

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Magyar szőlőültetvények vírusdiagnosztikája új, nagyérzékenységű diagnosztikai
módszerrel és kajszi ültetvények fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

JAKSA-CZOTTER NIKOLETTA

Festetics Doktori Iskola

Pannon Egyetem

Georgikon Kar

Témavezetők

Dr. Várallyay Éva

Dr. Kocsis László

Keszthely

2018

**MAGYAR SZŐLŐÜLTETVÉNYEK VÍRUSDIAGNOSZTIKÁJA ÚJ,
NAGYÉRZÉKENYSÉGŰ DIAGNOSZTIKAI MÓDSZERREL ÉS KAJSZI
ÜLTETVÉNYEK FITOPLAZMA FERTŐZÖTTségÉNEK VIZSGÁLATA**

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:

JAKSA-CZOTTER NIKOLETTA

Készült a Pannon Egyetem Festetics Doktori Iskolája keretében

Témavezetők:

Dr. Várallyay Éva

Elfogadásra javasolom (igen / nem)

.....

Dr. Várallyay Éva

Dr. Kocsis László

Elfogadásra javasolom (igen / nem)

.....

Dr. Kocsis László

A jelölt a doktori szigorlaton%-ot ért el.

Az értekezést bírálóként elfogadásra javasolom:

Bíráló neve:igen /nem

.....

Bíráló neve:igen /nem

.....

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján %-ot ért el.

Készthely,

.....

Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....

Az EDHT elnöke

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	- 6 -
Kivonat	- 9 -
Abstract	- 10 -
Abstrakt.....	- 11 -
1. Bevezetés és célkitűzés.....	- 12 -
2. Irodalmi áttekintés	- 14 -
2.1. A szőlő vírusainak és diagnosztikai módszereik áttekintése	- 14 -
2.1.1. A szőlő és termesztésének gazdasági jelentősége	- 14 -
2.1.2. Szőlőt fertőző RNS vírusok és előfordulásuk Magyarországon.....	- 15 -
2.1.3. Növényi vírusok és fertőzésük molekuláris háttere.....	- 21 -
2.1.4. RNS csendesítés, egy hatékony növényi védekezési mód vírusokkal szemben.....	- 22 -
2.1.5. Az antivirális géncsökkentés.....	- 23 -
2.1.6. Szőlő esetében használt vírusdiagnosztikai módszerek	- 24 -
2.1.7. Új generációs szekvenálási technológiák és alkalmazásuk	- 28 -
2.1.8. NGS alkalmazása a szőlő vírus diagnosztikában	- 31 -
2.2. Kajszi fitoplazmás megbetegedése Magyarországon.....	- 33 -
2.2.1. Fitoplazmák általános jellemzése	- 33 -
2.2.2. Fitoplazmák kimutatásának lehetőségei	- 35 -
2.2.3. 'Candidatus Phytoplasma prunorum', mint a Csonthéjasok európai sárgulása betegség kórokozója hazánkban.....	- 37 -
3. Anyag és módszer	- 40 -
3.1.Vírus fertőzés kimutatása és meghatározása szőlőben	- 40 -
3.1.1. Növényi minta gyűjtése.....	- 40 -
3.1.2. RNS kivonás.....	- 42 -
3.1.3. RNS keverék (pool) összeállítása.....	- 43 -
3.1.4. Kis RNS könyvtár készítés és szekvenálás	- 43 -
3.1.5. Bioinformatikai adatfeldolgozás	- 43 -
3.1.6. Víruskimutatás RT-PCR-el	- 45 -
3.1.7. PCR termék tisztítása és szekvenálása	- 47 -
3.1.8. Klónozás.....	- 48 -
3.1.9. Northern blot analízis	- 49 -
3.2. Fitoplazma kimutatás és meghatározás kajszi ültetvényben	- 51 -
3.2.1. Növényi minta gyűjtése.....	- 51 -
3.2.2. DNS kivonás	- 51 -
3.2.3. Fitoplazma kimutatás polimeráz láncreakcióval	- 52 -
3.2.4. PCR termék tisztítása és szekvenálása	- 53 -
4. Eredmények és megvitatásuk	- 54 -
4.1. Kis RNS NGS-en alapuló vírusdiagnosztikai eljárás technológiai leírása.....	- 54 -
4.2. Szőlő ültetvények vírushordozósságának felmérése kis RNS alapú új generációs szekvenálással (NGS).....	- 55 -
4.2.1. A szekvenálás és minőségének meghatározása.....	- 55 -
4.2.2. Vírus eredetű kis RNS-ek méreteloszlása	- 56 -

4.2.3. Virális kis RNS szekvenciák eredete a vizsgált 18 szőlő ültetvényben	- 58 -
4.2.4. Szekvenálási eredmények validálása vírus specifikus RT-PCR reakcióval	- 59 -
4.2.5. Kis RNS NGS, bioinformatika és molekuláris biológiai módszerek együttes kombinációjával azonosított szőlő vírusok	- 61 -
4.3. Fitoplazma fertőzöttség vizsgálata kajszi ültetvényekben	- 87 -
4.3.1. Mintavétel és DNS izolálás levélszövetből	- 87 -
4.3.2. 16SrX csoport fitoplazmáinak meghatározása nested-PCR-el.....	- 87 -
4.3.2.1. Érdi Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet mintáinak tesztelése	- 88 -
4.3.2.2. Balaton vidéki minták tesztelése	- 92 -
4.3.2.3. Gönci termőtáj mintáinak tesztelése.....	- 93 -
4.3.3. Fitoplazma izolátumok szekvencia analízise.....	- 94 -
5. Következtetések, javaslatok.....	- 96 -
6. Összefoglalás	- 99 -
7. Új tudományos eredmények	- 101 -
8. New scientific results	- 102 -
9. Irodalomjegyzék	- 103 -
11. Köszönetnyilvánítás.....	- 125 -
12. Mellékletek	- 126 -

Rövidítések jegyzéke

AGO	- Argonauta fehérje
AGVd	- Australien grapevine viroid - Ausztrál szőlő viroid
AMV	- Alfalfa mosaic virus - Lucerna mozaik vírus
AP	- Apple Proliferation – Almafa boszorkányseprűsödése
ArMV	- Arabis mosaic virus - Arabis mozaik vírus
ATP	- adenzin- 5'- trifoszfát
CEVd	- Citrus exocortis viroid - Citrus kéreg rendellenesség viroid
CP	- coat protein - köpenyfehérje
CRT	- ciklikus reverzibilis terminátor
DAS-ELISA	- double antibody sandwich - dupla ellenanyag szendvics
DCL	- Dicer-szerű enzim
DNS	- dezoxiribonukleinsav
dsRNS	- kétszálú (double strand) RNS
ELISA	- Enzyme-linked immunosorbent assay - Enzim-kapcsolt ellenanyag vizsgálat
ESFY	- European stone fruit yellows - Csonthéjasok európai sárgulása
GAMaV	- Grapevine asteroid mosaic-associated virus
GCMV	- Grapevine chrome mosaic virus - Szőlő krómmozaik vírus
GFkV	- Grapevine fleck virus - Szőlő foltosodás vírus
GFLV	- Grapevine fanleaf virus - Szőlő fertőző leromlás vírus
GFLV-VB	- Grapevine fanleaf virus-vein banding strain - Szőlő fertőző leromlás érmenti szalagosodás törzse
GFLV-YM	- Grapevine fanleaf virus-yellow mosaic strain - Szőlő fertőző leromlás vírus Sárga mozaik törzse
GLD	- Grapevine leafroll disease - Szőlő levélsodródás betegség
GLMD	- Grapevine Leaf Mottling and Deformation - Szőlő levélfoltosodás deformáció betegség
GLPV	- Grapevine line pattern virus - Szőlő vonalas mintázottság vírus

GLRaV 1, 2, 3	- Grapevine leafroll-associated virus 1,2,3 - Szőlő levélsodródás vírus 1,2,3
GLVd	- Grapevine Latent viroid
GPGV	- Grapevine Pinot gris virus - Szőlő Pinot gris vírus
GRBaV	- Grapevine red-blotch associated virus
GRGV	- Grapevine redglobe virus - Szőlő redglobe vírus
GRSPaV	- Grapevine rupestris stem pitting associated virus - Szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus
GRVfV	- Grapevine rupestris vein feathering virus
GSV	- Grapevine satellite virus - Szőlő szatellit vírus
GSyV1	- Grapevine Syrah virus1 - Szőlő Syrah vírus1
GVA	- Grapevine virus A - Szőlő A vírus
GVB	- Grapevine virus B - Szőlő B vírus
GVCV	- Grapevine vein clearing virus
GYSVd-1-2	- Grapevine yellow speckle viroid 1,2 -Szőlő sárga foltosság viroid 1,2
<i>hflB</i>	- ATP függő cink proteázokat kódoló gén
HSP70	- 70 kDa hősokk fehérje
HSVd	- Hop stunt viroid - Komló törpülés viroid
HTP	- High-Throughput - nagy áteresztőképességű
<i>imp</i>	- immunodomináns fehérjét kódoló gén
LAMP	- Loop-mediated isothermal amplification
MLO	- Mycoplasma-like organism - Mikoplazma-szerű szervezet
MP	- Movement protein - mozgási fehérje
NGS	- Next Generation Sequencing - Új Generációs Szekvenálás
nt	- nukleotid
ORF	- Open Reading Frame – nyílt leolvasási szakasz
PCR	- Polymerase chain reaction - Polimeráz-láncreakció
PD	- Pear decline - Körte leromlás
PDTW	- Pear decline Taiwan - Körte leromlás Taiwan törzse

PYLR	- Peach yellow leaf roll - Őszibarack sárgulásos levélsodródása
<i>rDNS</i>	- riboszomális RNS-t kódoló DNS
RDRP	- RNS-függő RNS-polimeráz, replikáz
RFLP	- Restriction Fragment Length Polymorphism - Restrikciós fragment hossz polimorfizmus
RISC	- RNA induced silencing complex - RNS indukálta géncsendesítési enzimkomplex
RNS	- ribonukleinsav
<i>rRNS</i>	- riboszomális RNS
RT-PCR	- Reverz-transzkripció polimeráz láncreakció
<i>secY</i>	- fehérje transzlokáz gén
siRNS	- small interfering RNA – kis interferáló RNS
SpaWB	- Spartium witches' broom - Jeneszter boszorkányseprűsödése
SSCP	- Single Strand Conformation Polymorphism - Egyszálú konformációs polimorfizmus
ssRNS	- egyszálú RNS (single-strand)
TBRV	- Tomato black ring virus - Paradicsom fekete gyűrűs vírus
TGS	- transzkripcionális géncsendesítés
<i>tuf</i>	- TU elongációs faktort kódoló gén
VANA	-Virion-associated nucleinsav vírus részecskékből tisztított nukleinsav
vsRNS	- virális eredetű siRNS
Vv-DCL	- <i>Vitis vinifera</i> Dicer-szerű enzim
YS	- Yellow speckle - sárga foltosság

Kivonat

Magyar szőlőültetvények vírusdiagnosztikája új, nagyérzékenységű diagnosztikai módszerrel és kajszi ültetvények fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

A disszertáció első része a szőlő ültetvények vírus fertőzöttségét hatékonyan kimutatni képes nagy érzékenységű diagnosztikai módszer, a kis RNS NGS kidolgozását mutatja be. A módszerrel hazánk szőlőültetvényeinek vírus fertőzöttségét mértük fel és új virális kórokozókat azonosítottunk. Az új eljárással Magyarország 9 borvidékén, 14 termő szőlőültetvény vírusdiagnosztikája készült el és az eredményeket molekuláris vizsgálatokkal igazoltuk vissza. A rutinszerűen vizsgált virális kórokozók mellett, hazánkban eddig nem leírt vírusok azonosítása is lehetséges a kis RNS alapú diagnosztikai módszerrel. Az azonosított vírus és viroid izolátumok szekvencia adatai elhelyezésre kerültek az NCBI GenBank adatbázisban. Az újonnan megjelenő vírusok széleskörű elterjedtséget mutattak, és az izolátumok filogenetikai elemzése alapján a vírusok szaporítóanyaggal való terjedése feltételezhető. A vizsgálat eredményei szerint az adaptált technikák és bioinformatikai elemzések alkalmasak arra, hogy az adott ültetvényben jelenlevő összes virális kórokozóról pontos képet kapjunk.

A dolgozat második része a csonthéjas ültetvényeken, elsősorban kajszin, komoly problémát okozó csonthéjasok európai sárgulása, fitoplazmás eredetű megbetegedés hátterében álló kórokozó felderítésével foglalkozik. A vizsgálat során Magyarország 5 jelentős kajszi ültetvényén mértük fel a betegséget kiváltó, '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' jelenlétét. A kórokozó jelenlétének igazolásához levélmintákból megfelelő minőségű és mennyiségű DNS-t izoláltunk. A fitoplazma jelenlétét nested-PCR módszerrel univerzális, minden fitoplazma kimutatására alkalmas, illetve a 16SrX fitoplazma csoport elkülönítésre specifikus indítószekvenciák kombinációjával mutattuk ki. Megállapítást nyert, hogy a vizsgált kajszi ültetvényekben a '*Ca. P. prunorum*' jelen van, általánosan elterjedt. Filogenetikai vizsgálatunk szerint, elterjedtségük mögött a nem megfelelő szaporítóanyag anyag felhasználás állhat.

Abstract

Virus diagnostics of Hungarian vineyards by a new, high sensitive diagnostic method and investigation of phytoplasma infection in apricot orchards

The first part of the dissertation presents a high sensitive diagnostic method, virus-derived smallRNA NGS. The procedure was carried out in 14 vineyards from 9 vine-growing region of Hungary, and the results are confirmed by molecular methods. With virus-derived smallRNA NGS could detect not only the viruses tested routinely, but also new ones, which had never been described in Hungary before. The results show that these adapted techniques and bioinformatics analyses can reveal the exact picture of all of the viral pathogens present in the sample. The second part of the dissertation deals with the exploration of the European stone fruit yellows disease, causing serious problems in apricot orchards. The presence of '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' was examined in five apricot orchards in Hungary. Leaf samples were collected and DNA was extracted for nested-PCR based detection. A widespread distribution of '*Ca. P. prunorum*' was found in apricot orchards. According to the detected viruses and '*Ca. P. prunorum*' phylogenetic analysis, inadequate propagating material may be used behind their spread.

Abstrakt

Die Virendiagnostik der ungarischen Weingüter durch eine neue, hochempfindliche diagnostische Methode und die Recherche von Phytoplasmen in Aprikosenplantagen

Der erste Teil dieser Dissertation präsentiert eine hochempfindliche diagnostische Methode - eine viren abgeleitete kleine RNA NGS. In 9 Weinbaugebieten Ungarns wurden 14 Weingüter ausgewählt in welchen diese Prozedur durchgeführt wurde, die Ergebnisse wurden durch molekulare Methoden bestätigt. Mit der viren abgeleiteten kleinen RNA NGS konnten zu den regelmäßig getesteten Viren auch neue Viren - welche zuvor nie in Ungarn beschrieben wurden - entdeckt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass durch diese angepassten Techniken und bioinformatischen Analysen ein gesamtes Bild aller hier getesteten viralen Krankheitserreger geschaffen werden konnte. Der zweite Teil dieser Dissertation beschäftigt sich mit der Erkundung der europäischen Steinobstvergilbung, welche ernstzunehmende Probleme auf Aprikosenplantagen verursacht. Das Vorkommen der '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' wurde in 5 ungarischen Aprikosenplantagen untersucht. Für die Entdeckung durch die geschachtelte PCR wurde DNA aus Blattproben extrahiert. Es wurde eine weite Verbreitung der '*Ca. P. prunorum*' in Aprikosenplantagen festgestellt. Bezugnehmend auf die entdeckten Viren und der '*Ca. P. prunorum*' Analyse kann es sein, dass die Ursache durch ungeeignetes Fortpflanzungsmaterial herbeigeführt wird.

1. Bevezetés és célkitűzés

A fás szárú növények (szőlő, gyümölcs) jelentős gazdasági értéket képviselnek hazánkban. Azonban a növényeket megbetegítő különböző kórokozók, legyenek akár vírusok vagy fitoplazmák, komoly gondot okoznak napjainkban a gyümölcs- és szőlőtermesztésben egyaránt, mivel ellenük nincs kidolgozott növényvédelmi technológia, vagy engedélyezett növényvédőszer. Magyarországon a szőlőtermesztésben a különböző vírus eredetű kártételek, míg a gyümölcstermesztésben a fitoplazma eredetű megbetegedések okoznak jelentős veszteséget a gazdálkodóknak.

A vírus és fitoplazma okozta megbetegedéseknek számos gazdasági következménye lehet: gyenge termésminőség és termésveszteség, a tőkék/fák produktív időszakának rövidülése, fokozott tőkeleromlás, a tőkék/fák élettartamának csökkenése, majd elhalása. A kórokozók által előidézett gazdasági hátrányok felértékeltek a kutatásuk fontosságát, az elmúlt évtizedekben egyre több információra derült fény, e növényi kórokozókról, életmódjukról, terjedésükről. Napjainkban, köszönhetően az országok közötti intenzívebb kereskedelemnek és szaporítóanyag forgalomnak, fennáll a veszélye a Magyarországon eddig még nem ismert, új kórokozók behozatalának és újabb variánsok elterjedésének. Jelenleg a kimutatásukra alkalmazott hagyományos diagnosztikai módszerekhez minden esetben (szerológiai vizsgálat-ELISA, PCR alapú tesztek) szükség van a kórokozó előzetes ismeretére. Sok esetben azonban a vírusok és fitoplazmák gyors evolúciós változása és az egy fajhoz tartozó különböző törzsek változékonyságai miatt, ezek a tesztek akár álnegatív eredményeket is adhatnak, valamint nem alkalmasak az újonnan megjelenő kórokozók kimutatására.

A kórokozók azonosítása és a patogénmentes szaporítóanyag-előállítás során a legnagyobb problémát a megbízható és megfelelő érzékenységgel rendelkező diagnosztikai módszerek hiánya jelenti. A fás szárú növények vírusdiagnosztikája számára az újgenerációs szekvenálási technikák fejlődése és az RNS interferencia folyamatának felderítése új lehetőséget nyitott. Vírusfertőzés során a növény védekező rendszere az RNS interferencia folyamatának aktiválásával, vírus eredetű, a vírus szekvenciájával megegyező kis RNS-ek (21-24nt hosszú RNS-ek) keletkeznek. Így az adott növény kis RNS-einek szekvenálásával és a szekvenciák bioinformatikai elemzésével nemcsak az ismert vírusokat és azok lehetséges változatait tudjuk detektálni, de ismeretlen kórokozók jelenléte is

kimutathatóvá válik. A fitoplazmák kimutatását számos tényező nehezítheti, azonosításukra jelenleg a legmegbízhatóbb eljárás az adott csoportra specifikus nested-PCR reakció és az azt követő restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus (RFLP).

Kutatásom során a szaporítóanyag és a növényállomány vizsgálatához kívántam, minél megbízhatóbb, gyorsabb és nagyobb érzékenységű módszereket fejleszteni és adaptálni, mely révén a későbbiekben lehetőség nyílna olyan patogének kimutatására alkalmas protokoll kidolgozására is, amely beilleszthető a hazai certifikációs rendszerekbe.

Célkitűzések

A kutatómunka fő célja, olyan nagy érzékenységgel rendelkező és rövid időn belül eredményt adó új, molekuláris biológiai vírus és fitoplazma detektálási módszerek adaptálása, valamint a már meglévő módszerek fejlesztése és alkalmazása szőlőn és kajsziarackon, melyek érzékenysége meghaladja a hagyományos tesztekét, illetve alkalmasak új, eddig nem ismert patogének azonosítására is.

1. Egy új, hatékony vírusdiagnosztikai eszköz, a növények védekező mechanizmusa során keletkező vírus eredetű kis RNS-ek új generációs szekvenálási (NGS) módszerének és az adatok bioinformatikai munkafolyamatának kidolgozása, optimalizálása és bevezetése vizsgálatainkba.
2. Az általunk kidolgozott kis RNS alapú NGS technika segítségével 9 magyar borvidék 14 ültetvényének vírus fertőzöttségi állapotának felmérése.
3. Szőlőt megbetegítő vírusok azonosítása metagenomikai módszerrel. A meghatározott vírus izolátumok filogenetikai vizsgálata és szekvenciáik génbankba történő elhelyezése.
4. Hazánk néhány jelentős kajszi termesztő régiójában a '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', mint a kajszit leginkább veszélyeztető kórokozó azonosítása, továbbá a kajszi ültetvények fertőzöttségének felmérése molekuláris biológiai módszerekkel (nested-PCR). A mintáinkban azonosított fitoplazmák 16SrX csoporton belüli elkülönítése, vizsgálata filogenetikai elemzéssel és a hazai fitoplazma izolátumokról szekvencia információ gyűjtése.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A szőlő vírusainak és diagnosztikai módszereik áttekintése

2.1.1. A szőlő és termesztésének gazdasági jelentősége

A szőlő egyike legrégebbi kultúrnövényeinknek. Magyarországon a szőlő (*Vitis spp.*) régóta elterjedt növény, a történelmi borvidékeken szőlőtermesztéssel, több mint 2000 éve foglalkoznak az itt élő népek. Világszerte ez egyik legszélesebb körben termesztett gazdasági növény; a jelenleg elérhető, 2014-es adatok szerint 7.5 millió hektáron folyik termesztés (OIV, 2018). Magyarországon a termesztésre használt területek nagysága az elmúlt évek tendenciáját megfigyelve csökkent, a 2014-es adatok szerint hazánk 62168 hektárnyi szőlőterülettel rendelkezik (OIV, 2018). A hazai szőlőültetvények nagyrésze borvidéki területekre koncentráltan találhatóak, 22 borvidékünk méreteit, ökológiai adottságait tekintve igen heterogénnek mondható. A szőlőt elsősorban gyümölcséért termesztik, melyet feldogozatlan, illetve feldolgozott formában is fogyasztanak. A belőle készülő bor a világ élvezeti cikkeinek listája élén helyezkedik el, jelentős gazdasági és kulturális értéket képviselve.

A hatékony és minőségi szőlőtermesztés alapja az egészséges szaporítóanyag kiválasztása és alkalmazása, melyeket a gazdaságilag jelentős vírusokra szigorúan szűrnek. A fertőzés szisztemikus jellege miatt ezek a kórokozók látens módon lehetnek jelen a növényekben, így könnyen tovább terjedhetnek a tünetmentes szaporítóanyaggal, így bekerülve az ültetvénybe jelentős károkat okozhatnak. A kártétel csökkentésének egyetlen módja, ha patogénmentes szaporítóanyag előállításával elejét vesszük a terjedésnek, ez pedig nagymértékben függ a szűréshez alkalmazott diagnosztikai eszközök pontosságától és megbízhatóságától.

2.1.2. Szőlőt fertőző RNS vírusok és előfordulásuk Magyarországon

1962-ben létrehozták az 'International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)' (Bovey & Gugerli, 2003) csoportot, mely hatalmas lendületet adott a virológiai kutatások számára. Az 1960-as évektől kezdődően, közel 70 szőlőt (*Vitis* és *Muscadinia spp.*) fertőzni képes vírust azonosítottak (Martelli & Boudon-Padieu, 2006; Martelli, 2014). Ezen vírusok nagyrésze a szőlőn megjelenő tüneteik alapján négy fő betegségkomplexhez köthető: (1) szőlő fertőző vírusos leromlás (infectious degeneration), (2) levélsodródás tünetcsoport (grapevine leafroll), (3) faszöveti barázdáltság (rugose wood) és a (4) látens foltosság tünetcsoport (grapevine fleck). A szőlőt fertőzni képes vírusok legnagyobb része pozitív, egyszálú RNS genommal rendelkezik, DNS vírusok előfordulása jelenleg nem ismert Magyarországon. Néhány vírusnak kettős szálú RNS-genomja van, ismertek azonban DNS-genommal rendelkező vírusok is a szőlőben. A szőlő vírusok nagy számával szemben csupán hét a szőlő fertőzésért felelőssé tehető viroidot azonosítottak eddig. A szőlővírusok kutatása területén Lehoczky János és munkatársai kezdtek vizsgálatokat a 60-as években, hazánkban. Ezek a kutatások főként a kórokozók jellemzésére, életmódjuk megismerésére, kimutatásukra, valamint a fertőzött tőkék kiszűrésére szolgáló rendszer kidolgozásra irányultak. Ezen munkának köszönhetően Magyarországon kötelezővé váltak a szőlővirológiai ellenőrzések a szaporítóanyag előállítás során. Az ellenőrzések a 87/2006.(XII.28.) FVM rendelet előírásainak megfelelően történnek.

A dolgozat keretein belül a Magyarországon ismert előforduló, valamint a világ, különböző tájain előforduló leggyakoribb és szőlőn újonnan leírt vírusokat, általuk okozott betegség komplexeket ismertetem részletesebben.

Szőlő fertőző leromlás

A szőlő legjelentősebb vírusos megbetegedése. A kórfolyamat kialakulásáért több, a *Picornavirales* rend, *Secoviridae* család, *Comovirinae* alcsalád, *Nepovirus* nemzetségbe tartozó vírus tehető felelőssé. A nemzetség a nevét a különböző fonalférgekkel terjedő izometrikus vírusok csoportjáról kapta. A nepovírusok izometrikus virionjai osztottak, háromkomponensűek (B, M és T). A B és M komponensek tartalmazzák a pozitív egyszálú RNS-t (RNS1, RNS2) (Mayo & Robinson, 1996). Az RNS1 és RNS2 egyetlen nyílt leolvasási szakaszt (Open Reading Frame, ORF) kódol, melyről egyetlen polipeptid íródik át. Napjainkig *Vitis spp.*-ben a világ, különböző területein 15 nepovírust írtak le,

melyek közül messze a Szőlő fertőző leromlás vírus (Grapevine fanleaf virus, GFLV) bizonyult a legjelentősebbnek, széleskörű elterjedtsége és gazdasági hatása miatt. Két törzsét különböztetik meg: (1) A Sárga mozaik törzs (Grapevine fanleaf virus - yellow mosaic strain, GFLV-YM) (Hewitt, 1950), mely esetében krómsárga elszíneződés látható a tőkén, a levelek érmenti és érközi területein kiterjedt foltok jelenhetnek meg, vagy teljesen elsárgul a levél. (2) Az érmenti szalagosodás törzsre (Grapevine fanleaf virus - vein banding strain, GFLV-VB) (Goheen & Hewitt, 1962) a sárga foltok, illetve az ér mentén megjelenő, hosszanti, sárga, szalagszerű lefutású, klorotikus mintázat jellemző leginkább. Hazánkban Martelli & Lehoczky (1968) leírták jelenlétét az Arabisz mozaik vírusnak (Arabis mosaic virus, ArMV), mely a GFLV-el mutat szerológiai közeli rokonságot. A szőlő króm mozaik vírust (Grapevine chrome mosaic virus, GCMV) - eredetileg Hungarian chrome mosaic virus - a világon elsőként a Balaton-felvidéken detektálták (Martelli és mtsai., 1965) a levelek krómsárgára színeződése, majd kifehéredése és kettős nóduszok kialakulása alapján. A paradicsom fekete gyűrűs vírust (Tomato black ring virus, TBRV) hazánkban 1981-ben izolálták először (Lehoczky & Burgyán, 1986), fertőzése esetén gátolt a tőkék fejlődése, a leveleken klorotikus tünetek jelenhetnek meg. Általánosságban elmondható, hogy a szőlő nepovírusok széles természetes gazdanövénykörrel rendelkeznek, melybe fás és lágyszárú növények egyaránt megtalálhatóak.

Levélsodródás tünetegyüttes

A szőlőféléket érintő betegségek közül a szőlőlevélsodródás betegséget (Grapevine leafroll disease, GLD) gazdaságilag igen jelentős vírusos megbetegedésként tartják számon világszerte (Martelli, 2014, Naidu és mtsai., 2014). A szőlő levélsodródását, több a *Closteroviridae* családba tartozó vírus okozhatja. Jelenleg, 5 különböző GLRaV vírust - GLRaV-1, -2, -3, -4, -7 - fogadnak el külön fajként, míg a GLRaV-5, -6, -9, -Pr, -De és Car törzseket a GLRaV-4 variánsaiként azonosították (Martelli és mtsai, 2012). A levélsodródás vírusok tagjai a *Closteroviridae* családon belül megoszlanak, a GLRaV-1, -3, -4 és annak törzsei az *Ampelovirus*, a GLRaV-2 a *Closterovirus*, míg a GLRaV-7 a *Velarivirus* nemzetség tagjai. A GLRaV vírusok sok közös tulajdonsággal rendelkeznek, azonban genomszerveződésükben és epidemiológiai tulajdonságaikban találhatók különbségek. Közös jellemzőjük: a család valamennyi tagja pozitív egyszálú RNS genommal rendelkezik, virionja fonál alakú és ez az egyetlen víruscsalád, mely rendelkezik 70 kDa méretű hősokk fehérjével (HSP70). A víruscsalád tagjai közül a GLRaV-1, -2, -3 és -4 előfordulását Magyarországon Lázár és munkatársai (1994)

igazolták. A GLRaV-7 kórokozó jelenlétét magyarországi eredetű mintából Choueiri és munkatársai (1996) mutatták ki, ezen kívül további adatok a vírus előfordulásáról jelenleg nem ismertek. A víruscsaládba tartozó többi kórokozó hazai előfordulásáról nincs információ. A betegségkomplex kialakulásának hátterében, vizsgálatok alapján (Cseh és mtsai., 2012, 2013), hazánkban a GLRaV-1 és -3 vírusok játszik a fő szerepet. A betegségre általánosan jellemző lehet a levelek lefelé sódródása, és a vörösbor szőlő fajtáknál a vörösre színeződő levéllemez és a kései bogyóérés többek között (Little & Rezaian, 2006), aminek következtében jelentős termésveszteség és minőségbeli csökkenés alakulhat ki a fertőzött ültetvényeken. A szőlő levélsodródás vírusoknak a *Vitis* fajokon kívül más gazdanövényköre nem ismert. A betegség terjesztésében a viaszos és teknős pajzstetvek játszik a fő vektor szerepét, azonban a GLRaV-2 vektora jelenleg nem ismert. Ezen kívül oltással és fertőzött szaporítóanyaggal való terjedésük ismert.

Látens foltosság tünetegyüttes

A betegség *Vitis vinifera* fajtákon általában látensen van jelen, különböző formáinak többségét a *Vitis rupestris* St. George indikátorfajtán azonosították (Martelli, 2014; Martelli és mtsai., 2015). A tünetegyüttes legismertebb és legelterjedtebb képviselője a Szőlő foltosodás vírus (Grapevine fleck virus, GFkV), a *Tymovirales* rend, *Tymoviridae* család, *Maculavirus* nemzetség típus faja (Martelli és mtsai., 2002), melyet hazánkban Lehoczky & Farkas (1981) talált meg először. A nemzetség másik tagja a Grapevine redglobe virus (GRGV). Hasonló tulajdonságokkal rendelkezik a *Marafivirus* nemzetségbe sorolható Grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV), Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV) is, melyek a GFkV vírussal közeli rokonságban állnak és együttesen alkotják a „a fleck-komplexet” (Martelli, 2014). Ugyancsak a fleck-szerű vírusokhoz (GFkV vírussal közeli rokon vírusok, melyek hasonló morfológiai és molekuláris tulajdonságokkal rendelkeznek) sorolják a Szőlő Syrah vírus1-et (Grapevine Syrah virus-1, GSyV1) (*Marafivirus*), melyet 2009-ben új generációs szekvenálás (NGS) eredményeként fedeztek fel Amerikában (Al Rwahnih és mtsai., 2009; Sabanadzovic és mtsai., 2009) és azóta számos európai országból jelentették előfordulását, többek között hazánkban is (Czotter és mtsai., 2015a). Mindkét nemzetség tagjai izometrikus virionnal és a pozitív egyszálú RNS genommal rendelkeznek. GFkV-ról és a vele rokon vírusokról ismert, hogy kizárólag *Vitis* spp. fertőznek, kivéve a GSyV1-et, mely természetes gazdakörébe tartozik a vadszedér (*Rubus* sp.), *Vitis rotundifolia* és a *Vitis aestivalis* (Sabanadzovic és mtsai. 2009). A GFkV fertőzésre jellemző, a harmad- és negyedrendű erek közelében áttetsző

foltok megjelenése, a foltosodó levelek ráncosodása, torzulása, és felfelé pöndörödése. GAMaV jelenléte esetében krémsárga elszíneződés látható a főbb erek mentén, míg GRVfV fertőzésre átmeneti klorotikus elszíneződéses reakció tapasztalható az elsődleges és másodlagos erek mentén. A GRGV esetében nem tapasztaltak látható tüneteket szőlőn eddig, valamint a GSyV1 fertőzés lehetséges hatásait is még tanulmányozni szükséges. Jelenlegi ismeretek alapján, ezen vírusok elterjedésének elsődleges módja a fertőzött szaporítóanyag alkalmazása. Mechanikailag nem terjednek, a betegséget kísérletesen úton aranka fajok képesek átvinni (Martelli és mtsai., 2002; Woodham & Krake, 1983).

Faszöveti barázdáltság tünetegyüttes

A faszöveti barázdáltság egy oltás révén átvihető fertőző rendellenesség komplex, mely betegséget először Olaszországban figyelték meg (Graniti & Martelli, 1965), majd nem sokkal később Magyarországon is leírták (Martelli és mtsai., 1967). A különböző indikátorokon (*V. rupestris*, Kober 5BB, LN33) adott reakciói alapján négy elváltozást azonosítottak a tünetegyüttesen belül: (1) *Rupestris stem pitting* (*Rupestris* faszöveti barázdáltság). A betegséggel a Szőlő *rupestris* faszöveti barázdáltság vírusa (*Grapevine Rupestris stem pitting associated virus*, GRSPaV) hozták összefüggésbe (Meng és mtsai., 1999), mely a *Tymovirales* rend, *Betaflexiviridae* család, *Foveavirus* nemzetség tagja. A GRSPaV genomja egy pozitív egyszálú RNS, melyen 5 ORF található. A vírus mechanikailag nem vihető át, eddig természetes vektorát sem azonosították (Nakaune és mtsai., 2008). A betegség nyomán a tőke farészénél gödröket és barázdákat figyeltek meg az oltás helye alatt, de sok esetben a farészen máshol is kialakulhatnak gödrök, barázdák. (2) Kober stem grooving (Kober faszöveti barázdáltság) betegséget a Szőlő A vírussal (GVA) kapcsolták össze (Garau és mtsai., 1994). A vírus *Vitivirus* nemzetség tagja (*Tymovirales* rend, *Betaflexiviridae* család), melyek genomszerveződésére a pozitív egyszálú RNS genom jellemző, ami általánosan 5 ORF-et kódol. Terjedésében különböző pajzstetvek (*Pseudococcus longispinus*, *Planococcus ficus*, további vektorai *Heliooccus bohemicus* és *Neopulvinaria innumerabilis* (Minafra és mtsai., 1997) játszhatnak szerepet. (3) Corky bark (parakérgűség) kórokozójaként a Szőlő B vírust (GVB) jelölték meg (Bonavia és mtsai., 1996), illetve a Szőlő D vírust (GVD) is egyes szerzők hozzá kapcsolják (Abou Ghanem és mtsai., 1997; Boscia és mtsai., 2001), mely vírusok szintén *Vitivirus* nemzetség tagjai. A GVB vírust *Planococcus citri*, *Pl. ficus*, *Pseudococcus longispinus*, *P. affinis*, and *Phenacoccus aceris* terjeszti, a GVD vírusnak vektora nem ismert. (4) Az LN 33 stem grooving (LN 33 faszöveti barázdáltság) elváltozásról nagyon

keveset tudunk, jelenleg nem ismert hozzá kapcsolható vírus ágens. Továbbá nem ismert bizonyíték arra vonatkozólag sem, hogy az utóbbi időben, molekuláris technikáknak köszönhetően, azonosított egyéb Vitivírusok (Szőlő E vírus, GVE és Szőlő F vírus, GVF) szerepet játszanának a betegség komplex kialakulásában (Abou Ghanem és mtsai., 1997; Nakaune mtsai., 2008; Al Rwahnih mtsai., 2012b). Jelenlegi ismeretek alapján a faszöveti barázdáltság rendellenesség komplex tagjainak természetes gazdanövényköre a *Vitis* nemzettségbe tartozó fajokra korlátozódik.

Szőlő Pinot gris vírus

A Szőlő Pinot gris vírus (GPGV) egy új, 2012-ben kis RNS szekvenálás eredményeként Olaszországban leírt *Trichovirus* (*Betaflexiviridae* család, *Tymovirales* rend) szőlőn (Giampetruzzi és mtsai., 2012). A GPGV fertőzést a jellegzetes levélfoltosodást és deformációt okozó GLMD (Grapevine Leaf Mottling and Deformation) betegséggel hozták összefüggésbe, mely betegséget már korábban, 2003-ban szintén Olaszországban figyeltek meg. Azonban a vírusnak létezik egy tünetet nem okozó, gyakoribb variánsa is. Szintén egy pozitív egyszálú RNS genommal rendelkező vírusról van szó, mely három ORF-et kódol. Részletesen vizsgálták a GPGV genetikai sokféleségét és kapcsolatát a GLMD betegséggel. A vizsgálatok során azt találták, hogy a tünetmentes szőlő mintából származó izolátum genomjának mozgási fehérjét (MP) kódoló szakaszában 6 extra nukleotid mutatható ki (Saldarelli és mtsai., 2015), ez a nukleotid polimorfizmus játszhat szerepet a tünetek kialakulásában. A vírust és/vagy az általa okozott betegséget a világ számos országában megtalálták, rendkívül széles körben elterjedt. Szőlőn kívül, természetes módon képes megfertőzni lágyszárú növényeket is, eddig *Silene latifolia* subsp. *Alba* és *Chenopodium album* L (Gualandri és mtsai., 2016) növényeken írták le jelenlétét, ami a vírus bonyolultabb epidemiológiájára utalhat. Terjedhet oltással, fertőzött szaporítóanyaggal, illetve gubacsatkaféléket (*Colomerus vitis*) (Malagnini és mtsai., 2016) sejtenek a vírus terjedésének hátterében.

Viroidok

A viroidok a legkisebb növényeket fertőző genetikai ágensek jelenleg, melyek egy kisméretű (250-400 nt) cirkuláris, fehérjét nem kódoló ssRNS-el (egyszálú RNS) rendelkeznek. Szőlőben több mint 30 éve írták le az első viroidot egy japán ültetvényben, ez a Komló törpülés viroid (Hop stunt viroid, HSVd) volt (Sano és mtsai., 1985). A HSVd előfordulása világszerte rendkívül elterjedt, hazánkban Farkas és munkatársai (1999)

azonosították először szőlő növényben, melyben látens fordul elő. Széleskörű elterjedését biztosíthatja, hogy szőlőn kívül számos más gazdaságilag jelentős növényfajt képes megfertőzni. Néhány évvel később fedezték fel és jellemezték a Szőlő sárga foltosság viroid 1-et és 2-öt (Grapevine yellow speckle viroid1,-2, GYSVd1, -2), mint a Sárga foltosság (Yellow speckle, YS), egy oltással átvihető betegség kórokozóját (Koltunow és mtsai., 1989). A betegség tüneteire jellemző a leveleken, illetve a levél ereket mentén kialakuló sárga foltok, pöttyök megjelenése. A GYSVd-1 első leírását követően számos országból számoltak be jelenlétéről szőlőn, ezzel szemben a GYSVd-2 eloszlása jóval korlátozottabbnak tűnik az irodalmak alapján. Az Ausztrál szőlő viroid (Australien grapevine viroid, AGVd) a világ több pontján előforduló, de kevésbé gyakori viroid, melyet először ausztráliában írtak le (Rezaian és mtsai., 1988). Egyetlen természetes gazdanövényén, a szőlőn, tüneteket nem okoz. A Citrus exocortis viroid (CEVd) a szőlő egy kevésbé gyakori viroidja, előfordulása csupán néhány fajta és/vagy földrajzi régióra korlátozódik. Az új generációs szekvenálási eljárás alkalmazásának eredményeként azonosítottak két további viroidot az elmúlt néhány évben: Grapevine Latent viroid (GLVd) (Zhang és mtsai., 2014) és Grapevine Hammerhead Viroid-Like RNA (Wu és mtsai., 2012). A viroidok különböző kombinációban való jelenléte jellemző szőlőben, melyek közül a HSVd és GYSVd-1 kevert fertőzés előfordulása a leggyakoribb. A szőlő viroidok terjedésében rovar vektorok szerepe nem ismert, átvitelük oltással, szaporítóanyaggal és maggal lehetséges (Szychowski és mtsai., 1988; Staub és mtsai., 1993; Wan Chow Wah & Symons, 1999).

Kevésbé elterjedt, kisebb gazdasági jelentőségű vírusok Magyarországon

Számos, olyan vírust ismerünk, melyek földrajzi előfordulása jóval behatároltabb, kevésbé gyakoriak, ezáltal kisebb mértékű gazdasági jelentőséget tulajdonítanak nekik. Ilyen szőlőt fertőző vírussnak tekinthető az *Alfamovirus* nemzetség (*Bromoviridae* család) típus tagja, a Lucerna mozaik vírus (Alfalfa mosaic virus, AMV), mely a szőlő vonalas és gyűrűs mintázottság betegség kórokozójaként ismert. Hazánkban a 80-as években írták le a vírust (Lehoczky & Beczner, 1980). Szintén ide sorolható a Szőlő vonalas mintázottság vírus (Grapevine line pattern vírus, GLPV), az *Ilarvirus* nemzetség feltételezett tagja. A vírust magyarországi szőlőről írták le (Lehoczky és mtsai., 1987) a leveleken megjelenő világos, juharfalevélre emlékeztető mintázata és szétszórtan látható pontok, foltok alapján. A kórokozó újabb előfordulásáról, egyéb molekuláris tulajdonságáról további adatok nincsenek. A Málna bokros törpülés vírus (Raspberry bushy dwarf virus, RBDV) az

Idaeovirus nemzetség egyedüli tagja, mely a különböző *Rubus* fajokat világszerte fertőzi. Szőlőn először Szlovéniában találták meg a vírust (Mavric és mtsai., 2003), majd néhány évvel később Szerbiában (Jeremovic & Paunovic, 2011) és Magyarországon (Plesko és mtsai., 2012) is azonosították. Filogenetikai vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a szőlőből származó RBDV izolátumok különböznek a málna eredetű izolátumoktól. Terjedése szőlő ültetvényben fertőzött szaporítóanyaggal, ezen kívül gyanítható a fonálféreg (*Longidorus juvenilis*) általi átvitele (Mavric-Plesko és mtsai., 2009).

2.1.3. Növényi vírusok és fertőzésük molekuláris háttere

A növényi vírusok rendkívüli változatosságot mutatnak, mind alakjukat, gazdakörüket, genomszerveződésüket és génexpressziós stratégiáikat tekintve. Az általuk okozott tünetek széles skálája ismert az alig észrevehetőtől a megfertőzött növény teljes nekrozisáig. Vírusos fertőzés során a vírusok sebzésen keresztül, oltással vagy különböző vektorok segítségével, passzív módon képesek bejutni a növénybe, ott intenzív replikációba kezdenek, majd a növény szállítószövet-rendszerén keresztül elterjednek az egész növényben (szisztemikus fertőzés). A növényi vírusok többnyire csak nukleinsavból és az azt körülvevő fehérjeburokból állnak. A nukleinsav lehet RNS vagy DNS, mindkettő lehet egy vagy kétszálú. Az eddig megismert növényvírusok több mint 90%-a egyszálú RNS vírus (ssRNS). Ezek 70%-ának, beleértve a szőlő vírusokat is, pozitív orientációjú egyszálú RNS genomja van (+ssRNS), vagyis e vírusok genomja a fertőzés során mRNS-ként képes viselkedni. A fertőzött sejtekben a vírusok, mivel saját anyagcserével nem rendelkeznek, a gazdanövény fehérjeszintetizáló rendszerét és a növény erőforrásait használják fel replikációjuk lebonyolításához (Buck, 1996). A vírus RNS-en kódolt gének száma általában egynél több (legalább 4-5 féle fehérjét kódolnak), így a vírusok különböző génkifejeződési stratégiákat dolgoztak ki: (1) szubgenomi RNS-ken keresztül, (2) osztott virális genommal, (3) poliproteinen keresztül, (4) átolvasható stop kodonnal (5), olvasási keretváltással (Hull, 2014). Sok esetben ezek a stratégiák egymással kombinálódva fordulnak elő.

A pozitív szálú RNS vírusok által kódolt legáltalánosabb fehérjék közé tartozik a köpenyfehérje (coat protein, CP), valamint sok vírus esetében sikerült azonosítani a mozgási fehérjét (movement protein, MP), mely struktúrális fehérjék a vírus életciklusa során különböző funkciókat töltenek be. A köpenyfehérje elsődleges funkciója a vírusrészecske külső burkának létrehozása, mely védi a vírus RNS-t a sejtben lévő nukleáz

hatásoktól, de sok esetben szerepet játszhat a vírus növényben való sejtről-sejtre való terjedésében (Lucas, 2006). Az MP szerepe a vírus sejtről-sejtre és szállítónyalábokban való terjedésében nyilvánul meg (Niehl & Heinlein, 2011), ennek révén a vírus RNS-ek képesek átjutni az egyik sejtől a másikba, a sejteket összekötő plazmodezmákon keresztül. Minden eddig leírt, replikációképes vírus kódol a replikációjáért felelős egy vagy több fehérjét, ezeket az enzimeket RNS-függő RNS-polimeráznak (RdRP, replikáz) nevezik. Kompatibilis növény vírus kapcsolat során a vírus képes hatékonyan elterjedni a gazdanövény szervezetében és megváltoztatni a gazdanövény génexpressziós rendszerét, ami a tünetek kialakulásához vezet.

2.1.4. RNS csendesítés, egy hatékony növényi védekezési mód vírusokkal szemben

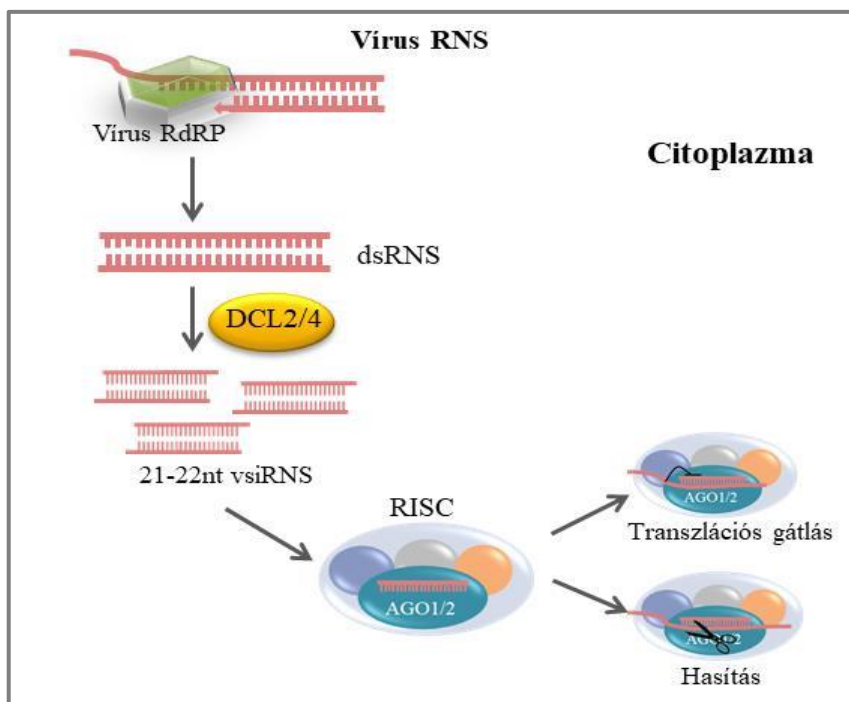
Helytűlő életmódjuknak köszönhetően a növények nem képesek aktívan kivédeni, elkerülni a kártevők és kórokozók támadásait. A növények azonban nem teljesen védtelenek az őket ért támadásokkal szemben, számos mechanizmust fejlesztettek ki az evolúció során védekezésül, így a vírusos fertőzésekkel szemben is.

Az elmúlt évtized egyik legjelentősebb felfedezése és aktívan kutatott területe a molekuláris biológiának az RNS csendesítés mechanizmusának felderítése volt, mely forradalmasította az addigi génszabályozásról alkotott ismereteket (Kidner & Martienssen, 2005; Baulcombe, 1999; 2004; Voinnet, 2008). Az RNS csendesítés egy szekvencia specifikus gén-inaktivációs mechanizmus, mely jelenséget először növényben, transzgénikus petúniában fedeztek fel (Napoli és mtsai., 1990). A kísérletben a pigmentációért felelős egyik gént (chalkon-szintáz) termeltették petúniában, azonban meglepő módon az intenzívebb szín elérése helyett, kifehéredett foltokat kaptak. Kiderítették, hogy a jelenség mögött a transzgén és az endogén génexpressziójának gátlása állt. Hasonló felfedezésről számoltak be nem sokkal később gombákban is, ahol a mechanizmust „quilling”-nek nevezték el (Romano & Macino., 1992), míg állati szervezetben Fire és munkatársai (1998) írták le RNS interferencia néven. Az RNS csendesítés az élővilágban egy általánosan elterjedt jelenség, mely fontos szerepet tölt be számos biológiai folyamatban: a vírusok elleni védekezésben, transzpozonok szabályozásában, fejlődésbiológiai folyamatokban. Az RNS csendesítés funkciója és molekuláris működése nagyon szerteágazó, azonban a különféle útvonalak megegyeznek abban, hogy a mechanizmus kiváltója a különböző eredetű kétszálú RNS (dsRNS) molekulák, amiket Dicer-szerű enzimek (DCL) kétszálú kis RNS-re (24-21 nt) vágnak. A

keletkezett kis RNS-ek eredetük szerint két nagy csoportra oszthatóak: siRNS-ekre (small interfering RNA) és miRNS-ekre (microRNA) (Baulcombe, 2004).

2.1.5. Az antivirális géncsendesítés

Vírusfertőzés során a vírus bejutva a növényi sejtbe, saját RdRp-je által replikálódni kezd, az ekkor keletkező hosszú dsRNS molekulák pedig az RNS csendesítés hatékony indukáló forrásai lesznek. A növényi sejtekben található DCL-ek egyike, melyek RNázIII és helikáz aktivitással rendelkeznek, elhasítják a dsRNS-eket rövid siRNS-re. *Arabidopsis thaliana* növényben a DCL fehérjecsalád négy tagja (DCL-1, -2, -3 és -4) ismert (Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009; Bernstein és mtsai., 2001; Hamilton & Baulcombe, 1999). Feltehetően a DCL4 felelős a 21 nt hosszúságú siRNS-ek kialakulásáért, a DCL2 22 nt hosszúságú, a DCL3 24 nt hosszúságú siRNS-ekké vágja a dsRNS-t. A DCL1 szintén 21 nt hosszúságú siRNS-eket készít, melyek főként az RNS silencing egy másik funkciójához, a mikroRNS közvetített génszabályozáshoz kapcsolódnak (Mlotshwa és mtsai., 2008). A virális eredetű dsRNS-ek hasításáért a DCL4 és DCL2 a felelős (Deleris és mtsai., 2006; Donaire és mtsai., 2009) (1. ábra). A kis RNS-ek jellegzetes kémiai szerkezettel rendelkeznek: a 3' végén 2 nt túlnyúló vég és hidroxil csoport található, az 5' végükön foszfát csoportot tartalmaznak.



1. ábra: Antivirális géncsendesítés mechanizmusa

Az így keletkezett virális eredetű siRNS-ek (vsiRNS) egyik szála beépül az RNS indukálta géncsendesítési enzimkomplexbe (RNA induced silencing complex, RISC), így a komplex szekvencia specificitással fog rendelkezni. A RISC központi molekulája az Argonauta fehérje (AGO), mely a cél mRNS-ek hasításáért felelős (Baumberger & Baulcombe, 2005). Vírus fertőzés esetében a növényekben az AGO1-nek és AGO2-nek tulajdonítják a legfontosabb antivirális szerepet (Carbonell & Carrington, 2015), de feltételezhetően más AGO-k is részt vesznek a mechanizmusban. A RISC komplexbe beépült siRNS szekvenciája alapján a komplex felismeri a vele komplementer szekvenciákat és elhasítja az egyszálú vírus RNS-eket, így gátolva azok transzlációs aktivitását, az mRNS hasításával vagy transzlációs gátlásával (1. ábra). Az RISC által kettévágott mRNS-t a szabad 5' és 3' végek felől a sejtben található exonukleázok lebontják. A növény, ezen folyamaton keresztül képes gátolni a vírusok elterjedését.

2.1.6. Szőlő esetében használt vírusdiagnosztikai módszerek

Szőlőtermesztésünk biztonságát számos kórokozó veszélyezteti. A vírusok és más oltással átvihető kórokozók (viroidok, fitoplazmák) a szőlő termesztett fajtáinak nagymértékű leromlását okozhatják, így kiemelt jelentőségű, az ellenük való védekezés jelenleg egyetlen módjaként, a patogénmentes szaporítóanyag előállítása. Az utóbbi években, a molekuláris biológia fejlődésével előtérbe kerültek és egyre szélesebb körben elterjedtek a különböző, nagyobb érzékenységgel és specificitással rendelkező molekuláris biológiai eljárások is a növényvédelmi gyakorlatban, jelentős módszertani fejlesztést eredményezve a szőlő patogénmentesítésében.

Biotesztelés

A biotesztelés vagy biológiai indexelés, a vírusok kimutatásának és vizsgálatának tesztnövényes módszere, mely egyidejűleg fejlődött a növényviroológiával. Ezt a klasszikus tesztelési stratégiát évtizedek óta használják a vírusos megbetegedések kimutatására számos növényben. A biotesztek lényege, hogy vírusfertőzésre érzékenyek mutatózó indikátor növényeket a megfelelő módon inokulálják a vizsgálni kívánt kórokozóval, majd megfigyelik az esetlegesen jelentkező tüneteket. A szőlő virológiai ellenőrzése fás és lágyszárú tesztnövényeken történik. A lágyszárú tesztelés során a mechanikailag átvihető vírusok (nepovírusok, néhány vitovírus) előszűrését végzik, míg a fás szárú növényeken történő tesztelés lehetőséget ad a fertőzöttség vagy a vírusmentesség megállapítására,

olyan vírusok esetében, melyek mechanikailag nem terjednek. Az indikátor növények alkalmazása a vírusdiagnosztikában drága, rendkívül munkaigényes, a tünetek azonosításához nagy szakmai hozzáértés szükséges, valamint a növények fenntartása sok helyet és időt igényel, hiszen a fás szárú tesztelés esetében a vizsgálatok évekig is eltartanak (Al Rwahnih és mtsai., 2015). Ezen kívül a vizsgálatokat nagymértékben befolyásolhatja a környezet szezonális jellemzői és a növekedési feltételek (Constable és mtsai., 2013). A biotesztek jelentősége mindezek ellenére jelentős, hiszen a vírusok patológiai tulajdonságai csak tesztnövényeken vizsgálhatók, és eredményei bizonyos esetekben megbízhatóbbak, mint a szerológiai és egyéb vizsgálatoké, így a biotesztek napjainkban sem veszítették el jelentőségüket a vírusdiagnosztikában.

Szerológiai vizsgálatok – ELISA

A gazdasági szempontból kiemelten fontos szőlő vírusok diagnosztizálására a különböző szerológiai módszerek rutinszerű alkalmazása a legáltalánosabb. Az eljárások közül több mint két évtizede a legelterjedtebb a precipitációs és az immunodiffúziós tesztek helyébe lépő, specifikus antitest-antigén reakción alapuló Enzim-kapcsolt ellenanyag vizsgálat (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) a vírusdiagnosztikában, amely ötvözi a reakciót egy katalitikus enzimreakcióval. A növényi vírusok detektálása esetében általánosan a keresett vírus köpenyfehérjéjét, illetve az ellene termeltetett antitestet alkalmazzák. A szőlő esetében számos a kereskedelemben elérhető ELISA-kit áll rendelkezésre a fő virális patogének detektálására, mint a GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 és GLRaV-4, ArMV és GFLV nepovírusok, GVA és GVB vitivírusok és a GFkV. Egy ELISA teszt annyira jó, mint a reakcióban alkalmazott antitest. A vírusdiagnosztikában általában az antitestek változatos fajlagosságú vegyes populációját tartalmazó poliklón antitesteket használják, de elterjedt a nagyobb specifitású monoklón antitestek alkalmazása is. A poliklón antitestek esetében alacsonyabb specifitás érhető el, ami néhány esetben előnyt is jelenthet egy-egy vírus, különböző variánsainak kimutatása esetében, ugyanakkor hátrányként kereszt-reaktivitás is kialakulhat. Magának az ELISA tesztnek is több típusa létezik, a növényviroológiai gyakorlatban a leggyakrabban az úgynevezett dupla ellenanyag-szendvics (double antibody sandwich, DAS-ELISA) módszer az elterjedt. A módszer széles körű elterjedése és töretlen népszerűsége számos előnyének köszönhető: gyorsaság, megismételhetőség, tömegtesztelés, elérhetőség. Hátrányai közé tartozik, hogy megfelelő antitest nem minden szőlő vírus ellen létezik, az előállításuk drága, a teszt eredményét nagymértékben befolyásolhatja a mintavétel ideje,

módja. Érzékenysége függ az antitest és antigén affinitásától, az alkalmazott konjugált enzim és szubsztát mennyiségétől.

Összehasonlítva a molekuláris módszerekkel az ELISA egy kevésbé érzékeny diagnosztikai eljárás (Gambino & Gribaudo, 2006; Komínek & Bryxiová, 2004), nagyszámú minta vizsgálatához, rutin ellenőrzésekhez azonban kiválóan alkalmazható. A szerológiai eljárások közül az ELISA teszt mellett a dot-blot és a Western blot módszerek a népszerűek (Bantari & Goodwin, 1985; Barnett, 1986).

Polimeráz láncreakció és különböző módszerei

A polimeráz láncreakció (Polymerase chain reaction, PCR) technikáját az 1980-as években dolgozták ki (Saiki és mtsai., 1985; Mullis és mtsai., 1986), vírus diagnosztikában való első alkalmazását pedig az 1990-as évek elején publikálták (Vunsh és mtsai., 1990). Előnyös tulajdonságainak köszönhetően a PCR módszer az egyik legelterjedtebb diagnosztizáló eszközök közé tartozik. A módszer a templát nukleinsav denaturációjának, a 18-24 nt hosszú oligonukleotid primer szekvenciák templáthoz való kötődésének, majd egy hőstabil polimeráz enzim működésének ismétlődő ciklusából áll, mely révén felsokszorozódik a primerek által határolt specifikus szakasz. Mivel a reakció exponenciális, így nagyfokú érzékenység érhető el alkalmazásával, ennek köszönhetően alacsony vírus titer esetén is megbízhatóan alkalmazható módszer (Maliogka és mtsai., 2014). A PCR reakciónak több változata ismert, ilyen a vírusdiagnosztikában rutin-szerűen használt Reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR). A PCR teszt eredetileg DNS templátra lett kidolgozva, azonban a növényi vírusok többsége, így a szőlő vírusok is RNS genommal rendelkeznek. Esetükben egy reverz-transzkripció lépéssel kell a reakciót kiegészíteni, amely reakcióban a reverz transzkriptáz enzim az RNS templátról DNS-t szintetizál. Az RT-PCR vizsgálatot a szőlő vírusdiagnosztikában először 1993-ban alkalmazták sikeresen a GFLV vírus kimutatására (Rowhani és mtsai., 1993). Ezt követően érzékenysége és gyorsasága révén az RT-PCR-t széles körben alkalmazták a szőlővírusok detektálására: GRSPaV (Nolasco és mtsai., 2000; Nassuth és mtsai., 2000), GVA különböző variánsainak (Goszczyński & Jooste, 2003), GVB izolátum kimutatása (Hu és mtsai., 2014) és GSyV1 (Glasi és mtsai., 2015) azonosítása többek között. Ez a PCR reakció kiválóan alkalmas rutin diagnosztikai vizsgálatokra, azonban sok esetben nagyobb érzékenységgű, specifikusabb vizsgálatokra van szükség.

A PCR alkalmazásának számos további módosítása ismert a vírusdetektálás területén, melyek közül néhányat ismertetünk. A nested-PCR segítségével a nem kívánatos termékek megjelenését küszöbölhetjük ki, illetve az extrém alacsony koncentrációban jelen lévő termékeket is kimutatható mennyiségben képes felszaporítani. A módszer során két, egymást követő PCR reakciót alkalmaznak, mely során a második primer pár az első pár által felszaporított DNS szakaszon belül anellál az első termékhez, ezzel nagyban növelve a végső termék specificitását. A módszert sikeresen alkalmazta Nassuth és mtsai. (2000) és Dovas & Katis (2003) a GVA, GVB és GVD vírusok azonosítására, Zhou és mtsai (2015) a GFLV, valamint Fan és mtsai. (2015) GLRaV-2 levélsodródás vírus kimutatására. A multiplex-PCR lényege, hogy a reakcióhoz több különböző primer párt is adunk, így több különböző - ideális esetben eltérő méretű - amplikon keletkezik egy reakció során. A több primer pár alkalmazása miatt az egyes termékek mennyisége arányosan kevesebb lesz, valamint további technikai nehézsége, hogy el kell kerülni a különböző primerek egymással kialakított kölcsönhatását, mert azok gátolják a reakció megfelelő végbemenetelét. A módszer nagymértékben növeli a diagnosztikai tesztek hatékonyságát és gazdaságosságát, mivel jól megtervezett primerek használatával egyidejűleg azonosítható a mintában jelen lévő több virális kórokozó. Gambino & Gribaudo (2006) kilenc szőlő vírus (nepo-, viti-, és leafroll vírusok, GRSPaV és GFkV) szimultán detektálására dolgozott ki egy multiplex-PCR eljárást, kilenc az adott vírus konzervált régiójára tervezett specifikus primer pár alkalmazásával. Az eddigi módszereknél még nagyobb érzékenységet tesz lehetővé a valós-idejű, kvantitatív-PCR (qPCR), melyet az 1990-es évek elejétől kezdtek el alkalmazni. A módszer lehetővé teszi a PCR ciklusok során keletkező termék valós idejű detektálását és kvantitatív nyomon követését. A termék mennyiségének mérése fluoreszcens detektáláson alapul, amihez kettős szálú DNS-hez kötődő fluoreszcens festékeket (SYBR Green I, EvaGreen) vagy fluoreszcensen jelölt szekvensspecifikus próbákat (pl.: Taqman, Hibridizációs próba, Molecular Beacon) használnak. A valós-idejű RT-qPCR módszer változatát ma már szinte valamennyi szőlő vírus kimutatására alkalmazzák (Czotter és mtsai., 2015b). A módszernek azonban számos hátránya is van, ezek közül kiemelendő a készülék és az alkalmazott reagensek magas költsége.

A nukleinsav-amplifikáción alapuló molekuláris módszerek közül egyre inkább előtérbe kerülnek az izotermális amplifikáción alapuló eljárások. A sokféle változat közül a vírusdiagnosztikában a LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) módszere bizonyult az elterjedtebbnek. Kifejlesztése Notomi és mtsai. (2000) nevéhez fűződik. A

LAMP működési elve, hogy a DNS amplifikálása nem igényel hődenaturációt a primerek megkötődése előtt, a reakciót pedig állandó (60–65 °C körüli) hőmérsékleten valósítják meg speciális DNS polimeráz, általában *BstI* enzim, segítségével. A reakció eredményeként különböző méretű hajtúhurkokat tartalmazó struktúrák jönnek létre. A termékdetektálás megvalósítható turbiditás, színváltozás vagy valós idejű fluoreszcenciás jelzéssel is. A módszer előnyei közé tartozik, hogy állandó hőmérsékleten zajlik, így nem igényel drága PCR és az eredmények értékeléséhez gél elektroforézis készüléket. Nagyfokú megbízhatóság, érzékenység és specifikusság jellemzi (Kogovšek és mtsai., 2015), továbbá a gyorsasága (30-60 perc) és alacsony eszközigénye miatt, akár mobil laboratóriumként is alkalmazható lesz a jövőben. A szőlő vírusok kimutatására történő alkalmazását - reverz-transzkripció lépéssel kiegészítve - a GLRaV-3 vírus azonosítása esetében írták le (Walsh & Pietersen, 2013).

Az elmúlt évek során, valamennyi technikát fejlesztették a hatékony diagnosztizálás céljából, különös tekintettel az érzékenységre, specifitásra és megismételhetőségre. Az eddigiekben tárgyalt valamennyi módszer meghatározó korlátja, hogy csak azon vírusok kimutatására alkalmasak, melyeket már ismerünk. Azonosításukhoz minden esetben szükséges a keresett kórokozó vírusfehérjére specifikus antitest vagy genomjuk egy részletének szekvencia ismerete (Massart és mtsai., 2014).

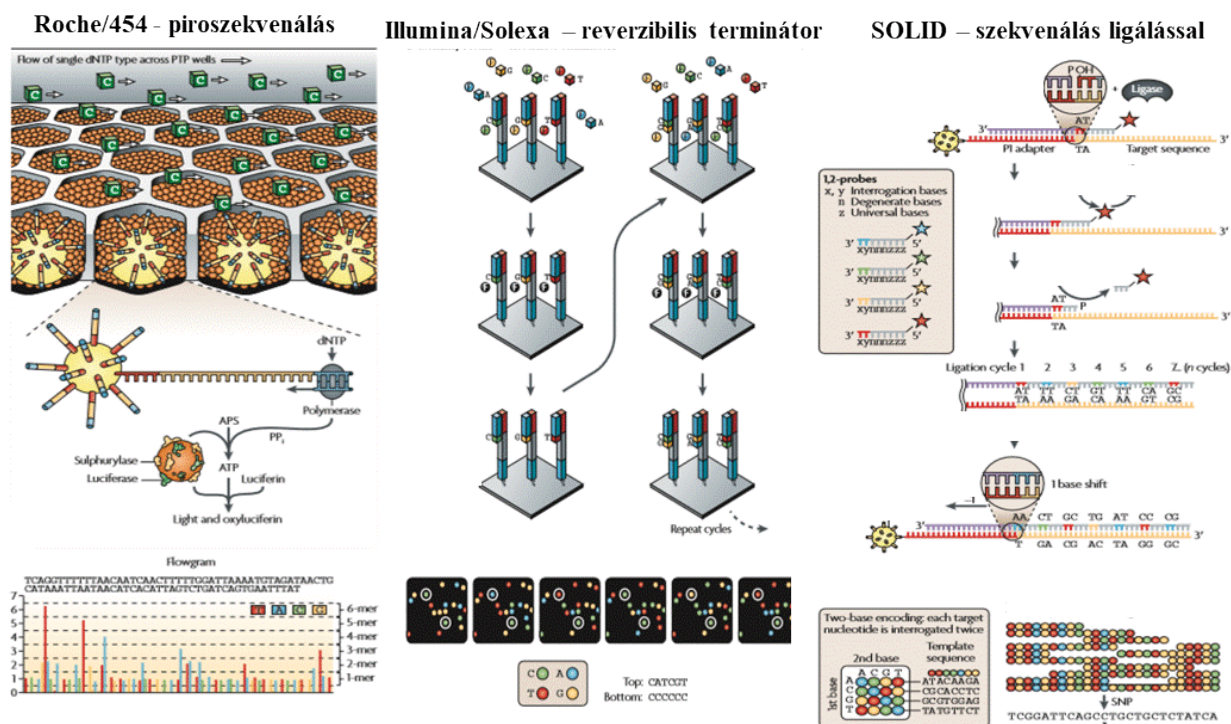
2.1.7. Új generációs szekvenálási technológiák és alkalmazásuk

A vírusfertőzöttség vizsgálatának legkorszerűbb módszertani fejlesztése a különböző Új Generációs Szekvenálási (Next Generation Sequencing, NGS) stratégiák alkalmazása. Esetükben a hagyományos módszerekkel ellentétben nincs szükség a kórokozó előzetes ismeretére, így nem csupán az ismert, de újonnan megjelenő vírusok kimutatására is alkalmasak.

Évtizedekig a hagyományos Sanger-szekvenálás volt az egyetlen módszer a megismerni kívánt szekvencia bázissorrendjének meghatározására. Az elmúlt évek során megjelentek az úgynevezett Új Generációs Szekvenálási technikák (NGS), amelyek nagy előrelépést jelentettek a szekvenálás területén azáltal, hogy lehetővé teszik egy kísérletben sok különböző minta párhuzamos és gyors, automatizált leolvasását (nagy áteresztőképességű, HTP: high-throughput módszer). Az NGS több eltérő módszert foglal magába, amelyek a minta előkészítés, a könyvtár előállítás, klonális amplifikáció, szekvenálás és adat analízis lépéseiben alkalmaznak különféle eljárásokat. Valamennyi

technika leegyszerűsített lényege, hogy az adott módszernek megfelelően, előzetesen előkészített DNS-szakaszokat szeparált klonális amplifikációt követően parallel szekvenálják, így hatalmas mennyiségű adathoz juthatunk, amelyeket analizálva a DNS nukleotidsav sorrendjéről nyerhetünk releváns információt.

A különböző gyártók eltérő szekvenálási technológiai stratégiákat alkalmaznak a növény vírus metagenomikában. A szekvenálás elve alapján csoportosítva a leggyakoribb eljárások közé tartozik a piacon először felbukkanó szekvenátor, mely a piroszekvenálás elvén dolgozott (például: Roche/454 sequencing). Ennek során az anorganikus pirofoszfát enzimatis reakciók sorozataképpen látható fényt bocsát ki, majd az emittált fényjelenségek érzékeny kamera segítségével detektálhatóak, sorrendjük és intenzitásuk flowgram formájában ábrázolható, amelyből a DNS szekvenciája megállapítható (Metzker, 2010) (2. ábra). A szekvenálás szintézis elvén alapuló módszer alapja a szintézishez szükséges nukleotidok beépülése, melyek különböző fluoreszcens jelöléssel ellátottak. A szilárd felülethez kötött, majd a klonálisan amplifikált DNS darabokhoz a különböző fluorofórokkal jelölt nukleotidok beépülnek (reverzibilis terminátorok), minden egyes nukleotid kötődése után a fluoreszcens jelet detektálják, végül lemossák a festéket, mielőtt egy újabb ciklusba kezdenek. Ezt a „négy-színű ciklikus reverzibilis terminátor” (CRT) módszert alkalmazza az Illumina/Solexa, valamint hasonló elven működik a Helicos Bioscience szekvenátora is (Metzker, 2010) (2. ábra). A harmadik elterjedt módszer a ligáláson alapuló szekvenálás, mely jelentősen eltér az eddigiektől. A szekvenálás ez esetben DNS-ligáz enzim segítségével valósul meg, ahol ligáz enzim a fluoreszcens festékekkel jelölt próbát a szekvenáló primerhez köti, majd fluoreszcencia kibocsátásával jelzi, hogy milyen bázis került a helyére (Metzker, 2010) (például: SOLID szekvenálás) (2. ábra).



2. ábra: A három elterjedtebb NGS technológia működési elvének ábrázolása (Metzker, 2010)

A növényi vírusok NGS alapú vizsgálatához különböző típusú nukleinsavakat célzó stratégiák állnak rendelkezésre. A vizsgált nukleinsav lehet totál RNS/DNS, a vírus részecskékből tisztított nukleinsav (VANA, virion-associated nucleid acid), duplaszálú RNS molekulák (dsRNS), valamint vírus eredetű kis interferáló RNS-ek (vsiRNS) (Roossinck és mtsai., 2015). A totál DNS/RNS kivonást követően közvetlenül lehet szekvenálást végezni, majd bioinformatikai elemzéssel azonosítják a virális szekvenciákat. A módszer előnye, hogy nem igényel jelentős laboratóriumi háttérrel, azonban a bioinformatikai elemzése bonyolult. Annak ellenére, hogy az egyik legegyszerűbb megközelítés a totál RNS kivonat alkalmazása lenne a szőlő esetében összesen egyetlen esetben, Jo és mtsai. (2015), alkalmazták a totál RNS szekvenálás módszerét vírus azonosításra. Ennek elsődleges oka talán abból ered, hogy a megszekvenált read-ek (leolvasások) legnagyobb arányban nem vírus eredetűek, ami az azonosítást negatívan befolyásolhatja (Roossinck és mtsai., 2015). A részlegesen, vagy teljesen tisztított vírus partikulumokból nyert nukleinsav molekulák szekvenálására különböző egyszerűbb és komplexebb tisztítási technikákat alkalmazhatunk, ez a megközelítés azonban technikailag nagyobb kihívást jelent a laborban. Szőlő metagenomikai vizsgálatokban való alkalmazása nem ismert. A növény vírus metagenomikai vizsgálatok fő célpontjai elsősorban a dsRNS-ek és vsiRNS-ek. Az RNS vírusok replikációjakor felhalmozódó dsRNS molekulák

viszonylag könnyen izolálhatók, egy reverz-transzkripció lépést igényelnek a DNS-könyvtár preparálás előtt. Ezt a módszert alkalmazta Al Rwahnih és mtsai. (2009), mely révén sikerült feltárni a Syrah hanyatlás betegség hátterében álló lehetséges vírusokat. A módszer hátrányai közé sorolják, hogy munkaigényes, valamint a negatív értelmű (-) ssRNS vírusok azonosítása esetében kevésbé hatékony (Roossinck és mtsai., 2015). Ellentétben korábbi kísérletekkel már nemcsak RNS vírusok és viroidok azonosítására alkalmas. Egy templát preparálási eljárás módosításával DNS vírusok is kimutathatóak vele, mint a Grapevine red-blotch associated virus (GRBaV) (Al Rwahnih és mtsai., 2013a). Az egyik legszélesebb körben alkalmazott stratégia a vírus eredetű kis RNS-ek új generációs szekvenálásán alapuló metagenomikai vizsgálatok. A módszer az RNS, DNS vírusok és viroidok fertőzésekor a növényi antivirális immunrendszer működése során termelődő rövid, 21-24nt hosszú vsiRNS-ek kimutatásán, szekvenálásán alapszik. Ezek a vírus eredetű kis RNS-ek, melyek az aktívan replikálódó vírusokról keletkeznek, ha nem is az összes, de a legtöbb virális kórokozót képviselik a növényben, amelyek a fertőzés során felhalmozódtak. Ez a stratégia egy sokoldalú lehetőség, amely lehetővé teszi DNS és RNS vírusok valamint viroidok egyidejű kimutatását (Massart és mtsai., 2014). Az eljárás során a kis RNS-eket általában méret alapján választják el gél tisztítás során, majd a szekvencia meghatározás érdekében az RNS molekulák 3' és 5' végeikhez adapter szekvenciákat ligálnak, ezt követően a különböző cDNS könyvtár preparálási eljárások során szekvenálhatóvá teszik a kis RNS-eket. A szekvenálást követően a rövid leolvasásokat általában *de novo* összeszerelik, hogy hosszabb kontig szekvenciákat kapjanak az adatbázisokban történő homológia alapú vírus azonosításhoz.

Az NGS alapú technikák sok lehetőséget rejtenek magukban, azonban módszertani fejlődésükhöz és a vírusdiagnosztikában való széleskörű elterjedésükhöz még időre lesz szüksége.

2.1.8. NGS alkalmazása a szőlő vírus diagnosztikában

Az NGS módszerének megjelenése áttörő hatással volt a növény virológiára. Ez a hatás az újabb és újabb vírusok azonosításában, biológiai sokféleségük, gazda szervezettel való kapcsolatuk feltárásában nyilvánult meg leginkább.

Az új generációs szekvenálást legelőször 2009-ben alkalmazták a szőlő vírusdiagnosztikában. Al Rwahnih és mtsai. (2009) a Syrah hanyatlás betegség etiológiáját szerették volna feltárni és ennek kapcsán egy új vírust, a Szőlő Syrah vírus1-et

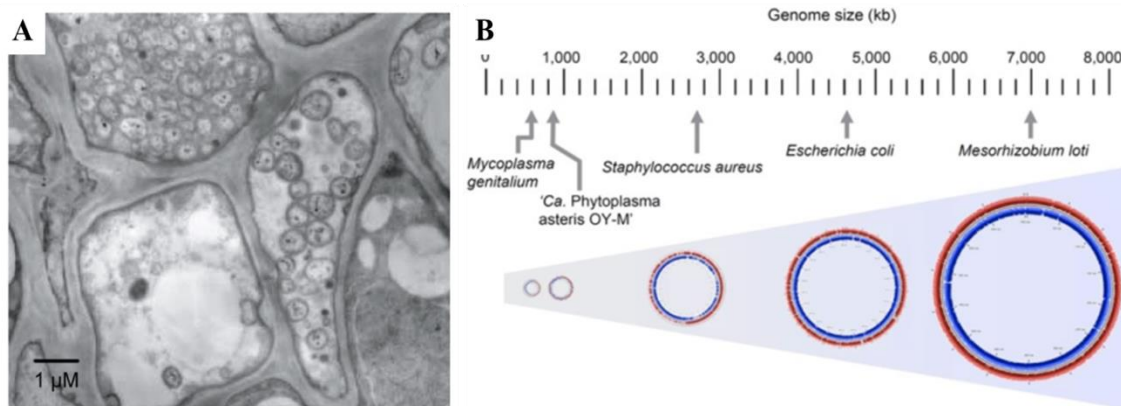
azonosították Life sciences 454 szekvenálással. A kutatás bebizonyította, hogy ezzel a módszerrel és genom homológia alapján történő kereséssel azonosíthatóak teljesen új vírusok. Emellett vizsgálatuk során számos más vírust és viroidot kimutattak mintáikban, így a módszer révén először sikerült betekintést nyerni a szőlő viromba, felfedve annak komplexitását. 2010-ben Coetzee és munkatársai teljes metagenomikai felmérést végeztek egy telejs szőlő ültetvényen. 44 random kiválasztott tőke poolozott mintáinak dsRNS frakcióját szekvenáltatták meg, mellyel sikerült az ültetvény teljes vírus fertőzöttségi állapotát felmérni. A mélyszekvenálás alkalmazásának további példája Pantaleo és munkatársainak (2010) munkája, melyben a *V. vinifera* Pinot noir ENTAV 115 klón különböző szerveiből izolált vírus-eredetű kis RNS-ek elemzésével azonosították a jelen lévő vírusokat (*Foveavirus*, *Maculavirus*, *Marafivirus*, *Nepovirus*) a mintában. A kis RNS alapú NGS módszer alkalmazásának szőlőn ez volt a legelső példája. Ugyanezen, vsiRNS alapú módszert alkalmazva Navarro és mtsai. (2009) írta le a HSVd és GYSVd1 viroidok jelenlétét és jellemezte ezen viroid-eredetű kis RNS-eket. Megerősítve ezzel az NGS széleskörű alkalmazhatóságát más taxonok kórokozóinak kimutatásában. Az NGS egyik legelőnyösebb tulajdonsága, szemben az eddigi módszerekkel, hogy nem igényel előzetes információt a vírusról, így alkalmas új vírusok, illetve vírus variánsok azonosítására. Ennek köszönhetően, az előzőekben felsoroltakon kívül, számos új szőlő vírust és variánsokat azonosították az elmúlt években NGS segítségével: Grapevine vein clearing virus (GVCV) (Zhang és mtsai., 2011), Grapevine leafroll-associated virus-7 (GLRaV-7) (Al Rwahnih és mtsai., 2012a), Grapevine Pinot gris virus (GPGV) (Giampetruzzi és mtsai., 2012), Grapevine virus F (GVF) (Al Rwahnih és mtsai., 2012b), Grapevine red blotch-associated virus (GRBaV) (Al Rawhni és mtsai., 2013a).

2.2. Kajszi fitoplazmás megbetegedése Magyarországon

2.2.1. Fitoplazmák általános jellemzése

A fitoplazmákat 1967-ben azonosították először sárgulásos tüneteket mutató, vírus fertőzöttnek vélt növények floémjából (Doi és mtsai., 1967). Mivel morfológiájukat tekintve sok hasonlóság mutatkozott az állati szervezetben előforduló mikoplazmákkal, kezdetben mikoplazma-szerű szervezetekként (mycoplasma-like organism, MLO) azonosították őket. További vizsgálatokkal és DNS szekvenciáik filogenetikai elemzése révén az 1990-es években derült fény arra, hogy ezek a kórokozók egy önálló monofiletikus csoportot alkotnak a baktériumok *Mollicutes* osztályán belül, mely csoportot 1993-ban az 'International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes' bizottság fitoplazmáknak nevezett el (Gundersen és mtsai., 1994). Rendszertani besorolásukkor, 2004-ben a nevük előtt szereplő '*Candidatus*' (jelölt) elnevezés alkalmazását vezették be, mint egy átmeneti taxonómiai kategóriaként megjelölve őket. Ez mindazon prokariótáknál bevezetésre került, melyek genomja ugyan ismert, de a Koch-féle posztulátumoknak nem tesznek eleget, azaz mesterségesen nem tarthatóak fenn, nem hozhatók tiszta tenyészetbe (IRPCM, 2004). A fitoplazmák osztályozására a genomjukban két kópiában megtalálható, erősen konzervált *16S rRNS* gént alkalmazzák, mint elsődleges filogenetikai paramétert (Lee és mtsai., 1998; Seemüller és mtsai., 1994). Ennek alapján két fitoplazma akkor sorolható két külön fajszintű taxonómiai egységbe, ha a *16S rRNS* génjük szekvenciája kisebb, mint 97,5% hasonlóságot mutat, továbbá egyes biológiai tulajdonságaikban, mint pl. gazdanövény, vagy rovarvektor eltérnek. A *16S RNS* gén Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) analízisével további fitoplazma csoportokat tudtak azonosítani (Lee és mtsai., 1993, 1998). Ezen módszereknek köszönhetően mostanra legalább 30, 16SrI-16SrXXX, fitoplazma csoportot és alcsoportjaikat írták le (Lee és mtsai., 2007; Marccone, 2014), melyek listája folyamatosan bővül, változik. A legújabb filogenetikai elemzésekhez nagyobb genetikai változékonysággal rendelkező géneket is bevonnak, mint például a *hflB* (Schneider és mtsai., 2014), *imp* (Morton és mtsai., 2003; Danet és mtsai., 2007), *secY* (Lee és mtsai., 2006), *tuf* gének (Marccone és mtsai., 2000) és a 16S-23S rRNS intergenikus spacer régió szekvenciák (Kirkpatrick és mtsai., 1994).

Morfológiájukra jellemző, hogy sejtfal nélküli, pleomorf, azaz rendkívül változatos alakokkal rendelkező növénypatogén szervezetek. Egyetlen sejtüket egy háromrétegű citoplazma membrán határolja. A fitoplazmák a növényeken belül kizárólag azok háncsszövetében, leginkább a rostacsövekben találhatók meg a sejtfalhoz tapadva (Lee & Davis, 1992) (3. ábra). A növényen belüli terjedésük módja még nem teljesen tisztázott. Feltételezik, hogy a rosta pórusoknak kulcsszerepük lehet a sejtek közötti vándorlásban, bár egyes megfigyelések szerint (Davis & Whitcomb, 1981) a vándorlást olyan sejtek között is megfigyelték már, amelyek között nem volt ilyen rosta pórus. Más elmélet szerint a plazmodezmákon keresztüli terjedésük is megvalósulhat (Ulrichova & Petru, 1975), de az elmélet nem bizonyított. A fitoplazmák jellegzetessége, hogy rovarvektoraik hemolimfájában is képesek szaporodni (Akiko, 2012), majd onnan rovarvektorok táplálkozása során, passzív módon kerülnek át a növényekbe.



3. ábra: A/ Elektronmikroszkópos felvétel egy 'Candidatus Phytoplasma asteris' fertőzött növény floémjéről. B/ Fitoplazma és egyéb baktérium fajok genom méretének összehasonlítása (Oshima és mtsai., 2013)

Mai ismereteink szerint a fitoplazmák az egyik legkisebb genommérettel rendelkező (530-1350 kb), önállóan szaporodni képes prokarióta csoport (Marccone és mtsai., 1999) (3. ábra). A kis genom méretre magyarázat lehet, hogy a fitoplazma genom lényegesen kevesebb anyagcsere-funkciót kódol, mint a többi baktérium génkészlete, ami parazita életmódjukból adódhat. Így nincs szükségük rá, hogy saját ATP szintézisük legyen (Christensen és mtsai., 2005), a gazdaszervezetből nyerik ki életfunkciójukhoz szükséges metabolitok nagy részét. Jelenleg öt fitoplazma genomjának teljes szekvenciája ismert. Ezek között két 'Candidatus Phytoplasma asteris' törzs található: az OY-M (Onion Yellows, hagymasárgulás) (Oshima és mtsai., 2004) és az AY-WB (Aster Yellows-

Witches Broom, őszirózsa boszorkányseprűsödése) (Bai és mtsai., 2006). Ezen kívül ismert a "*Candidatus Phytoplasma australiense*" egy ausztrál, illetve egy új-zélandi törzsének (Liefting és mtsai., 2006; Tran-Nguyen és mtsai., 2007), valamint a '*Candidatus Phytoplasma mali*' teljes genom szekvenciája (Kube és mtsai., 2008). Ezzel kapcsolatban érdekesség, hogy míg az első négy említett fitoplazma genomja cirkuláris, addig a '*Ca. P. mali*'-ra és a vele azonos filogenetikai csoportba (16SrX) tartozó fitoplazmákra a lineáris genom a jellemző (Kube és mtsai., 2008), ami baktréiumok esetében ritka jelenség.

Ezen obligát paraziták világszerte több mint 1000 növényen okoznak különböző betegségeket, elváltozásokat. Növények közötti terjedésükben jelenlegi ismereteink alapján rovarvektorok (elsősorban kabócák), oltás, szemzés, aranka növény (*Cuscuta sp.*) és a fertőzött szaporítóanyag játszik szerepet. A kórokozó mechanikai úton való terjedése nem ismert. Üvegházi körülmények közötti fenntartásuk rózsameténg (*Catharanthus roseus L.*) tesztnövényen történik (Dickinson és mtsai., 2013). Előnye, hogy számos fitoplazma könnyen fenntartható benne, és rövid időn belül intenzíven mutatja a betegségre jellemző tüneteket. Segítségével lehetséges genetikailag azonos növényekben összehasonlítani a különböző fitoplazmák által okozott tüneteket. A kórokozó genetikai állománya könnyen kinyerhető, így molekuláris vizsgálatok elvégzésére is alkalmas (Bertaccini, 2007). A fitoplazmák, tünetek széles skáláját képesek indukálni a növényeken: sárgulás, általános törpülés, "boszorkányseprűsödés", fillódia (a virágok helyett zöld levélszerű képződmények fejlődése), a vireszcencia (virágrészek elzöldülése), a virágok sterilitása, az internódiumok természetellenes megrövidülése (Bertaccini, 2007).

2.2.2. Fitoplazmák kimutatásának lehetőségei

A molekuláris technikák elterjedése előtt a fitoplazmák kimutatása nehézségekbe ütközött. Kezdetben a legalapvetőbb módszer, azonosításukra a tüneti megfigyelés és átviteli kísérletek voltak, majd a különböző mikroszkópikus technikák terjedtek el (elektron, fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok). Ezen módszerek azonban kevésbé alkalmasak rutin diagnosztikai vizsgálatokra és nem voltak megfelelőek a fitoplazmák megkülönböztetésére sem. Később szerológiai módszerekkel próbálkoztak, ezek közül is elsősorban az ELISA teszttel, melyet az 1980-as évek elején kezdték el használni. Sok esetben a szerológiai alapú eljárások nem bizonyultak elég megbízhatónak, érzékenynek (Batlle és mtsai., 2004). Az 1990-es évektől azonban, ezen módszereket egyre jobban kiszorították a különböző nukleinsav-alapú technikák, melyek alkalmasak mind növényi,

mind rovar vektorokból kimutatni a kórokozót. A módszerek közül egyértelműen a PCR az, melyet a fitoplazmák detektálásra általánosan kiválasztottak és alkalmaznak. Az erősen konzervált 16S *rRNA* gén minden prokarióta élőlényre általánosan jellemző. Ennek köszönhetően a fitoplazma detektálásra a valamennyi filogenetikai csoportot kimutató univerzális primereket, illetve az egyes fitoplazma csoportokra specifikus PCR primereket használnak, melyeket erre, a konzervált gén régióra terveztek. Később bevonták a vizsgálatokba a nagyobb változékonysággal rendelkező 16-23S *rRNA* intergenikus spacer régióra tervezett primereket (Ahrens & Seemüller, 1992; Firrao és mtsai., 1993; Gundersen és mtsai., 1996; Harrison és mtsai., 1996; Lorenz és mtsai., 1995; Marcone és mtsai., 2000; Namba és mtsai., 1993), valamint riboszómális fehérje génekre (Martini és mtsai., 2007) tervezett primer szekvenciákat is alkalmaznak azonosításukra. A sikeres PCR reakciót azonban számos tényező nehezítheti. Egyrészt nagymértékben meghatározza egyértelmű detektálásukat a jó minőségű DNS tisztítása, ami nem könnyű feladat (Firrao és mtsai., 2007). Kimutatták, hogy a fitoplazma DNS mennyisége a mintában kevesebb, mint a total DNS mennyiségének 1%-a (Bertaccini, 2007). A különböző DNS tisztítási eljárások során, így törekednek a fitoplazma DNS koncentrálására, ezzel párhuzamosan igyekeznek csökkenteni az enzim-inhibítorként ható polifenol és poliszacharid molekulák jelenlétét is. Sikeres kimutatásuk érdekében kulcs fontosságú a megfelelő módon és időben történő mintavétel, mivel jellemző rájuk a növényen belüli egyenlőtlen eloszlás, mely erőteljes szezonális fluktuációt is mutat (Seemüller és mtsai., 1984; Jarausch és mtsai., 1999a; Berges és mtsai., 2000; Constable és mtsai., 2003). Mivel előfordulásuk a növényekben floém limitált így kimutatásukra a legoptimálisabb a tüneteket mutató növényről a levél, levélnyél és erek felhasználása, de kimutathatóak gyümölcsből, gyökérből, kéreg kaparékból, rügyből, melyek begyűjtésére a nyári, kora őszi hónapok a legideálisabbak (Christensen és mtsai., 2004; Jarausch és mtsai., 1999c). Mindezek mellett a kimutatás érzékenységének és specifitásának növelése érdekében nested-PCR eljárást alkalmaznak leggyakrabban. Ennek során univerzális primerrel végeznek egy amplifikációt, majd ennek termékét felhasználva egy második reakció követi egy csoport-specifikus primer párral, az eljárással így kevert fertőzések is kimutathatóak (Lee és mtsai., 1994). A PCR termékeket a továbbiakban a RFLP módszerrel restrikciós endonukleázokkal hasítva, az egyes fitoplazma csoportok azonosítására, osztályozására lehet használni (Lee és mtsai., 1998). Egyéb, alternatív diagnosztikai módszer, melyet fitoplazmák detektálásra alkalmaznak az Egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism) vizsgálat a genetikai variabilitás kimutatására, a nagy érzékenységű real-

time PCR (Christensen és mtsai., 2004, 2013; Hodgetts és mtsai., 2009), valamint az izotermális amplifikáción alapuló, érzékeny és gyors LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) módszer (Tomlinson és mtsai., 2010; Hodgetts és mtsai., 2011; Kogovšek és mtsai., 2015), mely alkalmazása a fitoplazma diagnosztika területén mostanában kezd terjedni.

2.2.3. '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', mint a Csonthéjasok európai sárgulása betegség kórokozója hazánkban

A jelentős gazdasági értéket képviselő csonthéjas gyümölcsűek, közülük is elsősorban a kajszi ültetvények körében, évtizedek óta komoly pusztítást végez a Csonthéjasok európai sárgulása fitoplazmás megbetegedés (European stone fruit yellows - ESFY) (Lorenz és mtsai., 1994). A betegség kórokozója a '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', az általa kiváltott betegség napjainkban feltételezhetően mindazon európai területeken jelen van, ahol csonthéjas termesztés folyik (Seemüller & Foster, 1995; Jarausch és mtsai., 2000; Danet és mtsai., 2007). Kártétele Európa-szerte az utóbbi évtizedekben, Magyarországon pedig az elmúlt években kezdett egyre súlyosabbá válni, elsősorban kajszin, de előfordul más csonthéjas fajokon is. A betegség tüneteit először Franciaországban írták le 1924-ben, ezt követően Magyarországon 1992-ben figyelték meg először Süle és munkatársai a betegség tüneteit. Később a fák tömeges pusztulásának vizsgálata során azonosították a kórokozót (Süle és mtsai., 1997; Viczián és mtsai., 1997). A '*Ca. P. prunorum*' is a 16SrX csoportba tartozik, a 16S rDNS szekvencia analízise alapján (1. táblázat).

1. táblázat: A 16SrX fitoplazma csoport taxonómiai besorolása

Filogenetikai csoport	' <i>Ca. Phytoplasma</i> ' faj	Betegség	Referencia
Almafaboszorkányseprűsödése csoport (16SrX) AP (Apple proliferation)	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	Almafa boszorkányseprűsödés (Apple proliferation-AP)	Seemüller & Schneider (2004)
	' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '	Körte leromlás (Pear decline-PD) Őszibarack sárgulásos levélsodródása (Peach yellow leaf roll-PYLR) Körte leromlás Taiwan törzs (Pear decline Taiwan-PDTW)	Seemüller & Schneider (2004) Seemüller és mtsai. (1998) Liu és mtsai. (2007)
	' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> '	Jeneszter boszorkányseprűsödése (Spartium witches' broom - SpaWB)	Marcone és mtsai. (2004)
	' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> '	Csonthéjasok európai sárgulása (European stone fruit yellows-ESFY)	Seemüller & Schneider (2004)

Az összeállítás Lee és mtsai. (2007) munkája alapján készült.

Molekuláris vizsgálatok (Southern blot hibridizáció, RFLP, PCR termékek szekvencia analízise) rávilágítottak, hogy genetikai tulajdonságait tekintve a '*Ca. P. prunorum*' Európa szerte homogén kórokozó (Ahrens és mtsai., 1993; Lorenz és mtsai., 1994; Kison és mtsai., 1997; Jarausch és mtsai., 1998, 2000; Seemüller és mtsai., 1998; Seemüller & Schneider, 2004). A '*Ca. P. prunorum*' kórokozónak több törzse is ismert, amelyek eltérő virulenciával rendelkeznek, ezáltal különböző mértékben járulnak hozzá a specifikus tünetek kialakításához (Kison & Seemüller, 2001; Dosba és mtsai., 1991).

A kórokozó által okozott tünetek a fa szinte minden részén jelentkezhetnek, de főként a leveleken és hajtásokon figyelhetőek meg. A kialakuló szimptómák ráadásul az alanytól és a nemestől függően is változatosak lehetnek. Fiatal fák esetében a kórokozó szisztemikusan fertőzheti az egész fát. A virágok torzulnak, a fiatal levelek kúpszerűen a színük felé kanalasodnak, haragoszöldek, törékeny tapintásúak lehetnek. Egyes ágak, vagy az egész fa lombozata hirtelen sárgulni kezdhet, a fa kérgét lehántva a hancs narancssárgás elszíneződése tapasztalható fitoplazma fertőzés esetében. A kórokozó körben elpusztítja a hancsszövetet, s ez vezet a fa hirtelen, gutaütésszerű elhalásához. Azonban a gutaütéssel ellentétben, ebben az esetben nem figyelhető meg mézgaképződés. Idősebb fák esetében a fertőződés általában a fa egyes ágait, vágáit érinti, majd a kór továbbterjedhet és bekövetkezik a fa teljes pusztulása. Az egyik legjellemzőbb tünet, mely fitoplazma jelenlétére utal a kajszi fák idő előtti, korai virágzása (december-január). A '*Ca. P. prunorum*' elsősorban *Prunus* fajokat fertőz. Így a természetben megtalálható kajszin (*Prunus armeniaca*), szilván (*P. domestica*), japán szilván (*P. salicina*), őszibarackon (*P. persica*), de leírták mandulán (*P. dulcis*) és japáncseresznyén (*P. serrulata*), kökényen (*P. spinosa*), cseresznyén (*P. avium*), meggyen (*P. cerasus*) (Carraro és mtsai., 2002, 2004; Navratil és mtsai., 2001; Jarausch és mtsai., 1994, 1998, 1999b). A kórokozó a súlyosabb károkat kajszin, valamint japánszilván okozza, ahol a fertőzési arány akár a fogékony alanyok 50%-át is érintheti (Marcone és mtsai., 2010). Terjedésében két tényezőnek van kiemelkedő szerepe: a fertőzött szaporítóanyagoknak, mely révén a kórokozó képes nagyobb távolságokra eljutni, majd az ültetvények beteg egyedeiről rovarvektora veszi át a terjesztő szerepét. A kórokozó elsődleges vektorának a szilvalevélbolhát (*Cacopsylla pruni* Scopoli) tartják (Carraro és mtsai., 2001). A *C. pruni* egy Közép-Európai elterjedésű rovar, mely számos európai országban megtalálható. Magyarországi elterjedésével kapcsolatban még nincsenek pontos adatok, de számos kajszi termesztő körzetből jelentették előfordulását (Vas, Somogy, Pest, Borsod-Abaúj-Zemplén megyék). Ez az oligofág, kizárólag *Prunus* fajokon táplálkozó rovar túlevélű fajokon telet át imágó

formájában, majd az áttelelő nemzedék a tél folyamán megőrizve fertőzőképességét, kora tavasszal visszatelepülő egyedei révén képesek a fitoplazma átadására (Marccone és mtsai., 2010).

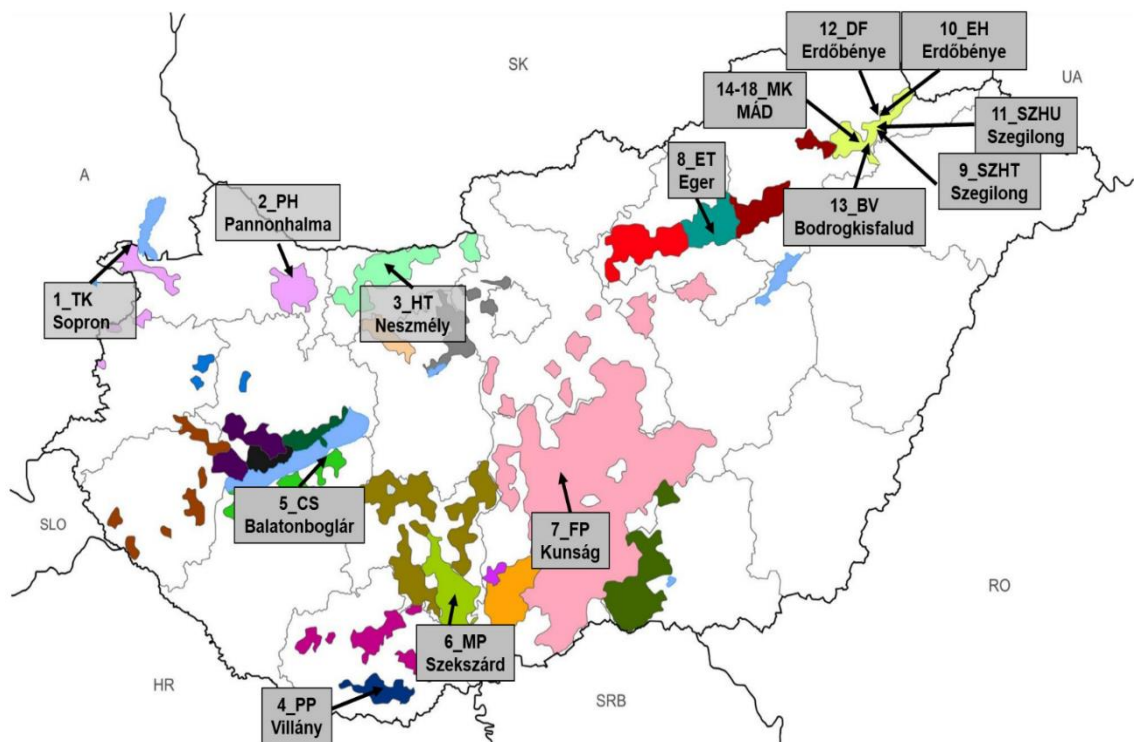
Mint valamennyi fitoplazmával szemben, így a '*Ca. P. prunorum*' ellen sem létezik olyan növényvédelmi megoldás, mely megoldást hozna a fertőzésével szemben, ha már jelen van az ültetvényben. Kezdetben antibiotikumos, tetraciklin származékokkal próbálták visszaszorítani a kórokozót (Davies & Clark, 1994), hosszú távon azonban nem hozott eredményt. Főként a szaporítóanyagok mentesítésére a hőkezelést (30-37°C-os vízfürdő) alkalmazzák széles körben a mai napig, ami azonban a vegetatív növényi részek károsodását okozhatja. Az esetek túlnyomó részében a fent említett kezelések nem alkalmazhatók sikeresen és hosszú távon. A fitoplazma jelenlétének, előfordulási valószínűségének csökkentésére az egyetlen megoldás jelenleg a megelőzés, melynek több módja is létezik. A legfontosabb az egészséges, különböző molekuláris módszerekkel, illetve *in vitro* mentesítési eljárásokkal ellenőrzött, megfelelő szaporítóanyag alkalmazása, mely már a telepítéskor meghatározza az ültetvény sorsát. Ezen kívül fontos szerep hárul a növényvédelemre is, hiszen a rovarvektorok számának csökkentésével a fitoplazma terjedését is gátoljuk, ezzel összefüggésben fontos az ültetvény és környezetének gondozása, mivel a különböző gyomok a vektor gazdanövényeként rezevoárként szolgálhatnak. Megoldást nyújthat egyes fajok esetében rezisztens fajták nemesítése, azonban a kajszi kórokozójával szemben jelenleg nem létezik rezisztencia.

3. Anyag és módszer

3.1. Vírus fertőzés kimutatása és meghatározása szőlőben

3.1.1. Növényi minta gyűjtése

A virológiai vizsgálatok során 9 borvidék, 14 ültetvényéről (4. ábra) - különböző korú, fajta-összetételű (18 különböző fajta) termőültetvényről: Sopron (Soproni borvidék), Pannonhalma (Pannonhalmi borvidék), Neszmély (Neszmélyi borvidék), Szekszárd (Szekszárdi borvidék), Soltvadkert (Kunsági borvidék), Mád, Erdőbénye, Szegilong, Bodrogkisfalud (Tokaji borvidék), Eger (Egri borvidék), Villány (Villányi borvidék) leveleket tartalmazó hajtás mintát gyűjtöttünk 2014. májusában. Néhány esetben: Balatonboglár (Balatonboglári borvidék) Erdőbénye (Tokaji borvidék) a 2014-ben gyűjtött vesszőket meghajtatva gyűjtöttük be a szükséges növényanyagot.



4. ábra: Mintavételi helyek Magyarországon a kis RNS könyvtár azonosítókkal

Ültetvényenként kiválasztottunk 5-10 tőkét és ezen egyedek több növényi részét (hajtás, kacs, virág, fiatalabb és idősebb levél) tartalmazó mintát szedtünk vizsgálatainkhoz. A mintázott szőlőtőkék kiválasztása véletlenszerűen, a rajtuk látható egyéb tünetek figyelembe vétele nélkül történt. Az általunk vizsgált ültetvények jellemzőit a 2. táblázat tartalmazza. A mintákat a hűtőtaszában szállítottuk és feldolgozásig -70 °C-on tároltuk.

2. táblázat: A vizsgált ültetvények általános jellemzői és a szekvenáláshoz alkalmazott kis RNS könyvtárak azonosítói

Könyvtár azonosító	Borvidék	Ültetvény helye	Fajta	Ültetvény kora
1_TK	Sopron	Sopron	Kékfrankos	20
2_PH	Pannonhalma	Pannonhalma	Olasz rizling	7
3_HT	Neszmély	Neszmély	Chardonnay	14
4_PP	Villány	Villány	Cabernet sauvignon	16
5_CS	Balatonboglár	Balatonboglár	Csabagyöngye	nem ismert
6_MP	Szekszárd	Szekszárd	Merlot	6
7_FP	Kunság	Soltvadkert	Generosa	4
8_ET	Eger	Eger	Kadarka	13
9_SZHT	Tokaj	Szegilong	Furmint	nem ismert
10_EH		Erdőbénye	Furmint, régi	100
11_SZHU		Szegilong	Furmint, új	1
12_DF		Erdőbénye	Furmint, régi	100
13_BV		Bodrogkisfalud	régi magyar fajták: 1:Purcsin,2:Balafánt,3:Sárga ortliebi, 4:Kék bakator, 5:Fehér járdovány	6
14_MK1		Mád	Furmint T85	nem ismert *
15_MK3			Hárslevelű K3	
16_MK4			Sárgamuskotály	
17_MK5			Teleki-Kober 125 AA	
18_MK7			Teleki 5C	

* rendszeresen vírus tesztelt vizuális megfigyeléssel

3.1.2. RNS kivonás

A begyűjtött mintákból növényi részenként (hajtás, kacs, virág, fiatalabb és idősebb levél) fásszárúakra optimalizált CTAB alapú RNS kivonást végeztünk Gambino & Gribaudo (2008) nyomán:

1. Az extrakciós puffert (2% CTAB, 2,5% PVP, 100 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 2 M NaCl) 65 °C-ra előmelegített vízfürdőbe helyeztük.
2. 150-200 mg növényi anyagot homogenizáltunk a 850 µl, 17 µl β-mercaptoetanollal kiegészített (közvetlenül felhasználás előtt adjuk hozzá) extrakciós pufferben, dörzsmozsárban.
3. A mintákat 10 percre 65 °C-os vízfürdőbe helyeztük, közben legalább egyszer vortex segítségével kevertettük.
4. A mintákhoz 850 µl kloroform:izoamilalkoholt adtunk, majd kézzel párszor megforgattuk. A mintákat 10.000 rpm-en 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk.
5. Új, üres 2 ml-es eppendorf csövekbe 800 µl kloroform:izoamilalkoholt mértünk.
6. Centrifugálás után a kapott felső fázist a 800 µl kloroform:izoamilalkoholra mértük. Centrifugáltuk a mintákat 10.000 rpm-en 10 percig 4 °C-on.
7. Tiszta 1,5 ml-es eppendorf csövekbe 250 µl 9M LiCl oldatot mértünk. Centrifugálás után a kapott felső fázist átpipettáztuk a 250 µl LiCl oldatot tartalmazó csövekbe, majd kézzel forgatással kevertük.
8. Inkubáltuk a mintákat 30 percig jégen tartva, majd centrifugáltuk maximális fordulatszámon (13.000 rpm) 20 percig, 4 °C-on.
9. A csapadékot 450µl, 65°C-os SSTE pufferben visszaoldottuk, majd azonos térfogatú kloroform:izoamilkoholt mérünk rá és ismét extraháltuk.
10. Centrifugáltuk a mintákat 10.000 rpm-en, 10 percig, 4 °C-on.
11. Ezalatt új, 1,5 ml-es eppendorf csövekbe 280 µl izopropanol oldatot és 30 µl 4M Na-acetátot mértünk. Centrifugálás után a kapott felső fázist átmértük az izopropanolt tartalmazó csövekbe, majd kézzel párszor forgatva kevertük és szobahőmérsékleten inkubáltuk 5-10 percig.
12. Centrifugáltuk a mintákat maximális fordulatszámon (13.000 rpm) 20 percig, 4 °C-on.
13. A csapadékot 1ml 70%-os etanollal maximális fordulatszámon (13.000 rpm) 5 percig, 4 °C-on mostuk.
14. A csapadékot speed vac készülékben 5-10 perc alatt beszárítottuk.

15. A csapadékot 25 µl steril vízben visszaoldottuk és -20°C-on tároltuk további felhasználásig.

3.1.3. RNS keverék (pool) összeállítása

Az egyes növényeket/tőkéket reprezentáló RNS keverékeket állítottunk elő, úgy hogy az adott tőkéhez tartozó különböző szervekből származó RNS kivonatokat egyenlő arányban elegyítettük (egyed pool). Az egyed pool-okból ezt követően ültetvényenként, ugyanezen módszert alkalmazva ültetvény keverékeket állítottunk elő, mely képviselte az adott ültetvény valamennyi mintázott tőkéjét (ültetvény pool). Ennek eredményeként 18 ültetvény RNS keveréket kaptunk, melyek koncentrációját és tisztaságát spektrofotométer segítségével ellenőriztük további munkánkhoz.

3.1.4. Kis RNS könyvtár készítés és szekvenálás

Az egyes ültetvény keverékekből 15-30 µg-nak megfelelő mennyiségű RNS kivonatot 65 °C-on 20 percig denaturáltunk. Ezt követően az RNS mintákat 8%-os urea tartalmú poliakrilamid gélen választottuk el, a gélből kitisztítottuk a kis RNS frakciót, majd belőlük kis RNS cDNS könyvtárat készítettünk saját, az Illumina Truseq Small RNA Sample Preparation kit (Illumina) optimalizálásával készült protokollunkat követve (Czotter és mtsai., 2018). Első lépésként az RNS molekulák 3' és 5' végeihez adapter szekvenciákat ligáltunk. Ezt követően reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk, RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) enzim segítségével. Végül PCR reakcióban amplifikáltuk az adapterekkel és egyedi index szekvenciákkal ellátott kis RNS-eket. A kapott terméket visszaizoláltuk 8%-os urea-mentes gélből, majd 1xTE pufferben oldottuk vissza. Az elkészült 18 kis RNS könyvtár (8 minta/szekvenáló lane) szekvenálását Illumina platformon az UD-Genomed Kft végezte.

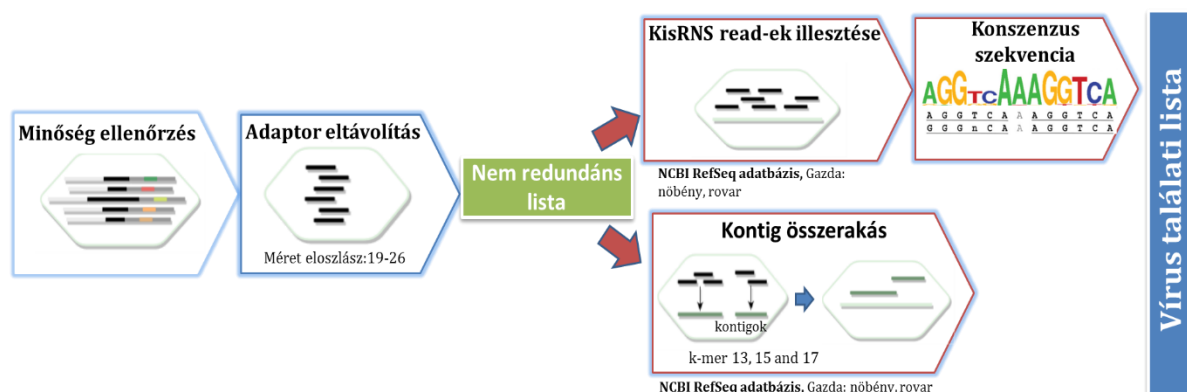
3.1.5. Bioinformatikai adatfeldolgozás

Az adatok feldolgozását megelőzően ellenőriztük a szekvenálás minőségét *FastQC* program használatával. A szekvenáláshoz szükséges primer és adapter szekvenciák eltávolítását, trimmelését *Trimmomatic* programmal (Bolger és mtsai., 2014) végeztük. Eltávolítottuk a redundáns read-eket *Picard MarkDuplicates* programmal a kis RNS

szekvenciáinkról, így képezve nem redundáns adatokat, melyek már csak egyedi szekvenciákat tartalmaztak.

A vírus azonosításhoz két bioinformatikai stratégiát alkalmaztunk egymással párhuzamosan (5. ábra):

- a) A nem redundáns kis RNS szekvenciákat direkt módon az NCBI RefSeq adatbázis vírus referencia szekvenciáihoz (növény és gerinctelen gazda) illesztettük fel. Az illesztéshez *BWA aln* programot alkalmaztunk (Li & Durbin, 2009).
 - Az adatok pontos értékeléséhez meghatároztuk az illeszkedő kis RNS read-ek számát a redundáns és nem redundáns adatokból egyaránt *Samtools idxStats* program alkalmazásával (Li, 2011).
 - A redundáns read-eket normalizáltuk read/millió read-re.
 - Konszenzus szekvenciákat generáltunk a nem redundáns, illeszkedő kis RNS szekvenciáink alapján *Samtools /bcftools* alkalmazással (Li & Durbin, 2009).
 - Kalkuláltunk egy lefedettségi % értéket, az alapján, hogy az adott vírus genomjának, hány %-áról rendelkezünk szekvencia információval.
 - A kapott adatokból eredményül egy vírus találati listát generáltunk.
- b) A kis RNS szekvenciákat *de novo* összeszereltük, hosszabb „kontig” szekvenciákba, 13-as, 15-ös és 17-es kmer érték beállítása mellett, a *Velvet Software* segítségével (Zerbino & Birney, 2008).
 - A kapott kontig szekvenciákat az NCBI RefSeq adatbázis növény vírus referencia szekvenciáihoz illesztettük *MegaBLAST* programmal (Morgulis és mtsai., 2008).
 - Ez alapján is készítettünk egy vírus találati listát.



5. ábra: NGS eredmények feldolgozásának bioinformatikai munkafolyamata

Méreteloszlás vizsgálatot végeztünk a trimmelt, a nem redundáns és a virális eredetű, redundáns szekvencia adatainkon, könyvtáranként. Néhány vírus esetében specifikusan is szétválogattuk a szekvenált kis RNS readek-et méret szerint, illetve megnéztük ezek polaritását a vírusgenomon, valamennyi könyvtárban.

3.1.6. Víruskimutatás RT-PCR-el

A kis RNS NGS eredményét egy független módszerrel, RT-PCR reakcióval vizsgáltuk. Az egyes szőlő minták ültetvény pooljaiból cDNS-t szintetizáltunk RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) segítségével. Az elkészített cDNS-t tízszeresre hígítottuk, melyet RT-PCR alapú vírustesztekben használtuk fel. A vírusok detektálására irodalomban publikált primereket, illetve sok esetben a vírus specifikus kis RNS read-ek alapján készített konszenzus szekvenciákra általunk tervezett primereket használtunk (3. táblázat). A vírus specifikus indítószekvenciákkal végzett DNS amplifikációt a Thermo Scientific Phire Green Hot Start II DNA polimeráz enzimmel végeztük.

A PCR reakcióelegy (15µl) tartalmazta a 0.5µl cDNS-t, 0.75-0.75µl 5' és 3' indító szekvenciákat (10 pmol/µl), 0.3 µl dNTP mixet (10 mM), 5X Phire puffert 3µl mennyiségben és 0.3 µl Phire polimeráz enzimet, valamint 9.4 µl MQ tisztaságú vizet.

A PCR reakciót az alábbi kondíciók mellett végeztük:

- 1) 98 °C - 30 másodperc
 - 2) 98 °C - 10 másodperc
 - 3) *°C - 10 másodperc
 - 4) 72 °C - 20 másodperc
 - 5) 72 °C – 1 perc
- } 40x

*Vírus primer specifikus anellációs hőmérséklet alkalmazása (3. táblázat).

A kapott PCR termékeket agaróz gélen (1.2%) méret szerinti elválasztással, gélelektroforézissel ellenőriztük.

3. táblázat: Vírus specifikus primerek és jellemzőik

Vírus név	Primer név	Primer szekvencia (5'-3')	T _m (°C)	Pozíció a referencia genomon	Funkció	Referencia genom	Hivatkozás
GFLV	GFLV _{Fw}	ATGCTGGATATCGTGACCCGTG	56	5506-5527	RNS1-poliprotein	NC_003615	Gambino & Gribaudo, 2006
	GFLV _{Rev}	GAAGGTATGCCCTGCTTCAGTGG		5623-5602			
ArMV	ArMV _{Fw}	TGACAACATGGTATGAAGCACACA	56	6127-6148	RNS1-poliprotein	NC_006057	Gambino & Gribaudo, 2006
	ArMV _{Rev}	TATAGGGCTTTTCATCAGCAAT		6528-6507			
GCMV	Nepo-B s	ATGTGYGCHACYACWGHATGCA	50	3818-3840	köpeny fehérje	NC_003621	Digiaro és mtsai., 2007
	Nepo-B a	TTCTCTDHAAGAAATGCCTAAGA		4209-4187			
GLRaV-1	GLRaV-1 _{Fw}	TCITTTACCAACCCCGAGATCAA	56	13401-13422	köpeny fehérje	NC_016509	Gambino & Gribaudo, 2006
	GLRaV-1 _{Rev}	GTGTCGTGTGACGTGCTTAAACG		13632-13611			
	GLRaV1-10372F	GCTCTCAATAAACGAACCAACGTC	51	10372-10394	HSP70	NC_016509	Czotter és mtsai., 2018b
	GLRaV1-11404R	CATGTAACTCAGAGAACATATCG		11404-11382			
GLRaV-2	GLRaV-2 _{Fw}	GGTGATAACCGACGCCTCTA	56	14614-14633	köpeny fehérje	NC_007448	Gambino and Gribaudo, 2006
	GLRaV-2 _{Rev}	CCTAGCTGACGCAGATTGCT		15156-15137			
GLRaV-3	GLRaV-3 _{Fw}	TACGTTAAGGACGGGACACAGG	56	13383-13404	köpeny fehérje	NC_004667	Gambino & Gribaudo, 2006
	GLRaV-3 _{Rev}	TGCGGCATTAAITCTTCATTG		13718-13699			
	LC1 _F :	CGCTAGGCGCTGTGGAAGTATT	52	10979-10999	HSP70	NC_004667	Turturo és mtsai., 2005
	LC2 _R :	GTTCGTCCCGGTACAGATAAT		11524-11504			
GVA	GVA6591F	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA	56	6591-6612	köpeny fehérje	NC_003604	Goszczynski & Jooste, 2003
	GVA6862R	TCGAACATAACCTGTGGCTC		6862-6843			
GVB	GVB H28	GTGCTAAGAACGCTTTCACAGC	56	6980-7001	RNS kötő fehérje	NC_003602	Minafra & Hadidi, 1994
	GVB C410	ATCAGCAACACGCTTGAACCG		7439-7418			
GFKV	GFKV _{Fw}	TGACAGCCTGCTGTCTCTA	56	6453-6472	köpeny fehérje	NC_003347	Gambino & Gribaudo, 2006
	GFKV _{Rev}	TGGACAGGGAGGTGTAGGAG		6631-6612			
	Gfk V1/F	GGTCCTCGGCCAGTGAAAAAGTA	62	5208-5231	replikáz	NC_003347	Czotter és mtsai., 2018b
	Gfk C1/R	GGCCAGGTGTGTAGTCGGTGTGTC		5559-5536			
GRGV	GRGV-F/1011	CACAACACTGAATGCTTCGGGAT	62	1011-1033	replikáz RdRp	AF521977	Czotter és mtsai., 2018b
	GRGV-R/1549	GGGCATCGAAGGACATGGGGTAG		replikáz poliprotein	NC_030693		
				köpeny fehérje	AF521977		
					NC_030693		

3. táblázat folytatása

Vírus név	Primer név	Primer szekvencia (5'-3')	T _m (°C)	Pozíció a referencia genomon	Funkció	Referencia genom	Hivatkozás	
GaMaV	GAMaV-F/1035	TCTGTCCCRTCATCGCGCATGAACC	62	1035-1059	replikáz-függő poliprotein	AJ249357.2	Czotter és mtsai., 2018b	
	GAMaV-R/1440	TGATGGGCTTGRAGAAATGAGCCGGCG		5902-5926	ORF1 poliprotein	NC_031692		
				1440-1415	replikáz-függő poliprotein	AJ249357.2		
GRVfV	GRGVfV-F/3501	CCTGCTGATCGCTGAGACTCG	55	6307-6286	minor köpenyfehérje	NC_031692		
				3501-3522	poliprotein	AY706994		
	3507-3528	NC_034205						
	GRGVfV-R/4914	CGAAGATTGCGTGTACTTCTT		4914-4893	poliprotein	AY706994		
				5070-5049		NC_034205		
GSyV-1	GRGVfV-R/6391	GCGCATTTCTRTGTGTGTCGG	-	6391-6370	polyprotein	AY706994	Czotter és mtsai., 2018b	
				6547-6526		NC_034205		
	Det-F	CAAGCCATCCGTGCATCTGG		1125-1144	feltételezett mozgási fehérje	NC_012484		Al Rwahnh és mtsai., 2009
				Det-R		GCCGATTTGAACCCGATGG		
	GRSPaV	GVQ-CPF		TCCAGCTTCAGGGTGAATT	50	5689-5708	kapszid fehérje	NC_012484
GVQ-CPR			GCAITGCTGCCATTGAGG			6409-6390		
RSPaVfW		GGGTGGGATGTAGTAACTTTGA	4298-4320	replikáz		NC_001948	Gambino & Gribaudo, 2006	
	RSPaVRev		GCAAGTGAAATGAAGCATCACT		4452-4430			
GPGV	RSPaV-F/6904	AGAGGCACATTTCAATCAAGTCAA	60	6904-6926	köpeny fehérje	NC_001948	Czotter és mtsai., 2018b	
				RSPaV-R/8445		TCTGAGCATTKAACYTCAAAG		8445-8423
	GPV5557F	ACTTATCTGATGGCTCTGATG		5568-5588	mozgási fehérje	NC_015782	Czotter és mtsai., 2018b	
	GPV7220R	GTTACGTGCTCTATGAGAC		7220-7201	köpeny fehérje			
	GPG-6609F	GAGATCAACAGTCAGGAGAG		6609-6628	köpeny fehérje			
RBDV RNA1	RBDV_RNA1F_4082	ACTCGAGTCTTAGGCTCGAGTGC	55	7020-7001	nem strukturális poliprotein	NC_003739	Czotter és mtsai., 2018b	
				RBDV_RNA1R_5406				CGAGTTAAGCCTAGTCAGCTAGGC
	RBDV_RNA2F_986	GTTGTGAATGAGCGGAATTC		986-1006	mozgási fehérje			
GSV	RBDV_RNA2R_2229	GGTTTGCTCAGCAAACAACGGC	55	2229-2208	köpeny fehérje	NC_003740	Czotter és mtsai., 2018b	
				GSVsatF72				TCTTACAATCCCTAGCGCTGGAC
	GSVsatR999	CTAACTAGGACTTATTCATAACT		999-977	5'UTR - 3'UTR	NC_021480	Czotter és mtsai., 2018b	
HSVd	HSVd-F	CTGGGGAATTCGAGTTGCC	60	1-21	genomi RNS	NC_001351	Farkas és mtsai., 1999	
				HSVd-R				AGGGGCTCAAGAGAGGATCCG
GYSVd-1	GYSVd-1-F	TCACCTCGGAAGGCCGCCGGG	60	31-51	genomi RNS	NC_001920	Czotter és mtsai., 2018b	
				GYSVd-1-R				GTGAAACCACAGGAACACAGG
GYSVd-2	GYSVd-2-F	GTACTTTCCTTATCTCGAAGC	60	184-204	genomic RNS	NC_003612	Czotter és mtsai., 2018b	
				GYSVd-2-R				CTAGCGCTCCGGTCCGGTCG

3.1.7. PCR termék tisztítása és szekvenálása

A kapott termékek egy részének bázissorrendjét a tisztított PCR termékek hagyományos Sanger szekvenálásával is ellenőriztük. A PCR reakciókhoz ebben az esetben Q5® High-Fidelity DNA polimeráz, 3'→5' exonukleáz aktivitással rendelkező enzimet (NEB) használtunk. A vírus specifikus PCR termékeket 1.2%-os gélből visszaizoláltuk és Thermo Scientific GeneJET Extraction Kit segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően kitisztítottuk, majd 30 µl MQ vízben oldottuk vissza. A Sanger szekvenálást a BIOMI Kft végezte számunkra. A szekvenciák és az adatbázis vírus szekvenciáinak összehasonlítását CLUSTAL Omega programmal végeztük, filogenetikai elemzésükhöz MEGA v.6 program, Neighbor-joining módszerét alkalmaztuk.

3.1.8. Klónozás

Az egyes vírusdarabok klónozásához a cDNS-ekről indított PCR reakciókat Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific) vagy Q5 High-Fidelity (NEB) DNS polimeráz enzimmal végeztük, melyek 3'→5' exonukleáz aktivitással rendelkeznek. A PCR termékeket ezt követően 1.2%-os gélből visszaizoláltuk és GeneJET Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével, a gyártó utasításait követve kitisztítottuk, majd 30 µl MQ tisztaságú vízben oldottuk vissza.

Ligálás és transzformálás

A tisztított PCR termékeket CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) pJET1.2 vektorába klónoztuk. A ligálást a gyártó útmutatása szerint végeztük, azzal a különbséggel, hogy 20-30 percen át inkubáltuk szobahőmérsékleten a ligálást.

A ligálási keveréket *E. coli* DH5α plazmid mentes kompetens sejtekbe juttattuk (transzformálás). 5 µl ligátumot, 200 µl jégen, lassan kiolvasztott kompetens baktérium-szuszpenzióval finoman elegyítettük, majd 20 percen át jégen tartottuk. Ezután 30 másodpercre 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd azonnal jégre tettük pár percre a szuszpenziót. Ezt követően 500 µl folyékony SOC táptalajt adtunk hozzá, és 37 °C-on 40 percen keresztül rázattuk. 200-250 µl-nyi baktérium szuszpenziót ampicillin tartalmú szilárd LB táptalajon kiszélesztettünk. A kész lemezeket egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A táptalajon csak azok a baktérium kolóniák lesznek életképesek és nőnek fel, amelyekben az inzert beépülése következtében a plazmidban lévő, a baktériumra toxikus

enzim működésképtelenné vált. Ennek ismeretében minden lemezről 4–6 különálló telepet oltottunk le folyékony, ampicillin tartalmú LB tápoldatba, majd egy éjszakán át 37 °C-on ráztuk őket.

A plazmid izolálás baktériumtenyészetből és a klónozás ellenőrzése

A baktérium sejtéből a rekombináns plazmid DNS tisztítását Plasmid DNA purification kit-tel (Macherey-Nagel) végeztük. A plazmid DNS-t végül 50 µl MQ tisztaságú vízben oldottuk vissza. Az klónozott DNS darabok jelenlétének ellenőrzését a XhoI és XbaI (Thermo Fisher Scientific) restrikciós enzimekkel való emésztéssel végeztük. A reakcióelegyet 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd a hasítás termékeit 1.2 %-os TBE agaróz gélen tettük láthatóvá. A nukleotid sorrend meghatározását a BIOMI Kft végezte számunkra.

Szekvencia elemzések

A nukleotid és aminosav szekvenciák vizsgálatához az NCBI adatbázist és CLUSTAL Omega programot, a szekvenciák illesztéséhez, a filogenetikai vizsgálatokhoz MEGA v.6 program Neighbor-joining algoritmusát alkalmaztuk. A filogenetikai törzsfák vizsgálatánál az alkalmazott bootstrap (ág-támogatottsági érték) érték: >70% (1000 bootstrap ismétlés) volt. A szekvenált részleges vírus szekvenciák közül 105 izolátum szekvenciáját helyeztük el a nemzetközi GenBank adatbázisban (3. melléklet).

3.1.9. Northern blot analízis

A vizsgálni kívánt, tisztított RNS-ekből mintánként 4-5 µg-ot használtunk fel. A mintákhoz egyenlő arányban mintakezelőt adtunk (10xMAE puffer, formamid, formaldehid, 10mg/ml EtBr), majd 20 percig 65°C-on denaturáltuk őket. Ezt követően az RNS mintákat formaldehides, 1.5%-os agaróz gélben, MAE pufferben (0,1M MOPS [pH 7,0], 40 mM Na-acetát, 5 mM EDTA) választottuk el. Elektroforézis után a gélből az RNS-t Nytran NX membránra (GE Healthcare) blottoltuk kapilláris módszerrel 20xSSC (1xSSC: 0.15 M NaCl, 15 mM Na₃-citrát, pH=7.2) oldatban, majd UV fényel keresztkötöttük.

Hibridizáció

A membránt 10-15 percig mostuk 2xSSC oldatban (0.3 M NaCl, 30 mM Na-citrát [pH=7.2]) a hibridizálás hőmérsékletén, 65°C-on. Ezt követően membránt Church

pufferben (0.5M foszfát puffer, [pH7.2], 1% BSA, 1mM EDTA, 7% SDS) 65°C-on előhibridizáltuk, majd a már radioaktív próbát tartalmazó Church pufferben hibridizáltuk 65°C-on, egy éjszakán keresztül. Másnap a membránokat csökkenő só koncentrációt alkalmazva mostuk (2xSSC, 0.1% SDS – 5 perc, 65°C; 0.5xSSC, 0.1% SDS – 15 perc, 65°C). Végül a membránra röntgenfilmet tettünk és a jel erősségtől függően pár óráig vagy akár több napig exponáltuk, majd előhívtuk.

Radioaktív próba készítése

Vírus specifikus, radioaktív P³² jelzett, DNS-próbákat készítettünk Thermo Scientific Decalabel DNS-jelölő készlet segítségével. Ehhez PCR reakcióban amplifikált és tisztított termékeket használtunk egy adott klónozott vírus darabról:

- GPGV: GPGV5557F és GPGV7220R primerekkel amplifikált - 1663bp
- RBDV: RBDV_RNA1F_4082 és RBDV_RNA1R_5406 primerrekkel amplifikált - 1324bp
- GSV: GSVsatF72 és GSVsatR999 primerekkel amplifikált - 927bp

3.2. Fitoplazma kimutatás és meghatározás kajszi ültetvényben

3.2.1. Növényi minta gyűjtése

A kísérletek elvégzéséhez 2016. július hónapban, az ország különböző területein gyűjtöttünk levélmintákat tünetes és tünetmentes fákról. Egy fáról négy-négy levelet szedtünk a fa koronájának különböző pontjairól. A jórészt magyar, de külföldi fajtákat is tartalmazó mintákat termő ültetvényeken: NAIK-Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet Érd, Boldogkőváralja, Balatonvilágos, Siófok, Zalaszentő, valamint a NAIK-Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet érdi izolátor házaiban és törzsültetvényén gyűjtöttük (4. táblázat). A leveleket a felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

4. táblázat: Fitoplazma fertőzöttség vizsgálatára kiválasztott mintavételi helyek

	Mintavétel helye		Vizsgált fák száma
1	Termőültetvény	Érd-Elvira	9
2		Boldogkőváralja	9
3		Balatonvilágos	13
4		Siófok	8
5		Zalaszentő	4
6	Törzsültetvény	Érd-Elvira öreg	12
7		Érd-Elvira új	23
8	Izolátorház	Érd-Elvira	22

3.2.2. DNS kivonás

A fitoplazmák jelenlétének teszteléséhez 0.1-0.15 g levél szövetből tisztítottunk DNS-t, NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) készlet segítségével, a gyártó utasításait követve. Az eljárás végén kapott oldat DNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotométer segítségével, valamint a minták 1.2%-os agaróz gél-elektroforézissel történő szétválasztásával ellenőriztük.

3.2.3. Fitoplazma kimutatás polimeráz láncreakcióval

A PCR-hez univerzális fP1/rP7 (Deng & Hiruki 1991, Schneider és mtsai., 1995) és 16SrX csoport specifikus f01/r01 (Lorenz és mtsai., 1995) indítószekvenciákat használtunk (5. táblázat). Az eljárás két egymást követő szaporítási szakaszból áll, amely során először a nagyobb szakaszt szaporítjuk fel, és ezt használjuk hígítva (1:40), templát DNS-ként a második szakaszban.

PCR reakció

Az első PCR reakcióelegy (15µl) tartalmazta az 1µl cDNS-t, 0.75-0.75µl fP1- rP7 primer szekvenciákat (10 pmol/µl), 0.3 µl dNTP mixet (10 mM), 5X Phire puffert 3µl mennyiségben és 0,3 µl Phire polimeráz enzimet, valamint 9,4 µl MQ tisztaságú vizet. A DNS fragmenteket 40 ciklusban szaporítottuk fel a következő paraméterek mellett: 98°C 30 másodperc, 55°C 10 másodperc, 72°C 20 másodperc és végül 72°C 1 percig. A kapott PCR termékeket agaróz gélen (1.2%) méret szerinti elválasztással, gélelektroforézissel ellenőriztük. A P1/P7 univerzális primer az egész 16S és 16-23S intergenikus szakaszt felszaporítja (1784 bp).

Nested PCR

A második PCR reakcióhoz, olyan primereket használtunk, amelyek az univerzális primerek által felszaporított részen belül helyezkednek el. Ez a módszer a kimutatás érzékenységét jelentősen növeli.

A nested-PCR reakcióelegy (15µl) tartalmazta az 1µl 1/40 hígított P1/P7 PCR terméket, 0.75-0.75µl f01-r01 primer szekvenciákat (10 pmol/µl), 0.3 µl dNTP mixet (10 mM), 5X Phire puffert 3µl mennyiségben és 0.3 µl Phire polimeráz enzimet, valamint 9.4 µl MQ tisztaságú vizet. A reakciókat ugyanazokkal a paraméterekkel végeztük el, mint az egyszerű PCR esetében. A kapott PCR termékeket (1100 bp) agaróz gélen (1.2%) méret szerinti elválasztással, gélelektroforézissel ellenőriztük.

Vizsgálatink legelején még nem rendelkezünk '*Ca. P. prunorum*' kontrollal, így pozitív kontrollként a 16SrI csoportba tartozó *Aster Yellow*s fitoplazmával fertőzött *Tagetes* DNS mintát használtunk. Ebben az esetben az első PCR során fitoplazma fertőzés esetében kapunk jelet, azonban a 16SrX csoportra specifikus nested-PCR végén már nem kaptunk terméket.

5. táblázat: A 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák kimutatására és azonosítására felhasznált primerek

Gén	Méret (bp)	Primer név	Szekvencia (5' → 3')
16Sr DNS	1784	fP1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT
		fP7	CGTCCTTCATCGGCTCTT
	1071	f01	CGGAAACTTTTAGTTTCAGT
		r01	AAGTGCCCAACTAAATGAT

3.2.4. PCR termék tisztítása és szekvenálása

A kapott termékek egy részének bázissorrendjét a tisztított PCR termékek hagyományos Sanger szekvenálásával is ellenőriztük. Ebben az esetben a PCR reakciókat Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific) DNS polimeráz enzimmal végeztük, mely 3'→5' exonukleáz aktivitással rendelkezik. A fitoplazma specifikus PCR termékeket 1.2%-os gélből visszaizoláltuk és Thermo Scientific GeneJET Extraction Kit segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően kitisztítottuk, majd 30 µl MQ vízben oldottuk vissza. A Sanger szekvenálást a BIOMI Kft végezte. A szekvenciák összehasonlítását CLUSTAL Omega programmal, a filogenetikai elemzésekhez MEGA v.6 program Neighbor-joining módszerét alkalmaztuk. A filogenetikai törzsfák vizsgálatánál az alkalmazott bootstrap érték: >70% (1000 bootstrap ismétlés) volt.

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1. Kis RNS NGS-en alapuló vírusdiagnosztikai eljárás technológiai leírása

Munkánk során kidolgoztunk egy új, vírus-eredetű kis RNS-ken alapuló vírusdiagnosztikai eljárást, mely segítségével a hazai szőlő ültetvényekből izolált kis RNS könyvtárak elemzésével felmérhetjük a szőlő ültetvények vírus fertőzöttségi állapotát. A kidolgozott protokoll rövid leírása és a legfontosabb észrevételek kiemelése (részletes leírása: Czotter és mtsai., 2018):

1) Mintagyűjtés: A minta begyűjtésének módja és időpontja körültekintő tervezést igényel, hogy elkerüljük a téves eredményeket és következtetéseket. Fontos a megfelelő időpont kiválasztása a vírus koncentráció szezonális fluktuációjából adódóan. Tapasztalataink alapján fás szárúak esetében a növekedési periódusban (április-július) való mintavétel a legideálisabb. A minták feldolgozását tekintve az egy egyed különböző szerveiből izolált RNS-ek, majd egy ültetvény több egyed RNS-ének kombinálása („poolozása”) megoldást jelenthet a fent említett problémák elkerülésére.

2) RNS izolálás: A kiváló minőségű RNS izolálása és a fás szárúak esetében az RNS extrakciót jelentősen megnehezítő poliszacharidok és polifenolok eliminálása érdekében a mintáinkból Gambino & Gribaudo (2008) optimalizált módszerével vontunk ki minden esetben RNS-t a friss, vagy -70 °C-on tárolt mintákból.

3) Kis RNS könyvtár készítés: A könyvtár preparálás az Illumina TruSeq Small RNA Library Prep. kit protokollja alapján történt. A jobb minőség elérése érdekében a könyvtárakat 15-30µg RNS kivonat gélből tisztított kis RNS frakcióból készítettük.

4) Szekvenálás: Számos cég kínál különböző szekvenáló platformokat. Ennek megválasztásánál érdemes figyelembe venni, hogy a leolvasások minősége függ az RNS minőségétől, valamint a read-ek száma (szekvenálás mélysége) összefügg a szekvenáló berendezéssel és az egy szekvenáló lane-ben együtt szekvenált könyvtárak számától is. Mivel fás szárúakban a vírus-eredetű kis RNS-ek száma általában igen alacsony, ezért tapasztalatunk szerint 10-12 könyvtárnál több egy lane-ben történő szekvenálása nem ajánlott. A kis RNS könyvtárakat Illumina platformon szekvenáltattuk 50bp-os leolvasással.

5) Kis RNS read-ek bioinformatikai elemzése: A bioinformatikai elemzéshez használt programokat és lépéseket az Anyag és módszer részben részletesen ismertettem. A módszer kidolgozása során legfőbb célunk az volt, hogy megtaláljuk azokat a programokat és elemzési beállításokat, melyekkel a leghatékonyabban elemezhetőek kis RNS szekvenálási adataink. Az adatok hagyományos módszerekkel történő validálása alapján három paraméterre egy-egy küszöbértéket határoztunk meg, melyek esetében a vírus előfordulása a mintában nagy valószínűségű. A bioinformatikai elemzések eredménye egy vírus lista, melynek eredményei molekuláris biológiai módszerekkel (pl. RT-PCR) visszaigazolhatóak.

4.2. Szőlő ültetvények vírushatározottságának felmérése kis RNS alapú új generációs szekvenálással (NGS)

Vizsgálatainkhoz a mintázott szőlő ültetvényeken random módon, tünetes és tünetmentes tőkékről egyaránt gyűjtöttünk mintát 2014 májusában, néhány esetben pedig hajtattott mintával dolgoztunk. A 14 termőültetvény fajtaösszetételét és korát tekintve is rendkívül változatos volt (2. táblázat). Annak érdekében, hogy átfogóbb képet kapjunk az egyes ültetvényekben jelen levő vírusokról, az ültetvény egyedeit reprezentáló RNS keverékeket (poolt) készítettünk az RNS kivonatokból. Ezekből készítettünk kis RNS könyvtárakat, melyek az egyes szőlő ültetvényeket (1-13 könyvtár) reprezentálták, illetve egy esetben ugyanazon ültetvény, különböző fajtáit (14-18 könyvtár). Az elkészített és egyedi index szekvenciákkal ellátott kis RNS könyvtárakat Illumina platformon szekvenáltattuk (8 minta/szekvenáló lane).

4.2.1. A szekvenálás és minőségének meghatározása

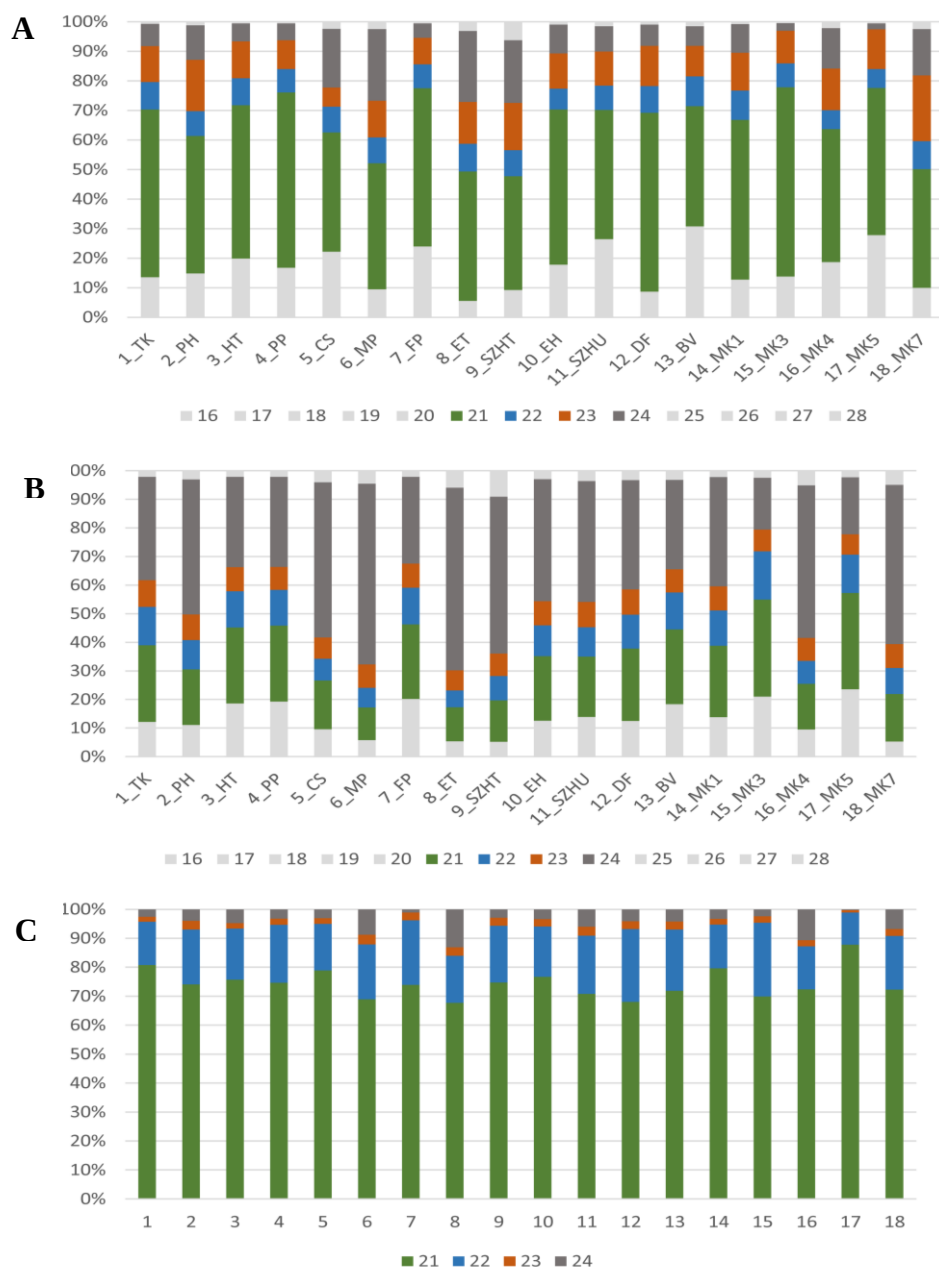
A szekvenálását követően az egyedi index szekvenciák alapján szétválogatott könyvtárak szekvenálásának minőségét minden esetben *FASTQC* programmal végeztük. A könyvtárak szekvenálásának minősége megfelelő volt, így folytathattuk elemzésüket. A nyers szekvenálási adatok alapján a szekvenált könyvtárak 8-14 millió read-et, átlagosan 10.006.951 millió read-et tartalmaztak (1. melléklet). Ez a tendencia a szekvenciák trimmelése után sem változott meg (átlag 9.366.732 millió read), nem volt jelentős a szekvencia veszteség. A trimmelés során a szekvenáláshoz szükséges univerzális indító és adapter szekvenciákat távolítottuk el a leolvasások végéről. Az alapelemzési lépéseket

követően megszüntettük a redundanciát adatainkban, vagyis meghatároztuk a nem-redundáns read számot (560.000-1.6 millió/könyvtár), anélkül, hogy a szőlő specifikus kis RNS-ek eltávolítottuk volna adatainkból. Elemzésünk következő lépésében, a kis RNS read-ek vírus referencia genomokra való illesztésével meghatároztuk a virális eredetű kis RNS-ek számát. A virális kis RNS szekvenciák illeszkedése a redundáns read-ek esetében a kapott leolvasások 2.3%-11.7%, míg a nem-redundáns read-ek esetében 3.3%-13% volt (1. melléklet).

4.2.2. Vírus eredetű kis RNS-ek méreteloszlása

A kis RNS-ek a különböző növényi DCL enzimek hasításának eredményeként keletkeznek. *Arabidopsis thaliana* növényben a DCL fehérjecsald négy tagja (DCL1, -2, -3 és -4) ismert, melyek részt vesznek az endogén folyamatok szabályozásában és az antivirális RNS csendesítésben egyaránt (Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009). A DCL4 felelős a 21nt hosszúságú kis RNS-ek kialakulásáért, a DCL2 22nt hosszúságú, a DCL3 24nt hosszúságú kis RNS-eket vág a dupla szálú RNS-ből (dsRNS), míg a DCL1 szintén 21nt hosszúságú kis RNS-eket hasít. A négy *Arabidopsis* DCL enzim homológjait *Vitis vinifera* genomban is azonosították (Vv-DCL) (Zhao és mtsai., 2015). Kutatásukban kimutatták, hogy Vv-DCL1 egyetlen RNáz III domént tartalmaz, a Vv-DCL2 és Vv-DCL3-ből hiányzik a dsRB domén, továbbá a Vv-DCL4 nem tartalmaz PAZ domént. Ennek ellenére, valószínűleg teljesen funkció képesek, mivel mintáinkban valamennyi méretű kis RNS (21nt, 22nt, 23nt, 24nt) megtalálható volt (6. ábra).

Megvizsgáltuk a redundáns kis RNS szekvenciáink méreteloszlását, ez alapján a többségük a 21-24nt közötti mérettartományba tartozik (6. ábra/A), ami azt is igazolta, hogy maga, a könyvtárkészítés sikeres volt. A kis RNS read-ek legnagyobb része 21nt hosszúságú mérettartományba esett, mely tartalmazta a mikroRNS szekvenciákat is, egybehangzóan korábbi vizsgálatokkal (Pantaleo és mtsai., 2010). A nem-redundáns read-ek esetében a 24nt hosszú kis RNS-ek túlsúlya érvényesült (6. ábra/B), valószínűleg a transzkripcionális géncsökkentés következményeként (TGS). Az antivirális géncsökkentés során a DCL4 és DCL2 hasítja a vírus eredetű dsRNS-eket kis RNS-ekre. A méreteloszlás vizsgálatot a vírus és viroid specifikus kis RNS-ekre szűkítve, azt tapasztaltuk, hogy mintáinkban a 21-22nt hosszú kis RNS-ek voltak a dominánsak, ami alapján feltételezhető, hogy szőlőben is a DCL2 és DCL4 enzimek játszhatják a kulcsszerepet a vírus eredetű kis RNS biogenezisben (6. ábra/C).



6. ábra: Kis RNS read-ek méreteloszlás vizsgálata az egyes könyvtárakban ültetvényenként

A: trimmelt kis RNS-ek méreteloszlása, B: nem-redundáns kis RNS-ek eloszlása, C: virális eredetű, redundáns kis RNS szekvenciák méreteloszlása

4.2.3. Virális kis RNS szekvenciák eredete a vizsgált 18 szőlő ültetvényben

A vírusok jelenlétének meghatározásához a kis RNS szekvenciákat felillesztettük, valamennyi ismert növényi és rovarfertőző vírus referencia genomjára (read bwa). Ezt követően meghatároztuk, hogy egy adott vírus genomjának, hány %-áról van szekvencia információnk (lefedettségi érték, %). Ezzel párhuzamosan a Velvet program segítségével a kis RNS-eket átfedő szakaszaik alapján hosszabb RNS darabokat (ún. kontigok) építettük össze (Zerbino & Birney, 2008), majd az így kapott hosszabb, kontig szakaszokat a vírus referencia genomokra illesztettük fel (kontig blast).

A két eltérő stratégiai elemzéssel a 18 szőlő ültetvényben a következő vírusok jelenlétét vizsgáltuk: Szőlő fertőző leromlás vírus (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV), Arabisz mozaik vírus (*Arabis mosaic virus*, ArMV), Szőlő levélsodródás vírus 1-3 (*Grapevine leafroll-associated virus 1-3*, GLRaV1-3), Szőlő A vírus (*Grapevine virus A*, GVA), Szőlő B vírus (*Grapevine virus B*, GVB), Szőlő foltosodás vírus (*Grapevine fleck virus*, GFkV), Szőlő króm-mozaik vírus (*Grapevine chrome mosaic virus*, GCMV), Rupestris faszöveti barázdáltság vírus (*Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*, GRSPaV), Málna bokros törpülés vírus (*Raspberry bushy dwarf virus*, RBDV) és viroidok: Komló törpülés viroid (*Hop stunt viroid*, HSVd) és Szőlő sárga foltosság viroid (*Grapevine yellow speckled viroid 1-2*, GYSVd-1 és 2).

Kis RNS szekvenálással azonosított további, Magyarországon ezelőtt nem leírt szőlőt fertőző vírusok: *Grapevine redglobe virus* (GRGV), *Grapevine asteroid mosaic-associated virus* (GAMaV), *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVfV), Szőlő Syrah vírus1 (*Grapevine Syrah virus1*, GSyV1), Szőlő Pinot gris vírus (*Grapevine Pinot gris virus*, GPGV), Szőlő szatellit vírus (*Grapevine satellite virus*, GSV). A bioinformatikai elemzések részletes és pontos eredményeit, valamennyi vírusra, viroidra és vizsgált szőlő ültetvényre vonatkozóan a 2. melléklet táblázatában összesítettük. Az adatok elemzését követően olyan küszöbértékeket határoztunk meg, mely nagy valószínűséggel megmutatta az adott vírus jelenlétét:

- Legalább egy vírus-specifikus kontig összeépítése, bármelyik kmer érték (kmer13, 15, 17) alkalmazásával.
- Lefedettségi %-érték magasabb, mint 40% a vírusok és magasabb, mint 80% viroidok esetében.

Az eredmények és elemzésük alapján elmondható, hogy a vizsgált ültetvények mentesek voltak GFLV, ArMV és GLRaV2 vírusfertőzéstől, míg sok esetben akár 13 különböző vírus, viroid egyidejű jelenlétét tapasztaltuk ugyanazon ültetvény esetében.

4.2.4. Szekvenálási eredmények validálása vírus specifikus RT-PCR reakcióval

A kis RNS szekvenálási eredményeket RT-PCR reakcióval vizsgáltuk és igazoltuk vissza, melynek során publikált vírus diagnosztikai primereket, illetve sok esetben saját kis RNS szekvenciánk alapján tervezett primereket (3. táblázat) használtunk. A kapott PCR termékeket 1.2%-os agaróz gélen választottuk el, termékeinket klónoztuk és nukleotid sorrendjüket hagyományos Sanger szekvenálással is meghatároztuk. Ezt követően a vírus szekvenciák elhelyezésre kerültek az NCBI GenBank nemzetközi adatbázisba (3. melléklet).

A kis RNS NGS alapú vírus diagnosztika eredményeit és összehasonlítását az RT-PCR eredményekkel a 6. táblázatban összegeztük. Az eredményeink azt mutatják, hogy a kis RNS NGS alkalmazhatósága és megbízhatósága, mint diagnosztikai eszköz vírusonként nagyon eltérő lehet. Így az összes azonosított vírust, víruscsoportot külön tárgyaljuk a továbbiakban. A felsorolás a 6. táblázat sorrendjét követi.

6. táblázat: A kis RNS NGS eredmények és az RT-PCR visszaigazolások összefoglalása

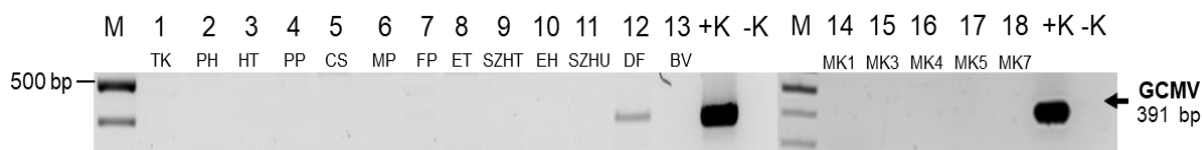
Könyvtár kód	Újtévény kora	Elemzés típusa	Nepovírusok			Szőző leviselődródás vírusok			Vírusok			Tymovírusok						Nem tesztelt vírusok			Vírusok		Virális kórokozók teljes száma egy újtévényben																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
			Nepovírusok			Szőző leviselődródás vírusok			Vírusok			Tymovírusok			Nem tesztelt vírusok			Vírusok																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
			CFLV	ArMV	GCMV/GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GVA	GVB	GFKV	GRGV/GAMaV	GRFV new	GRFV	GRFV	GSyV	GRSPaV	GPGRV/RBDVs	GSV	HSVd	GYSVd-1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1_TK	20	contig blast read bwa PCR	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

A bioinformatikai elemzések eredményei (contig blast, read bwa) 0 és 1 jelöli. A 0 jelölte, ha nem kaptunk találatot az adott vírusra, míg az 1 jelölte, ha legalább egy kontig szekvenciát összehasonlítottunk építeni, vagy a vírus genom lefedettségé magasabb volt, mint 40% (vírusok esetében), 80% (viroidok esetében). Az RT-PCR eredményét 1-el jelöltük, amennyiben kaptunk PCR terméket, vagy S-el, ha a termékről Sanger szekvenálás is készült. A kapott vírus találatokat szűrővel kiemeltük.

4.2.5. Kis RNS NGS, bioinformatika és molekuláris biológiai módszerek együttes kombinációjával azonosított szőlő vírusok

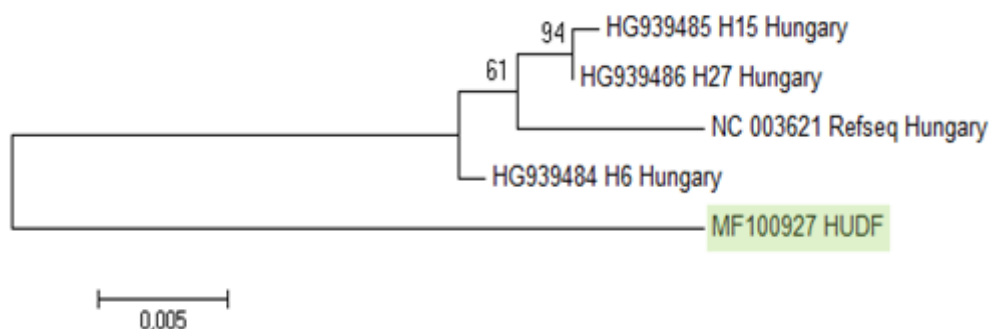
Szőlő krómmozaik vírus, GCMV

Az egyetlen *Nepovirus* nemzetségbe tartozó vírus, melyet hazai mintáinkban detektáltunk, a GCMV volt. A szőlő vírust a 12_DF tokaji ültetvényben mutattuk ki (6. táblázat). A vírus köpenyfehérje (CP) génjének egy részét amplifikáltuk, majd meghatároztuk aminosav szekvenciáját (7. ábra). A filogenetikai vizsgálat során összehasonlítva a Nemzetközi adatbázisban található izolátumok GCMV RNS2 köpenyfehérje szekvenciáit, melyek szintén magyarországi eredetűek (Elbeaino és mtsai., 2014), azt találtuk, hogy azok egymással közelebbi rokonságban állnak (több mint 96% hasonlóság a CP régióban), mint az általunk azonosított variánssal (88-89% hasonlóság) (8. ábra). Az adatbázisban található magyar származású GCMV RNS2 izolátumok pontos eredete azonban nem ismert, így nem zárható ki azok közös eredete sem. Ebben az esetben feltételezhető a GCMV variánsunk önálló fejlődése, ami magyarázat lehet a tapasztalt különbségre.



7. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz



8. ábra: GCMV izolátumaink, a referencia genom és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján.

Szőlő levélsodródás vírus 1 és 3 (GLRaV1-3)

A szőlő levélsodródás vírus csoport tagjai közül két vírust azonosítottunk és igazoltuk vissza jelenlétüket az általunk vizsgált ültetvény mintákban:

A **GLRaV1** vírust összesen 9 mintában detektáltuk (6. táblázat). Az RT-PCR visszaigazolás során használt, az irodalomban publikált primerekkel azonban nem tudtuk mind a 9 mintában kimutatni a vírus jelenlétét (9. ábra/A). A vírus egy kevésbé variábilis régiójára, HSP70 génjére, a mintáink kis RNS szekvenciái alapján új primer párt terveztünk, melyekkel a 9-ből 8 mintában sikeresen igazoltuk a GLRaV1 jelenlétét (9. ábra/A). A 13_BV mintában azonban nem kaptunk PCR terméket. Ahhoz, hogy eldöntsük, hogy vajon ebben a mintában valóban jelen van-e ez a vírus, a továbbiakban az ültetvény pool helyett, visszanyúltunk a 13_BV ültetvény egyedeinek RNS keverékeihez. Az ültetvényt alkotó egyedek RT-PCR vizsgálata esetében az 5 egyedből csupán 2-ben kaptunk vírus-specifikus terméket (9. ábra/B). Ez megmagyarázza, mért nem tudtuk az ültetvény keverékből kimutatni a jelenlétét.

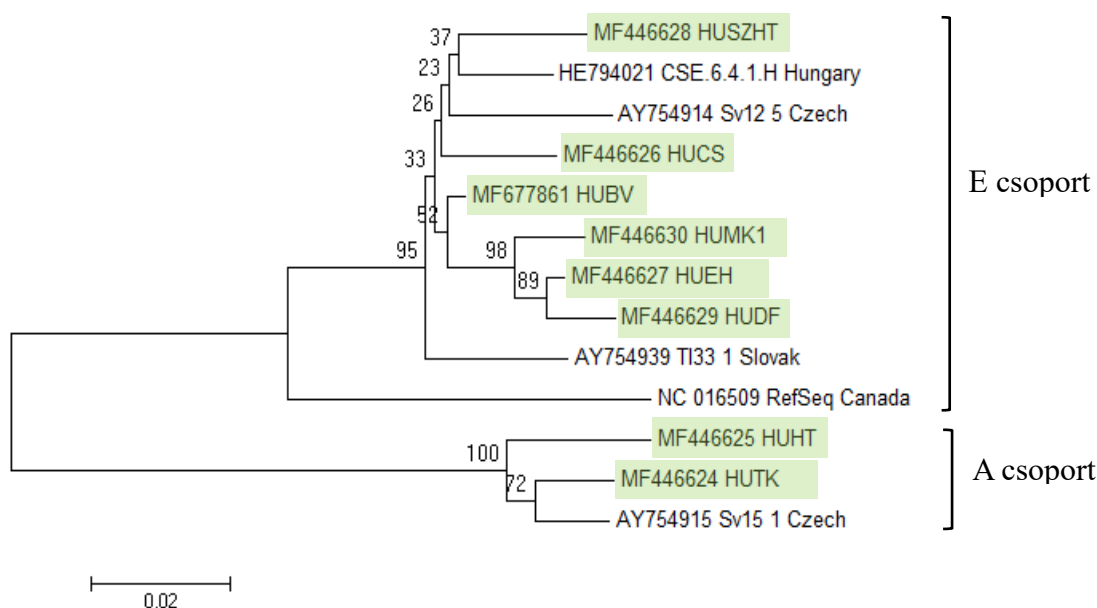


9. ábra: A/Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/ A 13_BV ültetvény egyedeinek tesztelése GLRaV1 vírus jelenlétére

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

Az izolátumok HSP70 génjének 1032bp hosszú szakaszának filogenetikai elemzése szerint - Kominek és munkatársai (2005) közleményében megjelentekhez hasonlóan - a genetikai változékonyságuk alapján két, A és E csoportot lehetett elkülöníteni (10. ábra). Továbbá az izolátumok és a referencia genom között csupán 82-92%-os hasonlóságot tapasztaltunk, mely a vírus nagymértékű változékonyságát mutatja. Változékonyságának köszönhetően a GLRaV1 vírust a hagyományos diagnosztikai módszerek sok esetben nem

tudják kimutatni (Esteves és mtsai., 2013). Az NCBI GenBank tartalmaz egy magyarországi eredetű, filogenetikailag E csoportba tartozó, GLRaV1 vírus izolátumot (CSE_6.4.1.H) (Cseh és mtsai., 2013), mely azonos földrajzi régióból származik, mint a mi HUTK és HUHT jelzésű mintáink, melyek az A csoportba klasztereződnek. Ez arra enged következtetni, hogy a fertőzés forrása, nem földrajzi eredetű, hanem nagy valószínűséggel a fertőzött szaporítóanyag lehet.



10. ábra: GLRaV1 izolátumaink, a referencia genom és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján.

A **GLRaV3** vírust a 14_MK1 és a 15_MK3 könyvtárakban detektálta a kis RNS szekvenálási elemzés, mely eredménnyel az irodalomban publikált primerekkel végzett RT-PCR visszaigazolási eredmények teljesen megegyeztek (11. ábra).



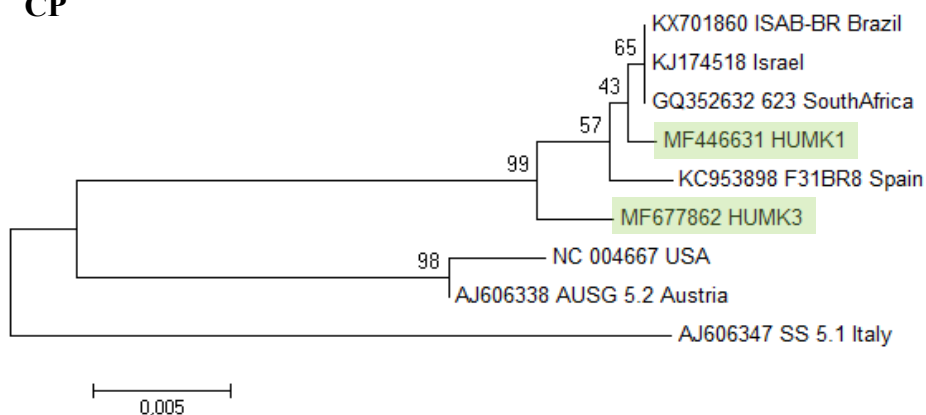
11. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

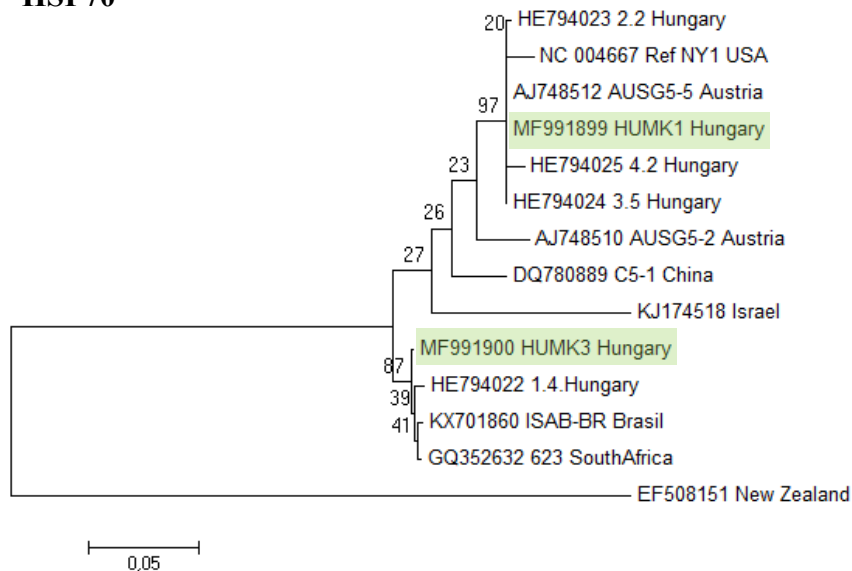
A két izolátum (HUMK1 és HUMK3) CP génjük 336bp hosszú szekvenciájának filogenetikai analízise szerint 98%-ban megegyeznek, míg az amerikai referencia

genomjukkal 91%-os hasonlóságot mutattak (12. ábra). Az izolátumok rokonsági viszonyait a szőlő levélsodródás vírus csoportra jellemző, HSP70 gén alapján is megvizsgáltuk, ahol izolátumaink két csoportra különülnek el az ország különböző pontjairól származó más, az adatbázisban megtalálható magyarországi izolátumokkal (Cseh és mtsai., 2013) (12. ábra). A 14_MK1 és 15_MK3 minták, bár azonos ültetvényről származnak, de két eltérő fajtát képviselnek. Mivel ezek a földrajzilag azonos helyről származó változatok filogenetikailag eltértek egymástól, így valószínűbb, hogy a vírus variánsok jelenléte szaporítóanyag eredetű, mint egy esetleges helyszíni fertőzés eredménye.

CP



HSP70

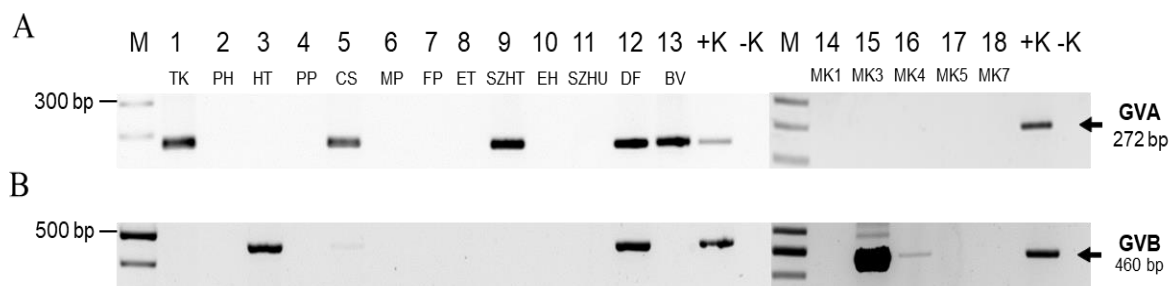


12. ábra: GLRaV3 izolátumaink CP és HSP70 génjének, a referencia genomok és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján.

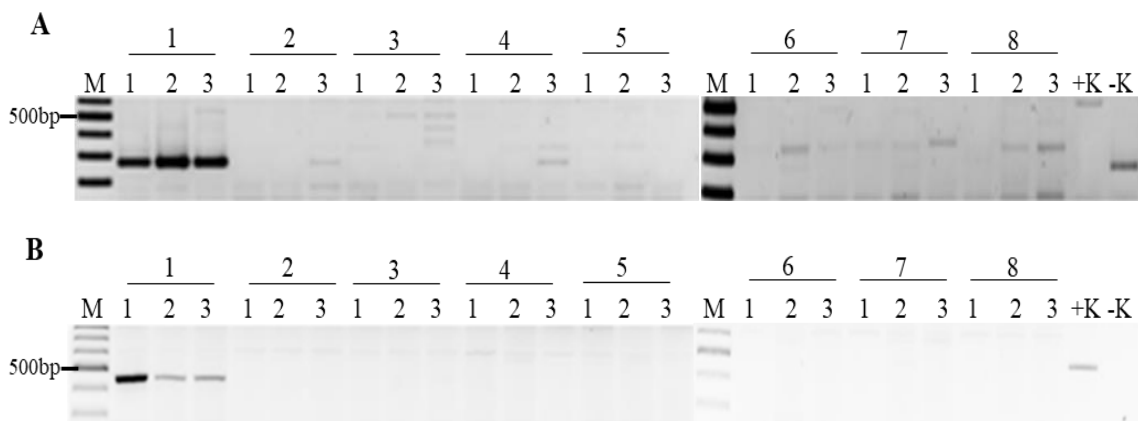
Szőlő A és B vírus (GVA, GVB)

Két, a *Vitivirus* nemzetségbe tartozó vírus jelenlétét mutattuk ki: a GVA vírust 5 ültetvényben, míg a GVB vírust 2 ültetvényben detektáltuk (6. táblázat, 13. ábra/A, B). A 12_DF mintában valós jelenlétük nem volt egyértelmű. Annak ellenére, hogy PCR terméket kaptunk és klónoztuk azt mindkét vírus esetében, a kis RNS NGS eredmények a GVB vírust egyáltalán nem jelezték előre, és a GVA esetében sem volt egyértelmű jelenléte az ültetvényben. A kérdés tisztázására teszteltük az 12_DF ültetvény egyedeit a GVA és GVB vírusokra. Így fény derült arra, hogy az ültetvény egyetlen egyede volt fertőzött a vírusokkal (14. ábra/A,B), ami csökkentheti a módszer érzékenységét.



13. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval A/GVA, B/GVB vírus esetében

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

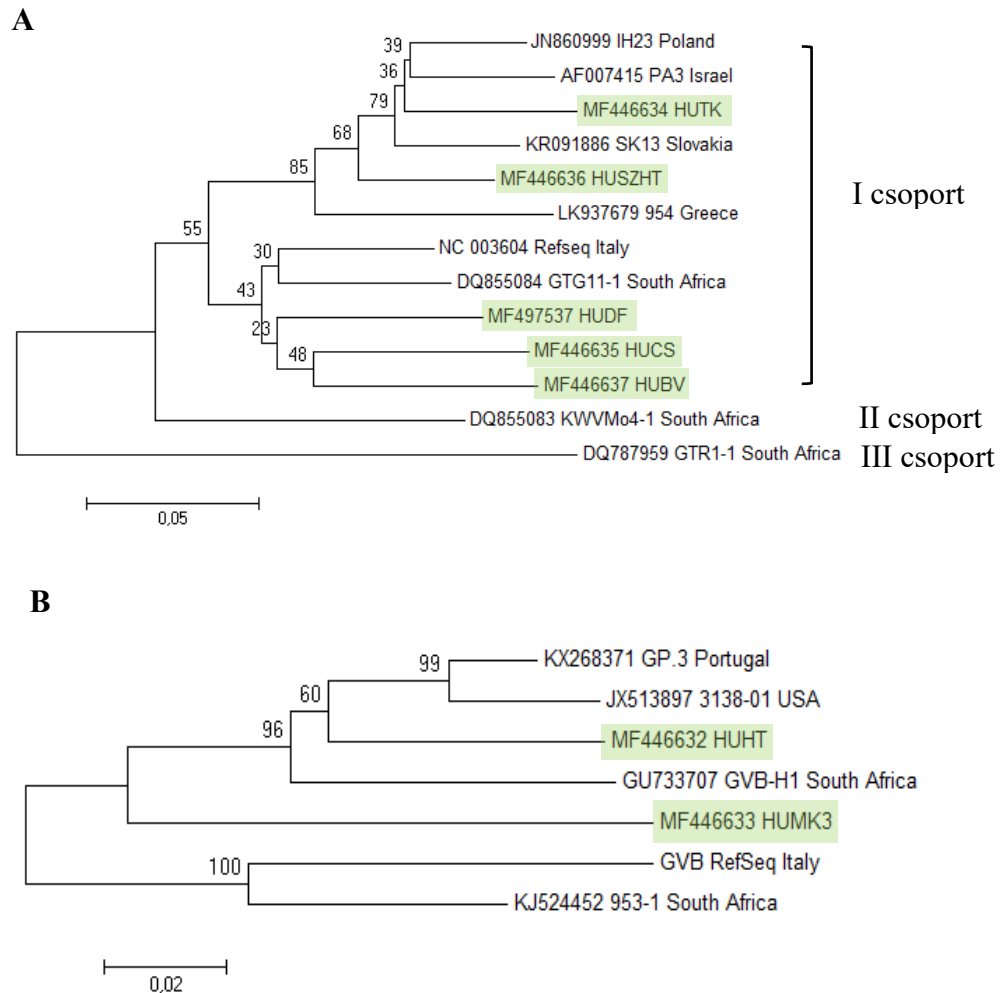


14. ábra: A 12_DF ültetvény egyedeinek tesztelése A/GVA és B/GVB vírus jelenlétére

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-8: DF ültetvény 8 egyede, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

GVA vírus izolátumok filogenetikai vizsgálatuk szerint, az olaszországi eredetű referencia genommal (NC_003604) 85-90% hasonlóságot mutatnak, valamint izolátumaink, más európai eredetű GVA variánsokkal együtt az I. filogenetikai csoportba

tartoznak (Goszczynski, 2014) (15. ábra/A). A GVB variánsok esetében nagyobb mértékű genetikai variabilitást tapasztaltunk: az izolátumok 85%-os hasonlóságot mutattak egymással összevetve, ennek megfelelően különböző rokonsági csoportokba tartoztak (Fonseca és mtsai., 2016) (15. ábra/B).



15. ábra: A/GVA és B/GVB izolátumaink, a referencia genomok és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata
A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján.

Az eredmények szerint a kis RNS NGS alapú vírus diagnosztikai eljárás a *Vitivirusok* esetében is jól működött. Azonban eredményeink alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy ha ültetvény pool sok nem fertőzött egyed RNS kivonatait is tartalmazza, az jelentősen csökkentheti a kimutatás érzékenységét és további kiegészítő vizsgálatok nélkül az egyenlőtlen, enyhe fertőzések nem mutathatóak ki egyértelműen.

Szőlő foltosodás vírus (GFkV)

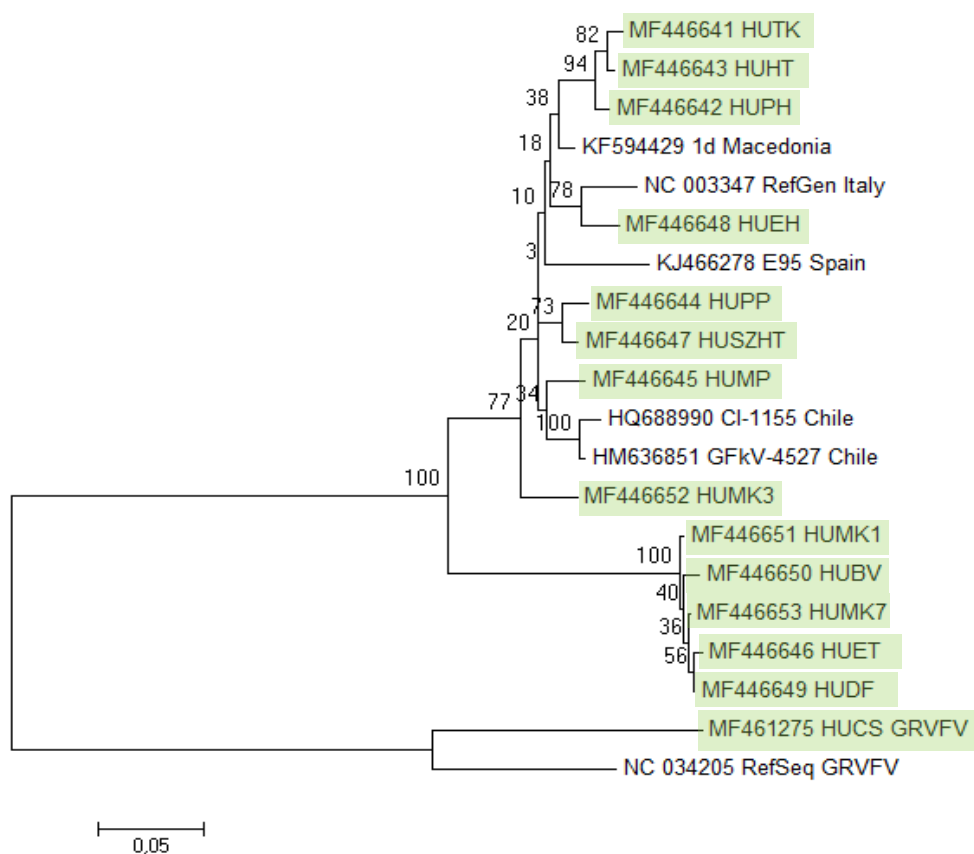
A GFkV vírus az egyik legelterjedtebb vírusnak bizonyult vizsgálatunk során: 18-ból 14 ültetvény esetében tapasztaltunk GFkV fertőzöttséget. A kis RNS NGS alapú vírus diagnosztika és a vírus RT-PCR visszaigazolása a legtöbb esetben, összhangban állt egymással (6. táblázat, 16. ábra). A 8_ET mintánál azt tapasztaltuk, hogy az irodalmi primerekkel nem volt sikeres a PCR alapú visszaigazolás, így a kapott kis RNS szekvenciák alapján új primer párt terveztünk a vírusra, mely használatával alátámasztottuk az adott ültetvényben a vírus jelenlétét (16. ábra).



16. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

A GFkV izolátumok filogenetikai elemzése nagymértékű variabilitást mutatott: 85-95%-os hasonlóság az olasz referencia szekvenciával (NC_003347) (17. ábra). Az 5_CS minta esetében azt a megfigyelést tettük, hogy a klónozott PCR termék szekvenciája alapján az izolátum nem GFkV, hanem GRVFV (az izolátum NCBI GenBank azonosítója: MF461275) eredetű, ami a két vírus magas szintű hasonlóságára utalhat. A *Tymovirusok* közeli rokonságban állnak; sok esetben együtt is élhetnek ugyanabban a növényben; a GFkV víusról ismert GRGV-al, GAMaV-al és GRVFV vírussal való együttes előfordulása (Sabanadzovic és mtsai., 2000) és néhány esetben GSyV1-el is, ezért nem meglepő, hogy ezeket a vírusokat a legtöbb mintánkban detektálni tudtuk.

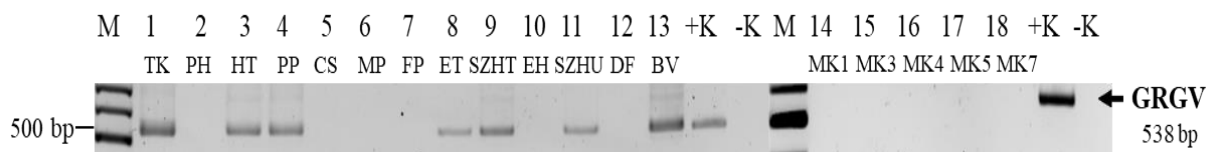


17. ábra: GFkV izolátumaink, a referencia genom és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján.

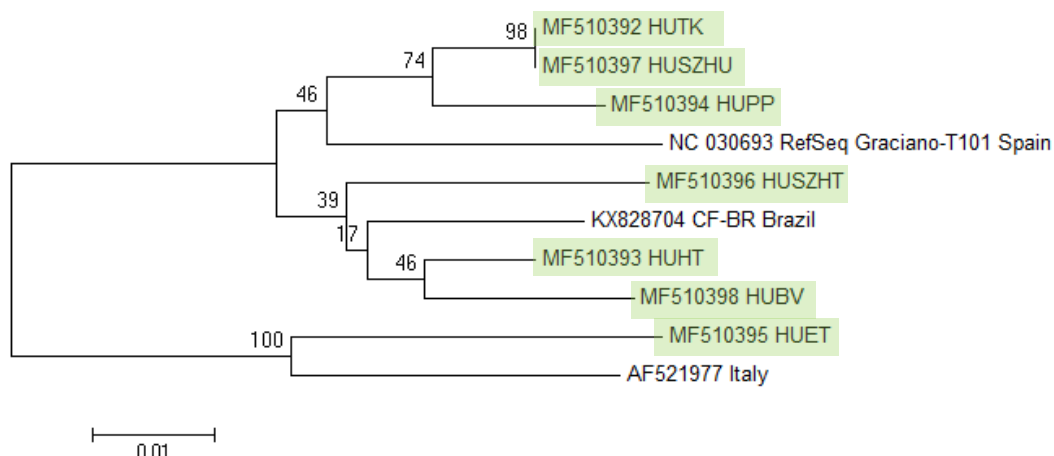
Grapevine redglobe vírus (GRGV)

A GRGV vírus hazánkban egy általunk újonnan azonosított szőlő vírus. Európa különböző területein korábban már jelentették a vírus előfordulását (Sabanadzovic és mtsai., 2000; Beuve és mtsai., 2015; Cretazzo és mtsai., 2017; Voncina és mtsai., 2017), valamint Brazíliában is megtalálták a kórokozót (Fajardo és mtsai., 2017). Szekvenálási adataink több ültetvényben is jelezték a vírus lehetséges előfordulását (6. táblázat), majd a visszaigazolással 7 ültetvényben sikerült alátámasztani jelenlétét (18. ábra). A GRGV vírust az ország különböző régióiban is megtaláltuk; a szekvenált törzsek 87-95% hasonlóságot mutattak a referencia szekvenciával (NC_030693), ezt a változékonyságot mutatta számunkra a variánsok rokonsági kapcsolatának vizsgálata is (19. ábra). A Red Globe egy californiai eredetű csemegeszőlő fajta. Termesztését, Sabanadzovic szerint, Olaszországban kezdték meg először, így feltételezik a vírus olaszországi eredetét. A különböző izolátumok variabilitása és a tény, hogy a GRGV eddig nem fordult elő Csehországban és Szlovákiában – még NGS vizsgálattal sem (Eichmeier és mtsai., 2016) – alátámasztja azt a feltevésünket, hogy a vírus nem Közép-Európai eredetű, hanem valószínűleg az eltérő földrajzi származású fertőzött szaporítóanyaggal kerülhetett be a térségbe.



18. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

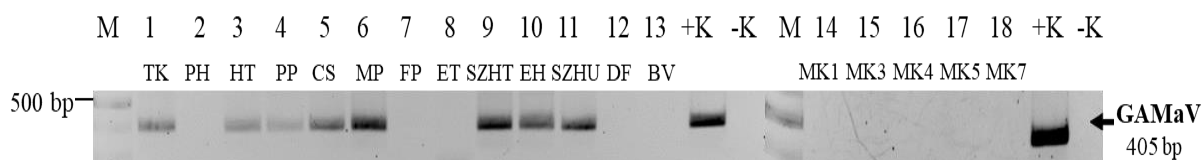


19. ábra: GRGV izolátumaink, a referencia genom és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatók, GenBank azonosítók alapján.

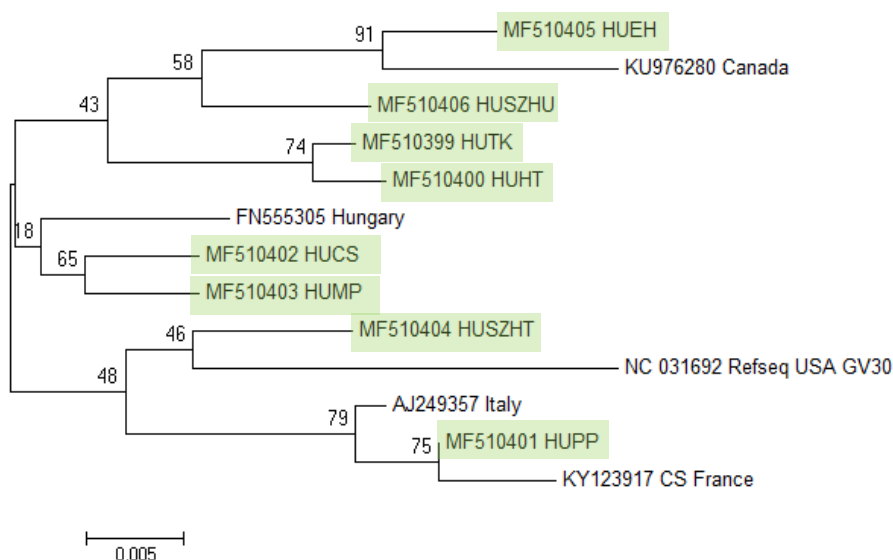
Grapevine asteroid mosaic associated virus (GAMaV)

A GAMaV szintén egy olyan vírus, mely hazánkban való előfordulása korábban nem volt ismert. Jelenlétét 8 mintában detektáltuk a kis RNS NGS és az RT-PCR visszaigazolások során (6. táblázat, 20. ábra). Annak ellenére, hogy 1994 óta ismert a vírus (Boscia és mtsai., 1994), nagyon kevés szekvencia információ áll rendelkezésünkre vele kapcsolatban. Referencia genomját (NC_031692) 2016-ban tették közzé a NCBI GenBank, és azóta - köszönhetően az NGS alapú kutatásoknak is - leírták a vírust Kanadában (Xiao & Meng, 2016) és Franciaországban (Candresse és mtsai., 2017a). A 8 klónozott izolátum 94-96%-ban azonos a referencia genommal, míg egymással 93-96%-os egyezést mutatnak. A filogenetikai vizsgálat szerint a magyar GAMaV izolátumok különböző földrajzi származású variánsokkal képeznek rokonsági csoportokat (21. ábra), így a vírusfertőzött szaporítóanyag használata a legkézenfekvőbb magyarázata a különböző GAMaV variánsok elterjedésének az országban.



20. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

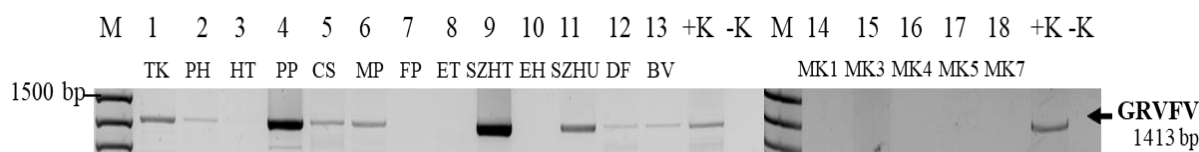


21. ábra: GAMaV izolátumaink, a referencia genom és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján.

Grapevine rupestris vein feathering (GRVVFV)

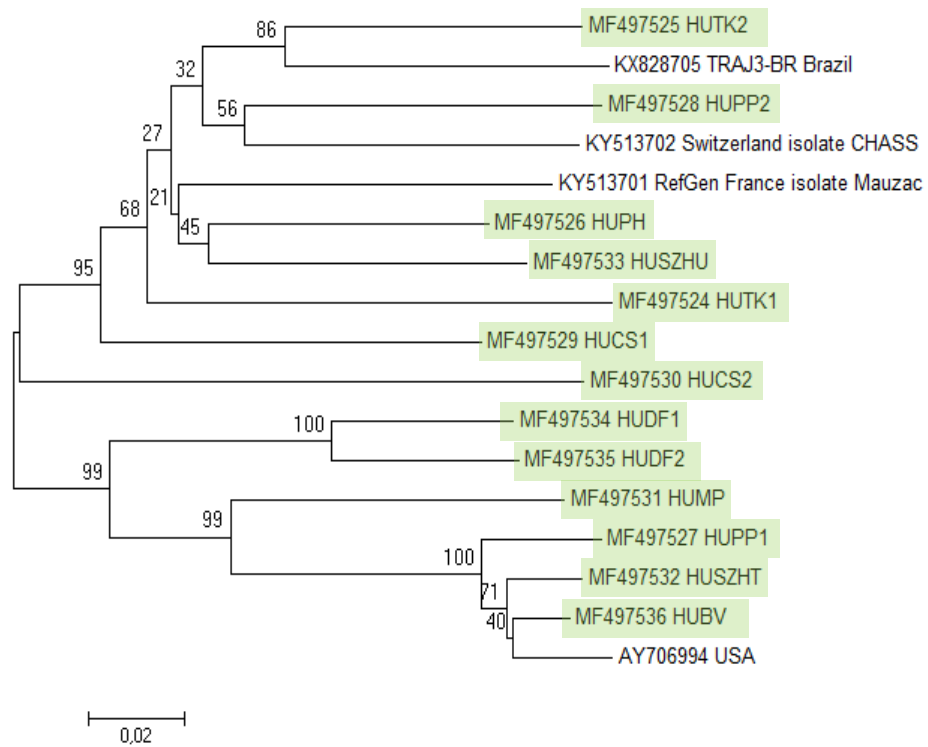
A GRVVFV vírus, egy olyan *Tymovirus*, melyet először találtunk magyarországi szőlő ültetvényekben. A vírust detektálásához egy teljes genom szekvenciát (AY706994) és az időközben megjelent referencia genomot (NC_034205) (Reynard és mtsai., 2017) vettünk alapul. Előbbivel 11, utóbbival 13 ültetvényben azonosítottuk a vírust bioinformatikai módszerekkel (6. táblázat). A francia referencia genom és a kaliforniai származású teljes GRVVFV genom szekvencia között 77%-os hasonlóságot találtunk, ami a vírus nagymértékű variabilitására utal. Ez a változékonyság lehet az oka a vírus sok esetben sikertelen detektálásának (Pantaleo és mtsai., 2010; Reynard és mtsai., 2017). A cDNS szintézist ez esetben vírus specifikus primerrel végeztük el, növelve a kimutatás érzékenységét. Kis RNS szekvenciáink alapján tervezett primerekkel 9 ültetvényben kaptunk GRVVFV specifikus terméket, de 4 mintában nem volt sikeres az NGS eredmények visszaigazolása (22. ábra).



22. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

A 9 izolátum 79-96% és 79-87% hasonlóságot mutatott az AY706994 és NC034205 genomokkal, megerősítve a különböző vírus izolátumok között mutatkozó diverzitást. Tovább vizsgálva a vírus variánsok sokféleségét, ugyanazon ültetvény (HUCS1-2, HUPP1-2, HUTK1-2, HUDEF1-2) több egyedének szekvenciáját is meghatároztuk. Filogenetikai elemzésük rávilágított, hogy egy ültetvényen belül több GRVVFV vírus variáns is előfordul (78-92% azonosság az egyedek között) (23. ábra). Az eset megmutatta számunkra, hogy kis RNS NGS eljárásnak nehézségei lehetnek a variábilis vírusok pontos és érzékeny diagnosztizálásához, habár magának egy Tymovírusnak a jelenléte pontosan meghatározható volt.

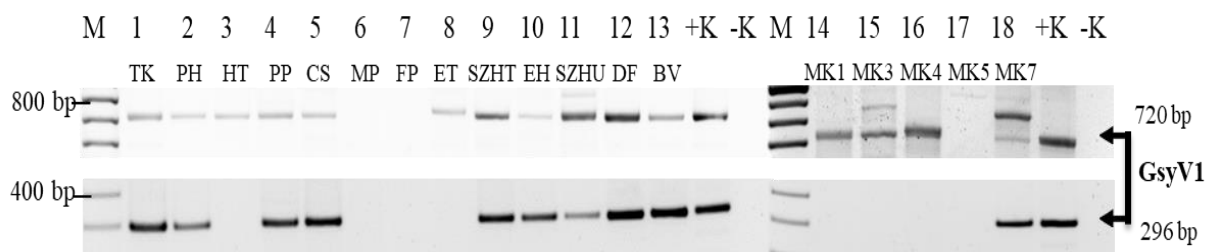


23. ábra: GRV-FV izolátumaink, a referencia genom és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján.

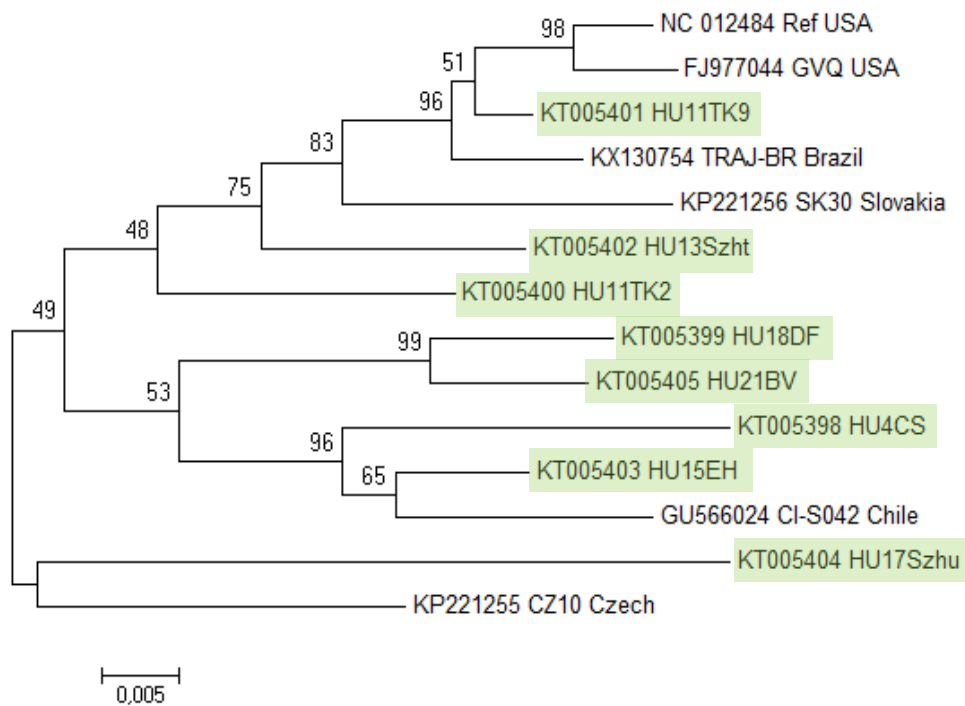
Szőlő Syrah vírus1 (GSyV1)

A GSyV1 *Tymovirus* széles körű jelenlétét korábban már leírtuk magyarországi ültetvényekben (Czotter és mtsai., 2015a). A szekvenálási eredmények 15 mintában mutatták a vírus előfordulását (6. táblázat). Igazolásához a vírus mozgási fehérje génjére (MP) tervezett DetF-DetR primer párral (Al Rwahnih, 2009) 10 minta esetében kaptunk vírus specifikus terméket. Míg a köpenyfehérje gén egy darabjának sokszorozásával (Sabanadzovic és mtsai., 2009) maradéktalanul sikerült alátámasztani az NGS eredményeket (24. ábra). A vírus elterjedtségére Csehországban és Szlovákiában is felfigyeltek, és nagyfokú változékonyságát tapasztalták a vírus 5' feltételezett MP régiójában (Glasa és mtsai., 2015), mely álnegatív eredményeket eredményezhet az erre a régióra tervezett primerek diagnosztikai célú alkalmazásával, mint esetünkben is. Az izolátumok CP génjének 720bp hosszú szakaszának filogenetikai elemzése szerint - Glasa és munkatársai (2015) munkája alapján - a két fő csoportba sorolódnak, egy izolátum elkülönülve, a harmadik csoportot alkotja (25. ábra). Megvizsgálva ugyanazon ültetvény (11_TK) különböző egyedeiben azonosított GSyV1 variánsok (HU11TK2 és HU11TK9) szintén nagymértékű variabilitást mutattak, ami alátámasztja azon elképzelésünket, miszerint a Közép-Európai GSyV1 variánsok nagyobb mértékű változékonyságot mutatnak, mint az Észak-Amerikai változatok.



24. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

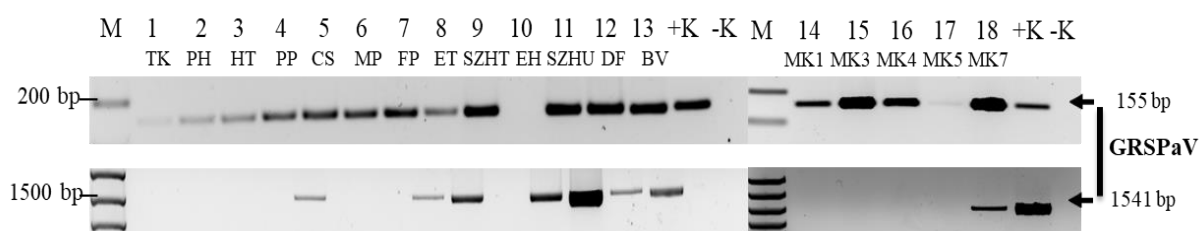


25. ábra: GSyV1 izolátumaink, a referencia genom és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján.

Rupestris faszöveti barázdáltság vírus (GRSPaV)

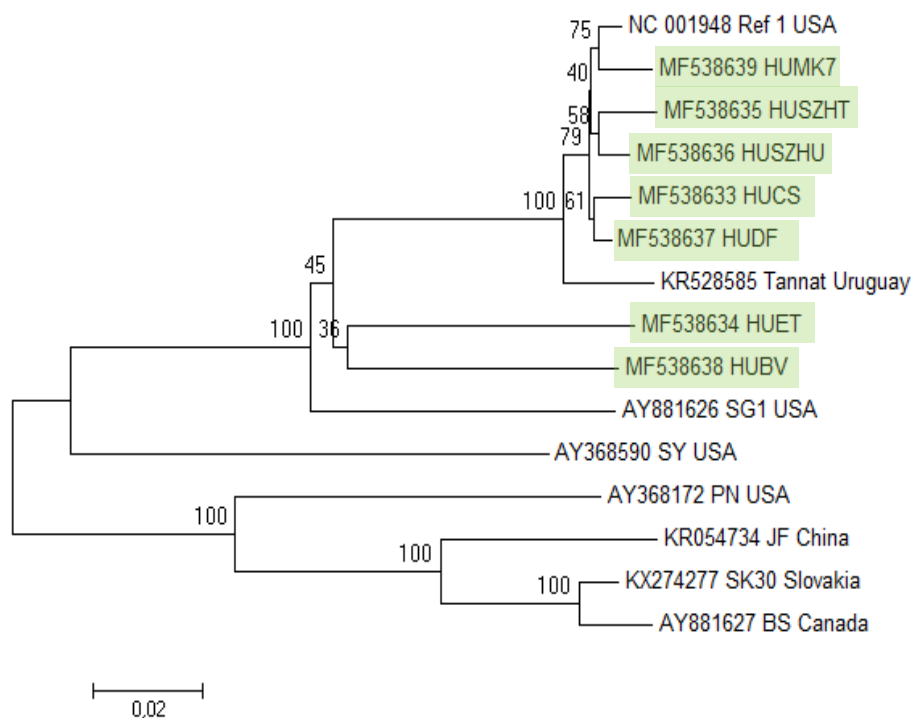
A GRSPaV a világon és hazánkban is egy régóta ismert, széles körűen elterjedt szőlőt fertőző vírus. A szekvenálási adatok szerint azonban csupán 3 ültetvényben bukkantunk a vírus nyomára, a vírus jelenlét elfogadására vonatkozó feltételeink alapján (6. táblázat). Ezzel éles ellentétben a publikált, replikáz gén egy nagyon rövid szakaszát amplifikáló, diagnosztikai primerrel végzett PCR reakcióval 16 mintában kaptunk vírus specifikus terméket (26. ábra).



26. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

A replikáz génről ismert, hogy alacsony proofreading aktivitás és gyakori rekombinációs események jellemzik, ennek következtében a különböző variánsok együttélése ugyanabban a növényben eltérő vírus variánsok kialakulásához vezethetett (Glasa és mtsai., 2017). Annak tesztelésére, hogy a GRSPaV specifikus readok száma, illetve a genom lefedettség növekszik-e, a bioinformatikai elemzéshez 5 különböző teljes GRSPaV variáns genomját használtuk. Az elemzés szerint, 40%-nál magasabb lefedettséget csupán további 2 mintában tapasztaltunk. A GRSPaV főként vegetatív szaporítás útján terjed; ennek eredményeként, rendkívül nehéz eliminálni a vírust, mely képes hosszú időn át együtt élni a szőlő növényvel (Meng és mtsai., 2006). Ez a koevolúció kölcsönös előnyök révén a gazdanövény génexpressziójának változásához vezetett, így a vírus jelenléte a stressz gének enyhe „down” regulációját eredményezte (Gambino és mtsai., 2012). Ennek köszönhető, hogy az együttélés következtében a vírus és a gazdaszervezet közötti védekezési reakció egyensúlyba került. Egy másik magyarázat szerint, GRSPaV kódolta silencing szupresszorok is gátolhatják a vírus eredetű kis RNS-ek biogenezisét, de ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek. A GRSPaV izolátumok filogenetikai vizsgálata érdekében, egy hosszabb 3' végi CP genom darabot amplifikáltunk a vírusból. A magyarországi variánsok az amerikai és Uruguay-i izolátumokkal alkotnak közelebbi rokonsági csoportot (27. ábra).

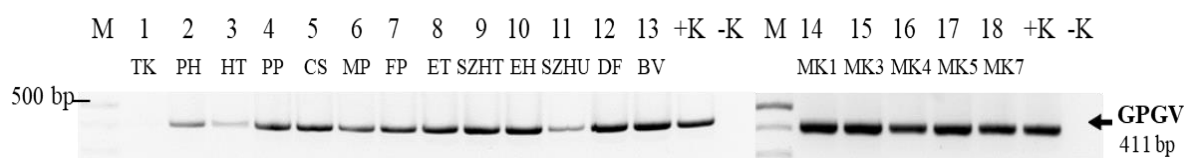


27. ábra: GRSPaV izolátumaink, a referencia genom és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus és viroid izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján.

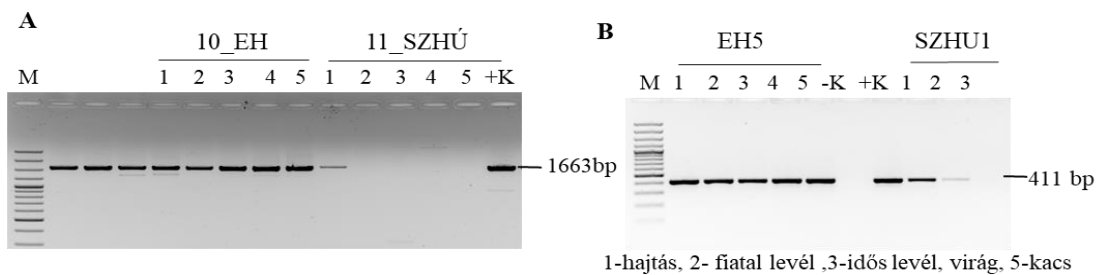
Grapevine Pinot gris virus (GPGV)

Vírus diagnosztikai felmérésünk szerint a GPGV, mely hazánkban egy újonnan leírt vírus, rendkívül elterjedt az általunk vizsgált ültetvényekben: 17 ültetvényben találtuk meg a vírust (6. táblázat), melyet az RT-PCR alapú igazolás is alátámasztott számunkra (28. ábra). Ahogy korábban említettük, a szekvenált, vírus eredetű kis RNS-ek esetében a 21 nukleotid hosszú kis RNS-ek túlsúlya a jellemző, így a GPGV esetében is ezt tapasztaltuk. Azonban ezzel ellentétben, két mintában (1_TK és 11_SZHU) a 24 nt hosszú GPGV eredetű antiszensz orientációjú read-ek dominanciáját tapasztaltuk (4. melléklet/A). Ezekben a mintákban a vírus specifikus read-ek száma nagyon alacsony volt, azonban mindkettőben kaptunk 2-2 db GPGV eredetű kontig szekvenciát, melyek a genom 5' régiójáról származnak. Ezt a genom régiót megvizsgálva (155-235bp) azt találtuk, hogy az olasz referencia genom (NC_015782) ezen régiója különbözik a többi adatbázisban levő GPGV teljes genom szekvenciától, valamint tartalmaz egy szakaszt, mely illeszkedik a *Vitis vinifera* szekvenciára. Hasonlóan a GPGV első leírásához (Giampetruzzi és mtsai., 2012), a bioinformatikai adatfeldolgozásunk során mi sem távolítottuk el a gazda/szőlő specifikus read-eket a vírus diagnosztikai elemzés során. Így a GPGV vírusként azonosított kis RNS szekvenciák ezekben a könyvtárakban álpozitív/gazda eredetű szekvenciák lehetnek, mely megmagyarázza méreteloszlásukat, valamint a kontig szekvenciák jelenléte és a kis RNS-ek direkt illesztésével kapott eredmények közötti ellentmondást. További kérdésként merült fel, hogy miért kaptunk ennek ellenére GPGV-specifikus PCR terméket a 11_SZHU mintában (28. ábra). Megvizsgáltuk az ültetvény egyedeit és azok különböző szerveit RT-PCR-el, kiderült, hogy ezen a nagyon fiatal ültetvényen csak egyetlen egyed volt fertőzött, és csupán a fiatal levelekben és a hajtáscsúcsban volt kimutatható a GPGV vírus jelenléte (29. ábra). A GPGV jelenlétét a 11 mintában (14-18 azonos ültetvény mintáit pooloztuk) Northern blottal is igazoltuk (30. ábra).



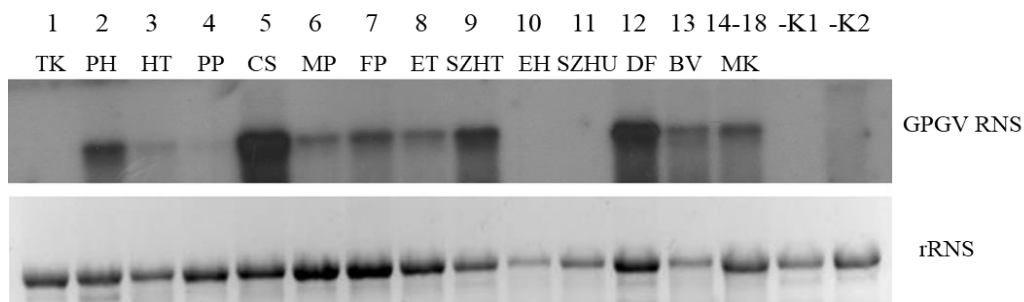
28. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz



29. ábra: A/10_EH és 11_SZHU ültetvény egyedeinek, B/EH5 és SZHU1 egyedek szerveinek tesztelése GPGV vírus jelenlétére

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-8: DF ültetvény 8 egyede, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

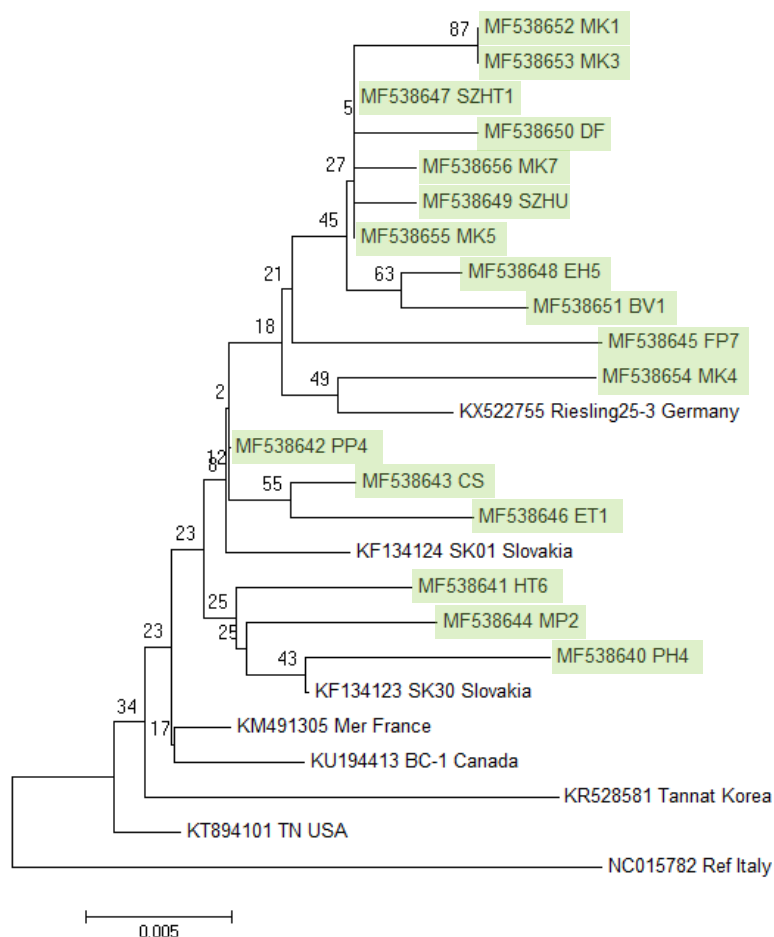


30. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása Northern blot hibridizációval a GPGV vírus jelenlétére

A GPGV jelenlétét minden ültetvényben vizsgáltuk: 1-13/ ültetvény pool, 14/ a 14-18 azonos ültetvények poolozásából készített RNS keverék. -K1: egészséges szőlő RNS, -K2: Nicotiana benthamiana negatív kontrol.

A 10_EH mintában a felvitt RNS alacsony mennyisége, míg a 11_SZHU mintánál az alacsony GPGV koncentráció lehet az oka, hogy nem kaptunk specifikus jelet a vizsgálat során. A vírus CP szekvenciájának vizsgálata alapján az izolátumok minimális eltéréseket mutattak, de filogenetikai vizsgálatuk során eltérő csoportokat alkottak és különböző földrajzi eredetű izolátumokkal mutattak közelebbi rokonságot (31. ábra). Ez alátámasztja azt a hipotézist, hogy a GPGV európai eredetű és a szaporítóanyaggal, vagy a gyomnövény rezervoárokból származóan terjedhet (Bertazzon és mtsai., 2016), majd Európából került el a világ más tájaira (Wu & Habili, 2017). Terjedésében feltételezhetően a fertőzött növényekből származó gubacsatka vektorok (Bertazzon és mtsai., 2017) játszanak szerepet, mely magyarázata lehet az 1 éves ültetvényben (11_SZHU) való egyenlőtlen jelenlétének. Nagymértékű elterjedtségének ellenére, a GPGV által okozott és megjelenő tünetek ritkák, az általunk mintázott egyedek közül egy sem mutatott GPGV fertőzésre utaló tüneteket. A látens és virulens törzsekre vonatkozó információk jelenleg még nem

egyértelműek (Saldarelli és mtsai., 2015); azonban a MP-vég polimorfizmusa szerint, valamennyi izolátumunk a látens csoporthoz tartozik, amelynek képviselői MP végükön rövidebbek 6 aminosavval.

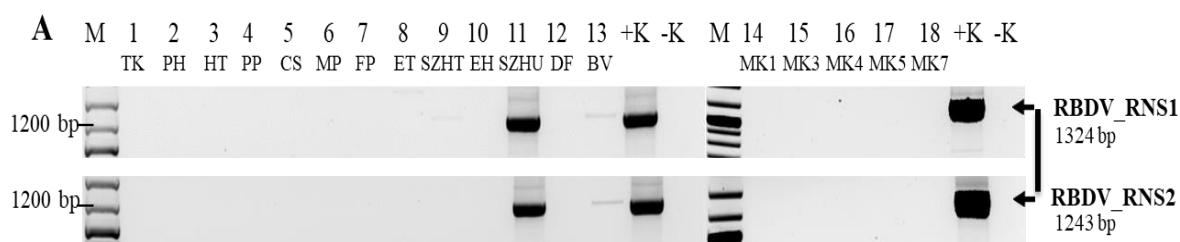


31. ábra: GPGV izolátumaink, a referencia genom és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

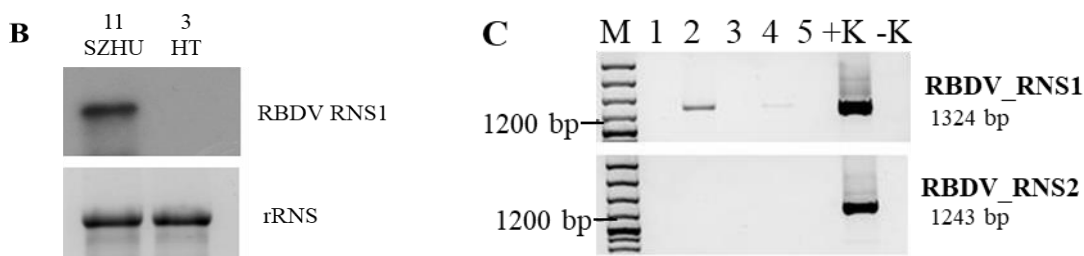
A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján.

Málna bokros törpülés vírus (RBDV)

2003-ban közölték le először Szlovéniában, hogy az RBDV vírus természetes módon képes fertőzni szőlőt (Mavric és mtsai., 2003). Azóta kevés erre vonatkozó információra derült fény, 2012-ben azonban szintén megtalálták a vírust Magyarországon (Plesko és mtsai., 2012). Vizsgálatink során egyetlen ültetvényben (11_SZHU) találtuk meg a vírust kis RNS szekvenálással (6. táblázat). A 11_SZHU ültetvény, egy nagyon fiatal, 1 éves Furmint ültetvény, melyben a vírus mindkét RNS-ét (RNS1, RNS2) sikerült RT-PCR-el kimutatni (32. ábra/A), valamint az RNS1 esetében Northern blottal is kimutattuk a vírus jelenlétét (32. ábra/B).



1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók



1-5: 13_BV ültetvény 5 egyede

32. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása A/vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/ Northern blot hibridizációval az RBDV vírus jelenlétére C/A 13_BV ültetvény egyedeinek tesztelése RBDV vírus jelenlétére

A,C/M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz,

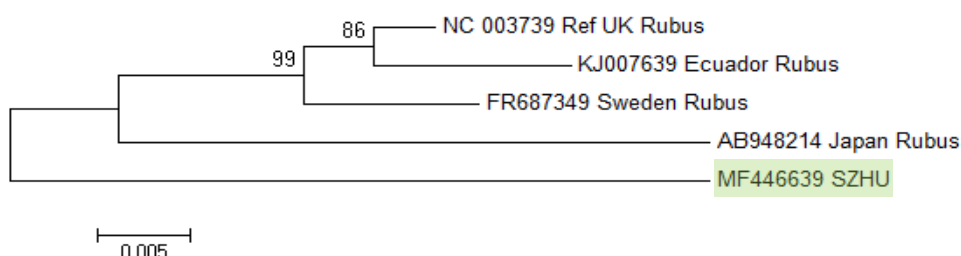
B/RBDV_RNS1 jelenlétét 11_SZHU ültetvényben vizsgáltuk, 3_HT pool alkalmazása negatív kontrollként

Habár a 13_BV ültetvényben is kaptunk RBDV specifikus kis RNS read-eket, valamint mindkét RNS-e esetében a lefedettségi érték elérte a 40%-ot, ennek ellenére PCR terméket nem kaptunk. Megvizsgáltuk ennek hátterét, visszanyúlva az ültetvény egyedeinek RNS keverékéhez és egyenként megvizsgáltuk az egyedeket is. Az RNS1 esetében, egyetlen egyednél (BV2) kaptunk terméket a várt méret tartományban (32. ábra/C). Sanger szekvenálással bizonyítottuk, hogy a BV2 egy RBDV specifikus szekvencia, mely 98.6%-os hasonlóságot mutatott a 11_SZHU izolátumunkkal. A BV2 egy

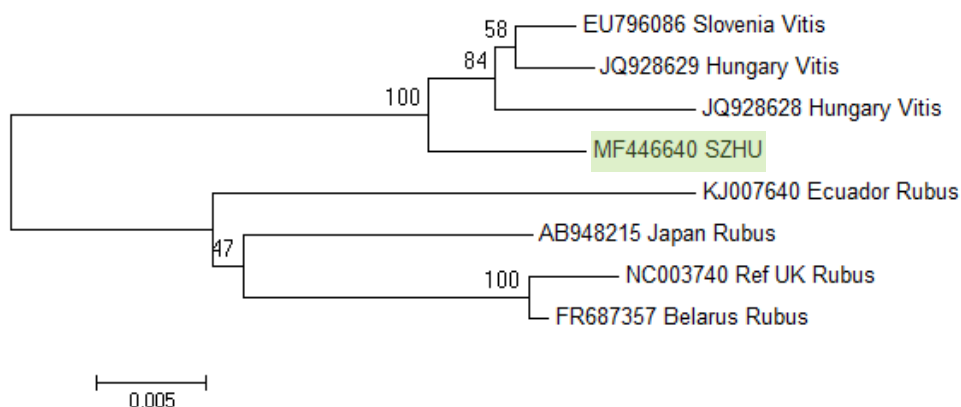
Balafánt, egy ősi, magyarfajta, amely sokáig jelen volt a gyűjteményben. Felmerül a kérdés, hogy a vírus hogyan fertőzhetett az ország északkeleti részén.

A 11_SZHU RNS1, 1324bp hosszú szakaszának filogenetikai elemzése szerint jelentősen eltér az egyéb, *Rubus* gazdában talált RBDV RNS1 szekvenciáktól (33. ábra). Hasonló elemzést végeztünk izolátumunk RNS2 MP régiójának 1243bp hosszú szakaszán (33. ábra), mely szerint a tokaji eredetű RBDV izolátumunk közelebbi rokonságban áll a Szlovén *Vitis* származású izolátummal, mint a magyarországi *Vitis* v. variánsokkal (JQ928628 és JQ928629). Ez azt sugallja, hogy a vírus megjelenése szaporítóanyag eredetű lehet.

RBDV_RNS1



RBDV_RNS2

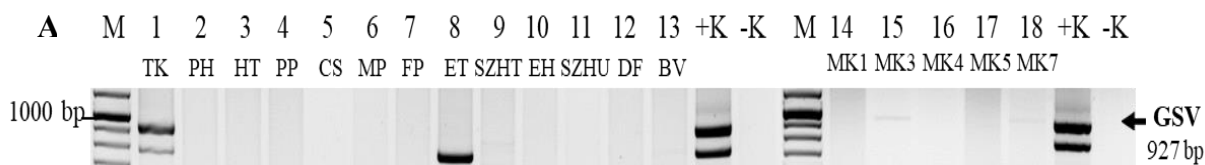


33. ábra: RBDV RNS1 és RNS2 izolátumaink, a referencia genomok és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

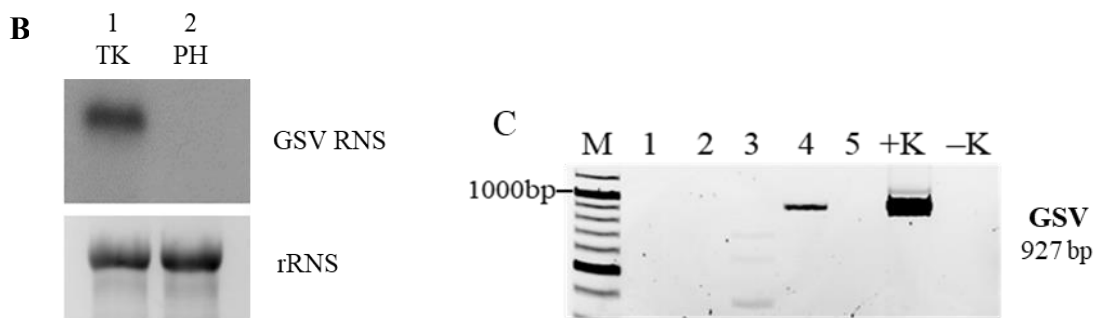
A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatók, GenBank azonosítóik alapján

Szőlő szatellit vírus (GSV)

A Szőlő szatellit vírust először Kaliforniában találták meg, dsRNS szekvenálás révén (AlRwahnih és mtsai., 2013b), majd Iránban is leírták jelenlétét (Candresse és mtsai., 2017b). Mintáinkban, 2 esetben (1_TK, 13_BV) azonosítottuk a GSV vírust (6. táblázat). Az 1_TK mintában RT-PCR-el (34. ábra/A) és Northern blottal (34. ábra/B) is sikeresen igazoltuk a jelenlétét.



1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók



1-5: 13_BV ültetvény 5 egyede

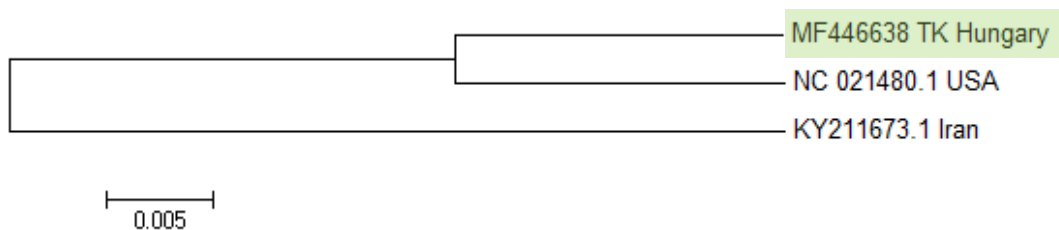
34. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása A/Vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/Northern blot hibridizációval GSV vírus jelenlétére, C/13_BV ültetvény egyedeinek tesztelése GSV vírus jelenlétére

A,C/M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

B/GSV azonosítása az 1_TK ültetvényben, 2_PH ültetvény pool alkalmazása negatív kontrolként.

A 13_BV mintában azonban az ültetvény keverékben nem, csak az ültetvény egyedeinek tesztelése során kaptunk specifikus terméket (BV4) (34. ábra/C). Habár a GSV 'helper' vírusát még nem azonosították, de megfigyelték, hogy egyik forrása *Vitivirus* és különböző GLRaV vírusokkal volt fertőzve (Al Rwahnih és mtsai., 2013b). Esetünkben a 1_TK és 13_BV ültetvényekben a GVA és GLRaV1 vírusok szintén megtalálhatóak voltak, ez alapján feltételezhető esetleges 'helper' vírus szerepük, de ez jelenleg még nem bizonyított. A 925 bp méretű GSV klónunk (HUTK) szekvencia összehasonlítása szerint

közelebbi rokonságban áll a kaliforniai izolátummal, mint az iráni eredetűvel (35. ábra), valamint némileg a másik BV4 egyed szekvenciájától is eltér, így eredete nehezen magyarázható.

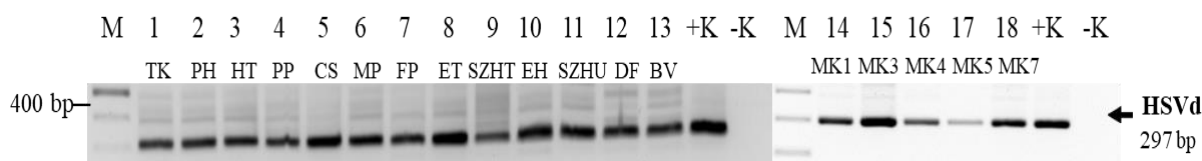


35. ábra: GSV izolátumaink, a referencia genomok és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján

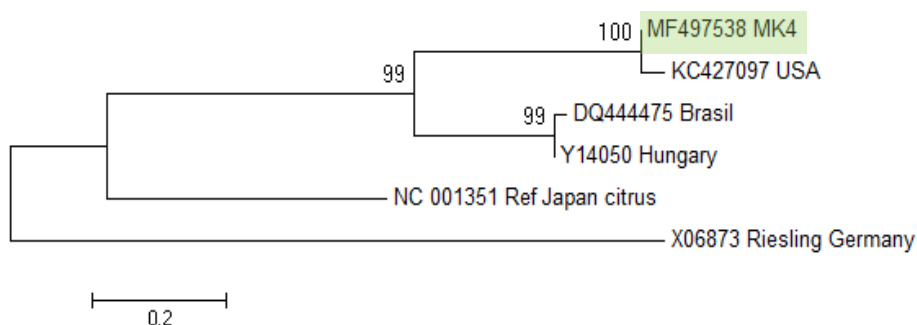
Komló törpülés viroid (HSVd)

Felmérésünk szerint, csaknem az összes könyvtárunkban kaptunk HSVd eredetű kis RNS szekvenciákat (6. táblázat). Méreteloszlásuk és polaritásuk a következő mintázatot követte: a 21bp, 22bp és 24bp méretű kis RNS-ek túlsúlya, valamint az szensz és antiszensz szálak egyenlő arányú jelenléte jellemezte, ami összhangban állt Navarro és munkatársainak (2009) részletes viroidokra vonatkozó vizsgálatával (4. melléklet/B). Bioinformatikai eredményeinket RT-PCR-el is sikerült alátámasztani (36. ábra). Mivel a különböző variánsok HSVd szekvenciái nagyon hasonlóak voltak, így egyetlen tokaji származású HSVd klón szekvenciáját határoztuk meg (MK4). A HUMK4 izolátumunk filogenetikai analízise azt mutatta, hogy 95% -ban azonos a referencia genomjával, azonban az eredetileg Egerből származó ENTAV115 Pinot noir német izolátummal (Navarro és mtsai., 2009, X06873) és a másik hazai HSVd változattal (Y14050) nem áll közeli rokonsági kapcsolatban (37. ábra).



36. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz

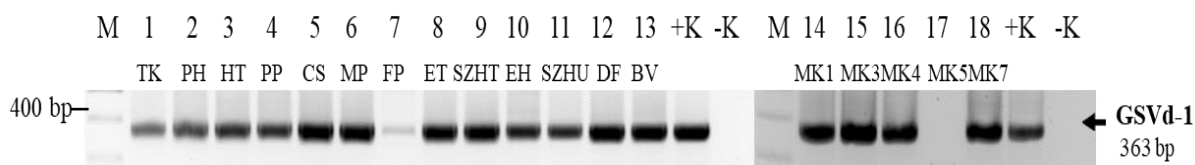


37. ábra: HSVd izolátumaink, a referencia genom és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítók alapján

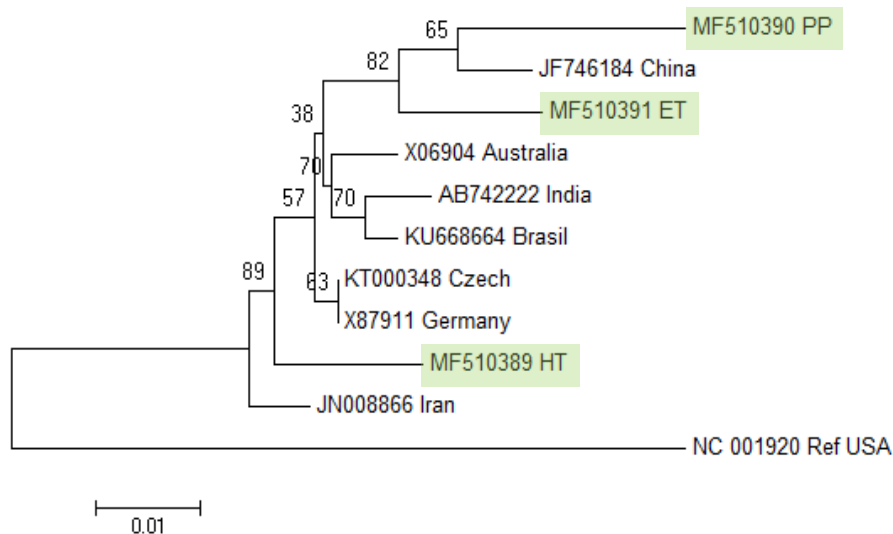
Szőlő sárga foltosság viroid (GYSVd1, 2)

A Szőlő sárga foltosság viroidot vizsgálataink során összesen 16 mintában azonosítottuk (6. táblázat). Ahogy a táblázatban is látható, a GYSVd1 viroid 16 mintában volt jelen, azonban a GYSVd2 viroid jelenlétére vonatkozó bioinformatikai elemzések nem voltak olyan egyértelműek. A GYSVd1 eredetű kis RNS-ek méreteloszlását megvizsgálva azt találtuk, hogy a 21, 22 és 24 nukleotid hosszúak voltak túlsúlyban, azonban a 22nt méretűek jelenléte nem volt olyan mértékben kifejezett, mint ahogy Navarro és munkatársai (2009) vizsgálata során a HSVd és GYSVd1 esetében tapasztalták a Pinot noir fajtaban (4. melléklet/C). A GYSVd1 RT-PCR igazolása sikeres volt, valamennyi minta esetében (38. ábra), azonban a GYSVd2 esetében specifikus PCR terméket egy esetben sem kaptunk. Ezen eredmények arra utalhatnak, hogy a magyarországi ültetvényekben előforduló variánsok inkább a GYSVd1 viroidhoz állhatnak közelebbi rokonságban. Ezt követően a három GYSVd izolátumunk szekvenciájának vizsgálata során, melyek az ország különböző tájairól származnak, jelentős eltéréseket tapasztaltunk, ahogy ezt a filogenetikai fa is mutatja (39. ábra). A szekvenciák illesztésével olyan 'hot-spot' régiókat tudtunk azonosítani, amely lehetővé teszi mutációk kialakulását, azonban a Pinot noir variánsokra jellemző mutációt nem találtunk bennük (Navarro és mtsai., 2009).



38. ábra: Kis RNS NGS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz



39. ábra: GYSVd1 izolátumaink, a referencia genom és a GenBank adatbázisban megtalálható izolátumok filogenetikai kapcsolatának vizsgálata

A zöld dobozban a saját szekvenált vírus izolátumaink találhatóak, GenBank azonosítóik alapján

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy sikerült kidolgoznunk és alkalmaznunk egy kis RNS-ken alapuló vírus diagnosztikai eljárást, mellyel felmértük 18 szőlő ültetvény vírus fertőzöttségi állapotát. Az új módszer, a korábbi vírusdiagnosztikai eljárásokkal ellentétben a vizsgált mintában levő összes kórokozó azonosítására alkalmas, azokról egyben szekvencia adatot is szolgáltat, melyekre új molekuláris biológiai tesztek eljárások tervezhetőek. A vírus specifikus kis RNS-ek újgenerációs szekvenálásával azonosítottunk hat, Magyarországon eddig ismeretlen virális kórokozót.

4.3. Fitoplazma fertőzöttség vizsgálata kajszi ültetvényekben

A gyümölcsfák fitoplazmás eredetű betegségei komoly problémát jelentenek a gyümölcstermesztők számára világszerte, szerepük különösen az utóbbi években nőtt meg ugrásszerűen. A kajszi fitoplazmás betegsége a csonthéjas fajokat veszélyezteti, hazánkban egyre növekvő problémát okozva. Munkánk során Magyarország több, jelentős kajszi ültetvényének a Csonthéjasok Európai Sárgulás fitoplazmával (ESFY) való fertőzöttségét vizsgáltuk.

4.3.1. Mintavétel és DNS izolálás levélszövetből

A fitoplazmák eloszlása és koncentrációja a növényen belül szezonális fluktuációt mutat, mintavételre a legideálisabb a nyári és kora őszi időszak, amikor a tünetek a legkifejezettebbek, valamint a fitoplazma koncentráció is megfelelő a detektálásukhoz (EPPO, 2017). A pusztuló, vagy már elpusztult részekből a kórokozót már nem lehet kimutatni. A fitoplazma DNS legnagyobb mennyiségben a floém szövetekben található, de a levelekből és levélnyélből is jól kimutatható a kórokozó.

A fitoplazma detektáláshoz és DNS izoláláshoz júliusi időszakban gyűjtött levélszövetet használtunk. Az összegyűjtött mintákból az Anyag és módszer részben leírtak alapján vontuk ki a DNS-t. Az így nyert DNS minőségét NanoDrop® ND-1000 segítségével (5. melléklet), valamint a minták 1.2%-os agaróz gél-elektroforézissel történő szétválasztásával ellenőriztük. Az eredmények alapján elmondható, hogy tiszta genomális DNS kivonatot kaptunk, mellyel tovább dolgozhattunk.

4.3.2. 16SrX csoport fitoplazmáinak meghatározása nested-PCR-el

Az érzékenység és specifitás fokozása érdekében nested-PCR módszert alkalmaztunk. Bertaccini munkája szerint (Bertaccini, 2007) a legtöbb esetben, a mintában lévő fitoplazma DNS mennyisége kevesebb, mint a teljes DNS kivonat 1% -a; így a vizsgálata során ezt a fitoplazma dúsítási technikát alkalmaztuk.

Az eljárás során először univerzális (fP1 és fP7) primereket használtunk (5. táblázat), melyekkel minden eddig ismert fitoplazmát ki lehet mutatni, ezért a fertőzöttség megállapítására megfelelnek. Ezt követte egy második amplifikáció, csoport specifikus

primerekkel. Esetünkben 16SrX csoport-specifikus, fO1 és rO1 (5. táblázat), 1071bp nagyságú terméket amplifikáló primereket alkalmaztunk, mellyel kevert fertőzések esetén egyben a fitoplazma csoport is azonosítható. Úgy tapasztaltuk, a PCR reakciók során, hogy több DNS templát alkalmazása szükséges az egyértelmű kimutatáshoz, így 1-1.5 µl tiszta DNS-t alkalmaztunk a reakciókhoz.

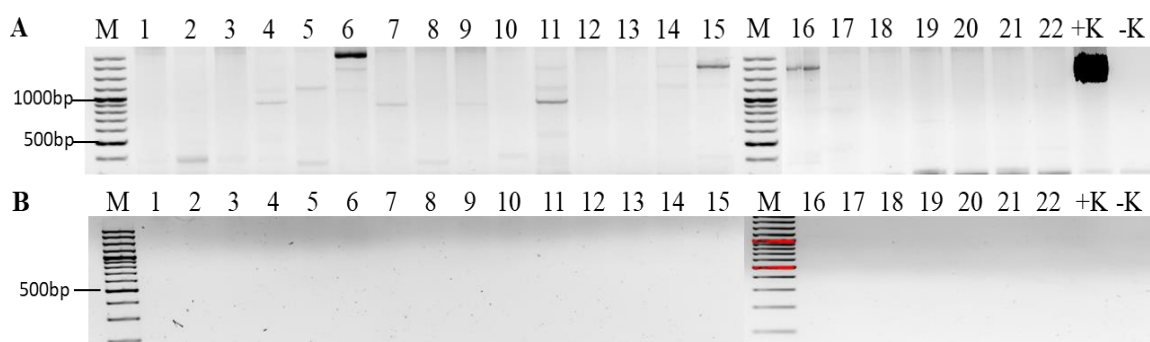
4.3.2.1. Érdi Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet mintáinak tesztelése

NAIK Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet, Érdi Elvira Major területén komoly gyümölcskutatói munka folyik. Itt gyűjtik és gondozzák az összes Magyarországon hivatalosan bejelentett, hazai termesztésre alkalmas fafajta mintapéldányait. A kutatáshoz Elvira Major területén található izolátorházból, a régi és új törzsültetvényről, illetve a termő ültetvényről gyűjtöttünk kajsziбарack levélmintákat és teszteltük őket az ESYF jelenlétére.

Izolátorház

Az izolátorházban 22 kajszi mintát teszteltünk fitoplazma jelenlétére. A mintavétel során végzett vizuális tünet felvételezés alkalmával, az egyedeken fertőzésre utaló tüneteket nem láttunk, egészségesnek tűntek.

Az izolátor háló alatt, vektormentes környezetben nevelt, kizárólag magyar fajtákból álló egyedek vizsgálatunk alapján teljesen fitoplazma mentesek voltak (40. ábra).



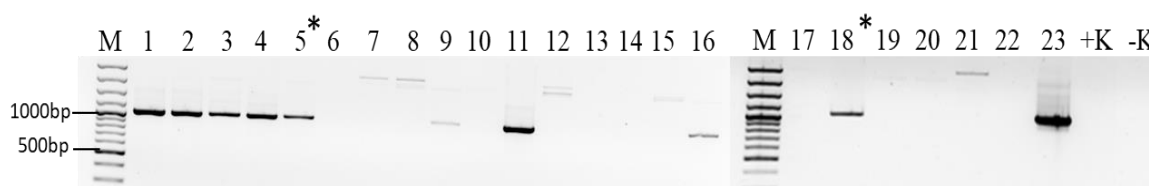
40. ábra: Érdi izolátorház minták A/Univerzális, B/16SrX csoport-specifikus indítószekvenciák alkalmazásával kapott nested-PCR eredményének gélelektroforézis képe

M: GeneRuler 100bp Plus DNS marker, 1-22: 22 vizsgált egyed, +K: Aster Yellows fitoplazmával fertőzött Tagetes DNS kivonat, -K: MQ víz

A továbbiakban csak a nested-PCR vizsgálat végeredményének gélelektroforézis képét mutatjuk be.

Új törzsültetvény

Az ültetvényt néhány éve telepítették az izolátorházból származó magyar fajták szaporítóanyagával. Az állomány nagy része egészségesnek látszott a mintavétel idején, azonban jelentős rovarkártétel volt megfigyelhető a fákon, leveleken. A vizsgálat során összesen 23 mintát teszteltünk az univerzális és csoport-specifikus primerekkel. A nested-PCR végeredménye alapján 23-ból 8 minta volt fertőzött a 16SrX csoportba tartozó fitoplazmával az ültetvényen (41. ábra). Mivel az izolátorház feltehetően vírusmentes volt, ez azt jelentheti, hogy az új törzsültetvénybe egészséges szaporító anyag került, így a törzsültetvények fertőzöttsége feltételezhetően fitoplazma vektor jelenlétének köszönhető.



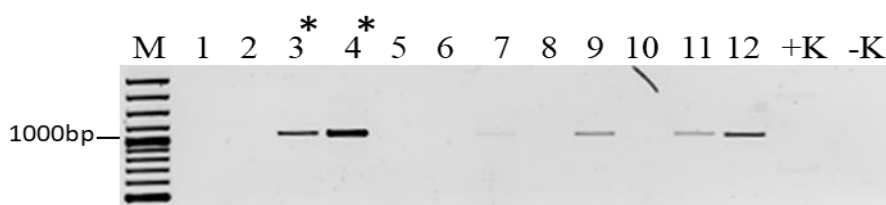
41. ábra: Érdi új törzsültetvény minták nested-PCR végeredményének gélelektroforézis képe

*M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-23: 23 vizsgált egyed, +K: Aster Yellows fitoplazmával fertőzött Tagetes DNS kivonat, -K: MQ víz, *: a jelölt PCR mintákat szekvenáltattuk*

Öreg törzsültetvény

Az öreg törzsültetvényről 12 mintát tudtunk tesztelni, ahol főként magyar fajtákat telepítettek, illetve mintát gyűjtöttünk egy cseresznyefajtáról (Cseresznye Rita) is, mely nagyon jellegzetes boszorkányseprűsödéses tüneteket mutatott. A kajszi fák között találtunk tünetmenteseket, ugyanakkor jellemző fitoplazmás tünetekkel is találkoztunk.

A nested-PCR eredménye alapján elmondható, hogy 5 mintában találtunk fitoplazma specifikus terméket, köztük a tünetes cseresznye mintában (11. minta) (42. ábra). A 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák közül a *Ca. P. prunorum* cseresznyén való előfordulása közismert (Jarausch és mtsai., 1999b) és hazai előfordulását is leírták (Viczián, 2002).

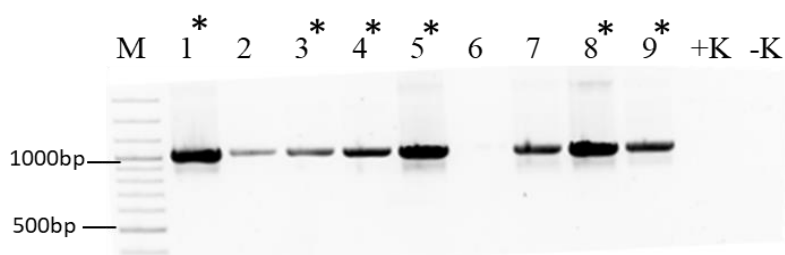


42. ábra: Érdi öreg törzsültetvény minták nested-PCR végeredményének gélelektroforézis képe

M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-12: 12 vizsgált egyed, +K: Aster Yellows fitoplazmával fertőzött *Tagetes* DNS kivonat, -K: MQ víz, *: a jelölt PCR mintákat szekvenáltattuk

Termőültetvény

A piaci igényeket kielégítve a termőültetvényen néhány magyarfajta mellett, főként francia fajtákat termesztünk (Flavorcot, Sweetcot). Az ültetvényen szinte mindenhol, így a mintázott egyedeken is erőteljes fitoplazma fertőzésre utaló tüneteket tapasztaltunk: sárgulás, levelek kanalasodása, sodródása. 9 fáról gyűjtöttünk mintát és teszteltük őket. Az ültetvényben igen erőteljes fitoplazma fertőzöttséget tapasztaltunk, amit a molekuláris vizsgálat is alátámasztott. 9-ből 8 minta PCR pozitív volt a 16SrX csoport-specifikus primerekkel végzett reakciót követően (43. ábra). Ilyen nagymértékben a fitoplazma feltehetően a nem bevizsgált szaporítóanyag révén került be az ültetvényhez, a fertőzés elterjedéséhez még hozzájárulhatott a francia fajták nagyobb fogékonysága a fertőzésekkel szemben.

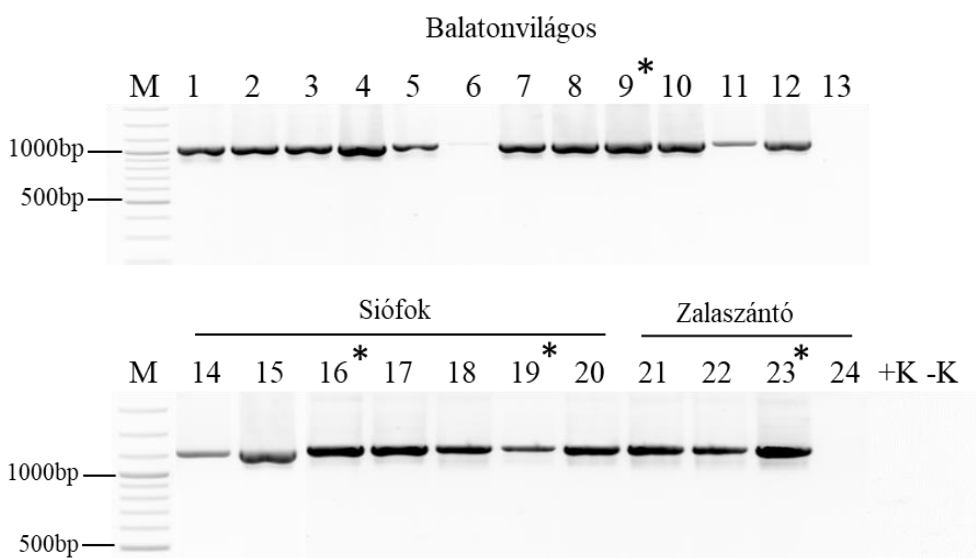


43. ábra: Érdi termőültetvény minták nested-PCR végeredményének gélelektroforézis képe

*M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-9: 9 vizsgált egyed, +K: Aster Yellows fitoplazmával fertőzött Tagetes DNS kivonat, -K: MQ víz, *: a jelölt PCR mintákat szekvenáltattuk*

4.3.2.2. Balaton vidéki minták tesztelése

A kajszi termesztés szempontjából kedvező adottságú termőhelyeket mintáztunk a Balaton környékén. Mintát gyűjtöttünk be Balatonvilágoson, Siófokon és Zalaszántón található ültetvényeken, ahol szinte kivétel nélkül csak francia fajtákat vontak termesztésbe. Jelenleg túlsúlyban vannak a magyar származású fajták, de ha az új telepítéseket nézzük, akkor megállapíthatjuk, hogy a külföldön nemesített fajták telepítési aránya egyre jelentősebbé válnak. Az eredmények szerint, valamennyi vizsgált termőültetvény erősen fertőzött volt 16SrX csoportba tartozó fitoplazmával (44. ábra). Ez esetben szintén a nem megfelelő szaporítóanyag használat, illetve a fajta érzékenység állhat a fertőzés hátterében.

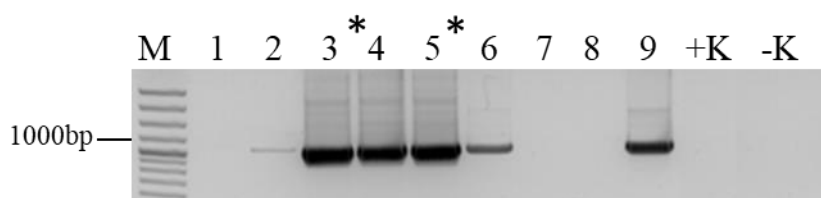


44. ábra: Balatoni minták nested-PCR végeredményének gélelektroforézis képe

*M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-24: 24 vizsgált egyed, +K: Aster Yellows fitoplazmával fertőzött Tagetes DNS kivonat, -K: MQ víz, *: a jelölt PCR mintákat szekvenáltattuk*

4.3.2.3. Gönci termőtáj mintáinak tesztelése

A vizsgált kajszi ültetvény Boldogkőváralján, a gönci termőtájon helyezkedik el. A kísérletet a Gyümölcsért Kft területén végeztük, 2010-ben telepített Sherpa (4-9 minta) és 13 éves Tomcot (1-3 minta) fajtán, melyek külön ültetvényeken helyezkedtek el. Az ültetvényen jelentős arányban voltak tünetes, pusztuló és elpusztult fák. 9 fáról gyűjtöttünk mintát, melyek között egészséges és tüneteket mutató egyedek is voltak. Mindkét fajta esetében találtunk fertőzött egyedeket, illetve a kórokozó látens jelenlétére utal, hogy egészséges egyedben (9. minta) is kimutattuk jelenlétét a kórokozónak (45. ábra).



45. ábra: Gönci termőtáj minták nested-PCR végeredményének gélelektroforézis képe

*M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-9: 9 vizsgált egyed, +K: Aster Yellows fitoplazmával fertőzött Tagetes DNS kivonat, -K: MQ víz, *: a jelölt PCR mintákat szekvenáltattuk*

4.3.3. Fitoplazma izolátumok szekvencia analízise

További vizsgálatra, minden ültetvényről kiválasztottunk egy-egy mintát (jelölve a gélképeken), és a csoport-specifikus primerrel kapott amplifikált termékek tisztítását követően meghatároztattuk az adott ültetvényen azonosított izolátumok szekvenciáját. Szekvenciákat összevetettük az NCBI adatbázisban előforduló, azonos filogenetikai csoportba (16SrX) tartozó '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', '*Ca. P. pyri*' és '*Ca. P. mali*' variánsok 16S *rRNS* génjének, a csoport-specifikus primerek által határolt szakaszaival BLASTn program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) segítségével.

A 16SrX csoport három tagjának 16S riboszómális DNS szakaszai közel azonosak, erős konzerváltságot mutatnak. A három fitoplazma ezen régióját tekintve csupán 1-1,5%-os eltérés tapasztalható nukleotid pozícióikat tekintve (Seemüller & Schneider, 2004). Az általunk izolált termékek bázissorrendjüket tekintve 99%-os hasonlóságot mutatnak az NCBI adatbázisban található '*Ca. P. prunorum*' izolátumokkal, míg a '*Ca. P. mali*' és '*Ca. P. pyri*' izolátumokkal, szintén nagymértékben, 98%-ban azonosak. A 46. ábrán látható ezen izolátumok szekvenciáinak illesztése.

Öreg_törzsültetvény	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
Új_törzsültetvény	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
KT906152_mali_16S	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
CU469464_mali_16S	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
KX077200_pyri_16S	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
AJ542543_pyri_16S	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
Boldogkővárálja	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
Termőültetvény	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
Zalaszántó	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
AY029540_prunorum_16S	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
LT548618_prunorum_16S	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
AJ542544_prunorum_16S	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
Balatonvilágos	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC
Siófok	TTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC

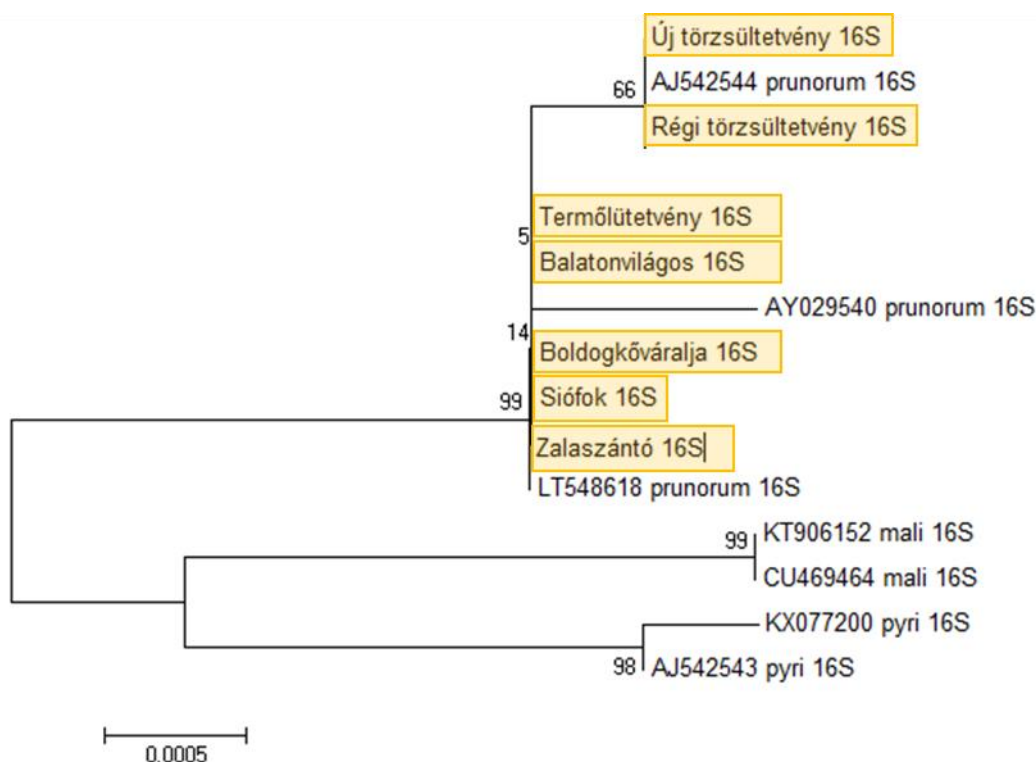
Öreg_törzsültetvény	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
Új_törzsültetvény	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
KT906152_mali_16S	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
CU469464_mali_16S	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
KX077200_pyri_16S	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
AJ542543_pyri_16S	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
Boldogkővárálja	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
Termőültetvény	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
Zalaszántó	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
AY029540_prunorum_16S	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
LT548618_prunorum_16S	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
AJ542544_prunorum_16S	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
Balatonvilágos	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
Siófok	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG

46. ábra: Részlet az egyes ültetvényekről származó hazai fitoplazma izolátumok és az NCBI adatbázisban található '*Ca. P. prunorum*', '*Ca. P. pyri*' és '*Ca. P. mali*' variánsok összevetéséből

Látható, hogy a '*Ca. P. prunorum*' izolátumok, ha minimálisan is, de eltérnek a csoport másik két tagjától (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). A szekvenciák közötti eltérések az ábrán zöld színnel vannak kiemelve.

Habár a három fitoplazma faj 16S rDNS szakaszai között a hasonlóság magas, néhány nukleotid eltérés tapasztalható, mely alapján a 'Ca. P. prunorum' szekvencia elemzéssel elkülöníthető.

Az izolátumok a filogenetikai törzsfán 2 fő ágra különülnek el (47. ábra). Az egyik ágon a 'Ca. P. prunorum' variánsok találhatóak, melyekkel PCR termékeink szekvenciái közeli rokonságot mutattak.



47. ábra: A fitoplazma izolátumok filogenetikai távolságainak ábrázolása a 16S rDNS génszakaszból

Az elágazáson szereplő számok az elágazás valószínűségét jelölik százalékos formában, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis során kaptunk.

A szekvencia analízist követően kajszi mintáinkban egyértelműen sikerült azonosítani a 'Ca. P. prunorum' (ESFY) kórokozót. Felmérésünk alapján elmondható, hogy a kórokozó a vizsgált kajszi termesztő régiókban nagyon elterjedt. Azonban a 16S rDNS gén nagyfokú konzerváltságából kifolyólag, a begyűjtött és megszekvenált fitoplazma szekvenciáink variabilitásáról, rokonsági viszonyairól, származásukról nem tudunk pontos képet alkotni. Az ESYF, ilyen széles körben való elterjedése mögött, feltehetően a nem megfelelő, fertőzött szaporítóanyag használat áll.

5. Következtetések, javaslatok

Az NGS technológia vírusdiagnosztikában való első alkalmazása óta számos tanulmány igazolta, hogy a módszer bepillantást enged akár egyetlen egyed, akár egy egész ültetvény teljes virológiai állapotába. Az általunk vizsgált 14 szőlő ültetvény kis RNS alapú NGS vizsgálatával kapott eredményeink is ezt a megállapítást támasztották alá, felfedve számunkra a vírusok komplexitását az egyes ültetvényekben.

A kis RNS szekvenáláson túl a kapott eredményeinkhez és a hatékony diagnosztikához elengedhetetlen volt a kapott kis RNS szekvenciáink bioinformatikai elemzése, mely folyamatos kihívást és fejlesztést jelentett munkánk során, hogy a legmegfelelőbb elemzési lépéseket találjuk meg. Standardizáltunk egy bioinformatikai munkafolyamatot és azt konzekvensen alkalmaztuk az összehasonlított könyvtárak elemzésénél. A vírusdiagnosztika mellett, a szekvenálási adatból a bioinformatikai elemzéseiből információ nyerhető az antivirális RNS csendesítés egyes részfolyamatairól, kis RNS-ek jellemzőiről is szólóben.

Eredményeink alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy mivel az egyes bioinformatikai módszerek eltérő eredményeket adhatnak, így az általuk kapott eredményeket validálni szükséges egy független módszer segítségével (RT-PCR, Northern blot). A visszaigazolási lépés az eredmények igazolása mellett, egyben segítséget nyújt abban is, hogy a kis RNS-ek új generációs szekvenálása a jövőben, milyen paraméterek figyelembe vételével és elfogadásával használható diagnosztikai célra. Valamint megállapítottuk, hogy a kis RNS NGS alkalmazhatósága és megbízhatósága vírusonként nagyon eltérő lehet, így sok esetben egyéni vizsgálatot igényel.

Vizsgálatunkban, a legtöbb esetben a kis RNS NGS és molekuláris módszerek eredményei megegyeztek, azonban számos esetben tapasztaltunk eltéréseket a két eredmény között. Ezen különbségek lehetséges okainak feltárása munkánk során, szintén hozzájárult a kis RNS NGS alapú diagnosztika alkalmazhatóságának kidolgozásához. Eredményeink szerint ezen eltérések több okra vezethetők vissza: (1) Sok esetben a vírusok és variánsaik változékonysága következtében az irodalomban ismertett primer szekvenciákkal végzett PCR reakciókkal sikertelen volt a vírusok visszaigazolása. Ennek kiküszöbölésére a hazánkban fellelhető izolátumok kimutatására kis RNS szekvenciáink alapján számos primert terveztünk munkánk során, melyekkel a visszaigazolások már

általában sikeresek voltak. (2) Más esetben, eredményeink alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy ha az ültetvény egyedeinek RNS keveréke (pool) sok, nem fertőzött egyed RNS kivonatait is tartalmazza, az jelentősen csökkentheti a kimutatás érzékenységét és további kiegészítő vizsgálatok nélkül (RT-PCR, ültetvény poolok kibontása egyedekre) az egyenlőtlen, enyhe fertőzések nem mutathatóak ki egyértelműen. (3) Előfordult, hogy az RT-PCR látszólag érzékenyebbnek tűnt az NGS-nél (pl.: GRSPaV). Ebben az esetben lehet, hogy a vírusok és gazdájuk közötti koevolúciós kölcsönhatás miatt a vírus eredetű silencing szupresszorok jelenléte és aktivitása befolyásolhatja a vírus eredetű kis RNS-ek biogeneizését, de ennek a hipotézisnek a teszteléséhez további vizsgálatok szükségesek. Eredményeink alapján elmondható, hogy a három módszer (kis RNS NGS, bioinformatikai elemzés, RT-PCR visszaigazolás) kombinációja hatékony vírusdiagnosztikát eredményezett, azonban a módszerek alkalmazása és összehangolása több nyitott kérdést és megoldandó problémát vetett fel.

Mintáinkat random módon gyűjtöttük minden esetben, egy-egy tünetet mutató egyed mintázása helyett, és e mintákból a vírusdiagnosztikához RNS keverékeket készítettünk. Az ültetvények egészségi állapotát így felmérve, számos hazánkban ismert szőlőt fertőző vírust azonosítottunk. Az ültetvények mentesek voltak GFLV, ArMV és GLRaV2 vírusoktól. A kötelezően szűrendő vírusok közül GCMV és GLRaV3 fertőzöttséget egy, GVB esetében három, míg GVA vírus előfordulását 5 ültetvényben tapasztaltuk. Korábbi vizsgálatokkal és tapasztalatokkal megegyezően, ahogy várható volt GLRaV1 és GFkV széleskörű elterjedtségét tapasztaltuk. A legnagyobb mértékű fertőzöttséget a HSVd, a GYSVd1 viroid (14 és 13 ültetvényben) és a GRSPaV vírus (14 ültetvény) mutatta.

Az újgenerációs szekvenálás egyik legnagyobb előnye, hogy új vírusok detektálását is lehetővé teszi. Így sikerült leírnunk számos, hazánkban újonnan megjelent virális kórokozót, melyek meglepő módon országszerte széles körben elterjedtek voltak és az egyes újonnan megjelenő vírusok variánsai esetében nagymértékű genetikai variabilitást tapasztaltunk. Ilyen új vírusok a GRGV, GAMaV, GRVfV és meglepő módon a legnagyobb fertőzöttséget mutató GSyV1 és GPGV vírusok. Két ültetvényben megtaláltuk a korábban hazánkban szőlőn már leírt RBDV vírust, illetve a világszerte még kevésbé ismert GSV szatellit vírust is. A dolgozatban szereplő vírus izolátumok szekvenciái és adatai elhelyezésre kerültek az NCBI GenBank, nemzetközi adatbázisban.

Eredményeinkből kitűnik, hogy a legtöbb esetben az ültetvények párhuzamosan több vírussal voltak fertőződve, sok esetben 10-13, illetve 2-3 vírus, viroid jelenlétét is tapasztaltuk egy-egy ültetvényben munkánk során. A jelenlevő vírusok száma és az

ültetvény kora között azonban nem találtunk összefüggést. Az egyik legfertőzöttebb ültetvény (12_DF) több mint 100 éves és 12 vírust detektáltunk benne, míg egy alig egyéves ültetvényben (11_SZHU) 9 vírus egyidejű jelenlétét tapasztaltuk. Mindez arra enged következtetni, hogy a nagymértékű fertőzöttség és több vírus kevert fertőzésének együttes előfordulása a nem megfelelő, fertőzött szaporítóanyag alkalmazásának következménye lehet. Ezt az elméletet támasztja alá a vírusok és variánsaik filogenetikai vizsgálatának eredménye, mi szerint egy adott vírus földrajzilag azonos helyről származó változatai filogenetikailag jelentősen eltérnek egymástól, ami alapján kizárható a helyszíni fertőzés lehetősége. A vírusok terjedésében az adatok alapján a kereskedelemnek, az ellenőrizetlen szaporítóanyag használatnak lehet a legnagyobb szerepe.

A nagy áteresztőképességű módszerek, például a kis RNS NGS-el végzett felmérések folyamatosan információt szolgáltatnak számunkra a különböző virális kórokozók jelenlétéről, fontosságáról, tulajdonságairól, és ezzel összefüggésben támogathatják az új, érzékenyebb tesztek kifejlesztését a rutin diagnosztikájukhoz. A fajták és az alany ültetvények rendszeres ellenőrzése, ilyen érzékeny módszerrel megakadályozhatja a fertőzött szaporítóanyag ültetését és segíthet a szőlőültetvények egészségének megőrzésében.

Munkánk további részét képezte a csonthéjasokat megbetegítő '*Ca. P. prunorum*' fertőzöttség felmérése hazánk főbb kajszi termesztő régióiban. E kórokozó az elmúlt évtizedben egyre súlyosabb károkat okozott Magyarországon. Molekuláris diagnosztikai módszerekkel végzett vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a '*Ca. P. prunorum*' jelen van, és elterjedt az általunk mintázott 5 kajszi termesztő régió ültetvényeiben. A vizsgálatra kiválasztott, evolúciósan konzervált 16S *rRNS* gén vizsgálata alapján igazoltuk a fitoplazma jelenlétét. Ahhoz azonban, hogy az egyes variánsok változékonyságáról és származásukkal kapcsolatban következtetéseket tudjunk levonni, más, nagyobb genetikai változékonyságot mutató gének (*aceF*, *pnp*, *imp*) vizsgálata lenne szükséges. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a '*Ca. P. prunorum*', ilyen széleskörű elterjedtségének hátterében szintén a nem megfelelően megválasztott szaporítóanyag használat áll. E mellett a fitoplazma nagymértékű pusztításához a kajszi ültetvényekben, hozzájárulhat a külföldi fajták telepítése, melyek érzékenyebbek lehetnek a fitoplazma fertőzésekkel szemben.

6. Összefoglalás

A fás szárú növényültetvények egészségügyi állapotát nagymértékben befolyásolja azok viroidokkal, vírusokkal, illetve fitoplazmákkal való fertőzöttsége. Számos betegség terjedhet látens, vizuálisan nem detektálható formában, mely kiindulópontja lehet a fiatal ültetvényeken megjelenő járványoknak. A fajtulajdonságok fenntartása miatt vegetatívan szaporított és hosszú évtizedekig fenntartott fás szárú növények egészségének kulcsa a kórokozó mentes szaporítóanyagok használatának és a fertőzések terjesztéséért felelős vektorok elleni növényvédelemnek a kombinációja. A jelenlévő kórokozók hatékony kimutatása pedig a használt diagnosztikai módszerek érzékenységtől, megbízhatóságától függ.

Munkánk célja a diagnosztikai módszerek tovább fejlesztése volt, melyek alkalmasak a szőlő ültetvények vírus fertőzöttségének felmérésére, illetve új, eddig nem ismert patogének azonosítására. A kutatási program további részét képezte a kajszi barack ültetvényt károsító fitoplazmák detektálása, mivel a tapasztalatok alapján a gyümölcsfák fitoplazmás eredetű betegségei egyre komolyabb problémát jelentenek a termesztők számára világszerte.

Munkánk során a hagyományos diagnosztikai módszerek (RT-PCR, ELISA) helyett, egy alapvetően új megközelítési módot használtunk a szőlő vírus fertőzöttségének kimutatására: a vírus eredetű kis RNS-ek újgenerációs szekvenálását (kis RNS NGS). Vírusfertőzés során a növény védekező rendszere az RNS interferencia aktiválásával vírus eredetű, a vírus szekvenciájával megegyező kis RNS-ek (21-24nt hosszú RNS-ek) keletkeznek. Így az adott növény, vagy ültetvény kis RNS-einek szekvenálásával és a szekvenciák bioinformatikai elemzésével a növényben jelenlevő összes kórokozó jelenlétét detektálni tudjuk, és átfogó képet kaphatunk az ültetvényekben előforduló ismert és a növényen felbukkanó új kórokozókról. A módszer kidolgozásához szükséges mintáinkat a korábbi virológiai gyakorlattal szemben nem tünetes tőkékről, hanem egy ültetvényt reprezentáló véletlenszerűen elhelyezkedő tőkékről szedtük, valamint egy tőke több szervét is begyűjtöttük. Fás szárúakra optimalizált, CTAB alapú módszerrel RNS-t izoláltunk, majd ezekből ültetvény poolokat állítottunk elő. Az ültetvényenként poolozott RNS kivonatokból Illumina protokoll alapján kis RNS könyvtárakat készítettünk, melyeket nagy áteresztő képességű, új generációs szekvenálásra küldtük. Az ezt követő bioinformatikai

elemzések során megpróbáltunk egy standardizálható, visszaigazolható eredményt adó elemzési munkafolyamatot ('pipeline') kidolgozni, melyet a későbbiekben rutinszerűen lehet alkalmazni vírusok, viroidok azonosításra. A szekvenálási adatok bioinformatikai elemzésével meghatároztuk a jelenlévő hazánkban ismert előforduló, valamint új, hazánkban eddig nem ismert vírusokat és viroidokat az egyes mintákban. Az eredmények valódiságát először bioinformatikai módszerekkel, majd az eredeti RNS-ekről készült cDNS-ekről vírus specifikus primer szekvenciákkal végzett PCR reakcióval igazoltuk vissza. A felmérés alapján az ültetvények GFLV, ArMV és GLRaV2 vírusoktól mentesnek bizonyultak. GCMV és GLRaV3 vírusokat egy-egy ültetvény esetében, a GVB vírus 3, míg a GVA vírus jelenlétét 5 vizsgált ültetvényben tudtuk kimutatni. Széles körű elterjedtséget tapasztaltunk a GLRaV1 és a GFkV vírusok esetében. A legnagyobb mértékű fertőzöttséget azonban a viroidok (HSVd, GYSVd1) és a GRSPaV vírus esetében tapasztaltunk. Az izolátumok szekvencia adatai bekerültek az NCBI GenBank, nemzetközi szekvencia adatbázisába. Módszerünkkel azonosítottunk hat, Magyarországon eddig ismeretlen vírust (GPGV, GSyV1, GSV, GRGV, GAMaV, GRVfV), melyek jelenlétét saját kis RNS szekvenciáink alapján tervezett vírus specifikus primereket alkalmazva RT-PCR-el és Northern blot vizsgálattal is igazoltuk. Az izolátumok szekvencia adatait az NCBI GenBank, nemzetközi adatbázisában hozzáférhetővé tettük.

Napjainkban egyre több gondot okoznak a különböző fitoplazmás megbetegedések, melyek közül a legégetőbb probléma jelenleg a kajszi fitoplazmás eredetű megbetegedése. Munkánk során Magyarország több kajszi ültetvényén vizsgáltuk a '*Ca. P. prunorum*' jelenlétét. Az ültetvényekről levélmintákat gyűjtöttünk és DNS-t tisztítottunk a nested-PCR alapú kimutatáshoz. A kórokozó jelenlétének igazolásához a fitoplazmák kimutatására használt univerzális, és az egyes fitoplazma csoportok elkülönítésre alkalmas indítoszekvenciák kombinációját használtuk és meghatároztuk az azonosított izolátumok genomjának 16S rRNS génjének egy darabjának szekvenciáját. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált kajszi ültetvényekben a csonthéjasok európai sárgulás fitoplazma jelen van és általánosan elterjedt az általunk vizsgált ültetvényekben.

7. Új tudományos eredmények

1. Optimalizáltuk és sikeresen alkalmaztuk a vírus eredetű kis RNS-ek újgenerációs szekvenálását (NGS), valamint a szekvenált eredmények elemzésére kidolgozott bioinformatikai munkafolyamatokat szőlő mintákon, mint hatékony vírusdiagnosztikai eszköz.

2. A kis RNS alapú NGS technika segítségével 9 magyar borvidék 14 ültetvényéből izolált kis RNS könyvtárak analízisével felmértük a vizsgált ültetvények vírus fertőzöttségi állapotát.

3. Az általunk alkalmazott metagenomikai módszerrel és bioinformatikai elemzéssel kimutattunk 6 (GPGV, GSyV1, GRGV, GAMaV, GRVfV, GSV) olyan vírust, melyek előfordulása korábban nem volt ismert hazánk szőlő ültetvényeiben. Az izolátumok szekvencia adatai hazánkból elsőként kerültek be a nemzetközi GenBank szekvencia adatbázisába.

4. Felmértük a főbb kajszi termesztő régiók fitoplazma fertőzöttségét és megerősítettük a '*Candidatus phytoplasma prunorum*' jelenlétét, valamint széles körű elterjedtségét kajszi ültetvényeken.

8. New scientific results

1. We have optimized and successfully applied the new generation sequencing (NGS) methods of the virus-derived small RNAs and a bioinformatics workflows designed to analyze the sequencing results on grapevine samples as an effective virus diagnostic tool.
2. Small RNA based NGS method was used to investigate the viral infection status of the examined plantations by analyzing small RNA libraries isolated from 14 plantations of 9 Hungarian wine-growing regions.
3. Using this metagenomic approach and bioinformatics analysis we detected 6 viruses (GPGV, GSyV1, GRGV, GAMaV, GRVfV, GSV) that have not previously been known in the examined grapevine plantations in Hungary. The sequence data of the Hungarian grapevine virus isolates have been introduced the international GenBank sequence database.
4. The phytoplasma infection had been surveyed in the most important apricot-growing regions and confirmed the presence of '*Candidatus* phytoplasma prunorum' and its widespread distribution in apricot orchard.

9. Irodalomjegyzék

- Abou Ghanem, N., Saldarelli, P., Minafra, A., Buzkan, N., Castellano, M.A., Martelli, G.P. (1997)** Properties of Grapevine virus D, a novel putative trichovirus. *Journal of Plant Pathology*, 79: 15–25.
- Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemüller, E. (1993)** Genetic diversity among mycoplasma-like organisms associated with stone fruit disease. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6: 686-691.
- Ahrens, U., Seemüller, E. (1992)** Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathol.*, 82: 828-832.
- Akiko S., Saskia A.H. (2012)** The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Microbiology*, 15:247-254.
- Al Rwahnih, M., Ashita, D., Anderson, M., Rowhani, A., Uyemoto, J.K., Sudarshana M.R. (2013a)** Association of a DNA virus with grapevines affected by red blotch disease in California. *Phytopathology*, 103: 1069–1076.
- 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.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Sudarshana, M. R., Rowhani, A. (2013b)** Gene from a novel plant virus satellite from grapevine identifies a viral satellite lineage. *Virus Genes*, 47:114–118.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Islas, C., Rowhani, A. (2015)** Comparison of next generation sequencing vs. biological indexing for the optimal detection of viral pathogens in grapevine. *Phytopathology*, 105: 758–763.
- Al Rwahnih, M., Sudarshana, M.R., Uyemoto, J.K., Rowhani A. (2012b)** Complete genome of a novel vitivirus isolated from grapevine. *Journal of Virology*, 86: 9545.
- Al Rwahnih, M., Dolja, V.V., Daubert, S., Koonin, E.V., Rowhani, A. (2012a)** Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family Closteroviridae. *Virus Research*, 163: 302–309.
- Bai, X., Zhang, J.H., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W., Hogenhout, S.A. (2006)** Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J. Bacteriol.*, 188: 3682-3696.
- Banttari, E.E., Goodwin, P.H. (1985)** Detection of potato viruses S, X and Y by ELISA on nitrocellulose membrane (dot-ELISA). *Plant Disease*, 69:202-205.
- Barnett, O. W. (1986)** Application of new test procedures to surveys: merging the new with the old. In: Jones, R. A. C. and Torrance, L. (Eds), *Developments and*

Applications in Virus Testing. *Association of Applied Biologists*, Wellesbourne, 247–268.

- Battle, A., Laviña A., García-Chapa, M., Sabaté, J., Folch, C., Asin, L. (2004)** Comparative results between different detection methods of virus and phytoplasmas for pear and apple certification program. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 657:71-77.
- Baulcombe, D. (2004)** RNA silencing in plants. *Nature*, 431: 356-363.
- Baulcombe, D.C. (1999)** Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current opinion in plant biology*, 2: 109-113.
- Baumberger, N., Baulcombe, D.C. (2005)** Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 11928-11933.
- Berges, R., Rott, M., Seemüller, E. (2000)** Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90(10): 1145-1152.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., (2001)** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363-366.
- Bertaccini, A. (2007)** Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Front. Biosci.*, 12: 673-689.
- Bertazzon, N., Filippin, L., Forte, V., Angelini, E. (2016)** Grapevine Pinot gris virus seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy. *Arch. Virol.*, 161: 711–714.
- Bertazzon, N., Forte, V., Filippin, L., Causin, R., Maixner, M., Angelini, E. (2017)** Association between genetic variability and titre of Grapevine Pinot gris virus with disease symptoms. *PlantPathol.*, 66:949–959.
- Beuve, M., Candresse, T., Tannières, M., Lemaire, O. (2015)** First report of Grapevine redglobe virus (GRGV) in Grapevine in France. *Plant Dis.*, 99: 422–422.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014)** Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114–2120.
- Bonavia, M., Digiario, M., Boscia, D., Boari, A., Bottalico, G., Savino, V., Martelli, G.P. (1996)** Studies on “corky rugose wood” of grapevine and the diagnosis of Grapevine virus B. *Vitis*, 35: 53–48.
- Boscia, D., Digiario, M., Safi, M., Garau, R., Zhou, Z., Minafra, A., Abou Ghanem, N., Bottalico, G., Potere, O. (2001)** Production of monoclonal antibodies to Grapevine virus D and contribution to the study of its aetiological role in grapevine diseases. *Vitis*, 40: 569–574.
- Boscia, D., Sabanadzovic, S., Savino, V., Kyriakopoulou, P.E., Martelli, G.P., Laforteza, R. (1994)** A non-mechanically transmissible isometric virus associated with asteroid mosaic of the Grapevine. *Vitis*, 33: 101–102.
- Bovey, R., Gugerli, P. (2003)** A short history of ICGV. In Extended abstracts 14th meeting of ICGV, Locorotondo, Italy, 1–2.

- Buck, K.W. (1996)** Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Advances in virus research*, 47:159-251.
- Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2017)** 47 (2): 146–163.
- Candresse, T., Faure, C., Theil, S., Beuve, M., Lemaire, O., Spilmont, A. S., Marais, A. (2017a)** First report of Grapevine asteroid mosaic-associated virus Infecting Grapevine (*Vitis vinifera*) in France. *Plant Dis.*, 101: 1061–1061.
- Candresse, T., Marais, A., Theil, S., Faure, C., Lacombe, T., Boursiquot, J. M. (2017b)** Completenucleotidesequenceofan isolateofGrapevinesatellitevirus and evidence for the presence of multimeric forms in an infected Grapevine. *Genome Announc*, 5:e01703-16.
- Carbonell, A., Carrington, JC. (2015)** Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr Opin Plant Biol*, 27:111–117.
- Carraro, L., Ferrini, F., Ermacora, P., Loi, N. (2004)** Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma to *Prunus* species by using vector and graft transmission. *Acta Horticulturae*, 657: 449-453.
- Carraro, L., Ferrini, F., Ermacora, P., Loi, N. (2002)** Role of wild *Prunus* species in the epidemiology of European stone fruit yellows. *Plant Pathology*, 51: 513-517.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P. (2001)** Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 695-700.
- Choueiri, E., Boscia, D., Digiaro, M., Castelano, M.A., Martelli, G.P. (1996)** Some properties of a hitherto undescribed filamentous virus of the grapevine. *Vitis*, 35: 91-93.
- Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., Schulz, A. (2005)** Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant. Sci.*, 10 (11): 526-535.
- Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M., Schultz, A. (2004)** Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real time PCR and bioimaging. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 17: 1175-1184.
- Christensen, N.M., Nyskjold, H., Nicolaisen, M. (2013)** Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. In: M. Dickinson & J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, 938: 245–252. New York, NY, Humana Press. 421.
- Coetzee, B., Freeborough, M.J., Maree, H.J., Celton, J.M., Rees, D.J., Burger, J.T. (2010)** Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, 400(2), 157-163.
- Constable, F.E., Gibb, K.S., Simons, R.H. (2003)** Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52:267-276.
- Constable, F.E., Connellan, J., Nicholas, P., Rodoni, B.C. (2013)** The reliability of woody indexing for detection of grapevine virus-associated diseases in three different climatic conditions in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19: 74–80.

- Cretazzo, E., Padilla, C.V., Velasco, L. (2017)** First report of Grapevine Red Globe virus in grapevine in Spain. *Plant Dis.*, 101: 264–265.
- Cseh, E., Takács, A., Gáborjányi, R., Palkovics, L., Kocsis, L. (2013)** Rt-PCR Analysis and Evolutionary Relationship of Some Hungarian Grapevine leafroll associated virus 1 and 3 isolates. *Am. J. Plant Sci.*, 4:2006-2010.
- Cseh, E., Takács, A., Kocsis, L., Gáborjányi, R. (2012)** General properties of grapevine viruses occurring in Hungary. *Journal of Central European Agriculture*, 13(1): 44-57.
- Czotter, N., Molnár, J., Pesti, R., Demián, E., Baráth, D., Varga, T., Várallyay, É. (2018)** Use of siRNAs for Diagnosis of Viruses Associated to Woody Plants in Nurseries and Stock Collections. In: *Viral Metagenomics: Methods and Protocols*. (Pantaleo, V. and Chiumenti, M., eds.). New York, NY: Springer New York, 1746: 115-130.
- Czotter, N., Szabó, E., Molnár, J., Kocsis, L., Deák, T., Bisztray, Gy., Tusnády, G.E., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015a)** First description of grapevine syrah virus 1 in vineyards of Hungary. *Journal of Plant Pathology*, 97: S67-S77.
- Czotter, N., Manduláné Farkas, E., Lózsa, R., Ember, I., Szűcsné Varga, G., Várallyay, É., Szegedi, E. (2015b)** Primers designed for the detection of grapevine pathogens spreading with propagation material by quantitative real-time PCR. *Internat. J. Hortic. Sci.*, 21(1-2): 21-30.
- Danet, J.L., Bonnet, P., Jarausch, W., Carraro, L., Skoric, D., Labonne, G., Foissac, X. (2007)** Imp and secY, two new markers for MLST (multilocus sequence typing) in the 16SrX phytoplasma taxonomic group. *Bull. Insectol.*, 60: 339-340.
- Davies, D.L., Clark, M.F. (1994)** Maintenance of mycoplasma-like organisms occurring in *Pyrus* species by micropropagation and their elimination by tetracycline therapy. *Plant Pathology*, 43: 819-823.
- Davis, M.J., Whitcomb, R.F. (1981)** Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so called rickettsia-like bacteria). The Prokaryotes: A Handbook on Habits, Isolation, and Identification of Bacteria. Heidelberg, *Springer-Verlag*, 2172-2188.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O. (2006)** Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*, 313:68–71.
- Deng, S., Hiruki, C. (1991)** Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14:53-61.
- Dickinson, M., Tuffen, M., Hodgetts, J. (2013)** The phytoplasmas: an introduction. In *Phytoplasma*, *Humana Press*, 1-14.
- Digiario, M., Elbeaino, T., Martelli, G.P. (2007)** Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting nepoviruses of subgroups A,B and C. *Journal of virological methods*, 141:34-40.

- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (1967)** Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches-broom, aster yellows, or paulownia witches-broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*, 33: 259-266.
- Donaire, L., Wang, Y., Gonzalez-Ibeas, D., Mayer, K.F., Aranda, M.A., Llave, C. (2009)** Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology*, 392:203–214.
- Dosba, F., Lansac, M., Mazy, K., Garnier, M., Eyquard, J.P. (1991)** Incidence of different diseases associated with mycoplasma-like organisms in different species of *Prunus*. *Acta Horticulturae* 283: 311-320.
- Dovas, C.I., Katis, N.I. (2003)** A spot multiplex nested RT-PCR for the simultaneous and generic detection of viruses involved in the etiology of grapevine leafroll and rugose wood of grapevine. *Journal of Virological Methods*, 109: 217–226.
- Eichmeier, A., Kominkova, M., Kominek, P., Baranek, M. (2016)** Comprehensive virus detection using next generation sequencing in grapevine vascular tissues of plants obtained from the wine regions of Bohemia and Moravia (Czech Republic). *PLoS ONE*, 11:e0167966.
- Elbeaino, T., Kiyi, H., Boutarfa, R., Minafra, A., Martelli, G. P., Digiario, M. (2014)** Phylogenetic and recombination analysis of the homing protein domain of grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates associated with 'yellow mosaic' and 'infectious malformation' syndromes in grapevine. *Arch. Virol.*, 159:2757–2764.
- Esteves, F., Santos, M.T., Eiras-Dias, J.E., Fonseca, F. (2013)** Molecular data mining to improve antibody-based detection of Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1). *J Virol Methods*, 194(1-2): 258-270.
- Fajardo, T.V. M., Silva, F.N., Eiras, M., Nickel, O. (2017)** High-throughput sequencing applied for the identification of viruses infecting grapevines in Brazil and genetic variability analysis. *Trop. Plant Pathol.*, 42: 250–260.
- Fan, X., Dong, Y., Zhang, Z.P., Ren, F., Hu, G., Zhou, J. (2015)** Detection and sequence analysis of grapevine leafroll-associated virus 2 isolates from China. *Journal of Phytopathology*, 163: 978–986.
- Farkas, E., Palkovics, L., Mikulás, E., Balázs, E. (1999)** High incidence of hop stunt viroid in Hungarian grapevines. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 34:7-11.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998)** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
- Firrao, G., Gobbi, E., Locci, R. (1993)** Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organism. *Phytopathology*, 83:602–607.
- Firrao, G., Garcia-Chapa, M., Marzachi, C. (2007)** Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Front Biosci*, 12:1353–1375.

- Fonseca, F., Duarte, V., Santos, M.T., Brazao, J., Eiras-Dias, E. (2016)** First molecular characterization of grapevine virus B (GVB) in Portuguese grapevine cultivars and improvement of the RT-PCR detection assay. *Arch. Virol.*, 161: 3535–3540.
- Gambino, G., Cuozzo, D., Fasoli, M., Pagliarani, C., Vitali, M., Boccacci, P., Pezzotti, M., Mannini, F. (2012)** Co-evolution between Grapevine rupestris stem-pitting-associated virus and *Vitis vinifera* L. leads to decreased defence responses and increased transcription of genes related to photosynthesis. *J. Exp. Bot.*, 63: 5919–5933.
- Gambino, G., Gribaudo, I. (2006)** Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology*, 96: 1223–1229.
- Gambino, G.P., I., Gribaudo, I. (2008)** A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal.*, 19(6), 520-525.
- Garau, R., Prota, V.A., Piredda, R., Boscia, D., Prota, U.(1994)** On the possible relationship between Kober stem grooving and Grapevine virus A. *Vitis*, 33: 161–163.
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., Terlizzi, F., Credi, R., Saldarelli, P. (2012)** A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Res*, 163(1): 262-268.
- Glasa, M., Predajna, L., Soltys, K., Sihelska, N., Nagyova, A., Wetzel, T., Sabanadzovic, S. (2017)** Analysis of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus in Slovakia reveals differences in intra-host population diversity and naturally occurring recombination events. *Plant Pathol. J.*, 33: 34–42.
- Glasa, M., Predajna, L., Soltys, K., Sabanadzovic, S., Olmos, A. (2015)** Detection and molecular characterization of grapevine Syrah virus 1 isolates from Central Europe. *Virus Genes*, 51: 112–121.
- Goheen, A.C., Hewitt, W.B. (1962)** Vein banding, a new virus disease of grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 13 (29): 73-77.
- Goszczynski, D.E. (2014)** Complete genome sequence of a natural mutant of grapevine virus A (GVA). *Arch Virol*, 159(9): 2523-2528.
- Goszczynski, D.E., Jooste, A.E.C. (2003)** Identification of divergent variants of Grapevine virus A. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 397–403.
- Graniti, A., Martelli, G.P. (1965)** Further investigations on legno riccio (rugose wood), a graft-transmissible stem-pitting of grapevine. In Proceedings international conference on virus and vector on perennial hosts with special reference to vitis, Davis, USA, 168–179.
- Gualandri, V., Asquini, E., Bianchedi, P., Covelli, L., Brilli, M., Malossini, U., Bragagna, P., Saldarelli, P., Si-Ammour, A. (2016)** Identification of herbaceous hosts of the Grapevine Pinot gris virus (GPGV). *European Journal of Plant Pathology*, 147(1):21-25.

- Gundersen, D.E., Lee, I.-M. (1996)** Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterr.*, 35: 144–151.
- Gundersen, D.E., Lee, I.-M., Rehner, S.A., Davis, R.E., Kingsbury, D.T. (1994)** Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas), a basis for their classification. *J. Bacteriol.*, 176: 5244–5254.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C. (1999)** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286:950–952.
- Harrison, N.A., Richardson, P.A., Tsai, J.H. (1996)** PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. *Plant Dis.*, 80: 263–269.
- Hewitt, W.B. (1950)** Fanleaf, another vine disease found in California. *Bull. Calif. Dep. Agric.*, 39: 62–63.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Dickenson, M. (2009)** Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2945–2950.
- Hodgetts, J., Tomlison, J., Boonham, N., Gonzales-Martin, I., Nikolić, P., Swarbrick, P., Yankey, E.N., Dickinson, M. (2011)** Development of rapid in-field loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays for phytoplasmas. *Bulletin of Insectology*, 64:41–42.
- Hu, G.J., Dong, Y.F., Zhang, Z.P., Fan, X.D., Fang, R., Zhu, H.J. (2014)** Detection and sequence analysis of Grapevine virus B isolates from China. *Acta Virologica*, 58: 180–184.
- Hull, R. (2014)** Plant Virology. *Academic Press* (fifth edition).
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phyto-plasma taxonomy group (2004)** ‘CandidatusPhytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243–1255.
- Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F., Bovè, J.M. (1994)** Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2916–2923.
- Jarausch, W., Eyquard, J.P., Mazy, K., Lansac, M., Dosba F., (1999b)** High level of resistance of sweet cherry (*Prunus avium* L.) towards European stone fruit yellows phytoplasmas. *Advances in Horticultural Science*, 13: 108–12.
- Jarausch, W., Lansac, M., Bliot, C., Dosba, F. (1999a)** Phytoplasma transmission by in vitro graft inoculation as a basis for a preliminary screening method for resistance in fruit trees. *Plant pathol.*, 48 (2): 283–287.
- Jarausch, W., Lansac, M., Dosba, F. (1999c)** Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasma in different *Prunus* species detected by specific PCR. *J Phytopathol*, 147:47–54.

- Jarausch, W., Lansac, M., Saillard, C., Broquaire, J.M., Dosba, F. (1998)** PCR assay for specific detection of European stone fruit yellows phytoplasmas and its use for epidemiological studies in France. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104: 17-27.
- Jarausch, W., Saillard, C., Broquaire, J.M., Garnier, M., Dosba, F. (2000)** PCR-RFLP and sequence analysis of a non-ribosomal fragment for genetic characterization of European stone fruit yellows phytoplasmas infecting various *Prunus* species. *Mol. Cell. Probes.*, 14: 171–179.
- Jeremovic, D., Paunovic, S. (2011)** Raspberry bushy dwarf virus – A grapevine pathogen in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina*, 26: 55–60.
- Jo, Y., Choi, H., Cho, J.K., Yoon, J.Y., Choi, S.K., Cho, W.K. (2015)** In silico approach to reveal viral populations in grapevine cultivar Tannat using transcriptome data. *Scientific Reports*, 5(15841): 2015.
- Kidner, C.A., Martienssen, R.A. (2005)** The developmental role of microRNA in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 8: 38-44.
- Kirkpatrick, B.C., Smart, C., Gardner, S., Gao, J.L., Ahrens, U., Maurer, R., Schneider, B., Lorenz, K.H., Seemüller, E., Harrison, N., Namba, S., Daire, X. (1994)** Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. *IOM Letters*, 3: 228-229.
- Kison, H., Kirkpatrick, B.C., Seemüller, E. (1997)** Genetic comparison of the peach yellow leaf roll agent with European fruit tree phytoplasmas of the apple proliferation group. *Plant Pathol.*, 46: 538-544.
- Kison, H., Seemüller, E. (2001)** Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *J. Phytopathol.*, 149 (9): 533-541
- Kogovšek, P., Hodgett, J., Hall, J., Prezelj, N., Nikolić, P., Mehle, N., Lenarčič, R., Rotter, A., Dickinson, M., Boonham, N., Dermastia, M., Ravnikara, M. (2015)** LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavescentia dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 64:286-296.
- Koltunow, A.M., Krake, L.R., Johnson, S.D., Rezaian, M.A. (1989)** Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently. *Journal of General Virology*, 70: 3411–3419.
- Komínek, P., Bryxiová, M. (2004)** Comparison of three techniques for detection of grapevine leafroll-associated virus 1. *Acta Virologica*, 49: 37–43.
- Komínek, P., Glasa, M., Bryxiova, M. (2005)** Analysis of the molecular variability of Grapevine leafroll-associated virus 1 reveals the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines. *Virus Genes*, 31(3): 247-255.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, D., Heitmann, K., Migdoll, M. A., Reinhardt, R., Seemüller, E. (2008)** The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma ‘Candidatus Phytoplasma mali’. *BMC Genomics*, 9:306.
- Lázár, J., Kölber, M., Mikulás, J., Farkas, G., Lehoczky, J. (1994)** Magyarország jelentős szőlőbetegségei. 40. Növényvédelmi Tudományos Napok. 87. (Abstr.).

- Lee, I.-M., Gundersen, D.E., Hammond, R.W., Davis, R.E. (1994)** Use of mycoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84: 559-566.
- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M. (1998)** Revised classification scheme of phytoplasma based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153-1169.
- Lee, I.-M., Zhao, Y., Davis, R.E., Wei, W., Martini, M. (2007)** Prospects of DNA-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. *Bulletin of Insectology*, 60 (2): 239-244.
- Lee, I.-M., Davis, R.F. (1992)** Mycoplasmas which infect plants and insects. Mycoplasmas; Molecular Biology and Pathogenesis, eds. *American Society for Microbiology*, 379-390.
- Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E., Gundersen, D.E. (1993)** Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. *Phytopathol.*, 83: 834-842.
- Lee, M.-I., Zhao, Y., Bottner K.D. (2006)** SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular probes*, 20:87-91.
- Lehoczky, J., Beczner, L. (1980)** Szőlőbetegség a lucerna mozaik vírus fertőzésétől I. *Kertgazdaság*, 2:59-66.
- Lehoczky, J., Burgyán, J. (1986)** A paradicsom fekete gyűrűs foltosság vírus előfordulása szőlőben Magyarországon. *Kertgazdaság*, 18(4):47-57.
- Lehoczky, J., Boscia, D., Martelli, G.P., Burgyán, J., Castellano, M.A., Beczner, L., Farkas, G., (1987)** Occurrence of line pattern a hitherto unknown virus disease of grapevine in Hungary. *Kertgazdaság*, 19: 61–79.
- Lehoczky, J., Farkas, G. (1981)** A szőlő látens foltosságának előfordulása Magyarországon. *Kertgazdaság*, 13(1):15-25.
- Li, H. (2011)** A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27: 2987–2993.
- Li, H., Durbin, R. (2009)** Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25: 1754–1760.
- Liefting, L.W., Havukkala, I., Andersen, M.T., Lough, T.J., Beever, R.E. (2006)** The complete genome sequence of 'Candidatus Phytoplasma australiense'. In Proc. 16th Congr. Int. Org. Mycoplasmol., 9-14. July, 2006, Cambridge, UK. Cambridge, UK.: 43.
- Little, A., Rezaian, M.A. (2006)** Improved detection of grapevine leafroll-associated virus 1 by magnetic capture hybridisation RT-PCR on a conserved region of viral RNA. *Arch. Virol.*, 151: 753-761.

- Liu, H.-L., Chen, C.-C., Lin, C.-P. (2007)** Detection and identification of the phytoplasma associated with pear decline in Taiwan. *European Journal of Plant Pathology*, 117: 281-291.
- Lorenz, K.H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E. (1995)** Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, 85: 771-776.
- Lorenz, K-H., Dosba, F., Poggi-Pollini, C., Llacer, G., Seemüller, E. (1994)** Phytoplasma diseases on *Prunus* species in Europe are caused by genetically similar organisms. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.*, 101: 567-575
- Lucas, W.J. (2006)** Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, 344:169-184.
- Malagnini, V., E. de Lillo, Saldarelli, P., Beber, R., Duso, C., Raiola, A., Zanotelli, L., Valenzano, D., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Ratti, C., Causin, R., Gualandri, V. (2016)** Transmission of Grapevine Pinot Gris virus by *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) to grapevine. *Archives of Virology*, 161(9):2595-2599.
- Maliogka, V., Martelli, G.P., Fuchs, M., Katis, N. (2014)** Control of viruses infecting grapevine. *Advances in Virus Research*, 91:175–227.
- Marcone C. (2014)** Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. *Annals of Applied Biology*, 165 (2): 199-221.
- Marcone, C., Gibb, K.S., Streten, C., Schneider, B. (2004)** ‘Candidatus *Phytoplasma spartii*’, ‘Candidatus *Phytoplasma rhamni*’ and Candidatus *Phytoplasma allocasuarinae*, respectively associated with spartium witches’-broom, buckthorn witches’-broom and allocasuarina yellows diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1025-1029.
- Marcone, C., Jarausch, B., Jarausch, W. (2010)** Candidatus phytoplasma prunorum, the causal agent of european stone fruit yellows: an overview. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 19-34.
- Marcone, C., Lee, I.-M., Davis, R. E., Ragozzino A., Seemüller, E. (2000)** Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50:1703–1713.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., Seemüller, E. (1999)** Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology.*, 89 (9): 805-810.
- Martelli, G. P., Boudon-Padieu, E. (eds.) (2006):** Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine, Bari 279 p.
- Martelli, G. P., Lehoczy, J. (1968)** Isolation of Arabis mosaic virus from Hungarian grapevines. *Phytopathol. Mediterr.*, 7:129-133.
- Martelli, G. P., Quaquarelli, A., Lehoczy, J., Sárospataki, Gy. (1967)** A disorder resembling “legno riccio” (rugose wood) of grapevine in Hungary. *Phytopath. Mediterr.*, 6: 110-112.

- Martelli, G. P., Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Saldarelli, P. (2002)** Maculavirus, a new genus of plant viruses. *Arch. Virol.*, 147: 1847-1853.
- Martelli, G.P. (2014)** Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96 (1 Supplement): 1-136.
- Martelli, G.P., Rowhani, A., Sabanadzovic, S. (2015)** The fleck complex. In *Compendium of grape diseases*, ed. W.F. Wilcox, W.D. Gubler, and J.K. Uyemoto, 2nd ed., 115–117. St. Paul: APS Press.
- Martelli, G.P., Lehoczy, J., Quacquarelli, A. (1965)** Host range and properties of a virus associated with Hungarian grapevines showing macroscopic symptoms of fanleaf and yellow mosaic. In *Proceedings international conference on virus and vector on perennial hosts, with special reference to Vitis*, Davis, USA, 389–401.
- Martelli, G.P., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Agranowsky, A.A., Al Rawhani, M., Dolja, V.V., Doas, C.I., Fuchs, M., Gugerli, P., Hu, J.S., Jelkmann, W., Katis, N., Maliogka, V.I., Melzer, M.J., Menzel, W., Minafra, A., Rott, M.E., Rowhani, A., Sabanadzovic, S., Saldarelli, P. (2012)** Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll- associated member of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology*, 94: 7–19.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A.J., Osler, R. (2007)** Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037-2051.
- Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H., Candresse, T. (2014)** Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Res.*, 188:90-96.
- Mavric, I., Virscek, Marn M., Zezlina, I. (2003)** Raspberry bushy dwarf virus infection of grapevine in Slovenia. In *Extended abstracts 14th meeting of IGVG*, Locorotondo, Italy, 20.
- Mavric-Plesko, I., Virscek, Marn M., Sirca, S., Urek, G. (2009)** Biological, serological and molecular characterization of Raspberry bushy dwarf virus from grapevine and its detection in the nematode *Longidorus juvenilis*. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 261–268.
- Mayo, M.A., D.J. Robinson. (1996)** Nepoviruses: Molecular biology and replication. In *The plant viruses: Polyhedral virions and bipartite RNA genomes*, ed. B.D. Harrison and A.F. Murrant, vol. 5, 139–185. New York: Plenum Press.
- Meng, B., Johnson, R., Peressini, S., Forsline, P. L., Gonsalves, D. (1999)** Rupestris stem pitting associated virus 1 is a consistently detected in grapevine that are infected with rupestris stem pitting. *Eur. J. Plant Pathol.*, 105: 191-199.
- Meng, B., Rebelo, A.R., Fisher, H. (2006)** Genetic diversity analyses of grapevine Rupestris stem pitting-associated virus reveal distinct population structures in scion versus rootstock varieties. *J. Gen. Virol.*, 87:1725–1733.

- Metzker, M.L. (2010)** Sequencing technologies – the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11(1): 31–46.
- Minafra, A., Hadidi, A. (1994)** Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods*, 47:175-187.
- Minafra, A., Saldarelli, P., Martelli, G.P. (1997)** Grapevine virus A: nucleotide sequence, genom organization, and relationship in the Trichovirus genus. *Arch. Virol.* 142: 417-423.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Vance, V. (2008)** Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends Plant Sci.*, 13(7):375-82.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., Schaffer, A. A. (2008)** Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 24: 1757–1764.
- Morton, A., Davies, D.L., Blomquist, C.L., Barbara, D.J. (2003)** Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Mol. Plant Pathol.*, 4: 109-114.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, *Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.*, 51: 263–273.
- Naidu, R.A., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D., Martelli, G.P. (2014)** Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant Disease*, 98: 1172–1185.
- Nakaune, R., Inoue, K., Nasu, H., Kakogawa, K., Nitta, H., Imada, J., Nakano, M. (2008)** Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of Rupestris stem pitting-associated virus. *J. Gen. Plant Pathol.*, 74: 156-163.
- Namba, S., Oyaizu, H., Kato, S., Iwanami, S., Tsuchizaki, T. (1993)** Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasmalike organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 461-467.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990)** Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, 2: 279-289.
- Nassuth, A., Pollari, E., Helmeczy, K., Stewart, S., Kofalvi, S.A. (2000)** Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *Journal of Virological Methods*, 90: 37–49.
- Navarro B., Pantaleo, V., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, Gy., Di Serio, F., Burgyán, J. (2009)** Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant-viroid interaction. *PLoS ONE*, 4(11): e7686.

- Navrátil, M., Válová P., Fialová, R., Petrová, K., PoncarováVorácková, Z., Fránová, J., Nebesárová, J., Karesová, R. (2001) Survey for stone fruit phytoplasmas in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 550: 377-382.
- Niehl, A., Heinlein, M. (2011) Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma*, 248(1):75-99.
- Nolasco, G., Mansinho, A., Teixeira Santos, M., Soares, C., Sequeira, Z., Sequeira, C., Correia, P.K., Sequeira, O.A. (2000) Large scale evaluation of primers for diagnosis of rupestris stem pitting associated virus-1. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 311–318.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Nobuyuki, A., Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12):e63.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat. Genet.*, 36:27-29.
- Oshima, K., Maejima, K., Namba, S. (2013) Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, 4:230.
- Pantaleo, V., Saldarelli, P., Miozzi, L., Giampetruzzi, A., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay T., Bisztray, Gy., Burgyán J. (2010) Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot Noir grapevine. *Virology*, 408(1): 49-56.
- Plesko, I.M., Marn, M.V., Nyerges, K., Lazar, J. (2012) First Report of Raspberry bushy dwarf virus Infecting Grapevine in Hungary. *Plant Disease*, 96(10): 1582-1582.
- Reynard, J. S., Brodard, J., Dubuis, N., Yobregat, O., Kominek, P., Schumpp, O., Schaerer, S. (2017) First report of Grapevine rupestris vein feathering virus in Swiss Grapevines. *Plant Dis.*, 101: 1062.
- Rezaian, M.A., Koltunow, A.M., Krake, L.R. (1988) Isolation of three viroids and a circular RNA from grapevines. *Journal of General Virology*, 69: 413–422.
- Romano, N., Macino, G. (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology*, 6: 3343-3353.
- Roossinck, M.J., Martin, D.P., Roumagnac, P. (2015) Plant Virus Metagenomics: Advances in Virus Discovery. *Phytopathology*, 105(6): 716-727.
- Rowhani, A., Chay, C., Golino, D.A., Falk, B.W. (1993) Development of a polymerase chain- reaction technique for the detection of Grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology*, 83: 749–753.
- Ruiz-Ferrer, V., Voinnet, O. (2009) Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol.*, 60:485-510.
- Sabanadzovic, S., Ghanem-Sabanadzovic, NA., Gorbalenya, AE. (2009) Permutation of the active site of putative RNA-dependent RNA polymerase in a newly identified species of plant alpha-like virus. *Virology*, 394(1): 1-7.

- Sabanadzovic, S., Abou-Ghanem, N., Castellano, M.A., Digiario, M., Martelli, G.P. (2000)** Grapevine fleck virus-like viruses in Vitis. *Arch. Virol.*, 145: 553–565.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985)** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350–1354.
- Saldarelli, P., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Malossini, U., Pirolo, C., Bianchedi, P., Gualandri, V. (2015)** Genetic Variability of Grapevine Pinot gris virus and Its Association with Grapevine Leaf Mottling and Deformation. *Phytopathology* 105(4), 555-563.
- Sano, T., Uyeda, I., Shikata, E. (1985)** A viroid-like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. *Journal of General Virology*, 66: 333–338.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D., Kirkpatrick, B.C. (1995)** Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, eds. Academic Press. San Diego, USA, 369-380.
- Schneider, B., Süle, S., Jelkmann, W., Seemüller, E. (2014)** Suppression of aggressive strains of 'Candidatus Phytoplasma mali' by mild strains in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana occidentalis* and indication of similar action in apple trees. *Phytopathology*, 104 (5): 453-461.
- Seemüller E., Schneider, B. (2004)** 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1217-1226.
- Seemüller, E., Foster, A. (1995)** European stone fruit yellows. In: Ogawa J.M., Zehr E.I., Bird G.W., Ritchie D.F., Uriu K., Uyemoto J.K. (eds.). *Compendium of Stone Fruit Diseases*, APS Press, St. Paul, MN, USA: 59-60
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M. (1998)** Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.*, 80: 3-26.
- Seemüller, E., Schaper, U., Zimbelmann, F. (1984)** Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz*, 91 (4): 371-382.
- Seemüller, E., Schneider, B., Mäurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K-H., Firrao, G., Avinent L., Sears, B.B., Stackebrandt, E. (1994)** Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int J Syst Bacteriol*, 44: 440–446.
- Staub, U., Polivka, H., Herrmann, J.V., Gross, H.J. (1993)** Transmission of grapevine viroids is not likely to occur mechanically by regular pruning. *Vitis*, 34: 119–123.
- Süle, S., Viczián, O., Péntzes, B. (1997)** A kajszi fitoplazmás pusztulása. *Kertészet és Szőlészet*, 45: 8-11.

- Szychowski, J.A., Goheen, A.C., Semancik, J.S. (1988)** Mechanical transmission and rootstock reservoirs as factors in the widespread distribution of viroids in grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39: 213–216.
- Tomlinson J. A., Boonham N., Dickinson, M. (2010)** Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. *Plant Pathology*, 59, 465–471.
- Tran-Nguyen, L., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., Gibb, K. (2007)** An overview of the genome sequence of 'Candidatus Phytoplasma australiense' - Australian strain. *B. Insectol.*, 60: 111112.
- Turturo, C., Saldarelli, P., Yafeng, D., Digiario, M., Minafra, A., Savino, V., Martelli, G.P. (2005)** Genetic variability and population structure of Grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *J. Gen. Virol.*, 86: 217-224.
- Ulrichova, M., Petru, E. (1975)** Elimination of mycoplasma in tobacco callus tissues (*Nicotiana glauca* Grah) cultured in vitro in the presence of 2,4-D nutrient medium. *Biol. Plantarum*, 17:103108.
- Viczián, O. (2002)** A magyarországon előforduló fitoplazmák molekuláris biológiai módszerekkel történő meghatározása és tanulmányozása. Doktori Értekezés. Szent István Egyetem Kertészettudományi Kar. Gödöllő
- Viczián, O., Süle, S., Péntes, B., Seemüller, E. (1997)** A kajszi fitoplazmás pusztulása Magyarországon. *Új Kertgazdaság*, 1: 48-51.
- Voinnet, O. (2008)** Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 464-470.
- Voncina, D., Al Rwahnih, M., Rowhani, A., Gouran, M., Almeida, R.P.P. (2017)** Viral diversity in autochthonous Croatian grapevine cultivars. *Plant Dis.*, 101: 1230–1235.
- Vunsh, R., Rosner, A., Stein, A. (1990)** The use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Ann. Appl. Biol.*, 117: 561-569.
- Walsh, H.A., Pietersen, G. (2013)** Rapid detection of Grapevine leafroll-associated virus type 3 using a reverse transcription loop-mediated amplification method. *Journal of Virological Methods*, 194: 308–316.
- Wan Chow Wah, Y.F., Symons, R.H. (1999)** Transmission of viroids via grape seeds. *Journal of Phytopathology.*, 147: 285–291.
- Woodham, R. C., Krake, L. R. (1983)** Investigations on transmission of grapevine leafroll, yellow speckle and fleck diseases by dodder. *Journal of Phytopathology*, 106: 193-198.
- Wu, Q., Habili, N. (2017)** The recent importation of Grapevine Pinot gris virus into Australia. *Virus Genes*, 53: 935–93
- Wu, Q., Wang, Y., Cao, M., Pantaleo, V., Burgyan, J., Li, W.X., Ding, S.W. (2012)** Homology- independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep

sequencing and a new computational algorithm. *Proceedings of National Academy of Science U.S.A.*, 109: 3938–3943.

Xiao, H., Meng, B. (2016) First report of Grapevine asteroid mosaic-associated virus and Grapevine rupestris vein feathering virus in Grapevines in Canada. *Plant Dis.*, 100: 2175–2175

Zerbino, D.R., Birney, E. (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.*, 18: 821–829.

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.

Zhang, Z., Qi, S., Tang, N., Zhang, X., Chen, S., Zhu, P., Ma, L., Cheng, J., Xu, Y., Lu, M., Wang, H., Ding, S.W., Li, S., Wu., Q. (2014) Discovery of replicating circular RNAs by RNA-seq and computational algorithms. *PLoS Pathogens*, 10: e1004553.

Zhao, H., Zhao, K., Wang, J., Chen, X., Chen, Z., Cai, R., Xiang, Y. (2015) Comprehensive Analysis of Dicer-Like, Argonaute, and RNA-dependent RNA Polymerase Gene Families in Grapevine (*Vitis Vinifera*). *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(1):108-121.

Zhou, J., Fan, X., Dong, Y., Zhang, Z.P., Ren, F., Hu., G. (2015) Detection and genetic variation analysis of grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates in China using RT-PCR, and nested RT-PCR. *Archives of Virology*, 160: 2661–2667.

International Organisation of Vine and Wine (O.I.V.). www.oiv.int.

10. Publikációk, előadások

Dolgozathoz kapcsolódó publikációk

IF-os folyóiratban

Czotter, N., Molnár, J., Szabó, E., Demián, E., Kontra, L., Baksa I., Szittya, Gy., Kocsis, L., Deák, T., Bisztray, Gy., Tusnády, E. G., Burgyán J., Várallyay É. (2018) NGS of virus-derived small RNAs as a diagnostic method used to determine viromes of Hungarian vineyards., *Frontiers in Microbiology*, 9:122.

Czotter, N., Molnár, J., Pesti, R., Demián, E., Baráth, D., Varga, T., Várallyay, É. (2018) Use of siRNAs for Diagnosis of Viruses Associated to Woody Plants in Nurseries and Stock Collections. In: *Viral Metagenomics: Methods and Protocols*. (Pantaleo, V. and Chiumenti, M., eds.). New York, NY: Springer New York, pp. 115-130.

Czotter, N., Szabó, E., Molnár, J., Kocsis, L., Deák, T., Bisztray, Gy., Tusnády, E. G., Burgyán, J., Várallyay É. (2015) First description of Grapevine Syrah virus-1 in vineyards of Hungary, *Journal of Plant Pathology*, 97: S67-S77.

Nem IF-os folyóiratban

Czotter, N., Czakó, K., Várallyay, É., Szegedi, E. (2016) Molekuláris diagnosztikai módszerek a szőlő szaporítóanyaggal terjedő károsítóinak kimutatására. *Kertgazdaság*, 48 (2):37-44.

Czotter, N., Demián, E., Molnár, J., Tusnády, E. G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2016) Szőlő vírusdiagnosztika új megközelítésben, *Borászati Füzetek*, 26 (4) 22-27.

Czotter, N., Mandulané Farkas, E., Lózsa, R., Ember, I., Szűcsné Varga, G., Várallyay, É., Szegedi, E. (2015) Primers designed for the detection of grapevine pathogens spreading with propagating material by quantitative real-time PCR. *International Journal of Horticultural Sciences*, 21 (1-2):21-30.

Czotter, N., Szabó, E., Molnár, J., Pesti, R., Oláh, E., Deák, T., Bisztray, Gy., Tusnády, E. G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015) Szőlőültetvényeink metagenomikai diagnosztikája új, hazánkban eddig nem leírt vírusok jelenlétét mutatta ki. *Növényvédelem*, 51 (12): 550-559.

Czotter, N., Deák, T., Lázár, J., Bisztray, Gy., Burgyán, J., Várallyay, É. (2014) Diagnosztikai módszerek fejlesztése a szőlő vírusfertőzöttségének megállapítására. *Növényvédelem*, 50 (12): 547-555.

Farkas, E., **Czotter, N.,** Lózsa, R., Dula, T., Ember, I., Várallyay, É., Szegedi E. (2014) Conventional PCR primers for the detection of grapevine pathogens

disseminated by propagating material. *International Journal of Horticultural Sciences*, 20 (3-4):69-80.

Hazai konferencia kiadványban

Czotter, N., Oláh, B., Petres, M., Baráth, D., Szabó, L., Kirilla, Z., Kocsisné Molnár, G., Kocsis László, Preininger, É., Lakatos, T., Szabó, Z., Várallyay, É. (2017) Fitoplazma fertőzöttség vizsgálata kajszi ültetvényekben. *Georgikon for Agriculture*, 21:22-26.

Czotter, N., Molnár, J., Deák, T., Tusnády, E. G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2016) Magyarországon megjelenő új szőlő vírusok azonosítása kis RNS-ek szekvenálásán alapuló metagenomikai módszerekkel, *Georgikon for Agriculture*, 20 (1): 34-38.

Czotter, N., Molnár, J., Balássy, J., Varga, T., Deák, T., Tusnády, E. G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2016) Új generációs szekvenálás alkalmazása a vírusdiagnosztikában. Kutatói utánpótlás elősegítő program I. szakmai konferenciája konferencia kiadvány (ISBN).

Czotter, N., Szabó, E., Deák, T., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015) Magyar szőlőültetvények vírusdiagnosztikája kis RNS-ek újgenerációs szekvenálásával. *Borászati Füzetek Különkiadványa*: 126-128.

Czotter, N., Szabó, E., Deák, T., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015) Új diagnosztikai módszerek a szőlő vírusfertőzöttségének megállapítására. *Borászati Füzetek Különkiadványa*: 153-155.

Molnár, J., **Czotter, N.**, Preininger, É., Szegedi, E., Kocsis, L., Deák, T., Tusnády, E.G., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015) Vírusdiagnosztika kis RNS-ek új generációs szekvenálásával. Agrárkutatás és innováció – változó ég alatt. *II.NAIK Napok konferenciakötet*, (ISBN 978-963-12-4392-5) 31-33.

Nemzetközi konferencia kiadványban

Czotter, N., Szabó, E., Molnár, J., Kocsis, L., Lázár, J., Szegedi, E., Deák, T., Bisztray, Gy., Tusnády, G.E., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015) Viromes of Hungarian grapevine plantations by next generation sequencing of small RNAs. Proceedings of the 18th Congress of the ICVG 95, Ankara, 2015 Sept 7-11.

Ismeretterjesztő

Czotter, N., Várallyay, É. (2016) Vírusdiagnosztika, Kertészet és Szőlészet, 18. szám, 2016. május 4., 16-19.

Dolgozathoz kapcsolódó előadások, posztterek

Magyar nyelvű posztterek

Demián, E., **Czotter, N.**, Molnár, J., Tusnády, E. G., Kocsis, L., Várallyay, Éva. (2017) Magyar alanszőlő ültetvények vírusdiagnosztikája kis RNS-ek újgenerációs szekvenálásával. 63. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2017. 02. 21-22.

Petres, M., **Czotter, N.**, Szabó, Z., Várallyay, É. (2017) Fitoplazma fertőzöttség vizsgálata sherpa fajtájú kajsziarack ültetvényben, 63. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2017. 02. 21-22.

Czakó, K., **Czotter, N.**, Kocsis, L., Várallyay, É. (2016) Szőlő Pinot gris vírus (GPGV) megjelenése hazánk szőlőültetvényein. 62. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2016. 02. 16-17.

Czotter, N., Szabó, E., Deák, T., Bisztray, Gy., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015) Magyar szőlőültetvények vírusdiagnosztikája kis RNS-ek újgenerációs szekvenálásával. Szőlőtermesztési és Borászati Tudományos Konferencia, 2015.

Czotter, N., Szabó, E., Deák, T., Bisztray, Gy., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015) Új diagnosztikai módszerek a szőlő vírusfertőzöttségének megállapítására. Szőlőtermesztési és Borászati Tudományos Konferencia, 2015.

Magyar nyelvű előadások

Czotter, N., Oláh, B., Petres, M., Baráth, D., Szabó, L., Kirilla, Z., Kocsisné Molnár, G., Kocsis, L., Preininger, É., Lakatos, T., Szabó, Z., Várallyay, É. (2017) Fitoplazma fertőzöttség vizsgálata kajszi ültetvényekben, XXVII. Növényvédelmi Fórum, Keszthely, 2017.01.18-20.

Czotter, N. (2017)_ Fitoplazma fertőzöttség vizsgálata kajszi ültetvényeken „Kajszi fapusztlással kapcsolatos 2016 évi eredmények megvitatására” konferencia, Budapest, 2017.01.31.

Czotter, N., Molnár, J., Deák, T., Tusnády, E. G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2016) Magyarországon megjelenő új szőlő vírusok azonosítása kis RNS-ek szekvenálásán alapuló metagenomikai módszerekkel. XXVI. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum, 2016. 01. 20-22.

Czotter, N., Molnár, J., Deák, T., Tusnády, E. G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2016) Magyar szőlőültetvények vírusdiagnosztikája kis RNS-ek újgenerációs szekvenálásával. 62.Növényvédelmi Tudományos Napok, 2016 Budapest, 02. 17-18.

Czotter, N., Molnár, J., Balássy, J., Varga, T., Deák, T., Tusnády, E. G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2016) Új generációs szekvenálás alkalmazása a vírusdiagnosztikában. Kutatói utánpótlás elősegítő program I. szakmai konferenciája, 2016.03.3-4.

Czotter, N., Demián, E., Baráth, D., Molnár, J., Tusnády, E. G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2016) Felválthatja-e a metagenomika a hagyományos vírusdiagnosztikai módszereket?, MBK Napok, Gödöllő, 2016.12.14-15.

Czotter, N., Szabó, E., Molnár, J., Deák, T., Bisztray, Gy., Tusnády, E. G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015) Magyar szőlőültetvények kis RNS NGS alapú vírusdiagnosztikai felmérése. Genetikai Műhelyek Magyarországon XIV. Minikonferencia, 2015.09. 04.

Idegen nyelvű poszterek

Demián, E., **Czotter, N.,** Czakó, K., Molnár, J., Tusnády, E.G., Várallyay, É. (2017) Detection and molecular characterization of Hungarian strain of Grapevine Pinot gris virus. 3rd Hunagrian Molecular Life Sciences Conference, Eger, 2017.03. 31- 04. 02.

Czotter, N, Molnár, J., Tusnády, E. G, Kocsis, L, Burgyán, J, Várallyay, É. (2016) Virus diagnosis in grapevine plantations with next generation sequencing metagenomic approach, International Advances in Plant Virology, Conference of AAB in conjunction with Cost Action FA1407, Greenwich, 2016.09. 06-09.

Czotter, N., Szabó, E., Deák, T., Lázár, J., Szegedi, E., Barta, E., Tóth, G., Bisztray, Gy., Burgyán, J., Várallyay, É. (2015) NGS aided diagnostics revealed presence of new/lately described viruses in Hungarian grapevine plantations. Molekuláris Élettudományi Konferencia, 2015.

Idegen nyelvű előadások:

Czotter, N., Demián, E., Molnár, J., Deák, T., Tusnády, E.G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É. (2017) Virus diagnostics of Hungarian grapevine plantations by next generation sequencing of small RNAs, 3rd Hunagrian Molecular Life Sciences Conference, Eger, 2017.03.31- 04. 02.

Czotter, N., Molnár, J., Tusnády, E. G., Kocsis, L, Burgyán, J., Várallyay, É. (2016) Validation of small RNA NGS based virus diagnostucs by RT-PCR, International Advances in Plant Virology, Conference of AAB in conjunction with Cost Action FA1407, Greenwich, 201.09. 06-09.

Czotter, N., Szabó, E., Molnár, J., Kocsis, L., Lázár, J., Szegedi, E., Deák, T., Bisztray, Gy., Tusnády, G. E., J. Burgyán, J., Várallyay, É. (2015) Viromes of Hungarian grapevine plantations by next generation sequencing of small RNAs. 18th Congress of the ICVG, Ankara, 2015.09. 07-11.

Más témában megjelent publikációk, előadások, posztterek

IF-os folyóiratban

Baráth, D., **Jaksa-Czotter, N.**, Molnár, J., Varga, T., Balássy, J., Szabó, L.K., Kirill, Z., Tusnády, E.G., Preininger, É., Várallyay, É. (2018) Small RNA NGS Revealed the Presence of Cherry Virus A and Little Cherry Virus 1 on Apricots in Hungary. *Viruses*, 10: 318.

Hazai konferencia kiadványban

Baráth, D., **Czotter, N.**, Bükki, A., Oláh, B., Balássy, J., Varga, T., Szabó, L., Tóth, T., Kirilla, Z., Kocsis, L., Preininger, É., Lakatos, T. Várallyay, É. (2018) Új csonthéjasokat fertőző vírusok kimutatása Magyarországon, *Georgikon for Agriculture*, 22 (1): 28-33.

Magyar nyelvű posztterek

Balássy, J., **Czotter, N.**, Molnár, J., Kirilla, Z., Tusnády, E. G., Preininger, É., Várallyay, É. (2016) Vírusfertőzöttség vizsgálata csonthéjas gyümölcsfákon metagenomikai módszerek segítségével. 62. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2016.02.17-18.

Balássy, J., Varga, T., **Czotter, N.**, Molnár, J., Kirilla, Z., Tusnády, E. G., Preininger, É., Várallyay, É. (2016) Csonthéjas gyümölcsfák vírusfertőzöttségének vizsgálata metagenomikai módszerekkel. FIBOK 2016, Gödöllő, 2016.03.21-22.

Magyar nyelvű előadások

Baráth, D., **Czotter, N.**, Bükki, A., Oláh, B., Balássy, J., Varga, T., Szabó, L., Tóth, T., Kirilla, Z., Kocsis, L., Preininger, É., Lakatos, T., Várallyay, É. (2018) Új csonthéjasokat fertőző vírusok kimutatása Magyarországon. XXVIII Növényvédelmi Fórum, Keszthely, 2017.01.17-19.

Demián, E., **Czotter, N.**, Várallyay, É. (2018) Grapevine Pinot gris vírus (GPGV), egy szőlővírus gyomnövényeken. XXVIII Növényvédelmi Fórum, Keszthely, 2017.01.17-19.

Kontra, L., Demián, E., **Czotter, N.**, Lázár, J., Várallyay, É. (2018) Szőlő vonalas mintázottság (GLPV) – egy ismeretlen ismerős. 64. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest 2017.02.20-21.

Czotter, N., Pena, E., Baráth, D., Csonka, G., Várallyay, É. (2018) Almafa boszorkányseprűsödés vizsgálata Olcsvaapátiban 64. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2017.02. 20-21.

Demián, E., Kontra, L., **Czotter, N.**, Lázár, J., Várallyay, É. (2018) GLPV- A 30-year-old new virus. Fiatal Biotechnológusok III. Országos Konferenciája, Budapest, 2018.03.28-29.

Idegen nyelvű poszterek

Demián, E., Czotter, N., Várallyay, É. (2018) Investigation of Grapevine Pinot gris Virus presence in non-Vitis hosts in Hungary. Power of Viruses. International Conference, Poreč, Croatia, May 16-18, 2018.

Baráth, D., Bükki, A., Czakó, D., Czotter, N., Szabó, L.K., Kirilla, Z., Preininger, É., Várallyay, É. (2018) Detection of CVA, LChV1 and PLMVd in Prunus sps in Hungarian stock collections. International Conference, Poreč, Croatia, May 16-18, 2018.

Szabó, L.K., Czotter, N., Baráth, D., Kirilla, Z., Hegedűs, A., Várallyay, É., Preininger É. (2018). Establishment of phytoplasma and virus infected in vitro shoot cultures of apricot cultivars. Fiatal Biotechnológusok III. Országos Konferenciája, Budapest, 2018.03. 28-29.

Bükki, A., Baráth, D., Czotter, N., Balássy, J., Varga, T., Szabó, L., Kirilla, Z., Preininger, É., Várallyay, É. (2018) Detection of new, cherry infecting viruses in apricot in Hungary. Fiatal Biotechnológusok III. Országos Konferenciája, Budapest, 2018.03.28-29.

Baráth, D., Czotter, N., Bükki, A., Oláh, B., Czakó, D., Szabó, L., Kirilla, Z., Preininger, É., Várallyay, É. (2018) Diagnosis of Peach latent mosaic viroid in Hungary. Advances in Plant Virology, Conference of AAB, 2018 12-13. Apr, Birmingham.

Idegen nyelvű előadások

Czotter, N., Varga, T., Baráth, D., Molnár, J., Balássy, J., Deák, T., Tusnády, E.G., Kocsis, L., Preininger, É., Burgyán J., Várallyay, É. (2017) NGS studies on fruit tree screenhouses and stock collections in Hungary 24th International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Thessaloniki, 2017.06.5-9.

Demián, E., Czotter, N., Várallyay, É. (2018) Detection of Grapevine Pinot gris Virus in different non-Vitis hosts in Hungary. 19th Conference of the ICVG, Santiago of Chile, 9-12.04. 2018.

Kontra, L., **Demián, E., Czotter, N., Lázár, J., Lehoczky, J., Várallyay, É.** (2018) GLPV – an unknown, but familiar grapevine virus. 19th Conference of the ICVG, Santiago of Chile, 9-12.04.2018.

Baráth, D., Czotter, N., Balássy, J., Varga, T., Molnár, J., Tusnády, E. G., Preininger, É., Várallyay, É. (2017) Hazánkban új viroid kimutatása kis RNS szekvenálással. Fiatal RNS kutatók fóruma, Gödöllő, 2017.06.23

Baráth, D., Czotter, N., Balássy, J., Varga, T., Szabó, L., Kirilla, Z., Molnár, J., Tusnády, E.G., Preininger, É., Várallyay, É. (2017) Undescribed viroid detection by metagenomic approach in Hungary. 3rd Hungarian Molecular Life Sciences Conference, Eger, 2017.03,31-04.02.

11. Köszönetnyilvánítás

Először is köszönetemet és hálámat szeretném kifejezni mentoromnak és egyik témavezetőmnek Dr. Várallyay Évának (tudományos főmunkatárs), aki az elmúlt évek során fáradtságot nem kímélve próbálta meg tudását és tapasztalatát átadni. Segítségével a vizsgálatokat a NAIK-Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, Diagnosztikai csoportjában készíthettem el, irányításával, tanácsadásával nagy segítséget nyújtott mind a kísérletek elvégzésében, mind a dolgozat megírásában. Szeretném köszönetemet kifejezni másik témavezetőmnek, Dr. Kocsis Lászlónak (egyetemi tanár) is, aki lehetővé tette, hogy a Pannon Egyetem, Festetics Doktori Iskolájában PhD. hallgató lehessenek, valamint hálás vagyok a munkám során nyújtott szakmai tanácsaiért.

Köszönöm továbbá a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet korábbi főigazgatóinak Dr. Burgyán Józsefnek, Dr. Bősze Zsuzsának és a jelenlegi főigazgatónak Dr. Olasz Ferencnek, hogy az intézetben engedélyezték munkámat.

Köszönettel tartozom a Diagnosztikai csoport régi és új tagjainak, legfőképpen Carmen Iliescu korábbi asszisztensünknek a sok segítségéért és Demián Emesének szakmai tanácsaiért és a kiváló hangulatért. Köszönet illeti a Diagnosztika és Növényi Fejlődésbiológia csoport többi tagját is, akikkel együttműködve egy nagyon jól működő csapatként tudtunk dolgozni.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönetet szeretnék mondani családomnak és férjemnek tanulmányaim során nyújtott szerető támogatásukért, hatalmas türelmükért és folyamatos biztatásukért.

12. Mellékletek

1. melléklet: Az egyes könyvtárakban/ültetvényekben meghatározott kiindulási statisztikai elemzések adatai

Könyvtár kód	Szekvenált read-ek száma	Trimmett read-ek száma	Nem-redundáns read		Virális eredetű read-ek (nem-redundáns)		Virális eredetű trimmett read-ek (redundáns)	
				%		%		%
1_TK	14225793	13415933	1393199	10,38	103734	7,45	521773	3,89
2_PH	10944995	10274405	1314920	12,80	88349	6,72	500064	4,87
3_HT	11278968	10543299	1044820	9,91	106406	10,18	750602	7,12
4_PP	10348976	9686536	1047588	10,81	119293	11,39	690870	7,13
5_CS	8949752	8026470	1396659	17,40	113952	8,16	942529	11,74
6_MP	8792762	8314196	1596686	19,20	47293	2,96	214733	2,58
7_FP	8167968	7570967	748435	9,89	78812	10,53	649788	8,58
8_ET	9523299	9047191	1736736	19,20	56897	3,28	241362	2,67
9_SZHT	10335718	9710361	1543155	15,89	79786	5,17	372377	3,83
10_EH	10966518	10231829	1022153	9,99	88567	8,66	658980	6,44
11_SZHU	11387471	10526772	991734	9,42	73748	7,44	792344	7,53
12_DF	8781158	8456355	686104	8,11	72909	10,63	379242	4,48
13_BV	8948530	8005070	807560	10,09	100614	12,46	869522	10,86
14_MK1	8761324	8319584	1070840	12,87	110821	10,35	613536	7,37
15_MK3	9890065	9471932	609567	6,44	79279	13,01	504839	5,33
16_MK4	9146674	8515500	1012599	11,89	50184	4,96	421905	4,95
17_MK5	10901405	10134043	567870	5,60	60127	10,59	626691	6,18
18_MK7	8773743	8350741	1221264	14,62	40897	3,35	196969	2,36
Átlagok	10006951	9366732	1100661	11,92	81759	8,18	552674	6,00

2. melléklet: Bioinformatikai elemzések részletes összesítése

Könyvtár kód	Elemzés típusa	Vírus találat															Viroldok					
		Karantén vírusok					Nem tesztelt vírusok															
		Nepovírusok			Szólo leteleződési vírusok		Vihvírusok			Tymovírusok			GPGV	RBDV	GSV	HSVd	GYSVd-1	GYSVd-2				
		GFLV	ArMV	GCMV	GLRAV1	GLRAV2	GLRAV3	GVA	GVB	GFRV	GRGV	GAMAV							GRVTV new	GRVTV	GSV	GRSPAV
1_TK	kmer13	0	0	0	12	0	0	0	0	5	1	1	1	3	2	0	0	1	0	0	0	
	kmer15	0	0	0	45	0	0	2	0	12	5	3	1	11	17	0	1	0	6	1	1	
	kmer17	0	0	0	18	0	0	1	0	2	2	1	1	2	4	0	1	0	6	0	1	
	read bwa	56/16	82/29	47/23	136/73	111	142	4585	160	3760	2298	2912	8532	7832	7438	297	140	35	2040	825	1123	160
	Rebuidás*	7/2	87/4	6/3	342/6	15	71	1332	30	667	364	452	2664	2300	1898	38	32	2	860	558	971	226
Lefedettség	%	11,33/7,23	15,73/9,41	9,58/7,6	92,52	9,89	8,71	82,42	18,9	90,44	85,76	93,17	95,13	98,53	99,06	37,95	19,74	11,65	96,69	100	85,71	66,47
2_PH	kmer13	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	1	7	0	0	8	0	0	1	0	
	kontig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	4	9	5	0	51	0	0	2	5	1
	kmer15	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	2	2	0	0	27	0	0	1	4	0
	kmer17	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	2	2	0	0	27	0	0	1	4	0
	read bwa	67/17	74/27	52/27	167	126	145	55	72	7048	563	792	6943	5516	3022	147	9282	39	16	702	1257	138
Rebuidás*	12/3	122/8	12/4	31	33	58	16	17	1877	105	163	2749	2085	847	35	3678	4	2	489	1249	182	
Lefedettség	%	12,61/10,08	12,89/2	11,08/9,73	12,87	10,28	8,91	12,44	13,9	93,93	48,05	42,52	96,43	97,13	93,79	21,67	98,59	11,55	21,74	100	98,9	69,97
3_HT	kmer13	0	0	0	9	0	0	0	0	4	2	0	2	0	1	0	9	0	0	1	0	0
	kmer15	0	0	0	18	0	0	0	0	10	5	0	4	0	4	0	30	0	0	2	1	0
	kmer17	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	3	0	0	0	17	0	0	1	1	0
	read bwa	81/26	87/45	87/32	348/5	182	212	101	1029	2985	5824	1141	5003	1748	1528	248	5344	78	11	1076	1389	347
	Rebuidás*	17/5	190/15	17/6	976	66	106	26	400	634	2126	260	1766	661	594	54	1783	10	1	1055	1728	732
Lefedettség	%	15,76/11,29	13,26/14,39	16,84/10,53	67,67	14,54	12,9	16,46	44,14	87,45	97,16	76,01	95,68	50,9	68,45	34,34	97,96	19,26	15,67	100	86,61	73,9
4_PP	kmer13	0	0	0	0	0	0	0	0	12	3	2	1	5	2	0	6	0	0	0	1	0
	kontig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	21	9	1	4	7	3	0	46	0	0	1	2	2
	kmer15	0	0	0	0	0	0	0	0	8	2	0	1	1	0	0	37	0	0	1	2	0
	kmer17	0	0	0	32	0	0	0	0	8	2	0	1	1	0	0	43	0	0	1	1	0
	read bwa	99/53	92/45	74/1	221	184	201	76	102	6637	6913	1721	5104	3851	3645	400	10485	54	10	1035	861	317
Rebuidás*	21/9	131/11	18/9	47	59	87	22	33	2207	1900	344	1586	1190	1143	80	4849	8	1	869	927	590	
Lefedettség	%	20,06/19,54	15,1/16,01	14,52/15,72	15,88	14,79	12,2	16,47	18,81	94,01	97,38	80,06	93,37	91,82	94,91	45,61	98,33	15,09	15,43	100	88,46	69,79
5_CS	kmer13	0	0	0	6	0	0	0	0	5	0	2	1	0	3	0	4	0	0	0	0	0
	kontig blast	0	0	0	28	0	0	3	0	5	0	3	2	3	8	0	48	0	0	2	1	1
	kmer15	0	0	0	32	0	0	1	0	1	0	0	2	1	0	0	43	0	0	1	1	0
	kmer17	0	0	0	32	0	0	1	0	1	0	0	2	1	0	0	43	0	0	1	1	0
	read bwa	45/26	68/29	42/18	291/93	122	120	3388	94	4168	440	1234	3362	3085	2883	581	9962	37	18	1634	1581	266
Rebuidás*	11/7	233/8	11/5	367/94	50	72	1681	38	2030	225	305	1229	1118	1750	110	6512	6	4	3012	2713	610	
Lefedettség	%	9,39/11,05	12,52/9,13	9,68/6,66	93,51	10,15	7,25	76,82	14,99	88,89	48,83	77,09	91,53	90,03	95,82	60,62	98,6	10,37	13,66	100	87,09	76,73
6_MP	kmer13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	kontig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	1	0	0	0	21	0	0	3	1	0
	kmer15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	1	0	0	0	21	0	0	3	1	0
	kmer17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	8	0	0	2	1	0
	read bwa	36/17	50/16	36/19	93	74	113	30	46	1123	153	1349	1026	335	524	133	3772	23	9	649	765	96
Rebuidás*	6/2	59/3	7/3	20	17	41	6	13	248	39	341	375	139	188	24	1145	3	1	526	728	76	
Lefedettség	%	6,02/7,95	9,66/6,25	9,23/7,06	7,67	6,28	7,88	6,85	8,84	67,09	21,54	83,52	68,19	22,12	53,48	21,91	94,94	8,15	14,47	100	86,26	61,01
7_FP	kmer13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	3	0	0
	kontig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57	0	0	0	0	0
	kmer15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0	3	3	2	0	42	0	0	1	4	0
	kmer17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	2	1
	read bwa	63/33	78/33	77/25	185	116	165	61	65	110	183	141	122	89	78	420	11886	36	10	533	36	13
Rebuidás*	16/7	133/10	19/7	50	45	80	15	62	55	64	34	28	66	156	102	7269	7	1	340	11	6	
Lefedettség	%	11,73/13,51	13,63/10,56	15,51/9,6	15,32	9,92	10,8	12,49	11,5	18,53	27,03	22,50	24,10	6,69	15,28	45,46	98,62	9,85	10,47	97,02	66,94	31,22
8_ET	kmer13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	kontig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0	3	3	2	0	42	0	0	1	4	0
	kmer15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0	3	3	2	0	42	0	0	1	4	0
	kmer17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	2	1
	read bwa	29/11	50/25	31/16	161	66	86	37	42	150	421	332	3368	2181	2398	532	9075	20	6	1527	1695	161
Rebuidás*	6/2	25/3	5/3	23	13	42	6	10	32	82	73	1258	998	792	77	3749	3	1	1599	3018	214	
Lefedettség	%	5,18/4,53	8,49/8,91	7,32/7,61	13,78	6,26	5,15	8,4	8,52	20,25	47,94	26,57	86,26	57,69	77,88	52,74	98,23	6,09	9,7	100	88,46	65,89

2. melléklet folytatása

[illegible]

A kontig blast elemzés megmutatja a vírus specifikus kontig darabszámot, mind a három kmer (kmer13, 15, 17) beállításra vonatkozólag. A kontig jelenlétet, mint vírus találatot értelmeztük és szűrőkkel kiemeltük a táblázatban. A szekvenált read-ek direkt felillesztésének elemzésével (read bwa) meghatároztuk a nem-redundáns, a normalizált redundáns (read/millió) vírus specifikus read-ek számát, valamint a genom lefedettségét. A vírus jelenlétét 200, illetve a feletti vírus specifikus read esetében fogadtuk el, valamennyi értéknél (szürke szín), illetve ha a lefedettség vírusok esetében meghaladta a 40%-ot (kék szín), viroidoknál a 80%-ot (zöld szín).

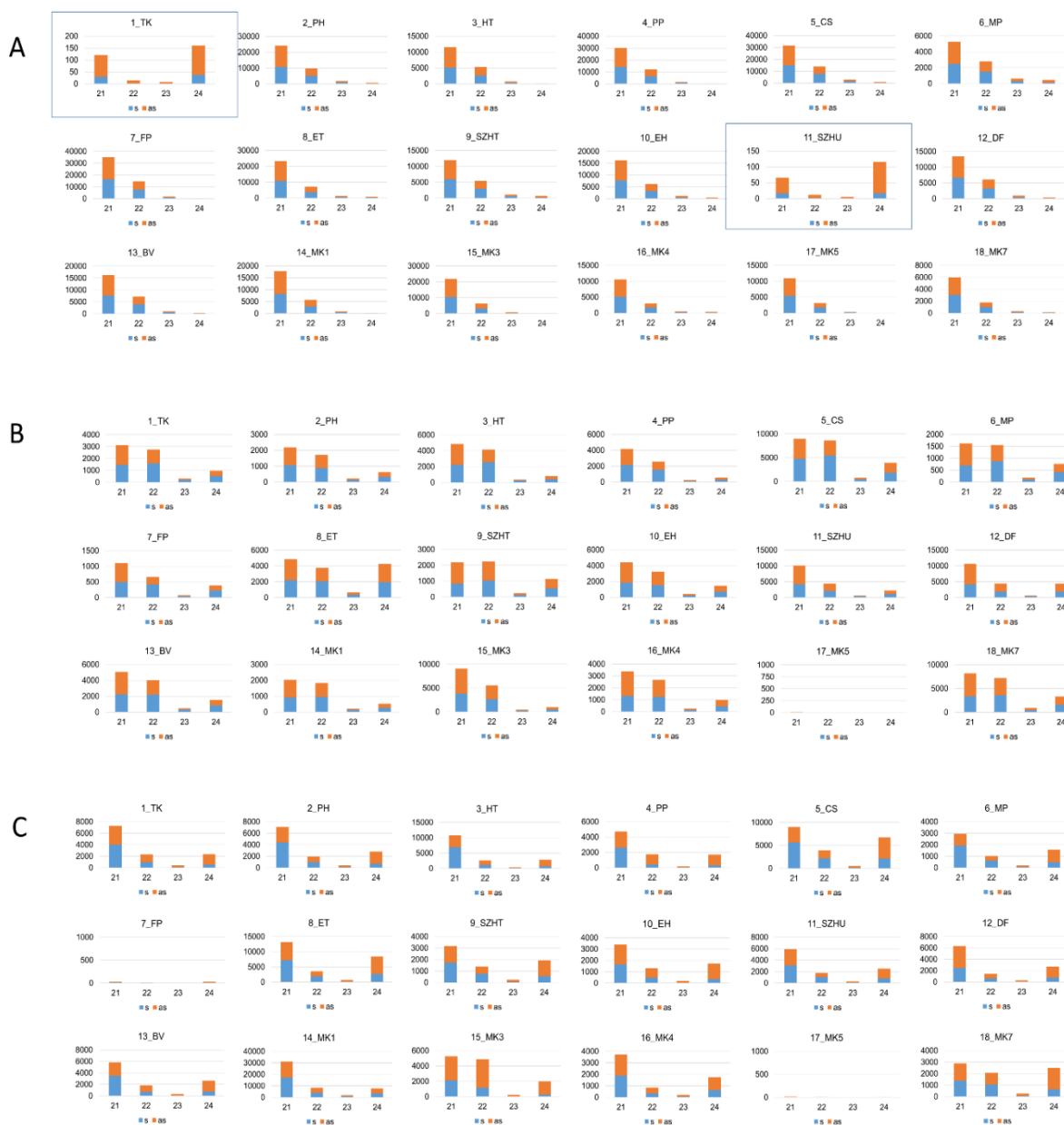
3. melléklet: A szekvenált és GenBank-ba feltöltött, azonosítóval ellátott izolátumok adatai

Vírus	Ültetvény azonosító	GenBank azonosító	Referencia genomon való pozíciója	Referencia genom	Azonosság nukleotid szinten (%)	Azonosság aminosav szinten (%)
GCMV	DF	MF100927	RNA2 3818-4182	NC_003621.1	88	98
GLRaV-1	TK	MF446624	10383-11362	NC_016509.1	82	88
GLRaV-1	HT	MF446625	10372-11404	NC_016509.1	83	90
GLRaV-1	CS	MF446626	10372-11300	NC_016509.1	91	93
GLRaV-1	EH	MF446627	10372-11403	NC_016509.1	91	94
GLRaV-1	SZHT	MF446628	10372-11403	NC_016509.1	92	92
GLRaV-1	DF	MF446629	10372-11404	NC_016509.1	91	94
GLRaV-1	MK1	MF446630	10372-11404	NC_016509.1	91	92
GLRaV-1	BV	MF677861	10372-11347	NC_016509	92	95
GLRaV-3	MK1	MF446631	13383-13713	NC_004667	91	94
GLRaV-3	MK3	MF677862	13451-13659	NC_004667	91	91
GLRaV-3	MK1	MF991899	10979-11524	NC_004667	99	98
GLRaV-3	MK3	MF991900	10979-11525	NC_004667	94	96
GVA	TK	MF446634	6591-6862	NC_003604.2	85	98
GVA	CS	MF446635	6591-6845	NC_003604.3	89	98
GVA	SZHT	MF446636	6591-6862	NC_003604.4	86	99
GVA	BV	MF446637	6591-6840	NC_003604.6	88	98
GVA	DF	MF497537	6591-6862	NC_003604.2	90	99
GVB	HT	MF446632	6980-7434	NC_003602.1	84	95/86
GVB	MK3	MF446633	6980-7434	NC_003602.1	83	79/88
GFKV	TK	MF446641	5208-5559	NC_003347	92	96
GFKV	PH	MF446642	5208-5559	NC_003347	93	96
GFKV	HT	MF446643	5208-5559	NC_003347	92	96
GFKV	PP	MF446644	5208-5559	NC_003347	91	93
GFKV	MP	MF446645	5208-5559	NC_003347	92	97
GFKV	ET	MF446646	5208-5559	NC_003347	84	90
GFKV	SZHT	MF446647	5208-5559	NC_003347	91	94
GFKV	EH	MF446648	5208-5559	NC_003347	95	99
GFKV	DF	MF446649	5208-5559	NC_003347	85	90
GFKV	BV	MF446650	5208-5559	NC_003347	85	90
GFKV	MK1	MF446651	5208-5559	NC_003347	85	90
GFKV	MK3	MF446652	5208-5559	NC_003347	90	97
GFKV	MK7	MF446653	5208-5559	NC_003347	85	90
GRGV	TK	MF510392	5856-6394	NC_030693	94	99/97
GRGV	HT	MF510393	5856-6128	NC_030693	95	98/100
GRGV	PP	MF510394	5856-6394	NC_030693	94	98/98
GRGV	ET	MF510395	5856-6394	NC_030693	87	91/94
GRGV	SZHT	MF510396	5856-6394	NC_030693	93	97/98
GRGV	SZHU	MF510397	5856-6394	NC_030693	94	99/97
GRGV	BV	MF510398	5856-6394	NC_030693	94	98/98
GAMaV	TK	MF510399	5902-6307	NC_031692	96	95
GAMaV	HT	MF510400	5902-6307	NC_031692	95	94
GAMaV	PP	MF510401	5902-6307	NC_031692	95	97
GAMaV	CS	MF510402	5902-6307	NC_031692	95	97
GAMaV	MP	MF510403	5902-6307	NC_031692	96	97
GAMaV	SZHT	MF510404	5902-6307	NC_031692	96	98
GAMaV	EH	MF510405	5904-6306	NC_031692	94	96
GAMaV	SZHU	MF510406	5902-6307	NC_031692	96	96
GRVfV	TK1	MF497524		AY706994/NC_034205	80/84	94/96
GRVfV	TK2	MF497525		AY706994/NC_034205	79/85	93/95
GRVfV	PH	MF497526		AY706994/NC_034205	80/86	92/95
GRVfV	PP1	MF497527		AY706994/NC_034205	96/80	98/90
GRVfV	PP2	MF497528		AY706994/NC_034205	78/85	94/95
GRVfV	CS1	MF497529		AY706994/NC_034205	80/84	92/93
GRVfV	CS2	MF497530		AY706994/NC_034205	81/80	93/82
GRVfV	MP	MF497531		AY706994/NC_034205	86/80	98/92
GRVfV	SZHT	MF497532		AY706994/NC_034205	96/80	99/91
GRVfV	SZHU	MF497533		AY706994/NC_034205	79/87	93/96
GRVfV	DF1	MF497534		AY706994/NC_034205	85/83	98/95
GRVfV	DF2	MF497535		AY706994/NC_034205	81/82	97/92
GRVfV	BV	MF497536		AY706994/NC_034205	96/79	98/95
GRVfV	CS	MF461275	4879-5228/5035-5383	AY706994/NC_034205	85/81	97/96

3. melléklet folytatása

GSyV1	CS	KT005394	1174-1409	NC_012484.1	94	100/88
GSyV1	PP	KT005395	1174-1409	NC_012484.1	94	100/86
GSyV1	PH	KT005396	1174-1409	NC_012484.1	95	100/89
GSyV1	TK	KT005397	1174-1409	NC_012484.1	94	100/91
GSyV1	CS	KT005398	5750-6387	NC_012484.1	92	97
GSyV1	DF	KT005399	5750-6387	NC_012484.1	93	100
GSyV1	TK2	KT005400	5750-6387	NC_012484.1	95	99
GSyV1	TK9	KT005401	5750-6387	NC_012484.1	98	99
GSyV1	SZHT	KT005402	5750-6387	NC_012484.1	96	99
GSyV1	EH	KT005403	5750-6387	NC_012484.1	93	99
GSyV1	SZHU	KT005404	5750-6387	NC_012484.1	92	97
GSyV1	BV	KT005405	5750-6387	NC_012484.1	93	100
GRSPaV	CS	MF538633	6904-8429	NC_001948.1	99	n/a
GRSPaV	ET	MF538634	6904-8429	NC_001948.1	90	n/a
GRSPaV	SZHT	MF538635	6904-8429	NC_001948.1	99	n/a
GRSPaV	SZHU	MF538636	6904-8429	NC_001948.1	99	n/a
GRSPaV	DF	MF538637	7690-8429	NC_001948.1	99	n/a
GRSPaV	BV	MF538638	6904-8429	NC_001948.1	90	n/a
GRSPaV	MK7	MF538639	6904-8429	NC_001948.1	98	n/a
GPGV	PH4	MF538640	6466-7109	NC_015782	96	n/a
GPGV	HT6	MF538641	6466-7109	NC_015782	97	n/a
GPGV	PP4	MF538642	6466-7109	NC_015782	97	n/a
GPGV	CS	MF538643	6466-7109	NC_015782	97	n/a
GPGV	MP2	MF538644	6466-7109	NC_015782	97	n/a
GPGV	FP7	MF538645	6466-7109	NC_015782	96	n/a
GPGV	ET1	MF538646	6466-7109	NC_015782	97	n/a
GPGV	SZHT	MF538647	6466-7073	NC_015782	97	n/a
GPGV	EH5	MF538648	6466-7109	NC_015782	97	n/a
GPGV	SZHU	MF538649	6466-7109	NC_015782	97	n/a
GPGV	DF	MF538650	6554-7069	NC_015782	97	n/a
GPGV	BV	MF538651	6466-7109	NC_015782	97	n/a
GPGV	MK1	MF538652	6466-7109	NC_015782	97	n/a
GPGV	MK3	MF538653	6466-7109	NC_015782	97	n/a
GPGV	MK4	MF538654	6511-7109	NC_015782	97	n/a
GPGV	MK5	MF538655	6466-7065	NC_015782	97	n/a
GPGV	MK7	MF538656	6466-7109	NC_015782	97	n/a
RBDV_RNA1	SZHU	MF446639	RNA1 4082-5488	NC_003739.1	94	98
RBDV_RNA2	SZHU	MF446640	RNA2 986-2229	NC_003740.1	95	93/97
GSV	TK	MF446638		NC_021480.1	96	96
HSV	MK4	MF497538	teljes genom	NC_001351	95	n/a
GYSVd1	HT	MF510389	teljes genom	NC_001920	90	n/a
GYSVd1	PP	MF510390	teljes genom	NC_001920	87	n/a
GYSVd1	ET	MF510391	teljes genom	NC_001920	88	n/a

4. melléklet: Vírus specifikus kis RNS-ek méreteloszlása és polaritásuk: A/GPGV, B/HSVd, C/GYSVd1



5. melléklet: Fitoplazma vizsgálatra begyűjtött minták pontos megnevezése és DNS koncentrációjuk

Mintavételi hely	Sorszám	Fajta	DNS koncentráció (ng/μl)
Érdi Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet			
Izolátorház	1	Ceglédi óriás 1/1	866,2
	2	Bergeron 1/5	188,1
	3	Ceglédi óriás 1/9	437
	4	Ceglédi arany 1/13	155,3
	5	Harcot 1/17	138,5
	6	Ceglédi bíbor 1/21	26
	7	Ceglédi bíbor 1/23	246,1
	8	Gönci magyar 1/25	274,1
	9	Rakovszky 1/30	409,3
	10	Maliga kajszi MK132 2/1	277,1
	11	Budapest 2/5	135
	12	Pannónia 2/9	213,2
	13	Ceglédi piroska 2/13	136,4
	14	OrangeRed 2/17	117,3
	15	Harmat 2/21	4,4
	16	Harmat 2/22	91,3
	17	Mandula kajszi 2/25	194,2
	18	Velcot 2/29	231
	19	Ligeti óriás 3/1	292,3
	20	Rózsakajszi 3/5	205,1
	21	Korai piros 3/9	200,2
	22	Magyar kajszi 3/13	149,3
Új törzsültetvény	1	Ligeti óriás 11/22	253,4
	2	Gönci magyar 8/1	491
	3	Bergeron 8/25	237,6
	4	Ceglédi arany 9/1	507,5
	5	Ceglédi bíbor 9/26	365,1
	6	Orangered 11/17	570,6
	7	Harmat 11/8	323,9
	8	Budapest 11/2	570,3
	9	Ceglédi arany 9/19	542,9
	10	Magyar kajszi 11/24	499,2
	11	Harcot 10/40	460,8
	12	Magyar kajszi 11/33	488,8
	13	Harcot 10/31	299,7

	14	Ceglédi óriás 10/20	288,6
	15	Rakovszky 8/43	227,4
	16	Mandula kajsi 11/39	363,8
	17	Korai piros 10/42	159,6
	18	Pannónia 12/2	265,6
	19	Ceglédi óriás 10/1	277,9
	20	Ceglédi óriás 10/24	268,4
	21	Maliga kajsi 9/42	159,9
	22	Pannónia 12/8	209,5
	23	Harcot 10/40	146,5
Öreg törzsültetvény	1	Magyar kajsi	239,6
	2	Pannónia 17/37	328,2
	3	Pannónia 17/40	293,7
	4	Ceglédi bíbor 18/45	222,4
	5	Ceglédi bíbor 18/42	503,1
	6	Gönci magyar 19/40	232,5
	7	Budapest 23/42-45	154,6
	8	Korai piros 27/38-40	99,5
	9	Mk132 29/27-40	163,1
	10	Harmat 30/37	278,3
	11	Cseresznye rita 29/35	192
	12	Korai piros 27/36-40	246,5
Termőültetvény	1	Nem ismert-beteg	73,1
	2	Sweetcot	105,1
	3	Sweetcot	92,2
	4	Gönci magyar	119,2
	5	Flavorcot	28,3
	6	Flavorcot	210,7
	7	elpusztult	17,4
	8	Flavorcot	7,1
	9	Nem ismert-fiatal gyanús	9,3
Balaton vidéki minták			
Balatonvilágos	1	Tomcot	67,4
	2	Tomcot	69,2
	3	Flavorcot	44,3
	4	Flavorcot	82,4
	5	Latica	25,1
	6	Bergeron	41,2
	7	Flavorcot	77
	8	Flavorcot	63,4
	9	Tomcot	37,6

	10	Tomcot	74,8
	11	Tomcot	60,4
	12	Firm Red	38,3
	13	Giant Red	23,1
Siófok	14	Vegyes	193,3
	15	Vegyes	100,5
	16	Vegyes	28,6
	17	Bergecot	120,2
	18	Bergarouge	57,1
	19	Flavorcot	51,2
	20	Chrisgold	37,1
Zalaszántó	21	Ladycot	20,2
	22	Perlecot	47,3
	23	Sunnycot	44,1
	24	Sunnycot	46,4
Gönci termőtáj			
Boldogkőváralja	1	Tomcot	24,8
	2	Tomcot	2,6
	3	Tomcot	15
	4	Sherpa	66,2
	5	Sherpa	109,1
	6	Sherpa	32,4
	7	Sherpa	41,3
	8	Sherpa	31,3
	9	Sherpa	66,1