ezen előnyök miatt lehetséges, hogy ennek a koevolúciónak következtében a vírus és a gazdaszervezet védelmi reakciója olyan egyensúlyt ért el, ami miatt a

GRSPaV elleni silencing mértéke, vagyis a vírus specifikus kis RNS-ek száma csökkent (Czotter és mtsai., 2018).

A vírus variánsok filogenetikai elemzéséhez a meglévő hazai szekvenciák mellé az NCBI GenBank adatbázisából töltöttem le különböző országokban leírt GVT szekvenciákat (4. táblázat), illetve a GVT és a GRSPaV referencia genomot. A Clustal Omega program segítségével összerendeztem, majd egyenlő méretre vágtam a szekvenciákat. A MEGA7 program segítségével, Neighbor-Joining módszerrel filogenetikai fát generáltam. A fa méretarányban van rajzolva, és az ágak hossza azonos egységekben van, mint a filogenetikai fa következtetésére használt evolúciós távolságoké.

A közeli rokonokat csoportokba soroltam Zarghani cikke alapján (Zarghani és mtsai., 2018). A rendszer szerint, a hazai szőlőültetvényeken jelen lévő GVT variánsok az első (GP I.): TK, ET, SZHT, PH, BV, FP, MK7; a harmadik (GP III.): PP; a negyedik (GP IV.): EH, DF, MK3; a hetedik csoportba MK1 sorolható.

Elmondható, hogy a hazai GVT variánsok nem alkotnak külön csoportot, lokálisan különböző helyzetű ültetvények vírusaival mutatnak közeli rokonságot (17. ábra).



17. ábra: Neighbor-Joining módszerrel rajzolt filogenetikai fa a különböző GVT szekvenciákról, gyökereztetve a GRSPaV referenciagenommal

Kísérleteim eredményeképpen először azonosítottam a GVT jelenlétét Magyarországon. Annak megállapítására, hogy a vírus a magyar szőlőfajtákban okoz-e tünetet, további vizsgálatok szükségesek.

4 Konklúzió

A HTS módszereknek hatalmas lehetőségei vannak a növényi vírusdiagnosztika területén, segítségükkel újabb és újabb vírusok azonosíthatóak, lépésenként egyre közelebb kerülünk a növényvilág teljes víruspopulációjának felderítéséhez.

Fontos gazdasági- és kultúrnövényünk, a szőlő vírusainak felderítésével számos kutatócsoport foglalkozik. Egyre bővülő információink segítségével tanulmányozhatjuk a különböző tünetek megjelenésében szerepet játszó vírusokat, a vírusok evolúciós kapcsolatait, változásait, a fertőzések dinamikáját.

Nincs használatban lévő protokoll arra, hogy melyik HTS módszert érdemes használni a szőlő vírusainak felderítésére, mindegyik módszernek megvan a maga előnye és hátránya. A dolgozat bemutatja a módszereket előnyeikkel és hátrányaikkal, de nem célja kiválasztani a legalkalmasabb megközelítést.

A teljes nukleinsav HTS módszerek nagy lefedettséget ígérnek és a vírusok magas reprezentáltságát, de használata során problémák adódnak a kis számban jelen lévő vírusok kimutatásával. Teljes RNS módszerrel egyaránt kimutatható DNS és RNS vírus is, teljes DNS megközelítéssel csak DNS.

A dsRNS és kis RNS HTS módszerek vírusokra specifikusabb szekvenciákat eredményeznek, de alacsonyabb lefedettséggel, mint a TNA. A dsRNS módszerrel csak az RNS vírusok mutathatók ki, kis RNS módszerrel DNS és RNS is.

A VANA módszer kevesebb vírusolvasatot hoz létre, de nagyobb lefedettséggel, illetve a nehezen tisztítható mintáknál jelent előnyt a használata, DNS és RNS vírusok kimutatására használható.

A vizsgálatok pontosságának növelése érdekében számos tanulmányban párhuzamosan használnak két HTS módszert is.

Munkám során Magyarországon elsőként kimutattam a GVT jelenlétét kis RNS HTS használatával. A szekvenciák bioinformatikai analízise 3 szignifikáns találatot mutatott. A vizsgálat RT-PCR-rel történő validálásakor azonban 12 minta lett pozitív GVT-re. Ezen ellentét feltehetően abból adódik, hogy a GVT, közeli

rokonához, a GRSPaV-hoz hasonlóan nem vált ki a növényből erősebb védekezési folyamatokat, kevesebb kis RNS képződik róla, így nehezebben detektálható ezzel a módszerrel.

Annak megállapítására, hogy a GVT a hazai ültetvényeken okoz-e tünetet, további vizsgálatok szükségesek.

Összefoglalás

A nemesített növényeket, így a szőlőt is, a fajtajelleg fenntartásának céljából vegetatívan szaporítjuk. A fertőzések elkerülése érdekében fontos a szaporítóanyag vírusmentessége. A telepítésre szánt szaporítóanyagok vírusdiagnosztikájára használhatunk nagy áteresztőképességű szekvenálási módszereket (high throughput sequencing – HTS) is. A HTS segítségével nemcsak az eddig ismert vírusokat tudjuk detektálni, hanem azokat is, amelyek genomjáról nem rendelkezünk szekvencia információval.

A HTS módszerek különböző alfajtaikat használhatjuk növényi vírusdiagnosztikára. Ezen módszerek közt a legnagyobb különbség az, hogy milyen nukleinsavat használnak a szekvenálás alapjául, így a mintaelőkészítés módja alapvetően eltér. A választott szekvenálási megközelítéstől függően különféle nukleinsavkivonatok használhatók a szekvenálásra alkalmas DNS-ek, vagyis a könyvtár készítéséhez. A növényi vírusok kimutatására a duplaszálú RNS, a kis RNS és teljes RNS módszert használják a leggyakrabban. A VANA megközelítés, mely esetben a tisztított virionokból vonják ki az RNS-t, szintén alkalmas növényi vírusok jelenlétének feltérképezésére. A teljes DNS módszerrel a DNS örökítőanyagú vírusok vizsgálhatók.

Kutatásom során, egy Magyarországon még le nem írt szőlővírus, a Grapevine virus T (GVT) jelenlétét vizsgáltam. A NAIK-MBK Diagnosztikai csoportja korábban kis RNS HTS-sel mérte fel a hazai ültetvények vírusfertőzöttségét. A GVT leírása később történt, mint a hazai termőültetvényekből készült kis RNS könyvtárak elemzése és a környező országokban igen elterjedt vírus.

Első lépésként bioinformatikai módszerekkel vizsgáltam a GVT előfordulását a rendelkezésemre álló könyvtárakban. A GVT jelenlétét vírusspecifikus RT-PCR-rel ellenőriztem, amihez a könyvtárakból származó GVT szekvenciák alapján primereket terveztem. A PCR termékek szekvenciáit az eddig ismert GVT genomokkal összehasonlítva filogenetikai elemzést végeztem. Kísérleteim eredményeképpen először azonosítottam a GVT jelenlétét Magyarországon. Annak megállapítására, hogy a vírus a magyar szőlőfajtákban okoz-e tünetet, további vizsgálatok szükségesek.

Summary

Cultivated plants, such as grapevine, are propagated vegetatively to preserve desirable characteristics. To avoid infections, it is important to use virus free reproductive material. Detection of viruses in the reproductive material intended for planting may be done by applying high throughput sequencing (HTS) methods. HTS is suitable for finding known viruses as well as describing novel ones without existing sequence information.

There are several HTS methods suitable for virus diagnostics. The main difference between them lies in the type of nucleic acid used as the basis of sequencing, which greatly affects sample preparation. The creation of the DNA library used for sequencing depends on the chosen method. The main nucleic acid types used in detecting plant viruses are double strand RNA, small RNA and total RNA content. VANA, which uses RNA extracted from virions, is also suitable for mapping plant viruses. Complete DNS extraction methods are used to detect DNA viruses.

During my research, I examined the presence of Grapevine virus T (GVT), a grapevine virus which has not been described in Hungary before. The Diagnostics Research Group in the institution NAIK-MBK has previously used small RNA HTS to assess the viruses present in Hungarian grapevine plantations. The first report of GVT took place after the analysis of the acquired libraries, and the novel virus has been found greatly abundant in neighbouring countries.

As a first step, I applied bioinformatic methods to detect GVT in our existing libraries. I verified the results using RT-PCR, for which I constructed primers based on the sequences acquired from our samples. Using the sequences from the PCR results and the known GVT genomes from previous projects, I carried out a phylogenetics analysis. As the result of my studies, I have successfully verified the presence of GVT in Hungary, for the first time. To find symptoms related to GVT infection in the plants, further research is required.

Hivatkozások

- Bernardo, P., Charles-Dominique, T., Barakat, M., Ortet, P., Fernandez, E., Filloux, D., ... Roumagnac, P. (2018). Geometagenomics illuminates the impact of agriculture on the distribution and prevalence of plant viruses at the ecosystem scale. *ISME Journal*, 12(1), 173–184. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.155>
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., & Rowhani, A. (2009). Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, 387(2), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.028>
- Jo, Y., Choi, H., Kyong Cho, J., Yoon, J. Y., Choi, S. K., & Kyong Cho, W. (2015). In silico approach to reveal viral populations in grapevine cultivar Tannat using transcriptome data. *Scientific Reports*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep15841>
- Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H., & Candresse, T. (2014). Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research*, 188, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.029>
- Chalupowicz, L., Dombrovsky, A., Gaba, V., Luria, N., Reuven, M., Beerman, A., ... Manulis-Sasson, S. (2019). Diagnosis of plant diseases using the Nanopore sequencing platform. *Plant Pathology*, 68(2), 229–238. <https://doi.org/10.1111/ppa.12957>
- Zhang, Y., Singh, K., Kaur, R., & Qiu, W. (2011). Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. *Phytopathology*, 101(9), 1081–1090. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-11-0034>
- Jo, Y., Song, M. K., Choi, H., Park, J. S., Lee, J. W., Lian, S., ... Cho, W. K. (2017). Genome sequence of grapevine virus T, a novel foveavirus infecting grapevine. *Genome Announcements*, 5(37), 2–3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00995-17>
- Read, D. A., & Pietersen, G. (2019). Analysis of Genotype Composition of Citrus tristeza virus Populations Using Illumina Miseq Technology. In *Citrus Tristeza Virus: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 2015, pp. 179–194). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-5_13, Rosario, K., Nilsson, C., Lim, Y. W., Ruan, Y., & Breitbart, M. (2009). Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environmental Microbiology*, 11(11), 2806–2820. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01964.x>
- Coetzee, B., Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J. G., & Burger, J. T. (2010). Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, 400(2), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.023>

- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), 356–363.
<https://doi.org/10.1038/nature02874>
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186, 20–31.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>
- Vončina, D., & Almeida, R. P. P. (2018). Screening of some Croatian autochthonous grapevine varieties reveals a multitude of viruses, including novel ones. *Archives of Virology*, 163(8), 2239–2243. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3850-6>
- Hily, J.-M., Poulicard, N., Candresse, T., Vigne, E., Beuve, M., Renault, L., ... Lemaire, O. (2020). Datamining, Genetic Diversity Analyses, and Phylogeographic Reconstructions Redefine the Worldwide Evolutionary History of Grapevine Pinot gris virus and Grapevine berry inner necrosis virus. *Phytobiomes Journal*, PBIOMES-10-19-0. <https://doi.org/10.1094/pbiomes-10-19-0061-r>
- Blouin, A. G., Ross, H. A., Hobson-Peters, J., O'Brien, C. A., Warren, B., & MacDiarmid, R. (2016). A new virus discovered by immunocapture of double-stranded RNA, a rapid method for virus enrichment in metagenomic studies. *Molecular Ecology Resources*, 16(5), 1255–1263. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12525>
- Ana Belén Ruiz-García, Rachelle Bester, Antonio Olmos, H. J. M. (2019). Bioinformatic Tools and Genome Analysis of Citrus tristeza virus. In *Citrus Tristeza Virus: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 163–178).
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-5_12
- François, S., Filloux, D., Fernandez, E., Ogliastro, M., & Roumagnac, P. (2018). Viral Metagenomics Approaches for High-Resolution Screening of Multiplexed Arthropod and Plant Viral Communities. In *Viral Metagenomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1746, pp. 77–95).
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_7
- Czotter, N., Molnar, J., Szabó, E., Demian, E., Kontra, L., Baksa, I., ... Varallyay, E. (2018). NGS of virus-derived small RNAs as a diagnostic method used to determine viromes of Hungarian Vineyards. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00122>
- Nemchinov, L. G., François, S., Roumagnac, P., Ogliastro, M., Hammond, R. W., Molloy, D. S., & Filloux, D. (2018). Characterization of alfalfa virus F, a new member of the genus Marafivirus. *PLoS ONE*, 13(9), 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203477>
- Wylie, S. J., Li, H., & Jones, M. G. K. (2013). Donkey orchid symptomless virus: A viral “Platypus” from Australian terrestrial orchids. *PLoS ONE*, 8(11), 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079587>
- Mardis, E. R. (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature Protocols*, 12(2), 213–218. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.182>

- Glasi, M., Predajna, L., Sihelská, N., Šoltys, K., Ruiz-García, A. B., Olmos, A., ... Sabanadzovic, S. (2018). Grapevine virus T is relatively widespread in Slovakia and Czech Republic and genetically diverse. *Virus Genes*, 54(5), 737–741. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1587-7>
- Zherdev, A. V., Vinogradova, S. V., Byzova, N. A., Porotikova, E. V., Kamionskaya, A. M., & Dzantiev, B. B. (2018). Methods for the diagnosis of grapevine viral infections: A review. *Agriculture (Switzerland)*, 8(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/agriculture8120195>
- Lefevre, P., Martin, D. P., Elena, S. F., Shepherd, D. N., Roumagnac, P., & Varsani, A. (2019). Evolution and ecology of plant viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(10), 632–644. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0232-3>
- Maliogka, V. I., Olmos, A., Pappi, P. G., Lotos, L., Efthimiou, K., Grammatikaki, G., ... Avgelis, A. D. (2015). A novel grapevine badnavirus is associated with the Roditis leaf discoloration disease. *Virus Research*, 203, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.003>
- García, Y. G., Montoya, M. M., & Gutiérrez, P. A. (2020). Detection of RNA viruses in Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) by RNAseq using total RNA and dsRNA inputs . *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 0(0), 1–19. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1748368>
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La, P., ... Saldarelli, P. (2012). A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in *Cv Pinot gris*. 163, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.010>
- Candresse, T., Filloux, D., Muhire, B., Julian, C., Galzi, S., Fort, G., ... Roumagnac, P. (2014). Appearances can be deceptive: Revealing a hidden viral infection with deep sequencing in a plant quarantine context. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102945>
- Massart, S., Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnikar, M., ... Wetzel, T. (2017). A framework for the evaluation of biosecurity, commercial, regulatory, and scientific impacts of plant viruses and viroids identified by NGS technologies. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00045>
- Beuve, M., Hily, J. M., Alliaume, A., Reinbold, C., Le Maguet, J., Candresse, T., ... Lemaire, O. (2018). A complex virome unveiled by deep sequencing analysis of RNAs from a French Pinot Noir grapevine exhibiting strong leafroll symptoms. *Archives of Virology*, 163(11), 2937–2946. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3949-9>
- Zarghani, S. N., Hily, J. M., Glasi, M., Marais, A., Wetzel, T., Faure, C., ... Candresse, T. (2018). Grapevine virus T diversity as revealed by full-length genome sequences assembled from high-throughput sequence data. *PLoS ONE*, 13(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206010>

- Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., & Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.024>
- Nerva, L., Turina, M., Zanzotto, A., Gardiman, M., Gaiotti, F., Gambino, G., & Chitarra, W. (2019). Isolation, molecular characterization and virome analysis of culturable wood fungal endophytes in esca symptomatic and asymptomatic grapevine plants. *Environmental Microbiology*, 21(8), 2886–2904. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14651>
- Li, L., Victoria, J. G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G. M., Kunz, T. H., & Delwart, E. (2010). Bat Guano Virome: Predominance of Dietary Viruses from Insects and Plants plus Novel Mammalian Viruses. *Journal of Virology*, 84(14), 6955–6965. <https://doi.org/10.1128/jvi.00501-10>
- Debat, H., Zavallo, D., Brisbane, R. S., Vončina, D., Almeida, R. P. P., Blouin, A. G., ... Asurmendi, S. (2019). Grapevine virus L: a novel vitivirus in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 155(1), 319–328. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01727-w>
- Dodds, T. J. M. and J. A. (1979). Isolation and Analysis of Double-Stranded RNA from Virus-Infected Plant and Fungal Tissue. *Phytopathology*, 69(8), 854. <https://doi.org/10.1094/phyto-69-854>
- Hily, J. M., Candresse, T., Garcia, S., Vigne, E., Tannière, M., Komar, V., ... Lemaire, O. (2018). High-throughput sequencing and the viromic study of grapevine leaves: From the detection of grapevine-infecting viruses to the description of a new environmental Tymovirales member. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01782>
- Ma, Y., Marais, A., Lefebvre, M., Theil, S., Svanella-Dumas, L., Faure, C., & Candresse, T. (2019). Phytovirome Analysis of Wild Plant Populations: Comparison of Double-Stranded RNA and Virion-Associated Nucleic Acid Metagenomic Approaches. *Journal of Virology*, 94(1), 1–14. <https://doi.org/10.1128/jvi.01462-19>
- Giorgio Gambino, Danila Cuzzo, Marianna Fasoli, Chiara Pagliarini, Marco Vitali, Paolo Boccacci, Mario Pezzotti, F. M. (2012). Co-evolution between Grapevine rupestris stem pitting- methylation and chromatin patterning associated virus and Vitis vinifera L. leads to decreased defence responses and increased transcription of genes related to photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 695–709. <https://doi.org/doi:10.1093/jxb/ers244>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2015). The Sequence of Sequencers : The History of SC. *Genomics*. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Flores, R., Hernández, C., Alba, A. E. M. de, Daròs, J.-A., & Serio, F. Di. (2005). Viroids and Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 117–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243>

- Marine, R. L., Magaña, L. C., Castro, C. J., Zhao, K., Montmayeur, A. M., Schmidt, A., ... Steven Oberste, M. (2020). Comparison of Illumina MiSeq and the Ion Torrent PGM and S5 platforms for whole-genome sequencing of picornaviruses and caliciviruses. *Journal Of Virological Methods*, (April).
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113865>
- Salk, J. J., & Kennedy, S. R. (2020). *Review Next-Generation Genotoxicology : Using Modern Sequencing Technologies to Assess Somatic Mutagenesis and Cancer Risk*. 151(September 2019). <https://doi.org/10.1002/em.22342>
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. (eds), (2011) *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, ISBN: 978-0-12-384684-6
- Martelli, G.P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology* 2014, 96, 1-136

NYILATKOZAT

Név: Holczbauer Aliz

ELTE Természettudományi Kar, szak: biológia alapszak

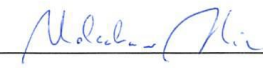
NEPTUN azonosító: NGKVB5

Szakdolgozat címe:

Újonnan leírt szőlővírusok lehetséges előfordulásának vizsgálata hazánk szőlőültetvényeit reprezentáló kis RNS könyvtárak elemzésével

A **szakdolgozat** szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló szellemi alkotásom, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam, mások által írt részeket a megfelelő idézés nélkül nem használtam fel.

Budapest, 2020. 05.13.


a hallgató aláírása

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Várallyay Évának, aki szakértelmével, tapasztalatával, türelmével, tanácsaival, biztatásával és a kutatásomhoz szükséges körülmények biztosításával nélkülözhetetlen támogatást nyújtott a dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönöm Demián Emesének, hogy rávilágított a témához tartozó fontos összefüggésekre, és hogy a módszerek elsajátításában mindig számíthattam kedves segítségére. Neki köszönhetem a laborban szerzett tudásom legnagyobb részét. Továbbá köszönettel tartozom az MBK-NAIK Molekuláris Növénykórtan Csoport többi dolgozójának.

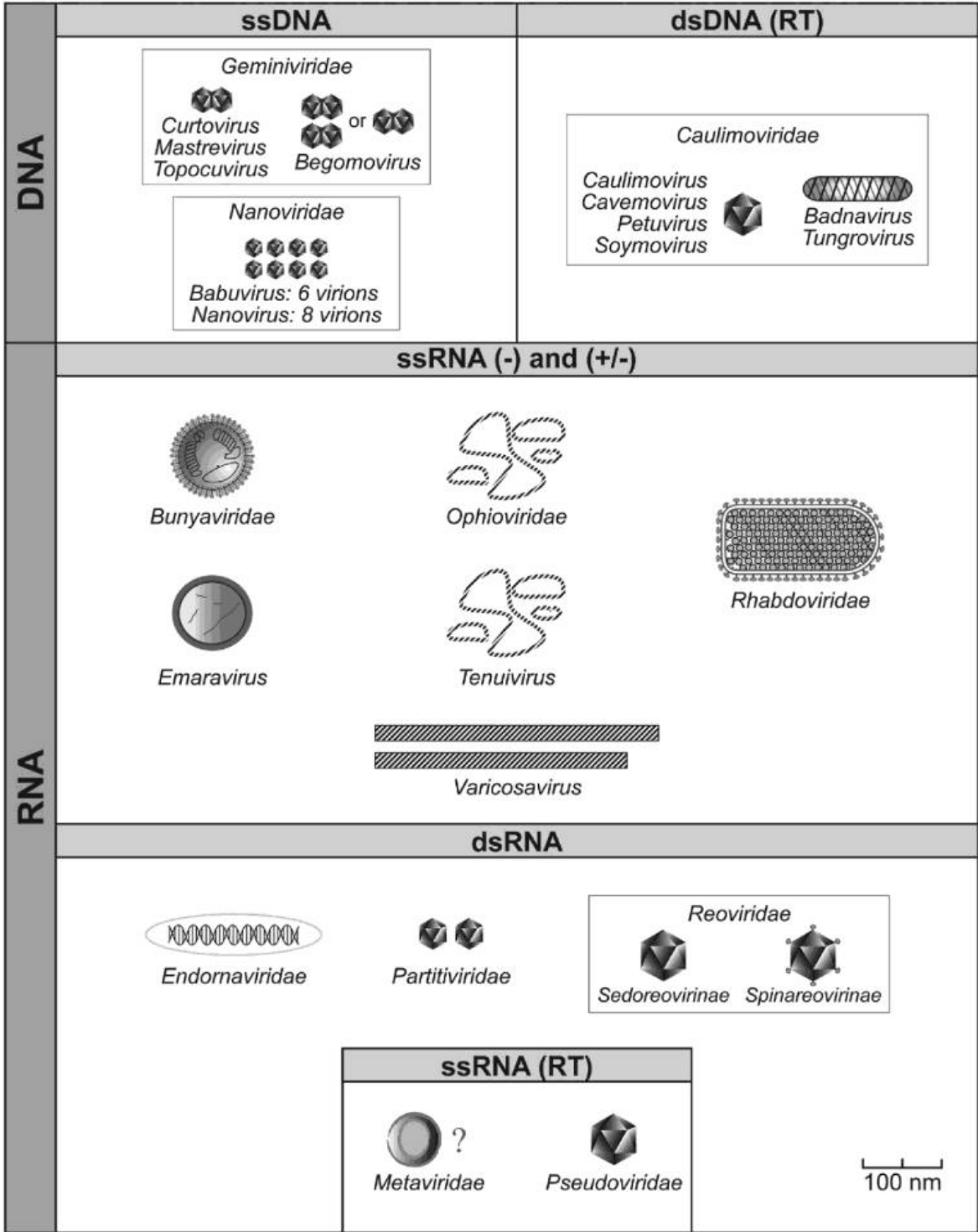
Szeretnék köszönetet mondani Pál Gábornak, amiért az ELTE részéről elvállalta a hivatalos témavezetői szerepkört és amiért hasznos tanácsaival segítette a dolgozat elkészítését.

Köszönöm Bódizs Szabolcs Attilának a támogatását és szakmai észrevételeit.

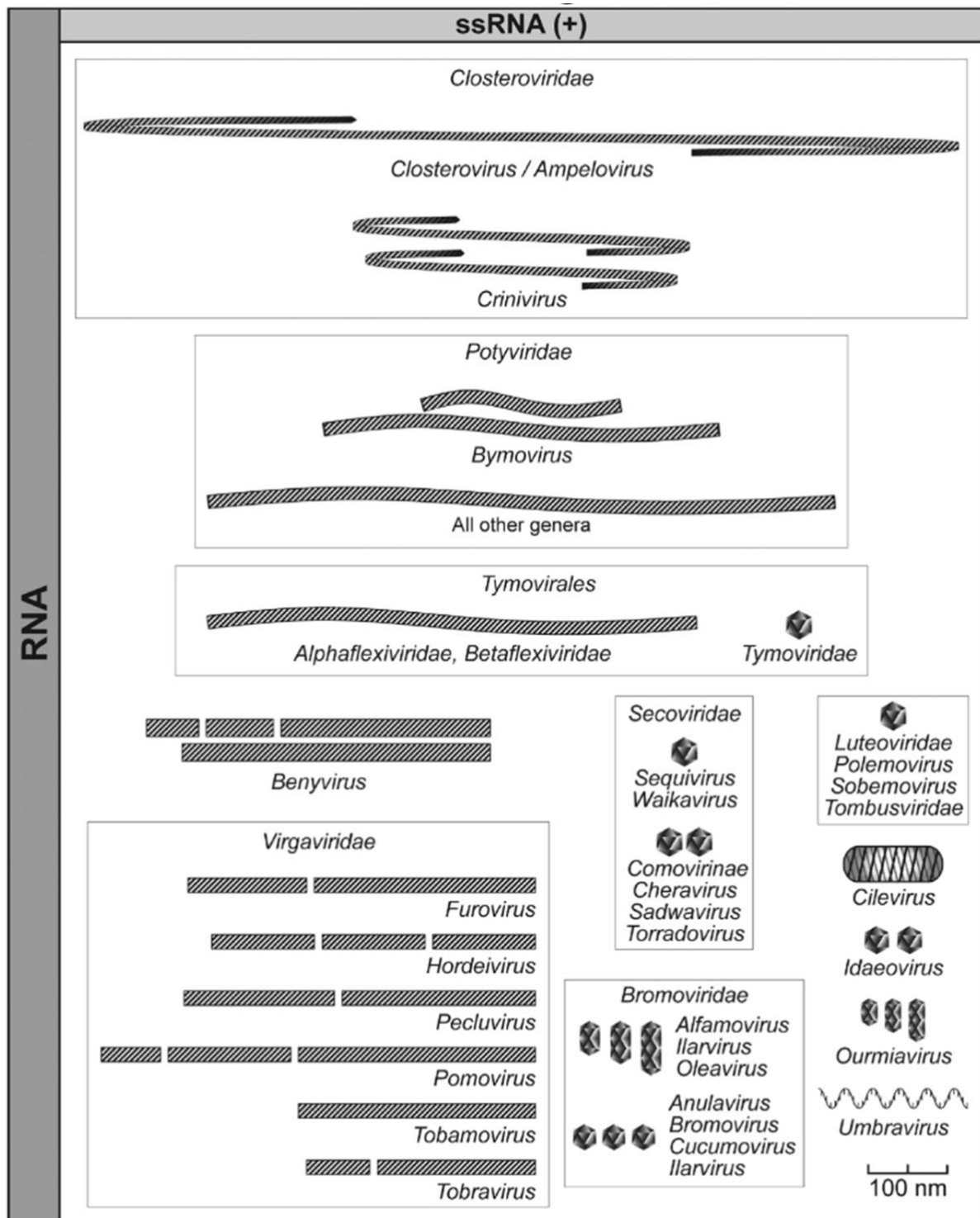
Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak és barátaimnak, hogy szeretettel, türelemmel és megértéssel fordultak hozzám a tanulmányaim alatt. Köszönöm édesanyámnak, hogy kitartóan és lelkesen érdeklődött a kutatásom részleteiről, még úgy is, hogy egy szót sem értett belőle.

Köszönöm mindenkinek!

Melléklet



1. melléklet: Növényeket fertőző vírusok (1.) (King és mtsai., 2011).



2. melléklet: Növényeket fertőző vírusok (2.) (King és mtsai., 2011).