

Bogyós gyümölcsök vírusfertőzöttségének vizsgálata nagy-átersztőkéességű szekvenálással

Szakdolgozat
biológia alapszak

készítette:
Péli Noémi

külső témavezető:
Dr. Várallyay Éva
tudományos tanácsadó
Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem, Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani
Tanszék, Genomikai Kutatócsoport

belső konzulens:
Dr. Knapp G. Dániel
egyetemi adjunktus
Növény-szervezettani Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2021

Rövidítések

dsRNS – double stranded RNA - duplaszálú RNS

ssRNS – single stranded RNA - egyszálú RNS

mRNS – messenger RNA - hírvivő ribonukleinsav

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay – enzim kötött immunszorbens módszer

PCR – polymerase chain reaction – polimeráz láncreakció

HTS – high-throughput sequencing – nagy áteresztőképességű szekvenálás

BCCV-1 – Blackcurrant-associated closterovirus 1 – feketeribizlihez kötődő closterovírus 1

cDNS – complementary DNA – komplementer DNS

NCBI – National Center for Biotechnology Information

nt – nucleotide – nukleotid

bp – base pair – bázispár

ORF – open reading frame – nyitott leolvasási keret

TNA – total nucleic acid – totál nukleinsav

siRNA – small interfering RNA – kis interferáló RNS

SBS – sequencing by synthesis – szekvenálás szintézissel

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

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

NGS – next-generation sequencing – újgenerációs szekvenálás

Tartalomjegyzék

1 Bevezetés.....	4
2 Vírusok jellemzése és jelentősége.....	5
2.1 A vírusok	5
2.2 A vírusok rendszerezése	6
2.3 Bogyós gyümölcsök növényeit fertőző vírusok	8
2.3.1 Blackcurrant closterovirus 1.....	10
2.4 A vírusok meghatározáshoz alkalmazott módszerek	11
2.4.1 Sanger-szekvenálás	12
2.4.2 Nagy-áteresztőképességű szekvenálás	12
2.5 HTS szekvenálási platformok	16
2.6 A szekvenálási eredmények bioinformatikai vizsgálata.....	16
3 Bogyós gyümölcsöket fertőző vírusok vizsgálata áfonyában (Saját kísérlet).....	18
3.1 Anyagok és módszerek.....	18
3.2 Eredmények.....	21
4 Konklúzió	26

1 Bevezetés

A bogyós gyümölcsök, mint az áfonya, vörösáfonya, málna, ribizli, feketeribizli fontos táplálékforrás az emberek számára, rendszeresen fogyasztjuk ezeket az emberi egészségre való jótékony hatásai révén. Az elmúlt évtizedekben megnőtt az igény ezekre a gyümölcsökre, ezen igény kiszolgálására nagymértékben kezdték termelni leginkább az áfonyát és a vörösáfonyát (Martin, Polashock és Tzanetakis, 2012). A fás szárú gyümölcsök hatalmas gazdasági jelentősége miatt fontos tudni, hogy milyen vírusok veszélyeztetik azokat, és hogy hogyan védekezzünk ellenük. A vírussal fertőzött növényen morfológiai és hormonális változások mehetnek végbe, aminek eredményeként általunk felismerhető tünetek jelennek meg. Ezek a tünetek a termés növekedését, fejlődését, terméshozamát és minőségét, valamint az évelő növényeknél, mint a bogyós gyümölcsök az élettartamát is befolyásolhatja (Hou, Li és Massart, 2020).

A bogyós gyümölcsökre gyakran úgy hivatkozunk mind a hétköznapiakban mind gazdasági és élelmiszeripari szempontból, mint egy egységes csoport, azonban korántsem alkotnak monofiletikus csoportot. Így amit összefoglaló csoportként bogyós gyümölcsnek nevezünk az rendszertani szempontból a *Fragaria*, a *Rubus*, a *Vaccinium*, a *Ribes* és a *Sambucus* nemzetségbe tartozó fajokat takarja (Martin és Tzanetakis, 2015). A bogyós gyümölcsök évelő növények, ezért a termelőknek hatalmas anyagi befektetéseket kell tenniük az ültetvények létesítésekor a föld megművelésétől, az ültetésen át, addig, hogy a növény elérje az érettségét és a maximális termelőképességét. A felnőtt növényeket is ugyanúgy gondozni kell, hogy megtartsák a termelőképességüket és minőségüket. Cserébe, ha a betegségeket távol tudják tartani a növényektől, akkor ezek az ültetvények akár több évtizeden át is jó termést hoznak (Martin, Polashock és Tzanetakis, 2012).

A vírusfertőzés eredhet egy, a vegetatív szaporítóanyagból vagy fertőzött egyed átültetéséből. Az egyes egyedek között pedig vektorok segítségével horizontálisan átadódhat a vírus, ami növeli a fertőzések számát és a különböző vírusok keveredésének mértékét egy példányon (Hou, Li és Massart, 2020).

A dolgozatom célja, hogy képet adjak a bogyós növényeket fertőző vírusokról és azok detektálási módszereiről. Ismertetem azokat a kutatásaimat, melyekbe bekapcsolódva nagy-áteresztőképesű szekvenálással kapott bioinformatikai adatokat elemeztem, ezek ezeknek az eredményét laboratóriumi kísérletekkel ellenőriztem kiemelkedő figyelmet fordítva a feketeribizlit fertőző BCCV-1 vírusra.

2 Vírusok jellemzése és jelentősége

2.1 A vírusok

A vírusok kutatását a 19. század végén kezdték meg, azonban már korábban is megfigyeltek növényeken betegségeket, melyekről utólag ma már feltételezik, hogy vírusok okozhatták, viszont akkoriban ezt még nem tudták megállapítani. Dimitrij Ivanovszkij orosz biológus a dohány mozaikbetegség tanulmányozása közben talált rá a vírusokra 1892-ben, ellenben ő még a baktériumok által termelt toxinnak hitte azokat. Azért jutott erre a következtetésre, mivel miután a porcelánszűrőn (vagy Chamberland-szűrőn) átszűrte a dohányleveleket, maradt az oldatban fertőző ágens annak ellenére, hogy ezzel a technikával baktériummentessé lehet tenni az oldatokat. A vírus szó a „contagium vivum fluidum” (latinul a fertőző élő folyadékot jelenti) kifejezésből származik, amivel a holland Martinus Beijerinck (1898) jellemezte a porcelánszűrőn átszűrt oldatot. Ma Beijerinck felfedezését tekintjük a virológia kezdetének (Hull, 2013).

A vírusok terjedéséhez elengedhetetlen valamilyen vektor, hiszen a vírus önerőből nem képes az egyik gazdaszervezetről a másikra eljutni. Ezért jelentős az az 1900 és 1935 közötti felfedezés, mely szerint a növényi vírusokat leginkább rovarok terjesztik. Csak ezt követően vált lehetővé tanulmányozásuk biokémiai módon, melyhez a kezdetekben a vizsgált növényben magas koncentrációban és elég stabil állapotban kellett jelen lennie a vírusnak annak érdekében, hogy az izolálás és az anyagok kémiai jellemzése sikeres legyen, hiszen a fehérjekivonási és tisztítási módszerek ekkoriban még nem voltak kifejlesztve. A felfedezéssel közel egyidőben az elektronmikroszkópiával vagy röntgen krisztallográfiával már meg tudták állapítani a vírusok alakját és méretét. Az elektronmikroszkópiai technikával, mely a nehézfémrel való árnyékolás fejlesztésén alapult, növelni lehetett a kontrasztot a vírus részei és a környező terület között. Viszont azzal, hogy fémmel vontak be vírusrészeket, elkerülhetetlenül sérültek bizonyos elemei, ez vezetett a magasfelbontású mikroszkópok és a negatív festési technikák kifejlesztéséhez a XX. század közepén. A század második felében a kutatások a virális genomok felépítésére, replikációjára, valamint a vírus, a gazdanövény és a gerinctelen vektorok közötti interakciókra fókuszálódtak (Hull, 2013).

A vírusok Frederick Charles Bawden kimutatása alapján csak fehérjékből és nukleinsavakból állnak. Nem tekinthetőek élőlénynek, mivel nem felelnek meg az általános életkritériumok élő anyaggal szemben támasztott követelményeknek, hiszen nincs bennük lezajló anyagcsere folyamat és szaporodásukhoz teljes mértékben a gazdasejtre vannak utalva.

Egy vírus két formában lehet jelen: virion, illetve vegetatív vírus állapotban. A virion a gazdasejten kívüli inaktív alak, önmagában képtelen a szaporodásra, de ugyanígy nevezzük a sejten belül a kiszabadulásra váró alakot is. A vegetatív vírus alak akkor jön létre, amikor a virion bejut a gazdasejtbe, ilyenkor a nukleinsavról másolat készül (ez az örökítőanyaguk), és az új vírus elkészüléséig ez az alak lesz jelen.

Ruger Hull a *Plant Virology* című könyvében a vírust így határozta meg: „A vírus egy vagy több nukleinsav templát molekulának az összessége, ami RNS vagy DNS, általában egy védő fehérje/lipidfehérje burokkal vagy burkokkal borított, ami képes szabályozni a saját osztódását, hogy az csak a megfelelő gazdasejten belül menjen végbe. Gyakran az örökítőanyag egy része horizontálisan transzmittálódik a gazdák között. Ezekben a sejtekben a replikáció (i) a gazdasejt fehérjeszintetizáló mechanizmusára támaszkodik, (ii) a ketté hasadás helyett inkább a szükséges anyagok összességéből szerveződik össze, (iii) olyan területen lokalizálódik, ahol nincsenek elkülönítve a folytonos lipoprotein kettősréteg membrán által a gazdasejt tartalmától, és (iv) folyamatosan növelik variánsaik számát a virális nukleinsavak különböző módosulásaival” (Hull, 2013).

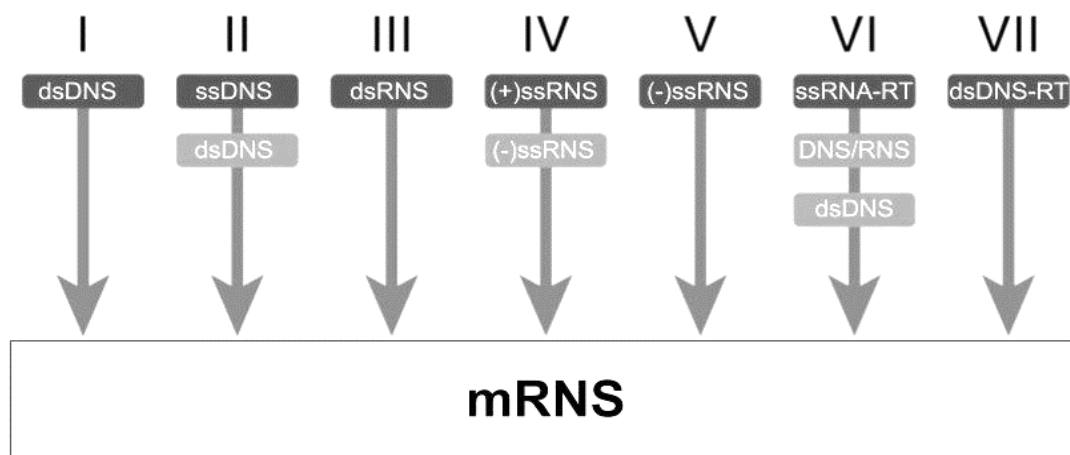
Hershey és Chase 1952-es kísérletei bebizonyították, hogy az *Escherichia coli*-t fertőző bakteriális vírusnak a virális DNS-e került be a sejtbe, míg a fehérje, ami a burkot alkotja, a gazdasejten kívül maradt. Az 1960-as évek végén kezdtek felfedezni más genom típusokat az RNS-en kívül, mint dsDNS és ssDNS. David Baltimore az 1971-es leírt cikkében a genetikai információjuk expresszálásának módja szerint kategorizálta az állati vírusokat. Ezt ma már minden vírusra, így a növényeket fertőző vírusokra is alkalmazzuk, és a Baltimore-osztályozásként hivatkozunk rá (*Baltimore classification ~ ViralZone*, 2021).

2.2 A vírusok rendszerezése

Minden tudományterületen törekednek az emberek egy rendszer létrehozására, és ez a virológiában sincsen másképp. A virológusoknak a vírusok rendszerezése lehetőséget adott arra, hogy a kutatók könnyebben kommunikáljanak egymással, és ezáltal jobban átlátható legyen az organizmusok rendszere. A rendszerezésnek lehetővé kell tennie, hogy az újonnan felfedezett vírusokat is be lehessen sorolni a megfelelő helyre, ami által a rokonsági kapcsolatot is le lehet írni. A víruskutatás elején úgy gondolták, hogy az adott növényfajon minden betegség tünete más-más vírustól származik, azonban az 1930-as évekre bebizonyosodott, hogy egy vírus több formában is jelen lehet az adott gazdanövényben, így többféle tünetet is képes okozni. Ugyanígy módon más vírusok is okozhatnak hasonló tüneteket a növényen, és egyes tünetek

lehetnek eredményei két vagy több vírus együttes előfordulásának is. Ennek következtében a korábbi vizsgálati módszereket, melyeknél csak a tüneteket vizsgálták a vírusok azonosítására, felül kellett vizsgálni és ki kellett egészíteni. A vírus okozta tünetek helyett ezért ma már a szekvenciájuk alapján soroljuk be őket, a nemzetközi taxonómiai bizottság (ICTV) által felülvizsgált rendszerbe. Az új vírusok azonosításakor azonban folyamatosan felmerül az a probléma, hogy a különböző vírus variánsok mégis milyen határértéknél tekinthetők eléggé különbözőnek ahhoz, hogy új fajnak, családnak vagy rendnek tekinthessük őket, és hogy melyik egységre vonatkozik ez a vírus örökítőanyagában. A Baltimore-féle osztályozás szerint a vírus genetikai információtartalmának típusa és a replikáció módja szerint osztjuk be a vírusokat hét csoportba (1.ábra) (Baltimore, 1971).

Baltimore-féle osztályozás



1. ábra: vírusok mRNS szintézis módján alapuló Baltimore féle osztályozása, az ábra a *ViralZone* honlap alapján készült (Baltimore classification ~ *ViralZone*, 2021)

A vírusok a genomjuk sokszorozásával szaporodnak és a genetikai információ kontrollált expressziójával pedig örökítik azt. Lényeges ezen folyamatok részletes tanulmányozása, mivel a replikáció és transzkripció különböző módokon mehet végbe. Ezekre a különböző módszerekre a virális genetikai rendszerként szoktunk utalni. A virális genetikai rendszernek két fő célja van: az új genetikai anyag, vagyis a DNS vagy RNS létrehozása, valamint a hírvivő ribonukleinsav (mRNS) szintetizálása. Az mRNS rendkívül fontos a vírusok számára, hiszen az mRNS szintézis és a transzláció is a gazdasejt segítségével, riboszómák és különböző sejtes faktorok felhasználásával megy végbe. Ezt figyelembe véve a vírus célja, az mRNS létrehozása, a transzláció után elkészült virális fehérje már csak kisebb változtatásokon mehet keresztül. Annak következtében, hogy a mRNS-en lényegi módosítás már nem megy végbe a szintézis

után, a vírus örökítőanyagának a szerkezete meghatározza a módot, mely alapján az mRNS szintetizálódni fog, és ez kulcsfontosságú a létrehozandó mRNS szempontjából. Az 1. ábrán látható egy összefoglalás arról, hogy a Baltimore-féle rendszerezés – vagyis a vírus örökítő anyaga szerinti csoportosításnál – az örökítőanyagból milyen útvonalon jön létre az mRNS.

2.3 Bogyós gyümölcsök növényeit fertőző vírusok

A bogyós gyümölcsöket igen sokféle vírus fenyegeti, és ezek a vírusok gyakran nem egy adott fajra specifikusak. Annak érdekében, hogy megelőzzük a gazdasági károkat, amelyek a vírusfertőzések következtében elpusztult vagy károsodott termékek miatt alakulnak ki, tanulmányoznunk kell ezeket a vírusokat.

2011 óta főként a nagyátersztőképességű szekvenálásnak köszönhetően rengeteg új vírust írtak le a bogyós gyümölcsök körében. A bogyós gyümölcsöket fertőző vírusok legtöbbje pozitív egyszálú RNS vírus, de duplaszálú DNS vírusokat is találunk köztük. A vírusok gyakran megtalálhatóak mind a vadon növekvő, mind a termesztett növényeken (Thekke-Veetil és mtsai., 2013; Hou, Li és Massart, 2020).

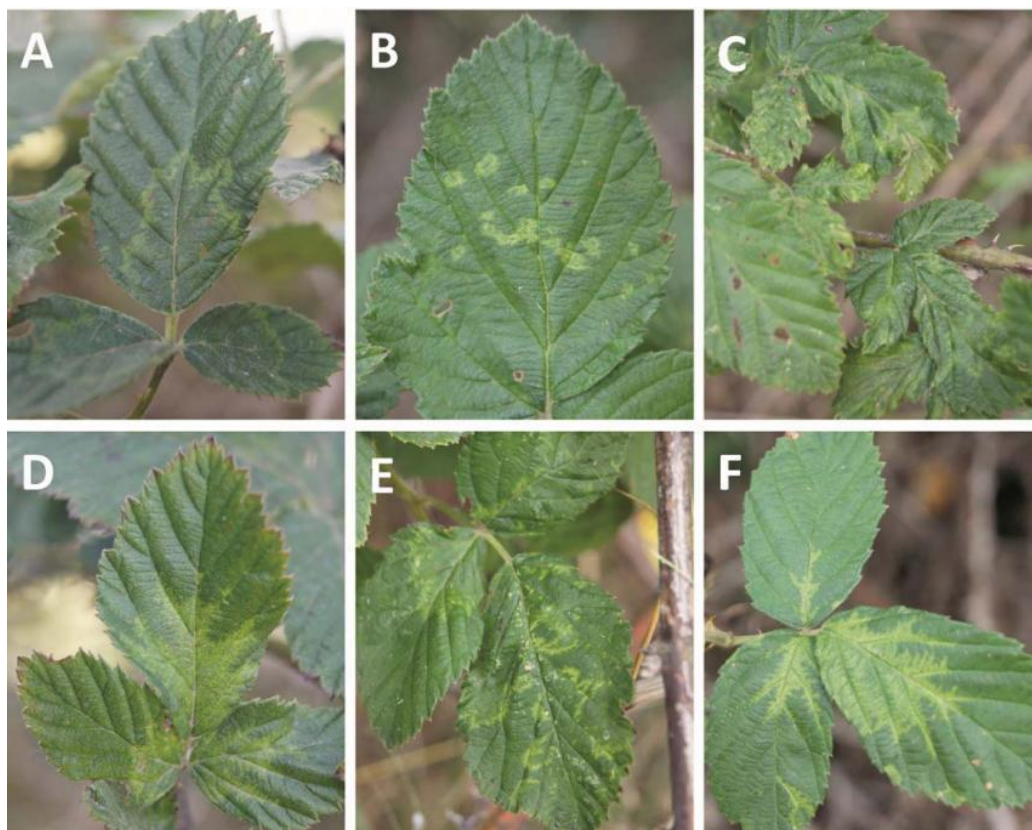
Egy bogyós gyümölcsöt fertőző vírus igen gyakran át tud terjedni és betegséget tud kialakítani egy másik a bogyós gyümölcsöt termő növényben. Mint ahogy ez megfigyelhető a *Rubus* génuszba tartozó földiszedren is, amit gyakran fertőz meg földiepernek vagy málnának a vírusa. De akár még az almán leírt vírus is megfertőzheti. Ezek mind kihatással lehetnek a termés mennyiségére és méretére, akár 50%-kal is lecsökkenhet, ami jelentős gazdasági kiesést okozhat a termelőknek (*Blackberry (Rubus spp.)-Virus Diseases | Pacific Northwest Pest Management Handbooks*, évszám nélkül; Martin és mtsai., 2013).

A vírusok jellegzetes tünetei, ha vannak, akkor a leveken mutatkoznak meg leginkább. Gyakran a tüneteket kialakító vírusokból, ha több is jelen van az adott növényben, akkor ezek a tünetek keveredhetnek, és ezért másképp jelennek meg, emiatt pedig nem lehet mindig tünet alapján egyértelműen meghatározni a vírust. A tünetek lehetnek elszíneződések, nektrózisok, deformációk (Horváth és Gáborjányi, 1999). Elszíneződés lehet például a mozaik vírusok jellegzetes tünete, gyakran világoszöld, sárga foltok jelennek meg a levélen az ilyen betegségeknél. Ilyenre példa a 2. ábrán látható Áfonya mozaik vírus (Blueberry mosaic virus) is (Pscheidt és Ocamb, 2021). Az erezet sárgulása is betegségeknek a tünete, például a 3. ábrán megfigyelhető földi szeder leveleken különböző mintázatokban az erezet körülötte sárgulás, ezt

egy több vírus okozta betegségkomplex, a Blackberry yellow vein disease (Martin és mtsai., 2013).



2. ábra: Áfonya mozaik vírus okozta tünetek áfonya növényen



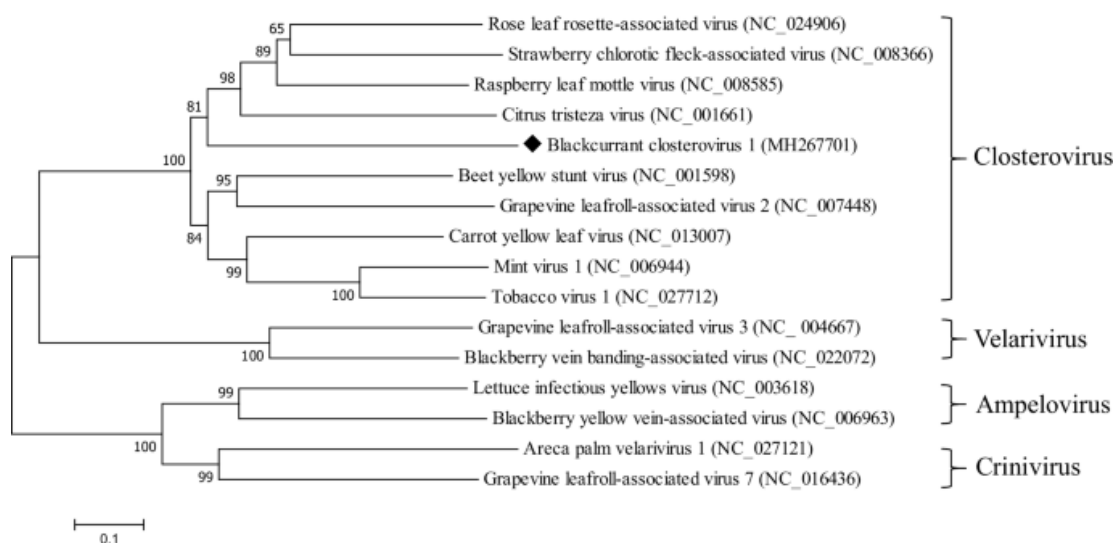
3. ábra: a feketeribizliben a sárga erezetűséget okozó betegségkomplex különböző lehetséges tünetei. A: tölgyfa levél mintázat; B és E: gyűrűsfoltosodásnak a tünetei; C:levél foltosodás; D és F: erezet sárgulása (Martin és mtsai., 2013)

2.3.1 Blackcurrant closterovirus 1

A Blackcurrant-associated closterovirus-1 (feketeribizhez kötődő closterovírus 1) nevű vírust feketeribizli növényben azonosították és írták le Zheng és munkatársai 2018-ban (4. ábra), miután egy nagy-áteresztőképességű szekvenálási vizsgálat során megtalálták azt. A vírus a *Closteroviridae* családba tartozik, azon belül is a *Closterovirus* génuszba (5. ábra). Ebbe a nemzetségbe tartozó vírusoknak, így a BCCV-1-nek is pozitív szálú RNS-ből (ssRNS) áll a genomja, valamint jellemző a *Closteroviridae* családra a hosszú, csavarodó, rostos virionok jelenléte is (Zheng és mtsai., 2018; Fuchs és mtsai., 2020).

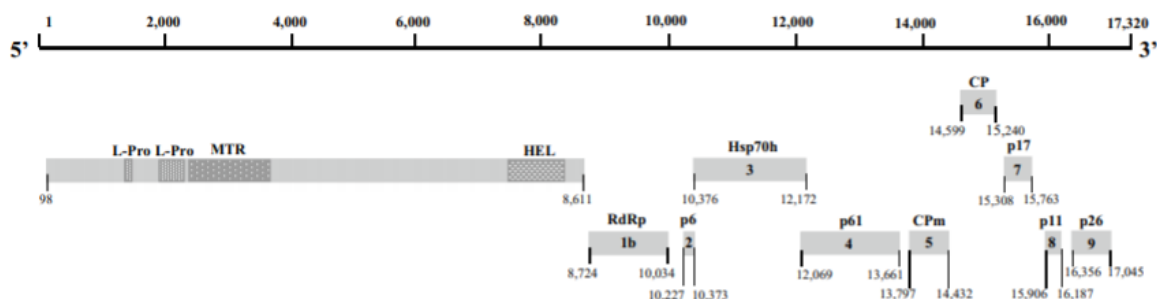


4. ábra: A feketeribizli növénynek a levele, amiről leírták a BCCV-1-et (Zheng és mtsai., 2018)



5. ábra: a Closteroviridae család kiválasztott fajainak filogenetikai fája a Blackcurrant Closterovirus 1 hősokk fehérjéje alapján (Zheng és mtsai., 2018)

A vírus 17320 nukleotidból áll, és ebben 10 nyitott leolvasási keret, ORF-et (open reading frame) tartalmaz (6. ábra). Az 1. táblázatban látható az ORF-ek számozása, hogy mit kódolnak egyes régiók, és hogy ezek a régiók az 5'-3' irányban hol találhatóak. (Zheng és mtsai., 2018)



6. ábra: a BCCV-1 genomi elrendeződése (Zheng és mtsai., 2018)

1. táblázat: A Blackcurrant closterovirus 1-ben megtalálható nyitott leolvasási keretek és kódolt fehérjét (Zheng és mtsai., 2018)

ORF régió	Mit kódol	5' kezdőpont	3' végpont
ORF1a	L-Pro, MTR, HEL	98	8611
ORF1b	RdRp	8724	10034
ORF2	p6	10227	10373
ORF3	Hsp70h	10376	12172
ORF4	P61	12069	13661
ORF5	CP minor	13797	14432
ORF6	CP	14599	15240
ORF7	p17	15308	17763
ORF8	p11	15906	16186
ORF9	p26	16356	17045

2.4 A vírusok meghatározáshoz alkalmazott módszerek

A XX. század első felében a vírusokkal fertőzött növényeken megjelenő tüneteket mutató növényeken a vírusok jelenlétét hagyományosan biotesztek segítségével bizonyították. Ennek során a fertőzést mutató növények kivonatait átdörzsölték teszt növényekre, az így adott tüneteket megfigyelve (elektronmikroszkópon képeken is) azonosítani és jellemezni tudtak

vírusokat. Később ezt az enzimhez kötött ellenanyagvizsgálattal (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay, ELISA) együtt használták. Az ELISA teszteket ma is gyakran használják már ismert vírusok kimutatására, de a kórokozó kimutatásához kell specifikus ellenanyag a vírusnak az egy adott, - jellemzően a köpenyfehérjéjére. A molekuláris biológia fejlődésével a vírusokról szekvencia információkat tudunk szerezni, így az ELISA mellett megjelent polimeráz-láncreakció (Polymerase Chain Reaction, PCR) alapú diagnosztika is. A PCR alapú diagnosztika, azonban szintén csak a már ismert vírusok kimutatására használható, mivel indító (primer) szekvenciákat kell alkalmazni, amelyek tervezéséhez ismernünk kell a vírus örökítőanyagának (vagy annak egy részének) nukleotid sorrendjét. A diagnosztika gyakran használja ezt betegségek és kórokozók kimutatására. Fontos azonban, hogy mind az ELISA mind a PCR csak ismert vírusokra alkalmazható – a specifikus ellenanyag vagy a tervezendő primer miatt, új vírust nem tudunk vele azonosítani. A biotesztek nem szolgáltatnak semmilyen információt a vírus örökítőanyagának nukleinsavsorrendjéről, csak tüneteket tudunk megfigyelni, és az alapján tudunk következtetni a vírusra, vagy az alapján tudjuk leírni az új vírust.

2.4.1 Sanger-szekvenálás

A metagenomikai kutatások alapja az, hogy a földön kialakult élőlények örökítőanyaga ugyanolyan alapú, mindet, az RNS-t és a DNS-t is, öt féle nukleotid építheti föl, a DNS esetében adenin (A), timin (T), guanin (G), citozin (C), az RNS-nél pedig adenin (A), uracil (U), guanin (G), citozin (C). Ezért, hogyha egy mintában meghatározzuk az összes nukleinsav bázissorrendjét, akkor abból megállapítható, hogy milyen élőlények voltak a mintában. Ennek a kezdete volt az 1977-ben Frederick Sanger által kidolgozott Sanger-szekvenálás (másnéven láncterminációs- vagy dideoxi-szekvenálás), egy polimerizációs reakció, amivel le tudták olvasni az ismeretlen DNS szekvenciát (Sanger, Nicklen és Coulson, 1977). Frederick Sanger módszerét a 2000-es években jelentős mértékben tovább fejlesztették, leginkább a szekvenálási reakció leolvasását automatizálták, így egyszerre nem csak egy nukleinsavnak a sorrendje vált meghatározhatóvá.

2.4.2 Nagy-áteresztőképességű szekvenálás

A High-throughput Sequencing (HTS), másnéven az újgenerációs szekvenálás (NGS) egy összefoglaló elnevezés az olyan DNS szekvenálási technikákra, amelyek a szekvenálandó mintában több millió DNS nukleinsavsorrendjét határozza meg párhuzamosan. A szekvenálás eredményeül kapott nyers információkat, szekvenciákat, ezután bioinformatikai módszerekkel

szükséges analizálni, ahhoz, hogy a mintában jelenlevő vírusokat már meglévő adatbázissal összehasonlítva azonosíthassuk, vagy akár teljesen új eddig ismeretlen vírusokat írassunk le (Behjati és Tarpey, 2013). A HTS módszerekkel lehet vizsgálni a genetikai diverzitást, a kis RNS-eket és ezek gén expresszióját is, így ezek a technikák megújították a vírusok felfedezési módszereit és a vírusdiagnosztikai módszertant (Villamor és *mtsai.*, 2019; Zakaria, Gaafar és Id, 2020).

A virális genomok igen sokfélék lehetnek azon túl is, hogy RNS vagy DNS építi fel azokat, de lehet cirkuláris, kétszálú, egyszálú vagy akár egy, vagy több darabból álló is. A mintánkban a virális szekvenciák igen változatosak: lehetnek RNS vírusok, DNS vírusok, viroidok és a gazda genomjába integrálódott virális részek is. A viroidok cirkuláris RNS-ek, amik 250-400 nukleotid hosszúságúak, fehérjét nem kódolnak, viszont képesek önmaguk a gazdasejtben sokszorozódni már vírus jelenléte nélkül (Steger és Riesner, 2018).

A HTS szekvenálásnál először ki kell tisztítani a mintából a nukleinsavat (a minta lehet vektorból, növényből, talajból vagy akár vízből is) (7. ábra). A nukleinsavak izolálását követően a HTS a már említett virális szekvenciák diverzitása miatt különböző platformokon végezhetjük el, különböző kiindulási anyagokkal. Az egyik ilyen platform az, amikor a mintában lévő összes RNS-t tisztítjuk ki, ezt totál RNS szekvenálásnak nevezzük. Ilyenkor az összes típusú virális szekvenciát detektálni tudjuk, hiszen a DNS vírusok fehérjét kódoló szakaszairól is íródnak át RNS-ek, és az RNS vírusokat, viroidokat és az integrált vírus szekvenciákat is tudjuk azonosítani. Másik lehetséges módszer a duplaszálú RNS-ek (dsRNS) tisztítása, ez RNS vírusoknál mindig jelen van a replikáció során, valamint viroidokra is jól használható, azonban DNS vírusokat kevéssé, a genomba integrált vírusokat pedig egyáltalán nem tudjuk ezzel a módszerrel meghatározni. A mintából ki lehet tisztítani a vírus részleteket, virionokat, ez a módszer a VANA (virion-associated nucleic acids, vagyis a virion-kapcsolt nukleinsav), és abból meg tudjuk határozni a benne levő nukleinsav bázissorrendjét. Viszont a gazdagenomba integrált vírusokat, valamint a viroidokat a köpenyfehérje (kapszid) hiánya miatt nem lehet így kimutatni. Végül pedig a vírusokat ki lehet mutatni úgy is, hogy a vírus replikációja során a növények védekező rendszere által termelt kis RNS-eket szekvenáljuk meg. Ezzel a szekvenálási platformmal a totál RNS kivonáshoz hasonlóan azonosítható az összes típusú vírus (Villamor és *mtsai.*, 2019).

A totál nukleinsav, vagy rövidítve TNA szekvenálás során a mintában található teljes DNS és RNS állományt megszekvenáljuk. Gyakran ezt a módszert választják kimutatásokhoz, mivel nagy és jó minőségű a kapott szekvencia adat (Kukurba és Montgomery, 2015).

A dsRNS módszere azon alapul, hogy az RNS vírusok a replikáció során duplaszálú RNS-t termelnek, a virális nukleinsav szekvenciák felszaporításával, dúsításával a minta vírusspecifikusságát tudjuk növelni (Decker és *mtsai.*, 2019). A jelenleg alkalmazott protokollok kit-ekre, vagy fenollal, vagy kloroformmal történő kivonásra támaszkodnak, hogy kinyerjék a totál DNS és az RNS-nek egy keverékét, amiből aztán a dsRNS frakciót kromatográfiával polimer cellulóz láncon felszaporítanak (Maliogka és *mtsai.*, 2018). Ugyanakkor a TNA a dsRNS módszerhez képest nagyobb lefedettséget biztosít, a vírusgenomot teljesebben vonhatjuk ki. Mégis a dsRNS módszer ma is gyakran alkalmazott, mivel a kisebb számban jelenlevő vírusok jobban kimutathatóak vele, mint a teljes nukleinsav kivonással (García, Montoya és Gutiérrez, 2020).

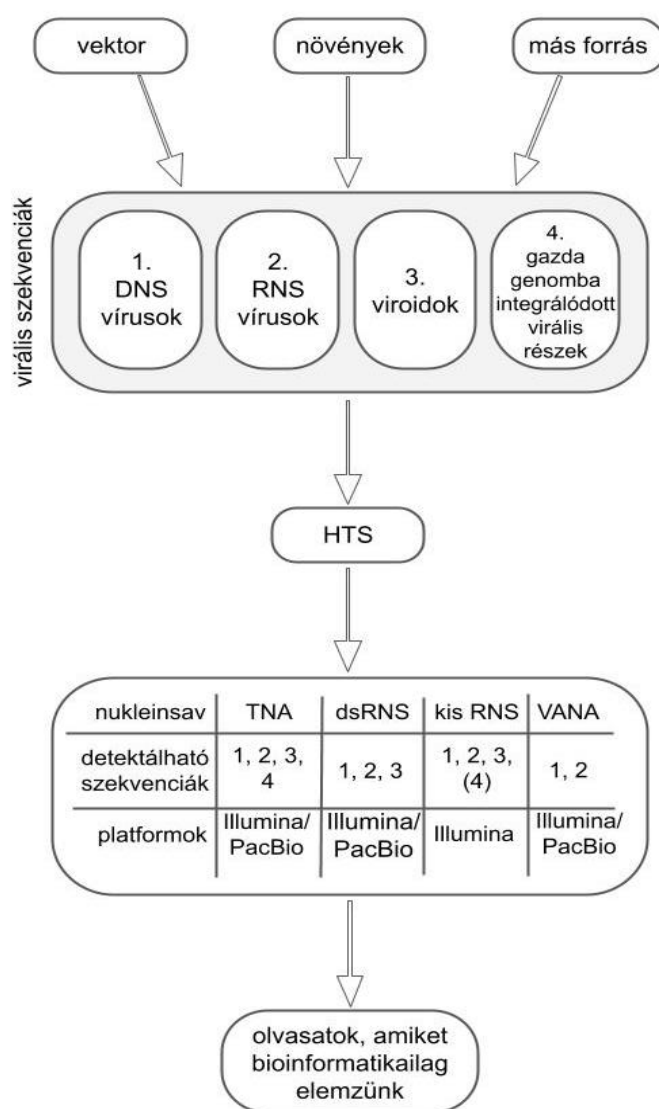
A VANA módszerrel a vírusrészecskéket vizsgáljuk. Pontosabban a vírus kapszid által megőrzött virális nukleinsavakat vizsgáljuk, és így az RNS és a DNS vírusok is kimutathatóak ezzel a módszerrel. Sajnos ez a módszer korlátozva van a kapsziddal rendelkező vírusokra, valamint a minta feldolgozása is bonyolultabb, mint a többi szekvenálási módszerrel (Maliogka és *mtsai.*, 2018).

Egy más megközelítési módot alkalmazó módszer a kis RNS, vagyis a siRNA HTS. A kis RNS-ek növények védekezőrendszere miatt jönnek létre. A növény védekező enzimeit, a DICER enzimeket a virális RNS-t ilyen kis méretű (21-24 nukleotid) hosszúságú szekvenciákra darabolják. Ezek a molekulák izolálhatóak a fertőzött növényekből, és HTS-t követően újra alkotható a vírus genomja. Ez a módszer használható mind a DNS, mind az RNS genomokra, csak a szekvenciák kis mérete miatt a genom illesztése nehezebb lehet (Maliogka és *mtsai.*, 2018).

Attól függően, hogy melyik szekvenálási platformot választjuk a mintánkhoz, befolyásolja, hogy milyen típusú örökítőanyaggal rendelkező vírusokat tudunk majd azonosítani (7. ábra). Azonban a választott szekvenálási platform alapján képesek vagyunk határozni a megtalált vírusok genomtípusát, ezért a Baltimore-féle rendszerbe azonnal besorolhatók, megkönnyítve ezzel az újonnan felfedezett vírusok klasszifikálását.

A szekvenálást követően rövid szekvenciákat kapunk, azaz readeket, melyek a szekvenálás típusától függően különböző eredetű nukleinsavakat tartalmaznak. Ezen readeknek

az egy mintából való összességére hivatkozunk könyvtárként a bioinformatikai elemzések során. Mivel a szekvenálást csak DNS templáton lehet végrehajtani, ezért a minta RNS-eiről cDNS másolatot kell készíteni, ezt pedig reverz transzkripcióval tudjuk végrehajtani. Valamint annak érdekében, hogy ne kelljen minden mintát külön szekvenáltatni, lehet egy úgynevezett adapter régiót ligálni, vagyis kapcsolni a cDNS-re. Ez az adapter régió, mint egy vonalkód tud működni az egyes cDNS-eken, és az egy mintába tartozóknak az adapter régió szekvenciája meg fog egyezni. Ezért pedig a bioinformatikai adatelemzés során a különböző minták elkülöníthetők egymástól, vagyis különböző könyvtárakat alkotnak. Egy ilyen szekvenálási reakció akár 250 millió readet is képes készíteni, ezért megéri az adapter régiókat illeszteni a cDNS-ek végére (*Illumina | Sequencing and array-based solutions for genetic research, 2021*).



7. ábra: a nagyáteresztőképességű szekvenálás lépései és típusai (MacIot és mtsai., 2020)

2.5 HTS szekvenálási platformok

A mintákból kivont nukleinsavak szekvenálására a cégek között verseny alakult ki, jelenleg az Illumina cég, majd az Ion Torrent a legerősebb. Mindkettő nagy kapacitású és rövid szekvenciákat képes leolvasni (Marine és mtsai., 2020).

A HTS platformok a Sanger szekvenálásra épülnek, ezért érthető, hogy az első platformok is ezeknek a mintájára épültek, így pedig szintézissel ment végbe a szekvenálás, ezt SBS-nek rövidítjük (sequencing by synthesis). Az adatok mind egyetlen könyvtárról származnak, minden beépülés során digitális felvétel készül, és ezért az adatok is digitálisak (Illumina | Sequencing and array-based solutions for genetic research, 2021).

Az Ion Torrent nem alkalmaz fluoreszcenciát vagy lumineszcenciát, emiatt fény utáni szekvenálási technológiaként is szoktak rá hivatkozni. A nukleotidok beépülésekor végbemenő pH változáskor protonok szabadulnak fel, amiket egy komplementer fél-oxid vezető (CMOS) érzékel (Heather és Chain, 2016).

Az SMS vagyis a közvetlen egymolekulás szekvenálásnak két típusa van: az egymolekulás valós idejű szekvenálás (SMRT) és a nanopore (Oxford Nanopore Technologies). Ezeknek az eredménye hosszú leolvasások, a fentebb említett két rövid leolvasási szekvenáláshoz képest, akár 10-250 kb hosszúságút. Míg összehasonlítási alapként a már említett Illumina szekvenálása 300 bázis leolvasására képes. Azonban ügyelni kell arra, hogy ezeknél a technikáknál az egy nukleotid variánsra vonatkozó hiba arány magasabb lehet (Salk és Kennedy, 2020).

2.6 A szekvenálási eredmények bioinformatikai vizsgálata

Az elemzés során először a szekvenált olvasatokról „readek”-ről el kell távolítani a könyvtárkészítés során a kis RNS-ekhez ligált adapterek szekvenciáját, így megkapjuk a trimmelt readeket, amiket méret szerint rendezünk. A kis RNS readek általában 21-24 nukleotid hosszúak, hiszen ezek a nukleinsavak, a DICER enzimek vágástermékei. A kis RNS readekből átfedő nukleotid részleteik alapján a program, de novo összeillesztéssel hosszabb, ún. contigokat hoztunk létre. A contig az angol contiguous (folytonos) szóból ered, és az egymással átfedő, így egy nukleotid szekvenciához tartozó readeket jelenti. Ezt követően a contigok között BLAST programmal keresünk olyanokat, melyek megegyeztek az NCBI GenBank adatbázisában található növényi gazdát fertőző vírusok referencia genomjaival. Az elemzés során egy találati listát kaptunk, mely tartalmazta azokat a vírusokat vagy rokon vírusokat,

melyek nagy valószínűséggel jelen lehetnek a mintánkban. Amennyiben pedig előzetesen vagy a BLAST algoritmussal végrehajtott illesztés során felmerült olyan vírus, amiről feltételezzük, hogy benne lehet, akkor a konkrét vírus referencia genomjára illesztjük a trimmelt szekvenciákat. Ilyenkor láthatóvá válik, hogy a vírusnak mely régióra illeszkednek inkább az olvasataink, és ez jelzés értékű lehet arra, hogy a laboratóriumi visszaigazolás során hova tervezzünk a PCR reakcióban használt primereket.

A vírus jelenlétét azonban nem elég a bioinformatikai eredmények alapján azonosítani, ezért a laboratóriumi módszerekkel is szükséges visszaigazolni azt, ehhez viszont vírus specifikus primerekre van szükség.

3 Bogyós gyümölcsöket fertőző vírusok vizsgálata áfonyában (Saját kísérlet)

A dolgozatomban a bogyós gyümölcsöket fertőző vírusok jelenlétét vizsgáltam meg egy vírusfertőzés tüneteit mutató áfonya mintában. Kísérleteim kezdetén az áfonya (*Vaccinium myrtillus*) leveleinek RNS kivonatából készült kis RNS könyvtár már elkészült, szekvenálása Illumina platformon már megtörtént. Én a szekvenálás eredményeinek bioinformatikai elemzését végeztem el, majd a mintában feltételezhetően meglévő vírusok tényleges meglétét vizsgáltam molekuláris biológiai módszerekkel.

Munkámhoz a Qiagen CLC Bioinformatics Workbench (CLC) bioinformatikai elemző programját használtam. A programban használt bioinformatikai lépések igen különbözőek lehetnek attól függően, hogy mire is keressük a választ, az ilyen bioinformatikai elemzések sorrendjét pipeline-nak nevezzük.

3.1 Anyagok és módszerek

A Qiagen CLC Bioinformatics Workbench programba importáltam a szekvenálás során kapott readeket, majd elemeztem az adatbázisban megtalálható növényi vírusok potenciális jelenlétét. Eredményül egy listát kaptam a mintában feltételezhetően megtalálható vírusokról. Ezeknek a jelenlétét szerettem volna visszaigazolni hagyományos kísérleti módszerekkel.

A vírus kimutatásához szükséges RT-PCR reakcióhoz vírus specifikus primereket terveztem a kis RNS olvasataink és a NCBI adatbankban hozzáférhető szekvenciák alapján. Az RT-PCR reakcióval való amplifikáláshoz a BCCV-1 vírus pozitív szálú RNS-ét át kell írunk cDNS-re. A 2. táblázat alapján reakciókeveréket mértünk össze, így a tisztított RNS mintákból a koncentrációjuk függvényében 500 ng-ot használtunk, és ezt steril, nagy tisztaságú milliQ vízzel (mQ) egészítettünk ki 2,75 µl-re. Utána ehhez hozzáadtunk 0,25 µl random primert, így a keverék végtérfogata 3 µl. Az RNS mintákat 5 percig 65 °C-on denaturáltuk, és ezt követően legalább 5 percre jégre helyeztük.

2. táblázat: cDNS szintézis

Felirat	Templát	Koncentráció (µg/ml)	Mennyiség (ml)	mQ	Primer
NO22/1	M311/1	457,6	1,1	1,65	0,25
NO22/2	M311/2	289,9	1,7	1,05	0,25
NO22/3	M311/3	638,6	0,8	1,95	0,25

Reverz transzkripciónál a denaturált mintáinkat összemértük az alábbi egy reakciókeverékre vonatkozó eleggyel (3. táblázat), aminek így a végtérfogata 5 µl. Ezt követően a mintákat termosztátba helyeztük a következő protokoll szerint (4. táblázat):

3. *táblázat: reverz transzkripció reakciókeveréke*

5x reakciópuffer	1 µl
10 mM dNTP mix	0,5 µl
Ribolock (RN-áz inhibitor)	0,25 µl
RevertAid reverz transzkriptáz ezim	0,25 µl

4. *táblázat: reverz transzkripció protokollja*

25 °C	5 perc
42 °C	60 perc
45 °C	10 perc
70 °C	5 perc

Az így kapott cDNS-eseket 10-szeresen hígítottuk, és a további PCR reakcióban templátként használtuk. A cDNS-eket minőségi ellenőrzésnek vetettük alá, amit aktin-tesztel végeztünk. Az aktin gén a sejtekben mindig aktív, így az aktin mRNS-e állandóan nagy mennyiségben jelen van. Sikeres reverz transzkripciónál minden mRNS-ről – vagyis mind a vírus, mind a növény mRNS-éről, így az aktin mRNS-ről – szintetizálódnak cDNS szálak. Emiatt pedig az aktin mRNS sikeresen használható a cDNS-ek minőségellenőrzésére. A minőségellenőrzést pedig aktin specifikus primerekkel végeztük, az 5. és 6. táblázat PCR reakcióelegye és protokollja szerint:

5. *táblázat: aktin PCR reakcióelegye*

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

6. táblázat: aktin PCR protokollja

98 °C	30 másodperc	} 35x
98 °C	10 másodperc	
55 °C	10 másodperc	
70 °C	20 másodperc	
70 °C	1 perc	

A PCR reakció sikerességét pedig 1,2%-os agaróz gél elektroforézissel vizsgáltam.

A vírus kimutatásához szükséges primerekhez anellációs hőmérséklet optimalizálása után a cDNS-ekkel elvégeztük a vírusspecifikus PCR reakciót (7. és 8. táblázat):

7. táblázat: vírusspecifikus PCR reakciókeveréke

cDNS templát	0,3 µl 10xRT
10 µM BCCV_13885F (forward) primer	1,5 µl
10 µM BCCV_15917R (reverz) primer	1,5 µl
5x Q5 puffer	6 µl
mQ víz	17,1 µl
10mM dNTP mix	0,6 µl
Q5 Hot start DNS polimeráz enzim	0,3 µl

8. táblázat: vírusspecifikus PCR protokollja

98 °C	30 másodperc	} 35x
98 °C	10 másodperc	
51 °C	30 másodperc	
72 °C	1 perc 40 másodperc	
72 °C	2 perc	

A PCR reakció sikerességét ugyancsak 1,2%-os agaróz gélen történő elválasztással ellenőriztem. A PCR reakció végén akkora termékek keletkezését várjuk, mint amekkora a primerek által amplifikált szakasz, így a mi esetünkben ez 2032 bázispár hosszúságú szakasz.

Az agaróz gélbe etidium-bromidot (EtBr) kevertünk bele a gél megöntése előtt, így a futtatás során és után UV fényben a PCR termékek láthatóvá tehetőek. Az UV fényvel láthatóvá tett PCR termékeket kivágtuk a gélből, majd pedig kitisztítottuk azokat a GeneJET Gel

Extraction Kit (Thermo Scientific) segítségével és annak protokollja szerint. A tisztítás eredményességét 1,2%-os agaróz gélen való futtatással ellenőriztük.

PCR termék ligálása során a PCR terméket összemértük ligáz enzimmal, az alábbi reakciómix szerint, majd ezt követően inkubálni hagytuk (9. táblázat).

9. táblázat: PCR termék ligálási reakcióelegye

2x reakció puffer	5 µl
pJET 1,2 plasmid	0,5 µl
Ligáz	0,5 µl
PCR termék	4 µl

Az inkubálás szobahőmérsékleten minimum 5 perc, de általában 20 perc.

A ligálást követően a termékünk felszaporításához baktériumsejtet kellett transzformálnunk. Ilyenkor a ligátumra kompetens sejteket mérünk, majd hűsokkoljuk a baktériumokat, aminek következtében a PCR terméket könnyebben fel tudják venni. A sejteket ezután rázatás során regenerálódni hagyjuk, és utána agarlemezeken szélesztjük ezeket. Egy éjszakán át 37°C-os termosztátba rakjuk. Másnap a kinőtt telepeket folyékony táptalajba oltottuk. Ezeket a csöveket is egy éjszakán át 37 °C-on rázattuk.

A plazmidokat a NucleoSpin Plasmid kit segítségével és protokollja alapján tisztítottuk, ehhez készítettük el a reakciókeveréket, aminek a végtérfogata 8 µl és ehhez hozzáadjuk a 2 µl emésztett plazmidot. A tiszta plazmidokat restriktációs enzimekkel emésztettük, XhoI XbaI-gyel, hogy a ligálás sikerességét ellenőrizzük (10. táblázat).

10. Táblázat: a plazmid tisztítás reakcióelegye

10x tango puffer	2 µl
X ho I	0,2 µl
X ba I	0,4 µl
mQ	5,4 µl

3.2 Eredmények

A CLC Genomics Workbench programmal végzett kis RNS könyvtár elemzés hajtottam végre. Ez alatt a kis RNS readeket trimmeltem, vagyis a szekvenálás előtt illesztett – és a szekvenálás során a különböző könyvtárak elkülönítésére szolgáló szekvenciákat az RNS-ek végein – adaptereket eltávolítottam. A trimmelt olvasatokból contigokat építettem, és ezeket a BLAST program használatával az NCBI adatbázis referencia genomjaihoz illesztett, ami

alapján egy víruslistát kaptunk (11. táblázat). A vírus találati listából leolvasható, hogy a kis RNS szekvenciáinkból generál contigjaink egyes vírusokra milyen mértékben illeszkedtek. Ebből a találati listából a 10^{-5} kisebb E-értékkel rendelkező és szignifikáns találatokat mentettem le.

11. Táblázat: az áfonya mintánkban legnagyobb valószínűséggel megtalálható vírusok ismétlődő és nem ismétlődő readjeinek, valamint az ebből épített contigok száma

	NC_040834	NC_022072	NC_029567	NC_003138
	Blackcurrant-associated closterovirus 1	Blackberry vein banding associated virus	Raspberry leaf blotch virus	Blueberry red ringspot virus
	BCCV-1	BVBaV	RLBV	BRRV
nem redundáns	908	919	503	789
redundáns	1452	1509	855	1136
contig	1	1	1	1

Ezt követően pedig ezek közül is leszűkítettünk egy vírusra, aminek jelenlétét laboratóriumi kísérletekkel igyekeztünk visszaigazolni. Ez a Blackcurrant-associated Closterovirus 1 (BCCV-1) vírus volt.

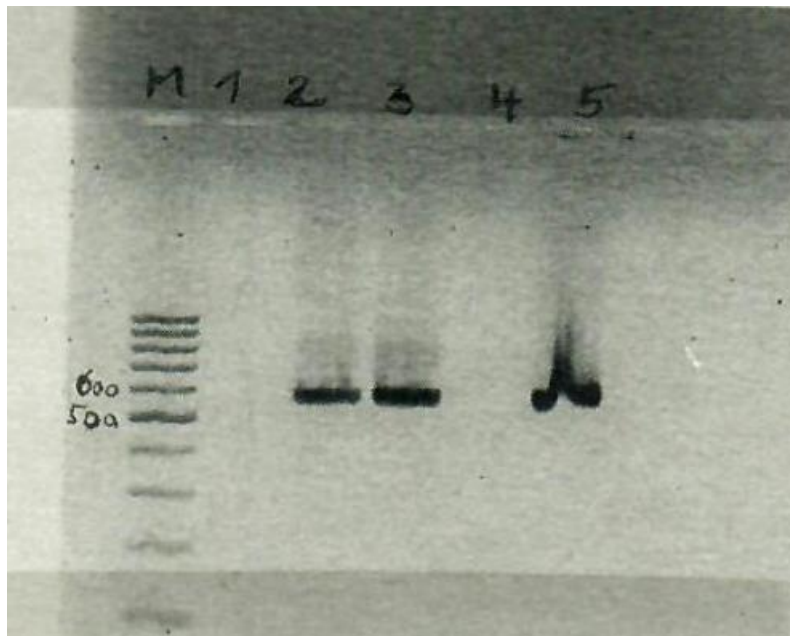
A vírus leíró cikkben Zheng és munkatársai a PCR vizsgálatokhoz a köpenyfehérjére (coat protein - CP) terveztek primereket: pCuClostF12 (14277-14236 nukleotid) és pCuClostR12 (15634-15653 nukleotid). A mi mintáinkban ezek a régiók nem voltak kis RNS-sel lefedve. Ezért a köpenyfehérjét kódoló régióban, a mi mintáinkkal jobban egyező és hosszabb szekvenciákat jelöltük ki, és azokra terveztük a vírus PCR kimutatásához primereket (12. táblázat).

12. táblázat: A tervezett primerek jellemzői, a primer hossza 2032 bázispár

Primer neve	Primer szekvencia (5'-3')	Pozíciója a referencia genomon	Amplifikált régió funkciója	Referencia genom
BCCV_13885F	CAGAAGTATTCAAKACGAAAG	13885-13905	CPm, CP, p17	NC_040834
BCCV_15917R	TCMGGAGTTGCATTGTTGGAYG	15917-15897		

A RT-PCR reakcióhoz a BCCV-1 pozitív szálú RNS-ét cDNS-re át kell írunk, ezt pedig a 3-as és a 4-es táblázatban leírt protokoll alapján hajtottuk végre.

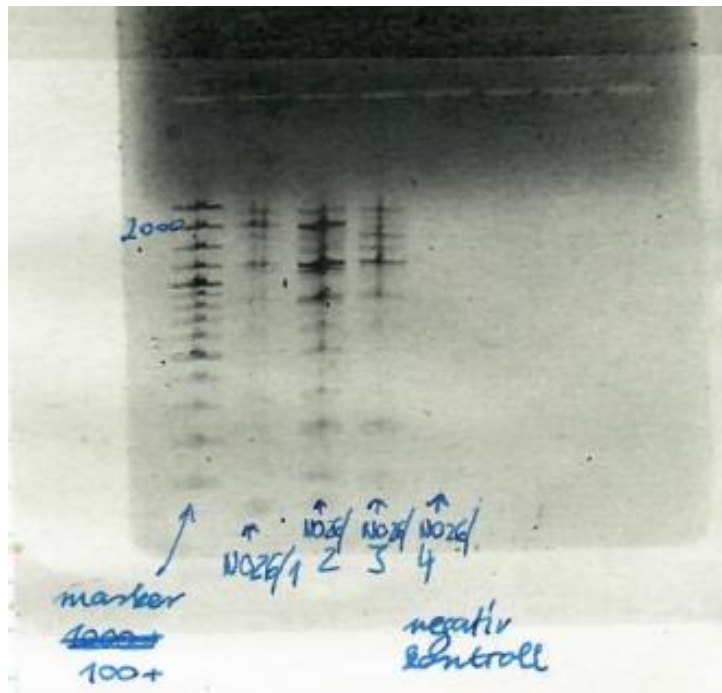
A keletkezett cDNS-ek minőségellenőrzésére használt aktin specifikus primereket összemértem a 10 szerezre hígított cDNS-sel és a PCR reakcióeleggyel a 5-ös táblázat szerint, majd a 6-os táblázat protokollja szerint végeztem el a PCR reakciót. PCR terméket EtBr tartalmú, 1,2%-os agaróz gélen választottam el (8. ábra).



8. ábra: aktin primer teszt specifikus PCR termékek gélképe

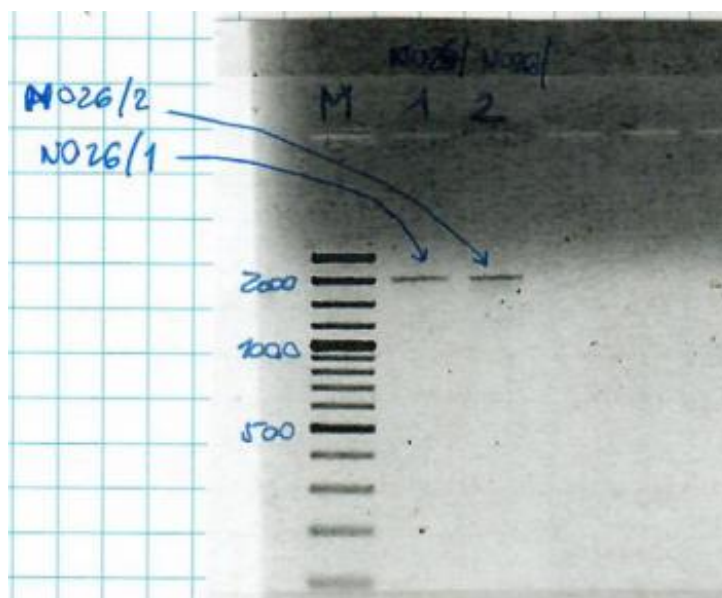
Az 8. ábra mutatja, hogy a reverz transzkripció megfelelően, melléktermékek nélkül ment végbe, ugyan 4. mintában nem sikerült felszaporítani a kívánt DNS szakaszt. A mintákban 600 bázispár nagyságú termékek keletkeztek.

A vírus kimutatásához végrehajtottuk a vírusspecifikus PCR-t, amihez a reakcióelegyet a 7. táblázatban leírtak szerint összekevertük és a 8. táblázatban protokollja alapján végeztük. A tervezett primerek nagyjából 2000 bázispár hosszúságú szakaszt fednek le a BCCV-1 genomján.



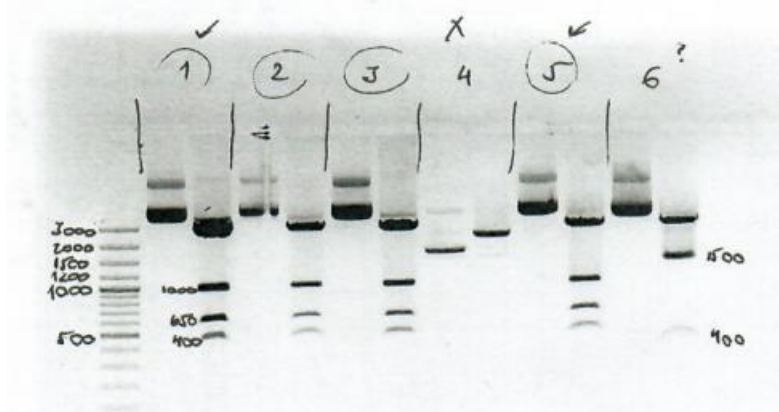
9. ábra: a tervezett primerekkel végrehajtott PCR reakció termékeinek agaróz gélen történő futtatási képe

A 9. ábrán látható, hogy az első és a második mintákban jelen volt a kívánt DNS szakasz 2000 bázis körül, azonban a harmadik mintában már nem találtuk. Ezért az 1-es és a 2-es minta PCR termékeit EtBr tartalmú 1,2%-os agaróz gélen futtattuk (10. ábra), majd UV fény segítségével a PCR termékeket kivágtuk a gélből. A GeneJET Gel Extraction kit segítségével tisztítottuk. A futtatás után kitisztítottuk a PCR termékeket.



10. ábra: A PCR termékek EtBr tartalmú gélen való futtatása a PCR termék tisztításához

A transzformálás után a plazmidokat XhoI XbaI enzimekkel emésztettük, majd agaróz géltre felváltva vittem fel azokat, először az emésztetlent és utána az emésztettet (11. ábra).



11. ábra: agaróz gélen futtatott emésztetlen és emésztett plazmidok képe

A ligálás eredményeként látható, hogy az 1-es és az 5-ös helyen felvitt minták esetén a klónozás sikeres volt, a PCR terméket sikeresen ligáltuk a plazmidba.

A klónt hagyományos Sanger szekvenálással szekvenáltattuk, amiből kiderült, hogy sajnos nem a vírust, hanem egy endogén áfonya mRNS-t amplifikáltunk. Ennek elemzése jelenleg is folyamatban van.

4 Konklúzió

A bogyós gyümölcsök az elmúlt évtizedekben egyre kedveltebbek lettek a fogyasztók körében, így érthető módon a termesztésük mértéke is megnőtt. Azonban ezzel együtt jár az is, hogy a gazdasági jelentősége ezen növényeknek nagyobb, és emiatt jobban oda kell figyelniük, hogy ne fertőződjenek meg különböző vírusokkal a termények.

Ehhez ismerünk kell az ezen növényeket fertőző különböző vírusokat, melyeket különböző módszerekkel lehet vizsgálni és azonosítani.

A nagyáteresztőképességű szekvenálás (HTS) egy forradalmi módszer, ami elősegíti a vírusok azonosítását, így a növényi vírusdiagnosztikában is elengedhetetlen szerepe lett. Azonban mivel még egy friss módszer, ezért nincsenek kidolgozott protokollok sem a HTS módszerekre, sem az azt követő bioinformatikai elemzésekre. Ez pedig megköveteli, hogy különböző módszereket kipróbáljunk ki, hogy a legalkalmasabbat megtaláljuk, viszont a tradicionális laboratóriumi módszerekkel történő visszaigazolást nem tudjuk elhagyni.

Összefoglalás

A bogyós gyümölcsök egyre növekvő kereslete, és így mennyisége és gazdasági jelentősége miatt fontos velük foglalkoznunk. Mivel a növényeket igen sokféle vírus fertőzheti és fertőzi meg, így a növénynek és szaporítóanyagának vírusmentessége kiemelt fontosságú. Ennek meghatározása pedig kiválóan alkalmasak a nagyátersztőképességű szekvenálási (HTS) módszerek, mivel ezekkel mind a már ismert vírusokat, mind a még ismeretlen, le nem írt vírusokat detektálni tudjuk.

A HTS módszerek különböző típusainak remekül használhatóak vírusdiagnosztikára. A típusok abban különböznek el, hogy a szekvenálás alapjául milyen nukleinsavat használnak, aminek következtében a minták előkészítése többféle módon mehet végbe. A megfelelő HTS technika kiválasztása függ attól, hogy milyen nukleinsav kivonatokat keresünk és kívánunk alkalmazni. A növényi vírusoknál használják a kis RNS, a dsDNS, a TNA és a VANA módszereket, a VANA-nál a virionokból kivont RNS-t szekvenáljuk, míg a másik három módszernél a vírus RNS-t vagy DNS-t.

A kutatásom folyamán az NAIK-MBK Diagnosztikai csoportja által korábban kis RNS HTS-sel szekvenált mintában vizsgáltam a vírusfertőzöttséget. A bioinformatikai elemzés során a mintában feltételezetten megtalálható vírust, a BCCV-1-et igyekeztem visszaigazolni hagyományos laboratóriumi RT-PCR kísérlettel.

A bioinformatikai elemzés során a rendelkezésemre álló könyvtárakban a szekvenált readekból contigokat építettem, majd ezeket az NCBI GenBank adatbázisában elhelyezett referencia szekvenciákkal hasonlítottam össze BLAST algoritmussal. Az illesztés alapján a mintánkat valószínűsíthetően megfertőző vírusra, a BCCV-1-re terveztem primert. A BCCV-1 jelenlétét vírusspecifikus RT-PCR-rel ellenőriztem, de sajnos a kapott jel egy endogén mRNS-ről keletkezett. Eredményeim rámutatnak a kisRNS HTS módszer azon sajátosságára, hogy a szekvenálási adatok során kapott eredményeket minden esetben szükséges kísérletesen is igazolni.

Summary

Due to the growing need of berry fruits commercially, the quantity needed, and the economic importance of the fruit has risen and continues to rise, therefore it is necessary to research these them. These plants can be affected by many different viruses and it is common for the plants to have diseases, so it is significant that both the plants and it's reproductive material. High-throughput sequencing (HTS) is an excellent tool to determine whether these crops potentially have virus diseases since the HTS method is capable of detecting both known and unknown virus sequences.

The different types of HTS methods are suitable for virus diagnostics. What differentiates these techniques is the sort of nucleic acid used as the base of the sequencing, hence the procedure of the sample preparations will have changes compared to one another. We choose which HTS method based on the kind of nucleic acid we would like to use and/or look for. For plant viruses, siRNA, dsDNA, TNA, and VANA are used, as well. With VANA the RNA extracted virions are sequenced, meanwhile for the other three methods the viruses' RNA or DNA are used.

During my research, I examined a sample, which was previously sequenced by siRNA technique by The Diagnostics Research Group of NAIK-MBK. During the bioinformatic analysis we have found a virus, the BCCV-1, which seemed to be in our sample, possibly, thus we planned RT-PCR reaction tests to confirm our assumption.

In the course of the bioinformatic analysis, I used the reads to build contigs from them in the existing libraries and with the BLAST algorithm I fitted the contig to plant virus genomes from the NCBI GenBank. I choose a virus, the BCCV-1, which was likely to be a virus that infected our sample according to the similarities, and constructed primers for the virus. I used the virus specific primers to perform RT-PCR, which failed to detect the virus. My results highlight the importance of validation processes during sRNA HTS virus diagnostics.

Hivatkozásjegyzék

Baltimore classification ~ ViralZone (2021) SIB Swiss Institute og Bioinformatics.
Elérhető: <https://viralzone.expasy.org/254> (Elérés: 2021. május 10.).

Baltimore, D. (1971) *Expression of Animal Virus Genomes, BACTERIOLOGICAL REVIEWS*. Elérhető:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC378387/pdf/bactrev00075-0012.pdf> (Elérés: 2021. január 30.).

Behjati, S. és Tarpey, P. S. (2013) „What is next generation sequencing?”, (98), o. 236–238. doi: 10.1136/archdischild-2013-304340.

Blackberry (Rubus spp.)-Virus Diseases | Pacific Northwest Pest Management Handbooks (évszám nélkül). Elérhető: <https://pnwhandbooks.org/node/2300/print> (Elérés: 2020. május 15.).

Decker, C. J. és mtsai. (2019) „DsRNA-seq: Identification of viral infection by purifying and sequencing dsRNA”, *Viruses*. MDPI AG, 11(10). doi: 10.3390/v11100943.

Fuchs, M. és mtsai. (2020) „ICTV virus taxonomy profile: Closteroviridae”, *Journal of General Virology*. Microbiology Society, 101(4), o. 364–365. doi: 10.1099/jgv.0.001397.

García, Y. G., Montoya, M. M. és 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*. Taylor and Francis Ltd., 53(9–10), o. 395–413. doi: 10.1080/03235408.2020.1748368.

Heather, J. M. és Chain, B. (2016) „The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA”, *Genomics*. Academic Press Inc., o. 1–8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003.

Horváth, J. és Gáborjányi, R. (1999) *Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek*. Mezőgazda Kiadó.

Hou, W., Li, S. és Massart, S. (2020) „Is There a “Biological Desert” With the Discovery of New Plant Viruses? A Retrospective Analysis for New Fruit Tree Viruses”, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fmicb.2020.592816.

Hull, R. (2013) *Plant Virology*. 5th kiad. Academic Press. doi:

<https://doi.org/10.1016/C2010-0-64974-1>.

Illumina | Sequencing and array-based solutions for genetic research (2021).

Elérhető: <https://www.illumina.com/> (Elérés: 2021. május 7.).

Kukurba, K. R. és Montgomery, S. B. (2015) „RNA sequencing and analysis”, *Cold Spring Harbor Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015(11), o. 951–969. doi: 10.1101/pdb.top084970.

Maclot, F. és mtsai. (2020) „Illuminating an Ecological Blackbox: Using High Throughput Sequencing to Characterize the Plant Virome Across Scales”, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fmicb.2020.578064.

Maliogka, V. I. és mtsai. (2018) „Recent advances on detection and characterization of fruit tree viruses using high-throughput sequencing technologies”, *Viruses*. MDPI AG. doi: 10.3390/v10080436.

Marine, R. L. és mtsai. (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*. Elsevier B.V., 280, o. 113865. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113865.

Martin, R. R. és mtsai. (2013) „Viruses and virus diseases of Rubus”, *Plant Disease*. The American Phytopathological Society , 97(2), o. 168–182. doi: 10.1094/PDIS-04-12-0362-FE.

Martin, R. R., Polashock, J. J. és Tzanetakis, I. E. (2012) „New and emerging viruses of blueberry and cranberry”, *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), o. 2831–2852. doi: 10.3390/v4112831.

Martin, R. R. és Tzanetakis, I. E. (2015) „Control of virus diseases of berry crops”, in *Advances in Virus Research*. Academic Press Inc., o. 271–309. doi: 10.1016/bs.aivir.2014.10.003.

Pscheidt, J. W. és Ocamb, C. . (2021) *Blueberry (Vaccinium corymbosum)-Virus Diseases | Pacific Northwest Pest Management Handbooks, Pacific Northwest Plant Disease Management Handbook*. Elérhető: <https://pnwhandbooks.org/node/2325/print> (Elérés: 2021. május 16.).

Salk, J. J. és Kennedy, S. R. (2020) „Next-Generation Genotoxicology: Using Modern

Sequencing Technologies to Assess Somatic Mutagenesis and Cancer Risk”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*. John Wiley and Sons Inc., o. 135–151. doi: 10.1002/em.22342.

Sanger, F., Nicklen, S. és Coulson, A. R. (1977) „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 74(12), o. 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.

Steger, G. és Riesner, D. (2018) „Viroid research and its significance for RNA technology and basic biochemistry”, *Nucleic Acids Research*, 46, o. 10563–10576. doi: 10.1093/nar/gky903.

Thekke-Veetil, T. és mtsai. (2013) „Molecular characterization and population structure of blackberry vein banding associated virus, new ampelovirus associated with yellow vein disease”, *Virus Research*. Virus Res, 178(2), o. 234–240. doi: 10.1016/j.virusres.2013.09.039.

Villamor, D. E. V. és mtsai. (2019) „High Throughput Sequencing For Plant Virus Detection and Discovery”, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0257-RVW>. Phytopathology. doi: 10.1094/PHYTO-07-18-0257-RVW.

Zakaria, Y., Gaafar, A. és Id, Z. (2020) „Comparative study on three viral enrichment approaches based on RNA extraction for plant virus/viroid detection using high-throughput sequencing”. doi: 10.1371/journal.pone.0237951.

Zheng, L. és mtsai. (2018) „Molecular characterization and detection of a new closterovirus identified from blackcurrant by high-throughput sequencing”, *Virus Genes*. Springer New York LLC, 54(6), o. 828–832. doi: 10.1007/s11262-018-1598-4.

NYILATKOZAT

Név: Péli Noémi

ELTE Természettudományi Kar, szak: biológia alapszak

NEPTUN azonosító: D3O7VL

Szakdolgozat címe:

Bogyós gyümölcsök vírusfertőzöttségének vizsgálata nagy-áteresztőképességű szekvenálással

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

Budapest, 2020.05.12.



a hallgató aláírása

Köszönetnyilvánítás

Meg szeretném köszönni Várallyay Évának, témavezetőmnek, hogy tapasztalatával, szakértelmével, tudásával és tanácsaival, valamint türelmével és biztatásával támogatott. Szeretném megköszönni, hogy a kutatásomhoz elengedhetetlen feltételeket biztosította és támogatta a dolgozatom elkészítését.

Szeretnék köszönetet mondani Demián Emesének mind a bioinformatikai mind a laborban végzett munkálatok során nyújtott segítségéért, sokat tanulhattam tőle. Valamint köszönöm a MBK-NAIK Molekuláris Növénykórtan Csoport többi dolgozójának is támogatásukat.

Köszönöm Knapp G. Dánielnek, hogy elvállalta a belső konzulens szerepkörét, és hasznos tanácsaival segítette a dolgozatomat.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családom és barátaim folyamatos, kitartó szeretetét és támogatását. Köszönöm, hogy tanulmányaim alatt végig megértők voltak.