

# **RNS alapú diagnosztikai módszer kidolgozása az alma vírusfertőzöttségének kimutatására**

Diplomamunka

biológus mesterszak

Molekuláris, Immun- és Mikrobiológia szakirány

készítette:

**Varga Tünde**

témavezető:

Dr. Várallyay Éva, Tudományos főmunkatárs

NAIK-MBK/Diagnosztikai csoport

belső konzulens:

Dr. Málnási-Csizmadia András, kutatóprofesszor

Biokémiai tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2016

# Tartalom

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.Bevezetés és célkitűzések.....                                                                       | 4  |
| 2.Irodalmi áttekintés.....                                                                             | 6  |
| 2.1 Az almafákat fertőző vírusok .....                                                                 | 6  |
| 2.2 Vírusdiagnosztika jelentősége a növénynemesítésben .....                                           | 11 |
| 2.3. Gyümölcsfákon alkalmazott vírusdiagnosztikai módszerek .....                                      | 11 |
| 2.3.1.Biotesztek .....                                                                                 | 12 |
| 2.3.2.Szerológiai tesztek-ELISA .....                                                                  | 13 |
| 2.3.3.RNS alapú diagnosztikai módszerek - Polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction, PCR) ..... | 14 |
| 2.3.4.RNS alapú diagnosztikai módszerek - Újgenerációs szekvenálás: Illumina szekvenálás ....          | 15 |
| 3.Anyag és módszer .....                                                                               | 17 |
| 3.1. Növényi minták .....                                                                              | 17 |
| 3.2. RNS kivonás.....                                                                                  | 18 |
| 3.3.cDNS szintézise RT-PCR-rel .....                                                                   | 18 |
| 3.3.1.cDNS szintézise reverz transzkripcióval .....                                                    | 18 |
| 3.3.2.cDNS minőségének ellenőrzése (Aktin teszt) .....                                                 | 19 |
| 3.4.Primerek tervezése .....                                                                           | 20 |
| 3.4.1.Primer tervezés <i>Malus domestica</i> aktin mRNS-re.....                                        | 20 |
| 3.4.2.Primer tervezés a négy alma karantén vírusra .....                                               | 21 |
| 3.5.Alma cDNS pool .....                                                                               | 22 |
| 3.6.Gradiens PCR.....                                                                                  | 22 |
| 3.7.Multiplex-PCR .....                                                                                | 23 |
| 3.7.1.Vírusprimerek működésének tesztelése.....                                                        | 23 |
| 3.7.2.Vírusdiagnosztika alma mintákon duplex-PCR-rel .....                                             | 23 |
| 3.8.PCR termék tisztítása, szekvenálása.....                                                           | 24 |
| 3.9.Filogenetikai elemzések .....                                                                      | 25 |
| 3.10.KisRNS könyvtár készítés.....                                                                     | 25 |
| 3.11.Szekvencia adatok bioinformatikai elemzése.....                                                   | 27 |
| 3.12.Új, specifikus vírusprimerek tervezése.....                                                       | 28 |
| 3.12.1.Primerek tervezése csonthéjasokat támadó vírusra .....                                          | 29 |
| 4.Eredmények és megvitatásuk .....                                                                     | 31 |
| 4.1. RNS kivonás.....                                                                                  | 31 |
| 4.2. cDNS minőségellenőrzésére és különböző vírusok kimutatására alkalmas primerek tervezése           | 32 |
| 4.2.1. Az RT-PCR során készült cDNS minőségellenőrzése aktin primerekkel .....                         | 32 |

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.2. Vírusprimerek tervezése .....                                                                                     | 32 |
| 4.3. Víruskimutatás a tervezett vírus specifikus primerekkel, különböző kombinációban .....                              | 33 |
| 4.3.1. Gradiens PCR .....                                                                                                | 33 |
| 4.3.2. Vírusprimerek különböző kombinációinak tesztelése PCR-rel .....                                                   | 34 |
| 4.4. Vírusdiagnosztika duplex-PCR segítségével és az ültetvényekben jelenlevő vírustörzsek<br>rokonsági vizsgálata ..... | 36 |
| 4.5. A kisRNS könyvtárak szekvenciáinak bioinformatikai elemzése .....                                                   | 40 |
| 4.6. Újgenerációs szekvenálással kapott vírusok jelenlétének visszaigazolása PCR alapú módszerrel<br>.....               | 45 |
| 5. Összefoglaló .....                                                                                                    | 47 |
| 6. Summary .....                                                                                                         | 48 |
| 7. Függelék .....                                                                                                        | 50 |
| 8. Irodalom .....                                                                                                        | 58 |
| 9. Internetes források: .....                                                                                            | 61 |
| 10. Tételes szerzői hozzájárulás .....                                                                                   | 62 |
| 11. Köszönetnyilvánítás .....                                                                                            | 63 |

## 1. Bevezetés és célkitűzések

A növényvírusok a növényt fertőzve, és megbetegítve a termés minőség- és mennyiségbeli romlását eredményezik, így évről évre jelentős gazdasági károkat okoznak. Ezen kórokozók morfológiai, citológiai és hormonális változásokat okoznak a növényekben, melyek különféle tünetekben nyilvánulnak meg. Hatásuk lehet a növény növekedésére, fejlődésére, így kihatnak az évelő fásszárúak élethosszára, a termés hozamra, illetve a termés minőségére is.

Gazdaságilag fontos növényeink folyamatosan ki vannak téve ezen kórokozók támadásának. Mivel a növényvédő szerek nem alkalmasak a fertőzött növények vírusmentesítésére, így a fertőzés megelőzésével érdemes és kell foglalkozni. Ilyen módszerek a rezisztenciára nemesítés, a vírusvektorok elpusztítása, vagy a vírusmentes szaporítóanyagok használata (Horváth és Gáborjányi, 1999). Az almafák szaporítása a fajtafenntartás érdekében vegetatívan történik, így a vírusok már magával a szaporítóanyaggal könnyen átjutnak az új növényekbe. Ez a probléma különös jelentőséggel bír az alma, mint évelő, fásszárú növény esetén, mivel az alma ültetvények egészségének megőrzése, vírusmentes fenntartása évtizedekig is fontos lehet.

Magyarországon az új gyümölcsfafajták nemesítésekor az anyanövényeket kötelező bizonyos vírusokra szűrni. Almafák esetében ezek az alma klorotikus levélfoltosság (Salamon, 2007) (*Apple chlorotic leaf spot virus* - ACLSV), az alma mozaik vírus (*Apple mosaic virus* - APMV), az almafa törzsbarázdáltság vírus (*Apple stem-grooving virus* - ASGV) és az almafa törzsgödrösödés vírus (*Apple stem-pitting virus* - ASPV). Ha az anyató ezen vírusok valamelyikével fertőzött, akkor vírus mentesíteni kell, ami általában a merisztéma, vagy hajtáscsúcs *in vitro* szaporítását jelenti. Mivel a vírusok legtöbbje a merisztémába nem tud belépni, így az ebből nevelt *in vitro* növények is vírusmentesek lesznek. Az ilyen elsődleges tenyészetekből többlépéses regenerációval lehet a vírusmentes anyanövényt felnevelni. A vírusmentes kiinduló állományból hozzák létre később a vírusmentes törzsállományt (prebázist), majd a vírusmentes törzsültetvényeket (bázist). A fajtanemesítés folyamatának minden szintjén hatóságilag előírt ELISA teszt alapján szelektálják ki a fertőzött növényeket. Mivel már a nemesítés is hosszú évekig tart, fontos hogy a szintén sokáig tartó vírusmentesítési folyamat alatt, és később is minél hatékonyabb legyen a fajtajelölt törzsültetvényeken alkalmazott, vírusok szűrésére használt diagnosztikai eljárás (Horváth és Gáborjányi, 1999).

A vírusok detektálására alkalmazott ELISA tesztek a vírus köpenyfehérjét felismerő specifikus ellenanyagon alapuló módszerek. Mivel a köpenyfehérje könnyen mutálódik és ilyenkor a tesztek már nem képesek kimutatni a keresett vírust, érdemes érzékenyebb eljárást alkalmazni. ELISA tesztek főként rutin ellenőrzésekhez érdemes használni, illetve amikor a fertőzött növényben magas koncentrációban van jelen a vírus, de mind a mono- mind a poliklonális ellenanyaggal való reakciók során gyakran lépnek fel problémák (Berniak és mtsai, 2009). A fent felsorolt négy kórokozó RNS vírus, melyekben az RNS-ek mennyisége nagyobb, mint a fehérjéké, illetve a vírus RNS-ek tartalmazzák az adott vírusra jellemző konzervatív szakaszokat. Az ilyen ritkán mutálódó konzervatív szakaszokra tervezett specifikus primereket használva a PCR-alapú eljárások az ELISA tesztekénél már hatékonyabbak, ami még hatványozódik azzal, hogy az eljárás során amplifikáció is történik. Összességében az RT-PCR alapú módszerek akár százszor érzékenyebbek lehetnek az ELISA tesztekénél (Berniak és mtsai, 2009). Ezért tehát célszerű a nukleinsav-alapú diagnosztikai módszerek kidolgozásával és fejlesztésével foglalkozni.

Kísérleteim három fő céljaként tűztem ki, hogy:

- 1/ a négy kötelezően szűrendő vírus detektálásához egy az ELISA módszernél hatékonyabb PCR alapú diagnosztikai eljárást fejlesszek ki,
- 2/ az optimalizált módszert alkalmazzam különböző hazai izolátorházban tartott prebázis, valamint szabadföldi termő és fajtajelölt törzsültetvények almafáin,
- 3/ szekvenciájuk alapján összehasonlítsam az izolátorházban tartott és a szabadföldi fajtajelölt almafákban talált vírustörzseket, és
- 4/ a mintáinkból készített kisRNS könyvtárak újgenerációs szekvenálásával átfogó képet kapjak a vizsgált fákat fertőző vírusokról.

## **2. Irodalmi áttekintés**

### **2.1 Az almafákat fertőző vírusok**

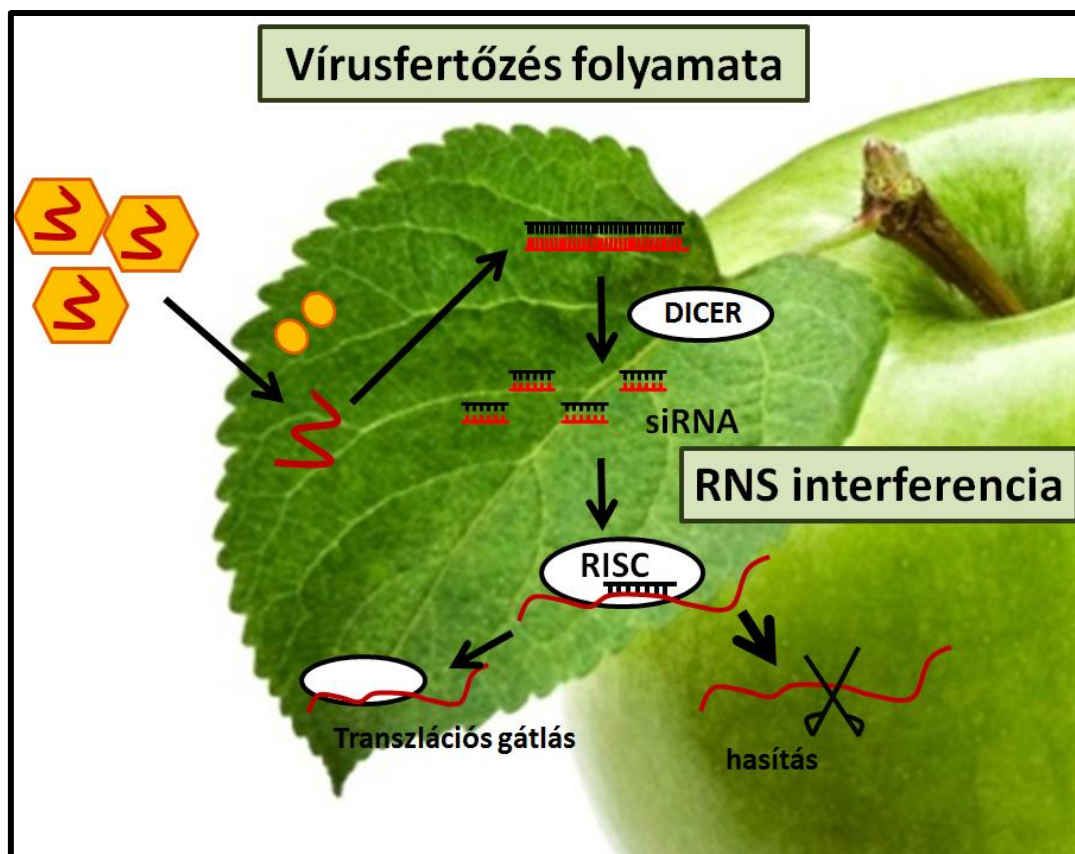
A vírusok nem sejtes szerveződésű, mikroszkopikus méretű parazita organizmusok, melyek az egész világon tért hódítottak. Minden élőlénynek, így a növényeknek is vannak vírusos fertőzései. A vírusok a gazdasejten kívül vírusrészecske, virion formájában léteznek. Örökítő anyagukat tartalmazó genomból, fehérjeburokból (kapszid), és bizonyos esetekben külső lipid burokból állnak.

A vírusok evolúciójában fontos szerepet kap a kapszid, mivel csakis a fehérjeburok által védett génállományú virion fertőzőképes. Genomjuk lehet egy vagy kétszálú DNS, illetve RNS. Az ismert növényvírus-nemzetségekből 52-nek (>80%) RNS, és leginkább egyszálú RNS (~70%) az örökítő anyaga (Horváth és Gáborjányi, 1999). Az egyszálú RNS vírusok evolúciója igen gyors, könnyen alkalmazkodnak a környezeti változásokhoz mindig újabb és újabb vírus variánsokat hozva létre. Genomjuk átírását az RNS-függő RNS-polimeráz enzim végzi, mely átlagosan minden tízezredik bázisnál hibát vét. A magas hibaráta oka, hogy ez a polimeráz működésekor nem igényel bázispárosodást (míg a DNS-függő RNS-polimeráz igen, így a duplaszálú DNS-genom nagyobb védeltséget élvez a mutagén hatásokkal szemben). Az RNS genomban történő kisebb szekvencia változások mikroevolúcióhoz, a nagyobb szekvencia változások -mint a gének újrendeződése, megkettőződése, kiesése-, makroevolúcióhoz vezetnek. (Roossinck, 2015).

A vírusok sikeres fertőzésekor a gazdanövény gyakran tünetekkel reagál. Kompatibilis vírus-gazdanövény kapcsolatban a vírus képes módosítani a növény génexpresszióját. A vírus-fertőzésre adott tünetek tulajdonképpen ezeknek a molekuláris szinten zajló génexpressziós változásoknak a fenotípusos megnyilvánulásai. A makroszimptómák szabad szemmel is jól láthatóak. Lokálisan - klorotikus, ill. nekrotikus levélfoltosság-, vagy szisztemikusan - mozaik, ér-nekrózis, érkivilágosodás, levéldeformáció,- jelenhetnek meg. A mikroszimptómák szabad szemmel nem látható, anatómiai elváltozások – ilyen például a kloroplasztiszok degenerálódása, kromoszóma-abnormalitás, intracelluláris, vagy citoplazmatikus zárványok kialakulása, stb. Megfigyelték, hogy a vírusfertőzésre való fogékonyságban vannak bizonyos tendenciák, ugyanis a fiatal növényeket fogékonyabbnak találták az idősebbeknél. Ezen kívül a lágyszárú

növények a fásszárúaknál rendszerint gyorsabban képesek reagálni a fertőzésekre (Horváth és Gáborjányi, 1999).

Csakúgy mint ahogy az állatok, úgy a növények is képesek felvenni a harcot az őket támadó különféle kórokozókkal. Az RNS-interferencia a növényekben olyan ősi, specifikus mechanizmus, melynek szerepe van többek közt a vírusokkal szembeni védekezésben is. Amikor az gyümölcsfát támadó RNS-vírusok örökítő anyagukat a gazdanövénybe juttatják, RNS-függő RNS-polimeráz enzimük komplementer szálát épít egyszálú genomjukhoz, így abból duplaszálú dsRNS lesz, ami géncsendesítést indukál a növénygazdában (Ahlquist, 2002). A dsRNS-t a Dicer enzim 21-25 bázispár hosszúságú kis interferáló RNS-ekre (siRNS) hasítja. Tehát az ilyen siRNS-ek felhalmozódása a szövetekben vírusfertőzést jelez. A siRNS-ek a target vírus RNS-ek szekvencia specifikus degradációját a RISC-enzimkomplex segítségével irányítják. A siRNS a RISC fő komponensével, az Argonauta fehérjével komplexet alkot, egyik szála degradálódik, a másik pedig aktiválja az enzim komplexet. Ha a RISC a beleépült siRNS szekvenciájával teljesen, vagy közel megegyező szekvenciát tartalmazó RNS-t talál a növényi sejtben, gátolja annak transzlációját: RNázként működve hasítja azokat, vagy transzlációjuk elnyomását indukálja. A target RNS-ről (amennyiben a siRNS virális eredetű volt – vírus RNS-ről) így nemcsak hogy fehérje nem képződik, de még le is bomlik. Tehát ily módon a növény az RNS-interferenciájának képességét a vírusok elleni védekezésre képes használni (1.ábra) (Molnár és mtsai, 2005).



1. ábra RNS interferencia folyamata a növényben

Az almafákat számos vírus fertőzi, melyek legsúlyosabb tünetei- a gyümölcsök deformálódása, a termés hozam, illetve a termés méretének csökkenése, éretlenül való lehullása és a fák idő előtti kipusztulása- egyben komoly gazdasági károkat is okoznak. Kutatásaimba négy fontos almafákat fertőző vírust vontam be, ezek az alma klorotikus levélfoltosság vírus (Salamon, 2007) (*Apple chlorotic leaf spot virus* - ACLSV), az alma mozaik vírus (*Apple mosaic virus* - APMV), az almafa törzsbarázdáltság vírus (*Apple stem grooving virus* - ASGV) és az almafa törzsgödrösödés vírus (*Apple stem pitting virus* – ASPV), melyek mindegyike egyszálú RNS vírus.

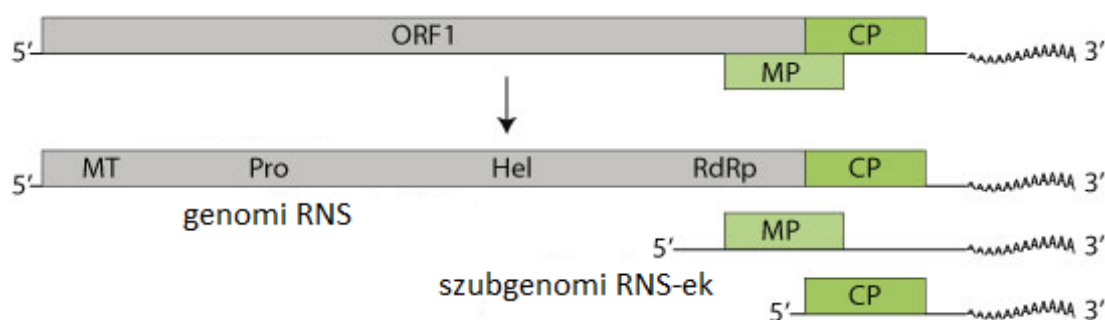
Az ASGV, az ASPV és az ACLSV is a Betaflexiviridae család tagjai, melyre jellemző a lineáris, pozitív egyszálú RNS genom (~ 7 kb), 3' terminális végén poliA farokkal (2. ábra) (Internetes források, 1. hivatkozás).





2. ábra Betaflexiviridae virionja

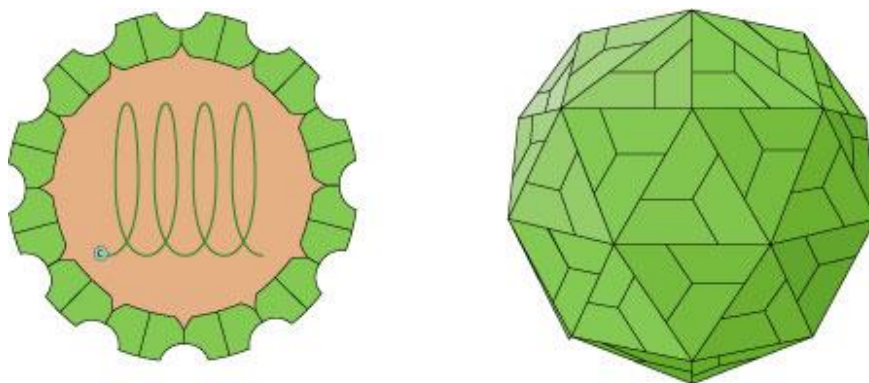
A vírus fertőzése során először bejut a gazdasejt citoplazmájába, ahol megszabadul a kapszidtól, így genomja szabaddá válik. A genom RNS-ről (3. ábra) közvetlenül transzlálódik az RNS-függő RNS polimeráz (RdRp). Az egyszálú virális RNS replikációval duplaszálú RNS-t képez, mely újabb egyszálú RNS-eket hoznak létre. A vírus szubgenomi RNS-éről transzlálódnak a köpenyfehérjék és mozgási fehérjék, melyekből újabb, fertőzőképes víruspartikulák szerelődnek össze (Internetes források, 1. hivatkozás).



3. ábra Betaflexiviridae genomszerveződése

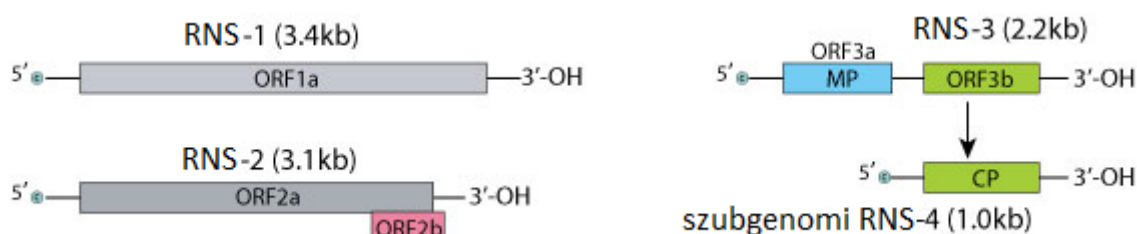
Az ACLSV fertőz almafákat, őszibarackot, körtét, sárgabarackot, szilvát, cseresznyét. Az almafa levelein, illetve termésén sárga klorotikus, szalagos elszíneződést okoz. Az ASPV-t alma és őszibarack fákon írták le, jellemző tünetei a fatörzs gödrösödése, esetenként apróbb levelek. Az ASGV vírus gazdanövényei lehetnek az alma, berkenye, citrusfélék, birs, lilium, sárgabarack, cseresznye, őszibarack, körte. Almafák a törzsén barna barázdákat okozhat (Internetes források, 3.4. hivatkozás).

Az előző vírusokkal szemben az APMV a Bromoviridae család tagja. Ezen csoport tagjai szintén pozitív, egyszálú genom RNS-sel rendelkeznek, ám ez 3 részre szegmentált: RNS1, RNS2 és RNS3-ból áll. Burok nélküliek, ikozahedrális szimmetriájú, gömb alakú virionjuk van, mely 180 köpenyfehérjéből áll (4. és 5. ábra) (Internetes források, 2. hivatkozás).



4. ábra *Bromoviridae* virionja

A fertőzés itt is hasonlóan zajlik, mint a Betaflexiviridae esetében. A vírus a gazdasejtbe jutva megszabadul köpenyfehérjéitől, RNS-éről 1a és 2a fehérjék expresszálnak, melyek a további replikációhoz szükségesek. A vírus egyszálú RNS-e duplaszálúvá replikálódik és a továbbiakban ez hozza létre az új egyszálú RNS-eket. A köpenyfehérjéket a szubgenomi 4-es RNS kódolja. A Bromoviridae családban a mozgási fehérjék tubuláris struktúrák kialakulását idézik elő, ezek segítségével terjednek a virionok sejtről sejtre (Internetes források, 2. hivatkozás).



5. ábra *Bromoviridae* genomszerveződése

Az APMV különféle Rosales fajokat, őszibarackfát fertőz, de megtámadja a nyírfákat, komlót is. Széles gazdakörrel rendelkezik, 19 család több mint 65 fajából írták le. Jellemző tünete a mozaikos, sárga levélfoltosság (Internetes források, 5. hivatkozás).

Az APMV-hez hasonló, osztott genomú multikomponens-vírusok számos előnyt élveznek. A több, rövidebb RNS szegment lehetővé teszi, hogy megnőjön a genom mérete anélkül, hogy probléma adódna az enkapszidációval. A kis virionok könnyebben mozognak, terjednek a növényben, illetve a vektorokkal. A transzláció önellenőrzése egyszerűbbé válik és nem

utolsó sorban a több szegmens az RNS-ek gyors rekombinációs újrendeződésére ad lehetőséget. A multikomponensű genom a növényvírusok körében gyakori, mivel itt a rovarokkal történő vírusátvitelkor biztosított, hogy minden genom-komponensből legyen a fertőzés helyén (Vos és mtsai, 1984).

## 2.2 Vírusdiagnosztika jelentősége a növénynemesítésben

A gyümölcsfák gazdasági jelentősége igen nagy. Emiatt szinte állandó probléma, hogy a vírusok és egyéb kórokozók a gyümölcstermesztésben időről időre nagy károkat okoznak. Az gyümölcsfák szaporítása ráadásul a fajtafenntartás érdekében vegetatívan történik, így a vírusok már a szaporítóanyaggal is könnyen átjuthatnak az új növényekbe. Ez a jelenség különös jelentőséggel bír a gazdaságilag fontos, évelő, fásszárú növények esetén, mivel az ültetvények egészségének megőrzése, vírusmentes fenntartása akár évtizedekig is fontos lehet. A vírusok ellen való védekezés egyetlen hatékony módja a vírusmentes szaporítóanyag alkalmazása, mely megteremti a feltételeket a növénynek, hogy jó minőségű gyümölcsöt teremjen. (Kiss, 1998). Magyarországon már több évtizede államilag kötelező gyümölcsfák fajtanemesítéskor törzskönyvezéshez az anyanövényeket bizonyos vírusokra szűrni. Almafák esetében ezek az AC-LSV, ASGV, ASPV és APMV. Ha az anyató ezen vírusok valamelyikével fertőzött, akkor vírusmentesíteni kell, ami általában a merisztéma, vagy hajtáscsúcs *in vitro* szaporítását jelenti. Mivel a vírusok legtöbbje a merisztémába nem tud belépni, így az ebből nevelt *in vitro* növények is vírusmentesek lesznek. Az ilyen elsődleges tenyészetekből többlépéses regenerációval lehet a vírusmentes anyanövényt felnevelni. Az almafákat a fajtanemesítés minden szintjén tesztelni kell a fent említett négy vírusra, így rendkívül fontos a jól megválasztott, érzékeny vírusdiagnosztikai módszer alkalmazása.

## 2.3. Gyümölcsfákon alkalmazott vírusdiagnosztikai módszerek

Immár több mint 120 év telt el azóta, hogy elsőként sikerült kimutatni kórokozó, nevezeten a Dohány mozaik vírus (Tobacco mosaic virus, TMV) jelenlétét és terjedését. 1892-ben Dimitrii Ivanovsky bizonyította, hogy a TMV-vel fertőzött dohánynövény szövetnedvével a kórokozó átvihető egészséges példányra (Bos, 1999). Ez a felfedezés szolgál a ma is széles körben alkalmazott biotesztek alapjaként. Ivanovsky felfedezése után a növényi vírusok

vizsgálatához összetett vizsgálatok részeként elektromikroszkópiát alkalmaztak, amely láthatóvá tette a vírusok okozta élettani és szövettani elváltozásokat. Elektronmikroszkópban a víruskapszidok morfológiájának vizsgálatával különböző genuszok azonosíthatók (Zechmann és mtsai, 2011). Az elektronmikroszkópiás módszer drága, időigényes és az egyes vírusszárak, változatok nem azonosíthatók, így nagy igény volt más vírusdiagnosztikai módszerek felfedezésére.

### **2.3.1. Biotesztek**

Az almafák biológiai tesztelésének számos módját ismerik és alkalmazzák. Az egyik lehetőség, mikor lágy szárú tesztnövényekre (például *Chenopodium quinoa*) mechanikai módszerrel, inokulálva viszik át a vírusokat. Teszteléskor a vírusfertőzött növény egy részét porcelánmozsárban szétdörzsölik, és a kapott szövetnedvvel inokulálják a tesztnövények leveleit. Ezt követően a tesztnövényeket kb. három hétre 20–22 °C-os, vektormentes üvegházban tartják.

Üvegházi almafák tesztelése történhet oltással vagy kettős oltással: elsőként a tesztnövényt a vizsgálandó fa vesszejére oltják, majd ezt a kombinációt tovább oltják nyugalmi állapotban lévő, meggyökeresedett, vírusmentes alanyra.

Szabadföldi fák virológiai tesztelésénél is különféle átviteli módszereket alkalmaznak. Ilyen például az egyszerű szemzés (a tesztnövény, illetve a vizsgálandó fáról származó szem 3–4 napos összetapasztása), kettős szemzés (egymásra tapasztják a vizsgált fáról és a tesztnövényről származó szemeket, majd következő évben a vizsgálandó fa-résről kihajtó hajtást visszacsípi). A szabadföldi gyors tesztek aránylag rövidebb időt vesznek igénybe (az egyik leggyorsabb ilyen módszer az ún. Shirofugen-teszt, ennek elvégzése 6 hétbe telik). Jelenleg úgy tudjuk, a gyümölcstermő növények legmegbízhatóbb biotesztelési módszere a szabadföldi főteszt. Ezt a módszert központi törzsültetvények ellenőrzésére használják, mivel hosszú ideig tart (a teljes teszt hossza 4 év), nagy munka- és területigényű. (Bach és Szőnyegi, 1996).

Az biotesztek előnye, hogy a tesztnövényeken kialakuló tünetek alapján egyértelműen láthatjuk egy már ismert vírus jelenlétét, emellett a módszer alkalmas vírus aktivitás becslésére is. Ám ezeket az eredményeket más, napjainkban ismert vírusdiagnosztikai eljárások is könnyen produkálják, sőt, sok szempontból messze felülmúlják. Így a biotesztek idejétmúltak tekinthetők, rendkívül nagy az eszköz-, terület- és munkaigényük, ezenfelül még hosszú ideig is tartanak. Nyilvánvaló hátrányai ellenére mégis széles körben használják megbízhatósága miatt (Bunikis és Barbour, 2002).

### **2.3.2. Szerológiai tesztek-ELISA**

Régóta a szerológiai módszerek a legszélesebb körben alkalmazott vírusdiagnosztikai eljárások (Horváth és Gáborjányi, 1999). Közülük a legnépszerűbbek az enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálatok (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA-tesztek), de alkalmazzák a gyöngy mikroszféra immunpróbát (MIA) és a kettős géldiffúziót, dot-blottot, ill. Western blottot is- bár ez utóbbiak főként taxonómiai kapcsolatok felkutatására alkalmasak. A szerológiai tesztek az immunológiában ismert antigén-antitest reakciók alapján működnek, segítségükkel a vírus fehérjéi, főként a köpenyfehérje azonosítható.

A tesztekhez feltétlenül rendelkezünk kell a vírus fehérjéjére specifikus antitestekkel. Ezek előállítására kísérleti állatokat tisztított növényi kórokozóval injektálnak be. Mivel a növényvírust az állat immunrendszere idegen anyagnak érzékeli, reakcióba lép vele és specifikus antitesteket termel. Ezen antitestek kivonhatók a vérszérumból és felhasználhatók a szerológiai tesztek során.

Az Elisa-tesztek hamar a vírusdiagnosztika egy fő eszközévé váltak, mivel gyorsabbak és könnyebben kivitelezhetőek a korábbi módszereknél. Eleinte poliklonális antitesteket alkalmaztak, így később a monoklonális antitestek használata tovább növelte a tesztek érzékenységét, specifitását (Boonham és mtsai, 2014). Az Elisa-teszteknél alapvetően indirekt és direkt eljárások különböztetők meg. Az indirekt Elisa-teszteknél két ellenanyagot használnak (ellentétben a direkt tesztekkel). A reagenseket egy műanyag hordozó (általában 96 lyukú plate) felületéhez kötik. Erre kerül az elsődleges antitesteket is tartalmazó szérum. Mosási lépés után hozzáadják a másodlagos antitest-enzim konjugátumot is a reakcióhoz. Abban az esetben, ha a másodlagos antitest elsődleges antitesthez köt, az enzim aktiválódik, megváltoztatja a színét. Tehát a reakció a lejátszódó színreakció alapján jól nyomon követhető egy fotométerrel a minta abszorbancia-értékeit leolvasva. Ennél az eljárásnál jelsokszorozás történik, így ez a módszer alkalmasabb kisebb koncentrációjú antigén detektálására, tehát érzékenyebb a direkt Elisa-teszteknél.

Az Elisa-tesztek hátránya, hogy az antigén-antitest kapcsolat reverzibilis, erőssége több tényezőtől is függ (pH, hőmérséklet, oldhatósági, ill. egyéb környezeti viszonyok), az eltérő körülmények eltérő eredményhez vezetnek. Bár az ELISA-tesztek se nem olyan érzékenyek, se nem olyan gyorsak, mint a nukleinsav alapú módszerek, nagyszámú minta vizsgálatához jobban alkalmazhatóak. A biotesztek szintén érzékenyebbek az Elisa-teszteknél, de a tesztnövények

felnevelése sokáig tart és csak kisszámú minta tesztelését teszi lehetővé (Horváth és Gáborjányi, 1999).

### **2.3.3. RNS alapú diagnosztikai módszerek - Polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction, PCR)**

Jelenleg a polimeráz láncreakción alapuló vírusdiagnosztikai eljárások a legelterjedtebbek közé tartoznak. A PCR-reakcióknak számos fajtája van, vírusdiagnosztikában legnépszerűbbek a reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) és a multiplex-PCR.

A reakcióhoz feltétlen szükséges DNS templát. Tehát az RNS vírusok esetében először az RNS-ről cDNS-t kell készíteni reverz transzkripcióval, ez fog templátként szolgálni a PCR-nél. A cDNS mellé a reakcióhoz kell még mérni dezoxinukleotid-trifoszfátokat (dNTP), melyek a szintetizálódó DNS építőkövei és legalább egy primer párt (forward és reverse). A primerek kb. 20nt hosszúságú oligonukleotidok, melyek kijelölik a PCR során felszaporítandó DNS szakaszt. Általában a vírusgenom egy konzervált régiójára szokták tervezni. Végül szükséges polimeráz is, ez a szintézist végző enzim. Az összemért elegyet sok egymást követő, háromlépéses (denaturáció, annealálás, extenzió) ciklus során inkubálják, ahol a három lépés mindegyike eltérő hőmérsékleten megy végbe. A reakció után a mintákat rendszerint agaróz gélen választják el molekulaméret szerint. Mivel a PCR-reakció során amplifikálódik a vírus örökítőanyagának egy adott részlete, a kórokozó detektálásához elég ha a kiindulási RNS kivonat csak kis mennyiségű vírus RNS-t tartalmaz (Bunikis és Barbour, 2002).

A multiplex-PCR módszer kettő, vagy akár több vírus egyidejű kimutatását teszi lehetővé oly módon, hogy a különféle vírusokra tervezett primer párokat egy reakcióba mérjük bele. Ha a primerek által közrefogott nukleinsav-darabok hossza kellő mértékben eltér egymástól, agaróz gélen méret szerint elválasztva a mintát egyszerre detektálható két, illetve ugyanezen az elven akár több vírus jelenléte is. Giorgio Gambino 2015-ben megjelent cikkében 9 szőlővírus egyidejű kimutatását mutatja be nagyon elegánsan, egyetlen multiplex-PCR módszerrel (Gambino, 2015).

A PCR technika előnye elsősorban nagyfokú érzékenységeben rejlik. Összességében az RT-PCR alapú módszerek akár százszor érzékenyebbek lehetnek az Elisa-tesztekénél (Berniak és mtsai, 2009). Általánosan alkalmazható, az Elisa-tesztekénél gyorsabb, illetve a primerek gyártása rövidebb időbe telik, mint az új antitesteké és költségkímélőbb is (Boonham és mtsai, 2014). A módszer hátrányai közé tartozik, hogy maga a műszer drága, illetve hogy a primerek

tervezéséhez ismernünk kell a keresett vírusok szekvenciáját (vagy legalább azok egy részét). Primer tervezésnél mindig hibaforrást jelent, hogy a mintáinkban levő vírus genomszekvenciája eltérhet attól a referenciagenom-résztől, mely alapján a primereket tervezzük.

#### ***2.3.4. RNS alapú diagnosztikai módszerek - Újgenerációs szekvenálás: Illumina szekvenálás***

Az újgenerációs szekvenálás (Next-Generation Sequencing, NGS) korszerű, nagy hatékonyságú, gyors és költségkímélő módszer, mely nukleinsav szekvenálásán és bioinformatikai analízisén alapul. Ezt alkalmazva csak néhány száz bázispár hosszú DNS, illetve RNS fragmentum szekvenálható, ám mivel nagy áteresztőképességűek (high-throughput), egy adott mintából több millió szekvenciát (read-et) le lehet olvasni. Az újgenerációs szekvenálásoknak sok fajtája létezik – ezek közül növényvírusok diagnosztikája során a Roche 454-et és az Illumina/Solexa szekvenálást használják leggyakrabban (Barba és mtsai, 2014).

Az Illumina/ Solexa szekvenálás során a DNS egyik végére timin túlnyúló véget tartalmazó adapter DNS-t ligálnak, amely alapján a DNS-szálak a szekvenáló lemez komplementer primereihez képesek hibridizálni. Ezek a továbbiakban templátként szolgálnak, erről szintetizálódik az új DNS. A DNS szálakat „bridge-PCR” módszerrel lokálisan felamplifikálják. Ezután a tényleges szekvenálás úgy történik, hogy elongációkor fluoreszcens dNTP-eket használnak és ezek jelét leolvasva történik a nukleotidsorrend meghatározása. A módszer különlegessége abban rejlik, hogy a lokálisan létrehozott kolóniák nagy mennyiségben tartalmazzák a keresett szekvenciát. Ebben rejlik az eljárás érzékenysége is: a bázissorrend leolvasása után a már ismert szekvenciákhoz illesztik őket, majd lefedettségük alapján határozzák meg az egyezés mértékét. A kapott szekvenciák bioinformatikai analízissel vizsgálhatók tovább.

Az előzőekben tárgyalt módszerek meghatározó korlátja volt, hogy csak a már ismert vírusok kimutatására alkalmasak, mert szükséges hozzájuk vírusfehérjére specifikus antitest, vagy genomjuk legalább egy részének szekvenciája, a primerek megtervezéséhez. Ezzel szemben az újgenerációs szekvenálások használatával egy mintából akár egy ismeretlen vírus teljes genomja is meghatározható (Massart és mtsai. 2014). 2009-ben az elsők között sikerült egy addig még ismeretlen vírust meghatározni, illetve genomját összeszerelni Kreuze-nak és munkatársainak, akik siRNS-extraktum szekvenálását követően Illumina Genome Analyzer

szekvencia összeszerelő szoftverrel több, mint 1000 nt hosszú kontigokat szereltek össze. Sok közülük egy addig még ismeretlen növényvírusból származott (Kreuze és mtsai, 2009).



### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. Növényi minták

A kísérletekhez magyarországi alma mintákat használtam fel, melyeket együttműködő partnereink, a Corvinus Egyetem kutatói gyűjtöttek szabadföldi termő ültetvényekről, szabadföldi fajtajelölt törzsültetvényekről, illetve izolátorházban nevelt fajtajelöltekről. A vizsgálatba bevontam az Év Fája 2013 versenyt megnyert, és 2014-ben az európai Év fája versenyen 2. helyezést elért 280 éves gödöllői Öreg Vackorfát is. Így összesen 21 különböző ültetvényről szedett levélmintát használtam fel kutatásom során (1. táblázat). A növényi mintákat a mintavételtől a felhasználásig -70°C-on tároltam.

1. táblázat A kísérletekhez felhasznált alma minták

| Termő ültetvényről:         | Fajtajelöltek        |                                | Egyéb:                  |
|-----------------------------|----------------------|--------------------------------|-------------------------|
|                             | Izolátorházból:      | Szabadföldi törzsültetvényről: |                         |
| Soroksár, MT-12 44.fa       | Rosmerta_izolátorház | Rosmerta_szabadföld            | Gödöllő,<br>Öreg Vackor |
| Soroksár, MT-12 II_6        | Hesztia_izolátorház  | Hesztia_szabadföld             |                         |
| Soroksár, 13_2              | Artemisz_izolátorház | Artemisz_szabadföld            |                         |
| Újfehértó, bio tábla        | Cordelia_izolátorház | Cordelia_szabadföld            |                         |
| Újfehértó, rezisztens tábla |                      |                                |                         |
| Vámosmikola, Golden D       |                      |                                |                         |
| Vámosmikola, Jonagold       |                      |                                |                         |
| Vámosmikola, Idared         |                      |                                |                         |
| Zalaszántó, "Fuji"          |                      |                                |                         |
| Breznán, Golden D           |                      |                                |                         |
| Tamási, Szarkahegy          |                      |                                |                         |
| Újfehértó, Freedom          |                      |                                |                         |

## 3.2. RNS kivonás

A minták teszteléséhez 0,1-0,15 g növényi szövetből vontam ki RNS-t Gambino és munkatársai protokollja alapján (Gambino és mtsai, 2008). Röviden: dörzsmozsárban homogenizált mintához 17  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanolt és 850  $\mu$ l 65°C-ra előmelegített extrakciós puffert (EB: 2%CTAB+ 2,5%PVP+ 100mM Tris-HCl (pH 8,0)+ 25mM EDTA+ 2M NaCl) adtam. 10 percre 65°C-os vízfürdőbe raktam, időnként vortexeltem őket. Ezután 850  $\mu$ l kloroform:izoamilalkohol (24:1)-t adtam hozzá, majd centrifugáltam (13.000 rpm) 4°C-on 10 percet. A centrifugálás után kialakult felülúszót 800  $\mu$ l kloroform:izoamilalkohol (24:1)-ba mértem, majd ismét centrifugáltam (13.000 rpm) 4°C-on, 10 percig. A felülúszót (kb. 450  $\mu$ l-t) 250  $\mu$ l 9M LiCl-hoz mértem, 30 percre jégre raktam, majd centrifugáltam (13.000 rpm), 4°C-on, 20 percig. Leöntöttem a felülúszót és a csapadékra 450  $\mu$ l 65°C-ra melegített SSTE-t (SSTE: 1M NaCl+ 0,5%SDS+ 10mM Tris-HCl (pH 8,0)+ 1mM EDTA (pH 8,0)) és 450  $\mu$ l kloroform:izoamilalkoholt mértem, majd lecentrifugáltam (13.000 rpm) 4°C-on, 10 percig. A felülúszóból 400  $\mu$ l-t rámértem 280  $\mu$ l izopropanol és 30  $\mu$ l 4M NaAcetát (pH 5,2) keverékére, ezt 4°C-on centrifugáltam (13.000 rpm) 20 percig. Az Eppendorf-csövek alján maradt csapadékot átmostam 1 ml 70% hideg EtOH-al, 4°C-on centrifugáltam (13.000 rpm) 5 percig, majd leöntöttem az alkoholt. Ezután 10 percig szárítottam a mintákat speed vac-ban, majd a visszaoldást 25-25  $\mu$ l steril milliQ tisztaságú vízzel (MQ) végeztem el.

Az RNS tisztítás sikerességét a minták gélelektroforezissel- 1,2%-os agaróz gélen - történő szétválasztásával ellenőriztem. Az egyes minták töménységét és szennyezettségét a teljes spektrum felvételére alkalmas NanoDrop 2000 UV-VIS spektrofotométerrel mértem. Egy ültetvényről 6-12 RNS kivonást végeztem. A minőség-ellenőrzés után az RNS-t tekintve megfelelően tömény mintákat összeszelve pool-t készítettem.

## 3.3. cDNS szintézise RT-PCR-rel

### 3.3.1. cDNS szintézise reverz transzkripcióval

A vírusok kimutatására szolgáló PCR során vírusspecifikus primerekkel DNS fragmentumokat tudunk felszaporítani, amihez előbb a tisztított RNS-ből cDNS-t kell szintetizálni és csak ezután kezdhető el a kórokozók kimutatása a mintákból.

A reverz transzkripciót a Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kitjével végeztem a kit használati leírása alapján. Röviden: 0,25 µl random primerhez templátként 500 ng tisztított RNS-t adtam, majd desztillált vízzel 3,12 µl-re egészítettem ki az oldatot és jégre tettem. Gyors centrifugálás után denaturáltam (5 perc, 65°C). Utána jégen hozzáadtam 1,88 µl-t a következő keverékből: mintánként 1 µl 5x Reaction buffer + 0,5 µl 10 mM dNTP + 0,125 µl Ribolock RNáz inhibitor + 0,25 µl RevertAid RNS polimeráz enzim. A mintákat 25°C-on, 10 percig annealáltam, 42°C-on 50 percig, majd 45°C-on 10 percig (cDNS szintézis) inkubáltam, végül 70°C-on 5 percig inaktiváltam az enzimet. A cDNS-t a PCR reakciókhoz 10-szeresére hígítottam

### ***3.3.2. cDNS minőségének ellenőrzése (Aktin teszt)***

Ahhoz, hogy leellenőrizsem, vajon sikeres volt-e a reverz transzkripció és megfelelő minőségű cDNS-t nyertem-e, *Malus domestica* aktin mRNS-ére terveztem specifikus primereket, melyekkel PCR reakciót mértem össze.

### 3.4. Primerek tervezése

#### 3.4.1. Primer tervezés *Malus domestica* aktin mRNS-re

Az irodalomban (Hassan és mtsai, 2006) (Menzel és mtsai, 2002) a vírus-kimutatásra használt protokollokban a cDNS szintézisét egyből követi a vírusspecifikus primerekkel történő, diagnosztikai PCR reakció. Laborunkban e két lépés közé beiktatjuk a cDNS minőségének ellenőrzését szolgáló, általunk „aktin tesztnek” nevezett eljárást. Ehhez szükséges az almára specifikus aktin mRNS-re primereket tervezni.

Az NCBI oldalán megkerestem a *Malus domestica* aktin mRNA szekvenciáját (AB638619.1). 20 bp hosszú, PCR-hez használható forward és reverse primert terveztem úgy, hogy kb. 600 bp-t fogjanak közre. A primer tervezéskor figyeltem arra, hogy a 3' vég mindig citozin, vagy guanin legyen, és hogy ne legyen sok (>3db) bázisismétlődés a primerszekvenciákban. A két szakasz alkalmasságát PCR Primer Stats programmal ellenőriztem le (hőmérséklet optimum, stb.).

Az aktin mRNS darabjának amplifikálásához a 2. táblázatban látható primereket használtam.

2. táblázat Aktin mRNS-re tervezett primerek

| Primerek    | Szekvencia (5'-3')    | Termék hossza (bp) |
|-------------|-----------------------|--------------------|
| Mxd_aktin-F | GGAAGTGGGAATGGTGAAGGC | 719                |
| Mxd_aktin-R | GCTCCAATTGTGATGACTTG  |                    |

A reakció összemérésekor a Thermo Scientific Phire Hot Start II DNA Polymerase-át használtam. A teszt során 14,5 µl reakcióelegyhez (1 reakcióra: 9,4 µl MQ + 3,0 µl 5xPhire puffer + 0,75 µl (10 pmol/µl) Mxdaktin1s primer + 0,75 µl (10 pmol/µl) Mxdaktin719as primer + 0,3 µl 10mM dNTP + 0,3 µl Phire enzim) 0,5 µl 10xhíg cDNS-t adtam. Negatív kontrollként cDNS helyett MQ vizet használtam templátként. A PCR reakció során először 98°C-on 30 másodpercig denaturáltam a DNS-t. Ezt követte 35 ciklusban: denaturálás 10 másodpercig 98°C-on, annealálás 10 másodpercig 55°C-on és az elongáció 20 másodpercig 72°C-on. Végül 1 percig 72°C-on láncépítéssel zárult a reakció. A kapott PCR termékeket 1,2%-os agaróz gélen gélelektroforezissal ellenőriztem.

### 3.4.2. Primer tervezés a négy alma karantén vírusra

Az irodalomban használt primerek szekvenciáit (Hassan és mtsai, 2006) (Menzel és mtsai, 2002) a Clustal Omega illesztőprogrammal hasonlítottam össze az NCBI, GenBank-ben található vírusszekvenciákkal (Függelék 1., 2., 3., 4. ábra). Mivel ezek a primerek nem voltak elég specifikusak újabbakat terveztem, az alma aktin primer tervezésénél már leírt módon. Igyekeztem minél több vírusvariáns szekvenciát bevonni a tervezésbe, hogy azok minél reprezentatívabban mutassák a különböző variánsok szekvenciájában mutató diverzitást (Malinowski, 2005). A primer tervezéshez az ACLSV esetében 14, az APMV esetében 13 az ASPV és az ASGV esetében 6 GenBank-ben található vírusszekvencia illesztését vettem figyelembe. A négy vírusra tervezett primerek szekvenciái a 3. táblázatban láthatók.

3. táblázat 4 alma vírusra tervezett primerek

| Primerek | Szekvencia (5'-3')        | Termék hossza (bp) |
|----------|---------------------------|--------------------|
| ACLSV-F  | AGACCCCTTCATGGAAAGACAGG   | 672                |
| ACLSV-R  | CTATTATTATAAGTCTAAACACT   |                    |
| APMV-F   | CCGTGAGGAGGACAGCTTGG      | 487                |
| APMV-R   | CAGATCTTCATCGATAAGTAGAAC  |                    |
| ASPV-F   | CTGGAACCTCATGCTGCAAACCTC  | 384                |
| ASPV-R   | CACACATAGCCGCCCCNGTTAGG*  |                    |
| ASGV-F   | GAATTGAAAACCTTTGCTGCCAC   | 337                |
| ASGV-R   | GACTYCTAACCCTCCAGTTCCAG** |                    |

\* N jelentése: A, vagy C, vagy T, vagy G

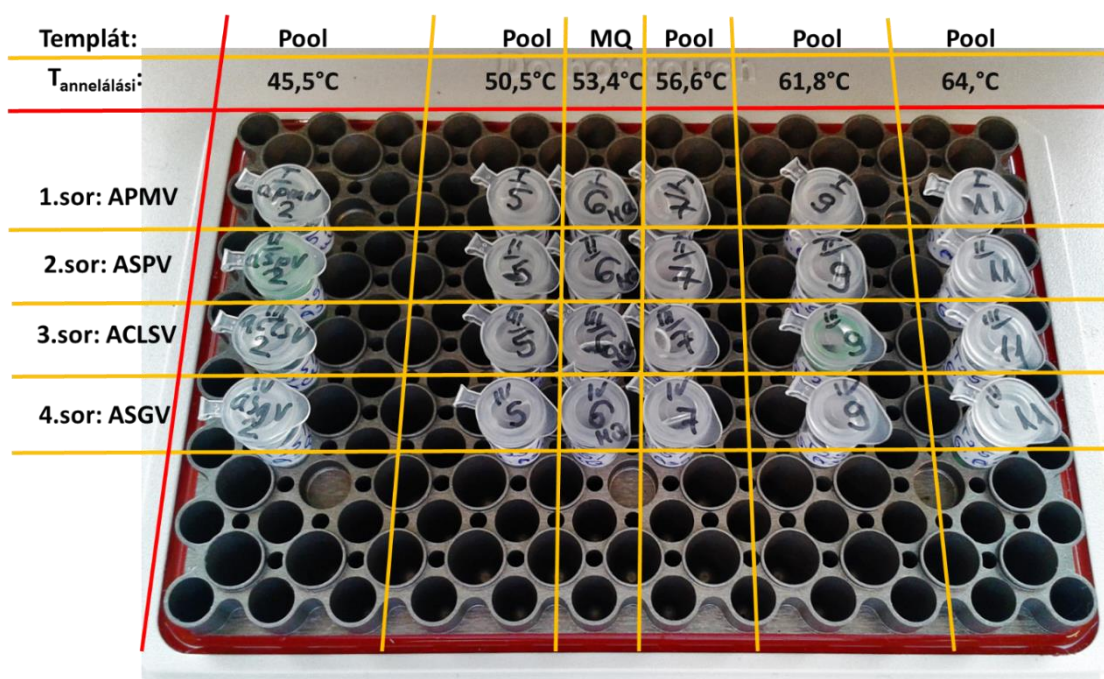
\*\* Y jelentése: C, vagy T

### 3.5. Alma cDNS pool

A különböző ültetvényekről szedett 10 fajta alma mindegyikének 10-szeresére hígított cDNS-éből 3-3 µl-t összemértem, így összesen 30 µl 10-szer híg Alma cDNS Pool-t kaptam.

### 3.6. Gradiens PCR

A PCR-t úgy állítottam be, hogy egymás melletti oszlopai 6 különböző hőmérsékleten végezzék az annealálást, így egy sort tekintve balról jobbra emelkedő hőmérséklet gradienst értem el. A sorokat felosztottam a vizsgált vírusok között, így az 1. sorban APMV primereket, a 2. sorban ASPV primereket, a 3. sorban ACLSV primereket, míg a 4. sorban ASGV primereket használtam. Minden sorban teszteltem a 6 különböző hőmérsékletre a primereket. Negatív kontrollként a 3.oszlop szolgált, ahol a mintákhoz templátként MQ-t adtam. A gradiens PCR során nyert termékeket gélelektroforezissel ellenőriztem 1,2%-os agaróz gélen (6. ábra).



6. ábra A gradiens PCR során a PCR készülék különböző pozícióiban összemért vírusspecifikus primerek és az annealálási hőmérsékletek elrendezése.

### 3.7. Multiplex-PCR

#### 3.7.1. Vírusprimerek működésének tesztelése

Az eljárás során a Thermo Scientific Phire Hot Start II DNA Polymerase-át és Phire Green Reaction Buffer-ét használtam. Az egyedi PCR során 9,4 µl MQ-t, 3,0 µl 5xPhire puffert, 0,75 µl (10 pmol/µl) forward vírusprimert, 0,75 µl (10 pmol/µl) reverse vírusprimert, 0,3 µl 10mM dNTP-t, 0,3 µl Phire polimeráz enzimet és 0,5 µl 10xhíg cDNS templátot mértem össze. A PCR kezdeti lépéseként elődenaturáltam a cDNS-t (98°C-on 30 msp.). Ezt 35 ciklusban követte a denaturáció (98°C-on 10 msp.), az annealálás (55°C-on 10 msp.), majd az elongáció (72°C-on 20 msp.). A végső lépés, a láncépítés (72°C 1 perc) volt. Az amplifikált termékeket agaróz gélen (1,2%) választottam el.

#### 3.7.2. Vírusdiagnosztika alma mintákon duplex-PCR-rel

A multiplex PCR abban különbözik az egyedi PCR-től, hogy ilyenkor egy reakcióhoz kettő vagy több primer párt mérünk, így időt és anyagot takaríthatunk meg. Ideális esetben a különböző összemért primer párok által felamplifikált DNS szakaszok hossza eléggé eltér ahhoz, hogy később elektroforezissel agaróz gélen elválasszuk a PCR terméket. A multiplex reakciókat optimalizálni kell: a felszaporított termékek hossza eltérő kell, hogy legyen, a primerek egymással nem reagálhatnak. Az optimalizálásához különféle kombinációkban próbáltam ki a négy almavírusra tervezett primerpárt:

duplex: ACLSV (672bp) x ASPV (384bp);

APMV (487bp) x ASGV (337bp);

ASPV (384bp) x ASGV (337bp),

triplex: ACLSV (672bp) x APMV (487bp) x ASPV (384bp),

tetraplex: ACLSV (672bp) x APMV (487bp) x ASPV (384bp) x ASGV (337bp).

Mivel a kombinációk közül a duplexek jól alkalmazhatónak tűntek, ezt az összeállítást használtam a továbbiakban a különböző magyar ültetvényekről származó minták tesztelésére.

### 3.8. PCR termék tisztítása, szekvenálása

A PCR során keletkezett termékek szekvenanciáját meghatároztuk, hogy igazoljam: a vírusok kimutatására tervezett primereim valóban a keresett vírusokat szaporították fel.

Szekvenálás előtt a DNS mintáimat a Geneaid PCR DNA Fragments Extraction Kit használatával (a PCR Clean Up Protocol kitleírás alapján) tisztítottam meg a mintákban maradt enzimtől és be nem épült nukleotidoktól. Röviden: 47 µl PCR termékhez 250 µl DF puffert adtam. Ezt az elegyet DF oszlopba pipettáztam át, majd lecentrifugáltam (30 msp., 14.000 rpm). Az átfolyó leöntését követően 600 µl Wash puffert mértem a DF oszlop közepére és egy perces állás után 30 msp-ig 14.000 rpm-en centrifugáltam. Az átfolyót ismét leöntöttem, majd centrifugában szárítottam az oszlopot (3 perc, 14.000 rpm). A DF oszlopra 25 µl Elúciós puffert pipettáztam, ezt 2 percig hagytam állni, majd 2 percig centrifugáltam 14.000 rpm-en. A tisztított DNS terméket 1,2%-os agaróz gélen futtatva ellenőriztem, majd a BIOMI Kft.-vel meghatároztattam a bázissorrendjét.

Az eredményül kapott bázissorrendet a vírus specifikus primerek tervezésekor már használt GenBank - vírusszekvenciákkal a Clustal Omega program segítségével hasonlítottam össze (7. ábra).

|                 |                                                                |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|
| Hestia,i.       | AAAGCTTTTGAAAAGAGCCCTTGGGTGGCTTTTGATTTTGCCACCGGTCTTAAATGAAC    |
| D14995.2        | AAAGCTTTTCGAAAAAAGTCCATGGGTGGCCTTTGATTTTGCCACTGGTCTGAAAAATGAAT |
| NC_001749.2     | AAAGCTTTTCGAAAAAAGTCCATGGGTGGCCTTTGATTTTGCCACTGGTCTGAAAAATGAAT |
| JN701424.1      | AAAGCTTTTCGAAAAAAGCCCGTGGGTGGCATTGACTTTGCCACCGGTCTCAAAATGAAT   |
| JQ308181.1      | AAAGCTTTTCGAAAAAAGCCCGTGGGTGGCATTGACTTTGCCACCGGTCTCAAAATGAAT   |
| AB004063.1      | AAAGCTTTTGAAAAAAGCCCTTGGGTGGCATTGATTTTGCCACCGGTCTAAAAATGAAT    |
| Vámos.,Idared   | AAAGCTTTTGAAAAGAGCCCTTGGGTGGCTTTTGATTTTGCCACCGGTCTTAAATGAAC    |
| Artemis,sz.     | AAAGCTTTTGAAAAGAGCCCTTGGGTGGCTTTTGATTTTGCCACCGGTCTTAAATGAAC    |
| Rosmerta,sz.    | AAAGCTTTTGAAAAGAGCCCTTGGGTGGCTTTTGATTTTGCCACCGGTCTTAAATGAAC    |
| Artemis,i.      | AAAGCTTTTGAAAAGAGCCCTTGGGTGGCTTTTGATTTTGCCACCGGTCTTAAATGAAC    |
| JX080201.1      | AAAGCTTTTGAAAAAAGCCCTTGGGTGGCTTTTGATTTTGCCACCGGTCTTAAATGAAC    |
| HE978837.1      | AAAGCTTTTGAAAAGAGCCCTTGGGTGGCTTTTGATTTTGCCACCGGTCTTAAATGAAC    |
| Vámos.,Jonagold | AAAGCTTTTGAAAAGAGCCCTTGGGTGGCTTTTGATTTTGCCACCGGTCTTAAATGAAC    |
| Hestia,sz.      | AAAGCTTTTGAAAAGAGCCCTTGGGTGGCTTTTGATTTTGCCACCGGTCTTAAATGAAC    |
|                 | ***** **                                                       |

7. ábra PCR technikával felamplifikált ASGV vírusszekvenciák (szürkével kiemelve) összehasonlítása hét, GenBank szekvenia adatbázisban talált ASGV törzs bázissorrendjével (részlet).

Az összehasonlítás során mindig volt a vírustörzsek szekvenciái között pár bázispárnyi különbség - aminek oka a vírusok gyors adaptációja, de az eredmény mindig azt mutatta, hogy a PCR reakció által felsokszorozott DNS termék valóban a keresett víusból való.



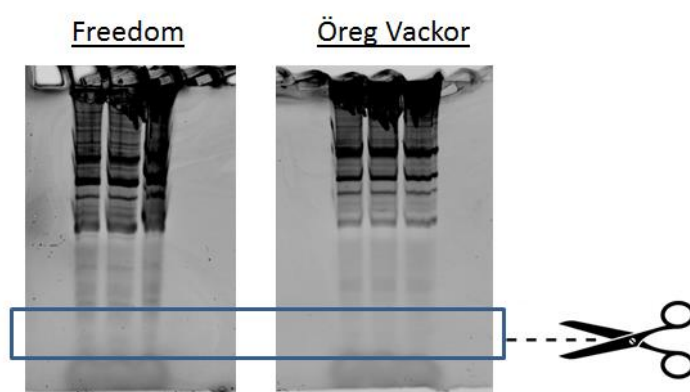
### 3.9. Filogenetikai elemzések

Az izolátorházban és a szabadföldi fajtajelölt almamintákon elvégzett PCR eljárás után a felamplifikált vírus darabok szekvenciáit Clustal Omega illesztőprogram segítségével hasonlítottam össze.

### 3.10. KisRNS könyvtár készítés

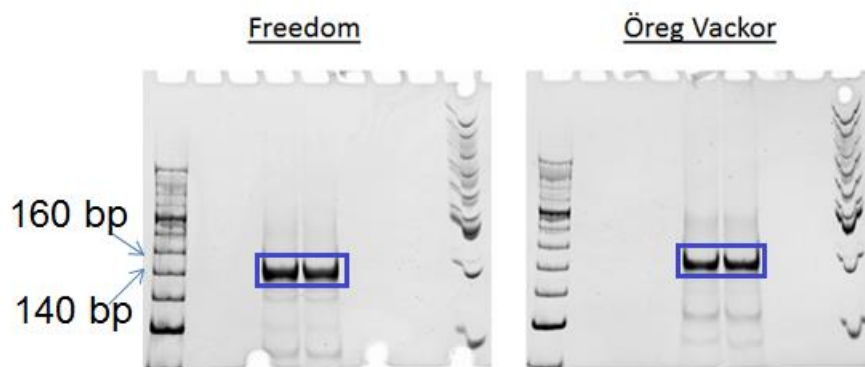
Az almalevél-mintákból kivont totál RNS frakciókból kisRNS könyvtárakat készítettem az Illumina TruSeq Small RNA Sample Preparation protokollja alapján.

A kisRNS könyvtárak készítésekor az totál RNS-t tartalmazó kivonatot 8%-os ureát tartalmazó poliakrilamid gélen méret szerint elválasztottam, majd UV-fény alatt kivágtam a kisRNS frakciónak megfelelő mérettartományban (xilén-cianol és brómfenolkék festékek alapján) található RNS-eket (8. ábra).



8. ábra KisRNS mérettartományának kivágása a referencia festék (a kék keretezés alatt látható sötét csík) alapján, 8%-os, ureás akrilamidgélből

A géldarabokból azRNS-t 0,3 M NaCl oldattal nyertem ki (rázatás mellett 4°C-on overnight inkubálással), majd alkohollal kicsaptam. A visszaoldott, tiszta kisRNS-hez 3' és 5' végeihez adaptereket ligáltam. Ezután a Thermo Scientific RevertAid H Minus Reverse Transcriptase-ával RT-PCR során cDNS-t szintetizáltam, amit az Illumina mintánként egyedi, speciális RNA PCR primer index szekvenciáinak felhasználásával PCR-el amplifikáltam. Ellenőrzésképp 8%-os natív poliakrilamidgélben futtattam meg a cDNS könyvtárakat, melyek az ellenőrző festékek két mérettartománya közé (140-160 bázispár) kerültek az elválasztásnál (9. ábra).



9. ábra KisRNS könyvtárak ellenőrző futtatása 8%-os akrilamid gélen

Végül 0,3 M NaCl oldattal (rázatás mellett, 4°C-on, overnight inkubálással) visszaoldottam a gélből a cDNS könyvtárakat, melyek minőségellenőrzését a szekvenálást is végző UD Genomed (Debrecen) végezte. Tesztjük igazolta, hogy a kisRNS könyvtárak minősége megfelelő a szekvenáláshoz (10. ábra).

# Vackor

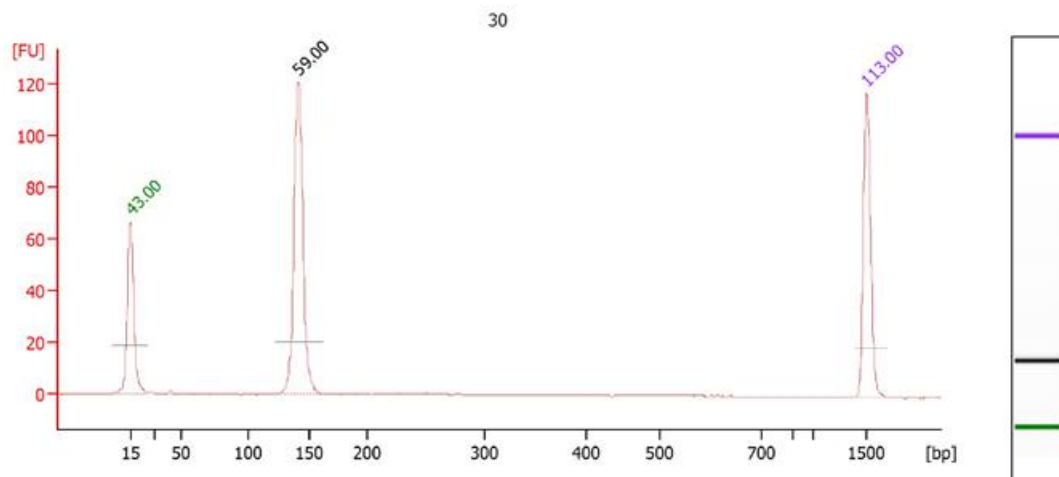
2100 expert\_DNA 1000\_DE34903783\_2014-10-15\_09-05-44.xad

Page 10 of

Assay Class: DNA 1000  
Data Path: C:\...-15\2100 expert\_DNA 1000\_DE34903783\_2014-10-15\_09-05-44.xad

Created: 10/15/2014 9:05:44 /  
Modified: 10/15/2014 10:11:00 /

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 6 : 30

Number of peaks found: 1

Peak table for sample 6 : 30

| Peak | Size [bp] | Conc. [ng/μl] | Molarity [nmol/l] | Observations |
|------|-----------|---------------|-------------------|--------------|
| 1    | 15        | 4.20          | 424.2             | Lower Marker |
| 2    | 142       | 6.08          | 65.0              |              |
| 3    | 1,500     | 2.10          | 2.1               | Upper Marker |

Illumina-ellenőrző  
gélkép:



10. ábra Az Öreg Vackor kisRNS könyvtár szekvenálásának ellenőrzése

## 3.11. Szekvencia adatok bioinformatikai elemzése

A visszakapott szekvenciák feldolgozását bioinformatikai módszerekkel végeztük Molnár János segítségével, aki az MTA Enzimológiai Intézetének munkatársa. Mivel a kisRNS szekvenciák végein még ott voltak az adapterek, először ezeket el kellett távolítani, ezt a Trimmomatic programmal végeztük. A kisRNS szekvenciák méret szerinti eloszlását Glen programmal készítettük el.

A könyvtárainkat a DPV (Descriptions of Plant Viruses) vírus-referenciagenomokat tartalmazó adatbázisára illetve egy vírus találati listát generáltam. A hibás illesztések kiszűrésére lefedettségi ábrákat is generáltam. Ehhez az adott kisRNS könyvtárat a vizsgált vírus GenBank-ben található referenciagenomjára illesztettem. Az előzőekben leírtakon kívül

genomösszerakást is alkalmaztuk, melyhez Velvet programot (Zerbino és Birney, 2008) használtuk.

### 3.12. Új, specifikus vírusprimerek tervezése

A Málna tarkázottság vírus (Raspberry leaf mottle virus, RLMV) víusból sok read-et mutatott ki a szekvenálás, így kiválasztottam három olyan könyvtárat, mely nagyszámú RLMV read-et tartalmaz, ezek a Zalaszántó (Fuji), izolátorházas, ill. szabadföldi Rosmerta minták voltak (11. ábra).

| Név                 |                   | RLMV    |
|---------------------|-------------------|---------|
| Zalaszántó, Fuji T5 | v13               |         |
|                     | v15               |         |
|                     | b                 |         |
| 13193366            | read/PCR          | 18148   |
|                     | read/million read | 1375,54 |
| Rosmerta_i          | v13               |         |
|                     | v15               |         |
|                     | b                 |         |
| 10962883            | read/PCR          | 16445   |
|                     | read/million read | 1500,06 |
| Rosmerta_sz         | v13               |         |
|                     | v15               |         |
|                     | b                 |         |
| 11016007            | read/PCR          | 24827   |
|                     | read/million read | 2253,72 |

11. ábra 3 alma könyvtár adatai RLMV-re

Ezek SAMtools fájljait illesztettem Clustal Omega programmal egymáshoz, illetve az NCBI, GenBank-ben található referenciagenom (NC\_008585.1) Hsp70-et kódoló régiójához. Ahol illeszkedést találtam, oda primereket terveztem (4.táblázat és 12. ábra).

4. táblázat RLMV-re tervezett vírus primerek

| Primerek | Szekvencia (5'-3')    | Termék hossza (bp) |
|----------|-----------------------|--------------------|
| RLMV_F   | GTGTTTGCTCTTACAGTGCGG | 340                |
| RLMV_R   | TTTCGGCGTCAGACAGTATAC |                    |



5. táblázat LChV-1 Hsp70 fehérjéjére tervezett primerek

| Primerek       | Szekvencia (5'-3')      | Termék hossza (bp) |
|----------------|-------------------------|--------------------|
| LChV-1_Hsp70_F | GTTAGATTCCGTCATTAGTC    | 792                |
| LChV-1_Hsp70_R | CAGTCGAACACTACCAAGCGTTC |                    |

```

NC_001836.1      CTGGAAGTTGTTAGATTCCGTCATTAGTCGAAATCATATCTCAAAGGCATTAGTTGTAT
64_Magyar_T     TTTGAAGTTGTTAGATTCCGTCATTAAATCGAAATCGTATCTCAAAGGCAttggttgtat
61_Ligeti_T     nnnnnagttgtagattccgctcattagnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
63_Pannni_T     nnnnnnnnnnnnnagattccgctcattagtnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
                    *****R

```

...

```

NC_001836.1      TGAACGCTTGGTAGTTCGACTGTTATTTA-----
64_Magyar_T     TGAACGCTTGGTAGTTCGATTGTTATTTA-----
61_Ligeti_T     nnnnnnnnnngtagttcgactggtattnn-----
63_Pannni_T     tgaacGCTTGGTAGTTCGACTgttattnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
                    *****

```

13. ábra Vírus szekvenciák illesztése LChV-1 Hsp70-fehérjéjére való primerek tervezésekor

6. táblázat LChV-1 köpenyfehérjéjére tervezett primerek

| Primerek    | Szekvencia (5'-3')   | Termék hossza (bp) |
|-------------|----------------------|--------------------|
| LChV-1_CP_F | GCAAAAGTCAGATGTTGGTG | 1096               |
| LChV-1_CP_R | GACGTGGTCCTAATACTTGC |                    |

```

NC_001836.1      ATCCAAGCAGAAGTTTACAGCAAAAGTCAGATGTTGGTGAAATTGATGCGACTATTAAAT
64_Magyar_T     ATCCAACAGAAGTTTACAGCAAAAGTCGGATGTTGGTgnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
61_Ligeti_T     nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnngttggtgaatttgatgcnnnnnnnnnnnn
63_Pannni_T     nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnngttggtgaatttgatgcnnnnnnnnnnnn

```

...

```

                    *****
NC_001836.1      GAGCTCTTCATGTTTTCGCAAGTATTAGGACCACGTCGCGGTAGGAGAAATTAGTGATTAT
64_Magyar_T     GAGCTCTTCATGTYTTCGCAAGTATTAGGACCACGTCGTGgTAGGAGAAATTagtgattat
61_Ligeti_T     nagctcttcattggttcgcaagtannnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
63_Pannni_T     nnnnnnnnnnnnnntcgcaagtattagaccnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
                    *****

```

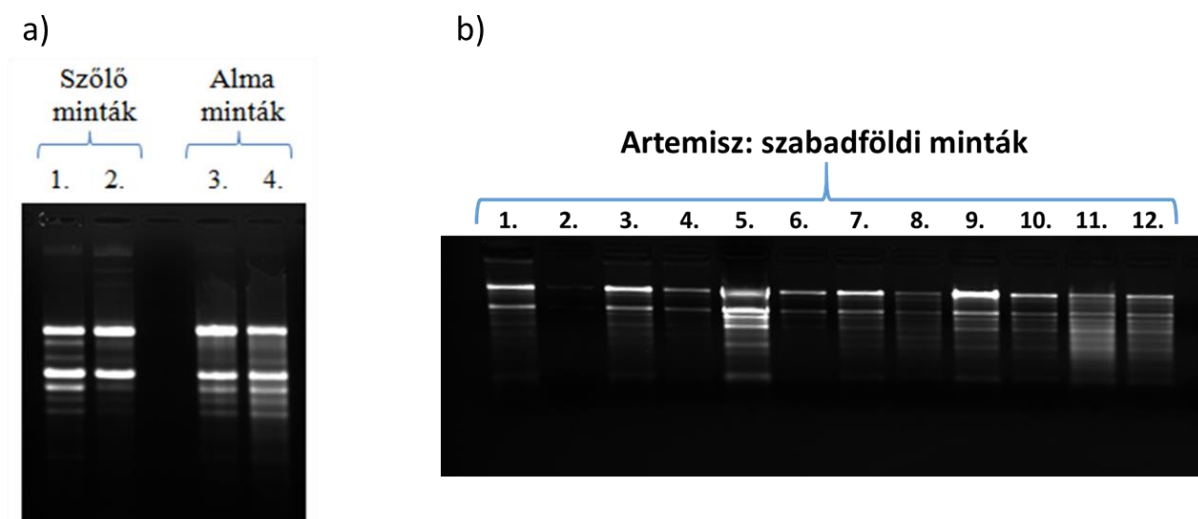
14. ábra Vírus szekvenciák illesztése LChV-1 köpenyfehérjéjére való primerek tervezésekor

Ezeket a primereket használva egyedi PCR-reakciókat mértem össze, majd a kapott PCR-termékeket 1,2%-os agaróz gélen elválasztottam. A várt mérettartományokban megjelenő termékeket kivágtam az agaróz gélből, visszaoldottam, majd elküldtem őket szekvenáltatni a Biomi Kft.-hez. A visszakapott szekvenciákat Nucleotide Blast programmal blasztoltam az NCBI GenBank szekvencia adatbázisához.

## 4. Eredmények és megvitatásuk

### 4.1. RNS kivonás

Laborunk a szőlővírusok diagnosztikájával foglalkozik; az RNS kivonási eljáráshoz Gambino és munkatársai által kifejlesztett protokollt alkalmazza (Gambino és mtsai, 2008) szőlőre optimalizálva. Ezt a módosított protokollt használtam saját alma mintáim RNS tisztításakor is – és ahogy az ábrán is látható, hasonlóan jól működik akár alma, akár szőlő mintán (15. ábra). Az RNS tisztítási módszerünkkel, 0,1-0,15 g növényi szövetből kapott kivonat a szövet minőségétől függően általában 6,3-12,5 $\mu$ g (c=250-500 ng/ $\mu$ l) RNS-t tartalmazott.

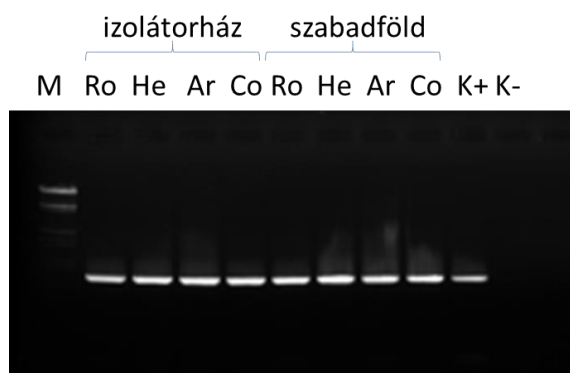


15. ábra Totál RNS kivonatok gélelektroforetikus képe 1,2% agaróz gélen történő szétválasztás után. a) Laborunk által optimalizált Gambino és munkatársai által kidolgozott RNS kivonási protokollal tisztított szőlő és alma minták. b) A Corvinus Egyetem szabadföld

## 4.2. cDNS minőségellenőrzésére és különböző vírusok kimutatására alkalmas primerek tervezése

### 4.2.1. Az RT-PCR során készült cDNS minőségellenőrzése aktin primerekkel

Ahhoz, hogy az almaminták örökítő anyagából szekvencia specifikusan felszorzozhassam a vizsgálni kívánt RNS vírusokat, vagy endogén RNS-eket, cDNS-t kellett készítenem róluk. A cDNS minőségét az általam tervezett alma aktin mRNS-re specifikus primerekkel összemért PCR reakcióval ellenőriztem (16. ábra).



16. ábra Alma minták cDNS szintézisének minőségellenőrzése aktin primerekkel.

Az általam tervezett alma aktin mRNS-re specifikus aktin primerek jól működtek, használatukkal a készített cDNS minősége jól ellenőrizhető volt. Az „aktin teszt” minden esetben igazolta, hogy az általunk cDNS szintézisre használt kit jól működik és a keletkezett cDNS minősége a további munkának megfelel.

### 4.2.2. Vírusprimerek tervezése

Mivel a vírusok gyorsan adaptálódnak a környezeti változásokhoz, mintáinkban jelen lehetnek olyan vírusvariánsok is, melyekre az irodalomban használt primerek nem működnek jól. Ahhoz, hogy ellenőrizzem, vajon az NCBI GenBank oldalán található vírusszekvenciákat figyelembe véve mennyire használhatóak az irodalomban publikált diagnosztikai primerek, Clustal Omega programmal összevettem az irodalomban használt (Hassan és mtsai, 2006) (Menzel és mtsai, 2002) primerek szekvenciáit az NCBI GenBank-ben található



vírusszekvenciákkal. Ebből az összehasonlításból kirajzolódott, hogy érdemes lenne újabb, specifikusabb primereket tervezni.

A Függelékben az 1. ábrán látható a 6 db ASPV szekvencia illesztésének részlete, jelölve rajtuk az általam tervezett és az irodalomban közölt PCR primereket. Jól látható, hogy az irodalomban használt vírusprimer nem illeszkedik elég jól, és hogy annak 3' vége adenozin. Ezen kívül előfordultak hosszabb bázis-ismétlődések is, például a Menzel és munkatársai által használt ASGV antisense primer esetében: „AACCCCTTTTGCCTTCAGTACGAA” (Menzel és mtsai, 2002). Ezeket a pontatlanságokat szerettem volna saját primereim esetében kiküszöbölni.

A Függelékben az 3. ábrán 13 db APMV, a 2. ábrán 14 db ACLSV, a 3. ábrán 13db AMV, míg a 4. ábrán 6db ASGV szekvencia illesztésének részlete látható, jelölve rajtuk az általam tervezett és az irodalomban közölt PCR primereket.

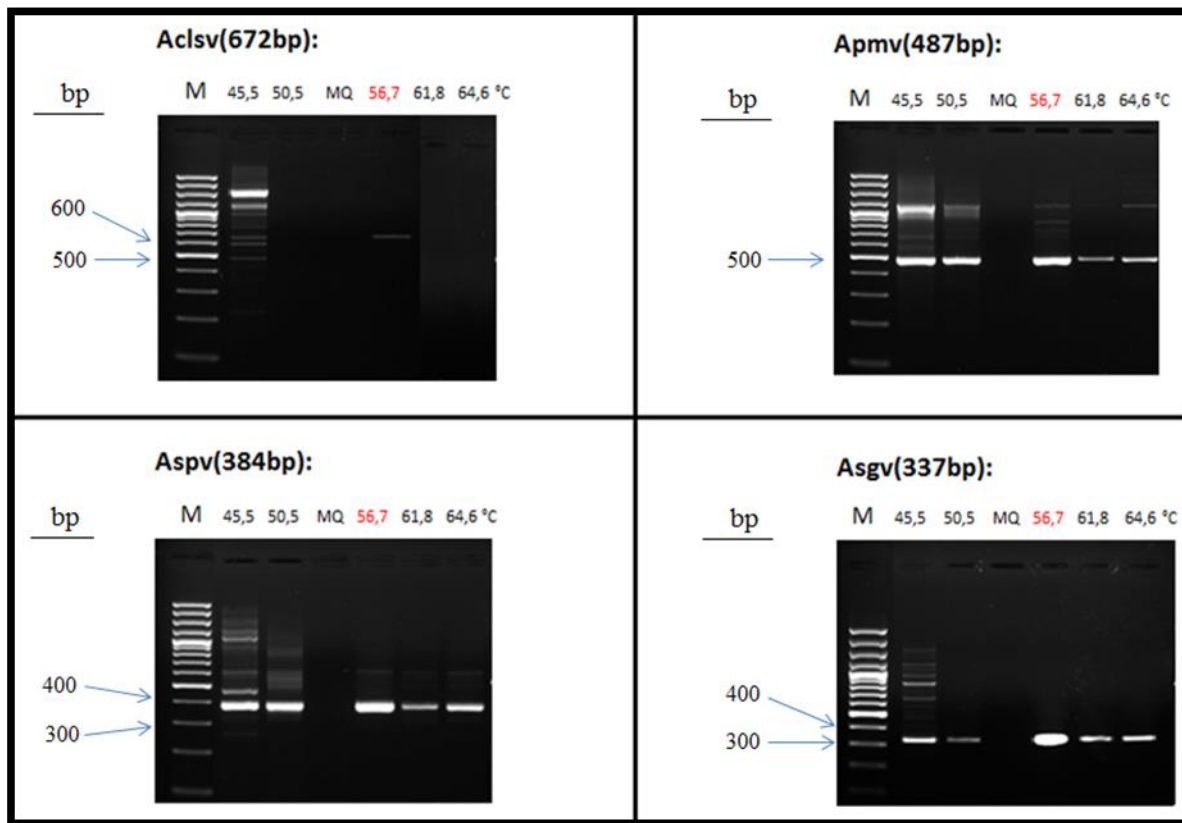
### **4.3. Víruskimutatás a tervezett vírus specifikus primerekkel, különböző kombinációban**

#### **4.3.1. Gradiens PCR**

Munkánk kezdetén nem volt a karantén vírusokra biztosan pozitív mintánk. Feltételeztem azonban, hogy az Anyag és módszer fejezetben leírt levélmintákban fellelhető a négy vírus mindegyike, ezért különböző termőültetvényekről szedett 10 alma-mintából egy cDNS keveréket mértem össze (alma cDNS pool). PCR reakcióval igazoltam, hogy az ültetvénytől valóban amplifikálható a vizsgálni kívánt vírusok mindegyike, így a továbbiakban ezt tudtam használni templátként, illetve pozitív kontrollként is.

Az újonnan tervezett almavírus-primerek annálálásához a megfelelő hőmérsékletet gradiens PCR-el választottam ki. A PCR eredményét gélelektroforezissel 1,2%-os agaróz gélen ellenőriztem, negatív kontrollként MQ desztillált vizet használtam templátként. A PCR során keletkezett melléktermékeket, illetve a várt mérettartományban megjelenő jelek erősségét tekintve mindegyik vírusspecifikus primerpár esetében az 56,7°C-on működtek legjobban a primerek. További kísérleteimhez ez alapján az 56°C-ot választottam annálálási hőmérsékletnek. A 17. ábra gélképein megfigyelhető, hogy az ACLSV primerek esetében kevés terméket kaptunk és hogy az APMV primerek egyéb, nagyobb méretű terméket is amplifikálnak. Az ACLSV-re specifikus primerek esetében a gyenge jel oka az is lehet, hogy a

templátként használt pool csak nagyon kis mennyiségben tartalmazza ezt a vírust. Ezek a pontatlanságok nem zavarják számottevően a diagnosztikát, így a primereket megfelelőnek találtam a további használatra.

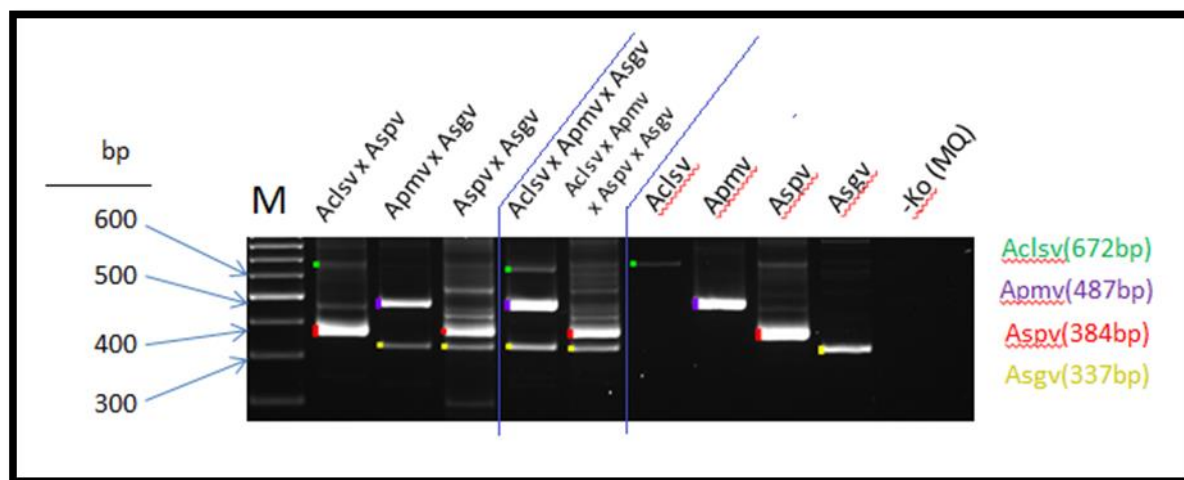


17. ábra A vírus specifikus primerek annealálásához megfelelő hőmérséklet megkeresése: a gradiens PCR termékeinek elválasztása agaróz gélen.

#### 4.3.2. Vírusprimerek különböző kombinációinak tesztelése PCR-rel

Mivel a diagnosztikai módszerek esetében sok mintát kell szűrni, érdemes a vírusteszteket több vírusra egyszerre elvégezni, duplex-, vagy multiplex-PCR reakcióval. Ilyenkor figyelni kell arra, hogy a primerek kitapadhatnak az alma endogén mRNS-eire, így nem a vírus adott darabja, hanem az alma RNS-ek egy része amplifikálódik. Azonban minél többféle primert használunk egy multiplex-PCR reakcióban, annál nagyobb a valószínűsége, hogy melléktermék is fog keletkezni. A multiplex reakciókat tehát használat előtt optimalizálni kell, figyelembe véve, hogy az adott primerpár használatával keletkezett termékek egyértelműen azonosíthatóak legyenek méret alapján, illetve, hogy a primerpárok együttes alkalmazása során a lehető

legkevesebb melléktermék keletkezzen. Így tehát a vírus-specifikus primerpárokat kipróbáltam multiplex-PCR-ként különböző kombinációkban, és egyedi PCR során is. A reakciók termékeit 1,2%-os agaróz gélen választottam el gélelektroforezissel (18. ábra).



18. ábra Vírusprimerek különböző párosításainak próbája.

A gélképen látható, hogy az egyedi PCR-ek jól sikerültek: egyértelműen kivehetőek rajtuk a vírus-specifikus primerek által felamplifikált termékek, bár az ACLSV esetében - a gradiens PCR-hez hasonlóan – ez esetben is gyengébb a jel.

A duplex-PCR-eknél is jól kivehetőek a várt mérettartományokban a PCR reakció termékei. Az ASPV-t és az ASGV-t azért próbáltam ki párban, mert köztük csak 50 bp-nyi méretkülönbség volt, így kíváncsi voltam, vajon jól láthatóan különválnak-e ezek a gélképen. Az eredmények szerint ezek is jól láthatóan szétváltak, viszont nagyobb mérettartományban több műtermék is megjelenik, ami nehezítheti a kiértékelést.

Az ACLSV, APMV és ASGV vírusok együttes detektálására használt triplex-PCR első látásra jónak tűnik, habár jobban megvizsgálva az ACLSV primerek által amplifikált termék jele alacsonyabban van kicsivel, mint a duplex, ill. szimplex esetében (valószínűleg ha jobban szétválasztom a termékeket, ez kiderült volna), ez félrevezető lehet. Ezen kívül a triplex-PCR-nél a 4. vírusra mindenképpen külön reakciót kellene összemérni - tehát nem könnyíti, rövidíti meg a négy vírusra való tesztelést.

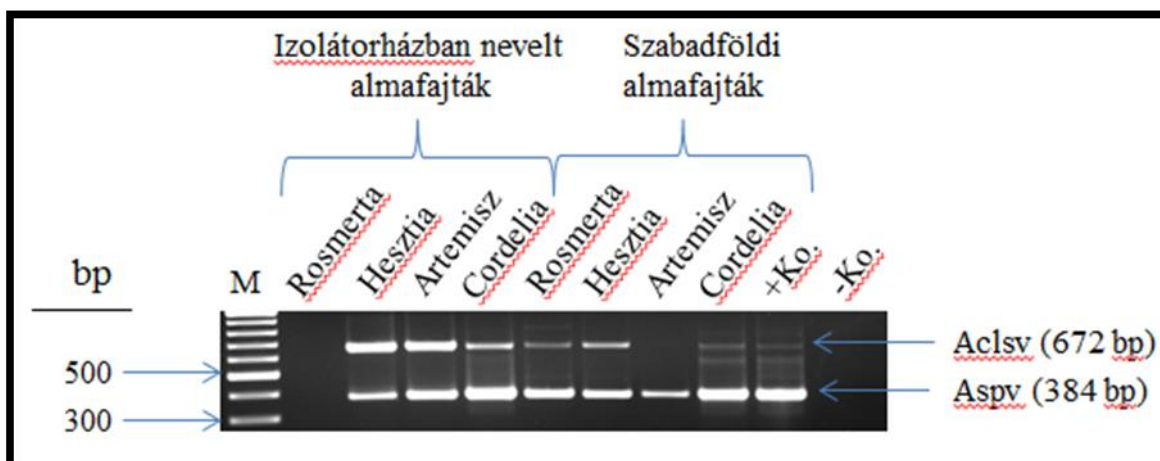
A tetraplex-PCR sok különböző méretű aspecifikus termék keletkezett, ami zavarja a kiértékelést, így ez nem használható. A gélkép alapján az is megállapítható, hogy azokban a mintákban, amelyek ASPV primert-t tartalmaztak, a várt mérettartományok mellett sokféle méretben jelennek meg egyéb fragmentek is, legyen szó szimplex-, duplex-, vagy tetraplex-

PCR-ről. Az ASPV-mentes triplex-PCR-ben, és abban a duplex-PCR-ben melyben ASPV vírusprimerek nem szerepeltek, ez a jelenség nem látható.

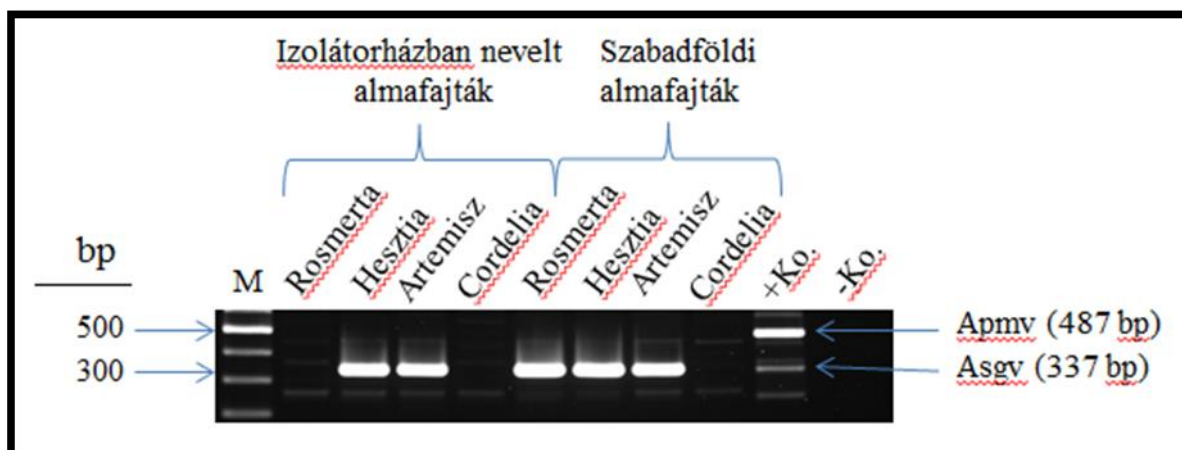
A fenti megfigyelések eredményeképp az alma minták diagnosztikai PCR-éhez a továbbiakban az ACLSV és ASPV, illetve az APMV és ASGV vírusprimerek kombinációját, duplex reakcióban alkalmaztam.

#### 4.4. Vírusdiagnosztika duplex-PCR segítségével és az ültetvényekben jelenlevő vírustörzsek rokonsági vizsgálata

Az előzőekben bemutatott, optimalizált duplex-PCR segítségével teszteltem a magyar ültetvényekről származó alma-mintákat, és a gödöllői Öreg Vackorfát a négy vírus jelenlétére. Példaként a 19. és 20. ábrán izolátorházban nevelt, és szabadföldi alma-fajtajelöltek víruseszjtjét mutatom be.



19. ábra Duplex-PCR ACLSV (672 bp) és ASPV (384 bp) vírusokra, az izolátorházban nevelt és szabadföldi fajtajelölt almamintákon.



20. ábra Duplex-PCR az APMV (487 bp) és ASGV (337 bp) vírusokra, az izolátorházban nevelt és szabadföldi fajtajelölt almamintákon.

Minőségbiztosítási lépésként néhány kiválasztott cDNS mintából összeállítottam egyedi PCR reakciókat is, majd a PCR termékeket tisztítottam, és ezeket a BIOMI Kft.-vel megszekvenáltattam. A kapott szekvenciákat az NCBI Nucleotide Blast programjával illesztettem a GenBank adatbázis szekvenciáihoz. A primerek specifikus működését igazolta az, hogy minden esetben a várt vírusok szekvenciáit kaptam vissza.

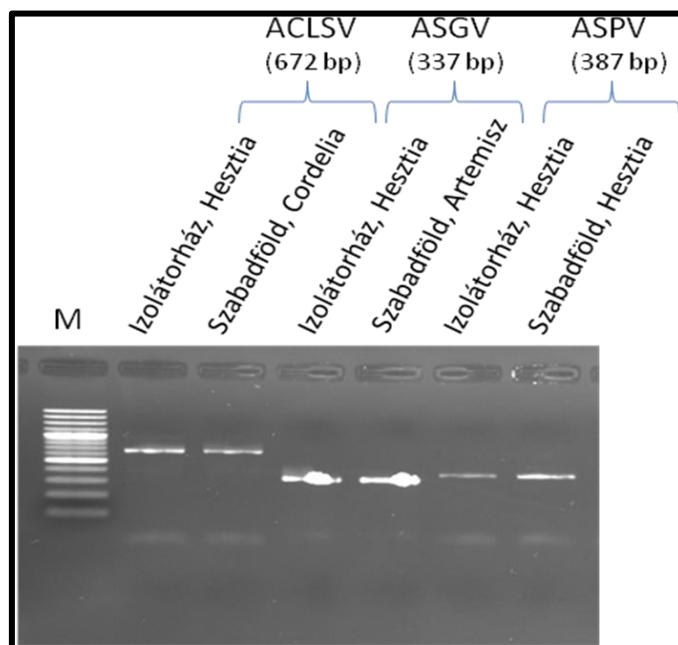
A 7. táblázatban összesítettem az általam feldolgozott növényi mintákból kapott PCR eredményeket. Ezen minták mindegyikén duplex-PCR-rel végeztem el a vírusdiagnosztikát, és az egyes vírusokra kapott pozitív eredményeket a megfelelő cellák piros kitöltésével jeleztem. Ahol a termék jelenléte nem volt egyértelmű, a cellát fehérén hagytam. A táblázatban tehát csak azon minták vannak pirosan jelölve, melyek biztosan pozitívak az adott vírusra. Sajnos az eredmények alapján megállapítható, hogy az általam vizsgált mintavételi helyeken több vírus is előfordul. A gödöllői Öreg Vackor esetében érdekesség, hogy a négy vírus egyike sem jelent meg a PCR termékek gélképén. Ez azzal magyarázható, hogy a természetben a vackorfa ivaros szaporodása során kiküszöböli a szülői egyedekben levő vírusok átvitelét az utódra. Ezzel szemben fajtanemesítéskor, a vegetatív szaporítás miatt, ha az anyató fertőzött volt, a vírusok átkerülnek az utódokba.

7. táblázat Alma minták vírusdiagnosztikája duplex-PCR-rel az almát fertőző négy leggyakoribb vírusra

| Alma minták neve |                             | PCR vírusspecifikus primerekkel |      |      |      |
|------------------|-----------------------------|---------------------------------|------|------|------|
|                  |                             | ACLSV                           | ASPV | ASGV | APMV |
| Termő ültetvény  | Soroksár, MT-12 44.fá       |                                 |      |      |      |
|                  | Soroksár, MT-12 II_6        |                                 |      |      |      |
|                  | Soroksár, 13_2              |                                 |      |      |      |
|                  | Újfehértó, bio tábla        |                                 |      |      |      |
|                  | Újfehértó, rezisztens tábla |                                 |      |      |      |
|                  | Vámosmikola, Golden D       |                                 |      |      |      |
|                  | Vámosmikola, Jonagold       |                                 |      |      |      |
|                  | Vámosmikola, Idared         |                                 |      |      |      |
|                  | Zalaszentő, "Fuji"          |                                 |      |      |      |
|                  | Breznán, Golden D           |                                 |      |      |      |
|                  | Tamási, Szarkahegy          |                                 |      |      |      |
|                  | Újfehértó, Freedom          |                                 |      |      |      |
|                  | Gödöllő, Öreg Vackor        |                                 |      |      |      |
| Fajtajelöltek    | Rosmerta_izolátorház        |                                 |      |      |      |
|                  | Hesztia_izolátorház         |                                 |      |      |      |
|                  | Artemisz_izolátorház        |                                 |      |      |      |
|                  | Cordelia_izolátorház        |                                 |      |      |      |
|                  | Rosmerta_szabadföld         |                                 |      |      |      |
|                  | Hesztia_szabadföld          |                                 |      |      |      |
|                  | Artemisz_szabadföld         |                                 |      |      |      |
|                  | Cordelia_szabadföld         |                                 |      |      |      |

A PCR tesztek alapján általánosan elmondható, hogy ha az adott vírusra a fajtajelölt az izolátorházban pozitív volt, akkor a szabadföldi is (ez alól az egyetlen kivétel az Artemisz fajtajelölt, aminek csak az izolátorházban található mintája pozitív az ACLSV-re). Néhány esetben a szabadföldi minta vírusfertőzést mutatott, míg az izolátorházban nevelt fa nem, ekkor a fertőzés valószínűleg a szabadföldre való kiültetést követően történt: Rosmerta esetén mind a négy vírusra, míg az Artemisznél ASGV-re, APMV-re, illetve a Cordeliánál APMV-re. Ahol az izolátorházban, és szabadföldön is ugyanarra a vírusra való fertőzöttséget mutat a PCR-teszt, ott feltételezhetően a fa már az izolátorházban fertőzött volt és később így ültették ki őket szabadföldre. A továbbiakban ezt a kérdést a vírusok rokonsági viszonyának megállapításával vizsgáltam tovább.

A PCR-tesztek alapján fertőzöttnek bizonyult alma minták egy részéből - melyeket a filogenetikai elemzésbe be szerettem volna vonni- egyedi PCR reakciók során amplifikáltam az adott vírusok egy-egy darabját. A 21. ábrán látható ezek közül néhány.



*21. ábra Izolátorházas Hesztia és szabadföldi Cordelia ACLSV vírusprimerekkel végzett egyedi PCR-ének, izolátorházas Hesztia és szabadföldi Artemisz ASGV primerekkel végzett egyedi PCR-ének, és az utolsó két oszlopban izolátorházas Hesztia és szabadföldi Hesztia*

Ezeket a mintákat DNS-termék tisztítása után megszekvenáltattam a BIOMI Kft.-vel. A visszakapott szekvenciákat a Clustal Omega illesztőprogrammal hasonlítottam össze az ACLSV, az ASPV és az ASGV vírusok esetében. A Clustal Omega többszörös illesztéssel (Multiple Sequence Alignment, MSA) dolgozik, mely módszernél a vizsgálatba belevontam a vírusprimerek tervezésekor használt, NCBI szekvencia adatbázisban talált további törzsek szekvenciáját, illetve ahol már elkészült, ott a termőültetvényekről felsokszorozott vírus darabok bázissorrendjét is. Illesztéskor a program filogenetikai fát is készít, mely alapján a törzsek rokonsági viszonyai demonstrálhatók. Ezek alapján szerettem volna megtalálni a választ arra a kérdésre, hogy vajon a szabadföldi fajtajelöltek kiültetés után fertőződhetek meg, vagy a vírusmentesítési folyamat nem volt tökéletes és már az izolátorházban is vírusosak voltak.

A filogenetikai fák Hesztia fajtajelölt almafák esetén mindhárom vizsgált vírusnál azt mutatják (Függelék 5., 6. és 7. ábrái), hogy az izolátorházas és szabadföldi minták vírusai együtt

clustereződnek. Ugyanez elmondható, ha a Cordelia fajtajöltet nézzük ASPV vírusra (Függelék 7. ábra).

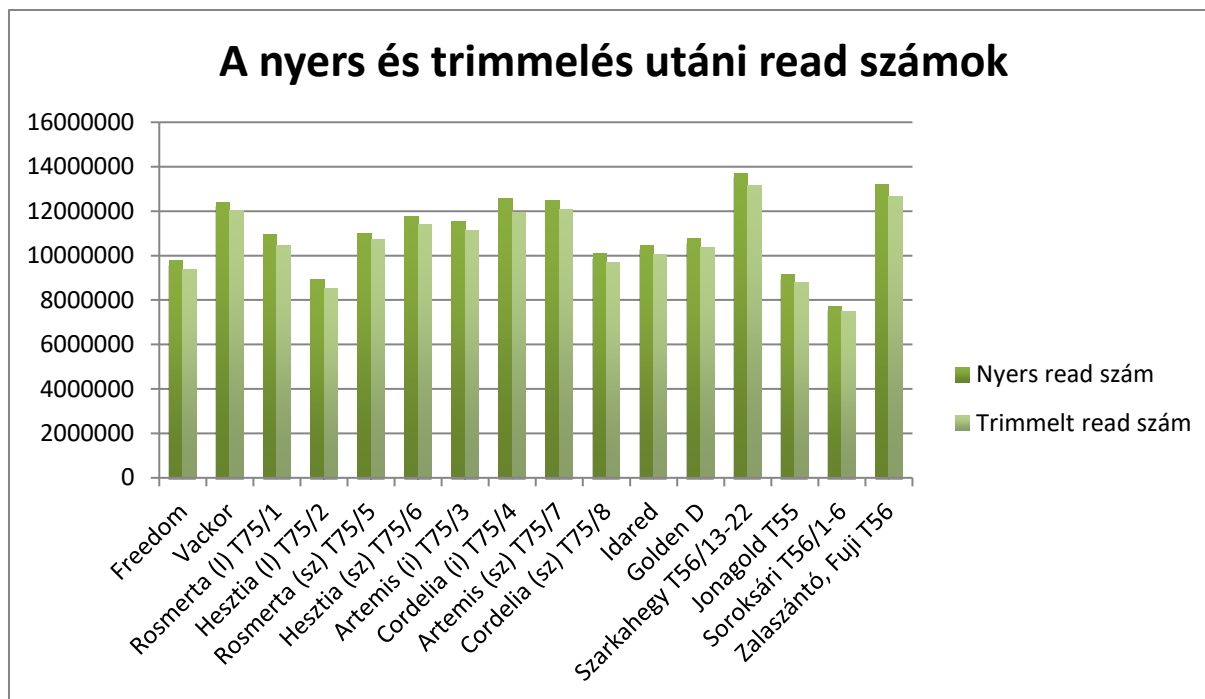
Ezek az eredmények tovább erősítik a feltételezést, hogy több esetben az izolátorházban már fertőzött fákat ültették ki szabadföldre, és már a vírusmentesítési folyamat sem volt kellően hatékony, illetve az azt segítő vírusdiagnosztikai eljárás nem volt megfelelően érzékeny. Hatékony diagnosztikai módszert alkalmazva az izolátorházas törzsállományból a vírusfertőzött fák már nem kerülhettek volna szabadföldre fajtajelöltként.

#### **4.5. A kisRNS könyvtárak szekvenciáinak bioinformatikai elemzése**

Az alma mintákból kisRNS könyvtárat készítve a könyvtár a levélmintánkban található összes kisRNS-t tartalmazni fogja, tehát nem csupán a növény endogén szabályozó kisRNS-eit, hanem az almát fertőző RNS vírusok ellen a növény védekezőrendszere az RNS interferencia során keletkező kisRNS-eket is. Az alma mintákból készített kisRNS-könyvtárak bázissorrendjének meghatározására nagy áteresztőképességű Illumina szekvenálást használtam, majd a kapott adatokat bioinformatikai módszerekkel elemeztem. Ily módon átfogó képet kaphatok a mintáimban előforduló vírusokról, viroidokról, eddig még ismeretlen kórokozókról (Visser és mtsai, 2014), (Adams és mtsai, 2009), és tovább vizsgálhatom a fajtajelöltek vírusfertőzöttségének okát. Az elemzések során kidolgozott „pipeline” pedig reményeink szerint optimalizálható lesz a vírusmentesítési protokollok folyamatos tesztelésére, így hatékonyabbá tételére.

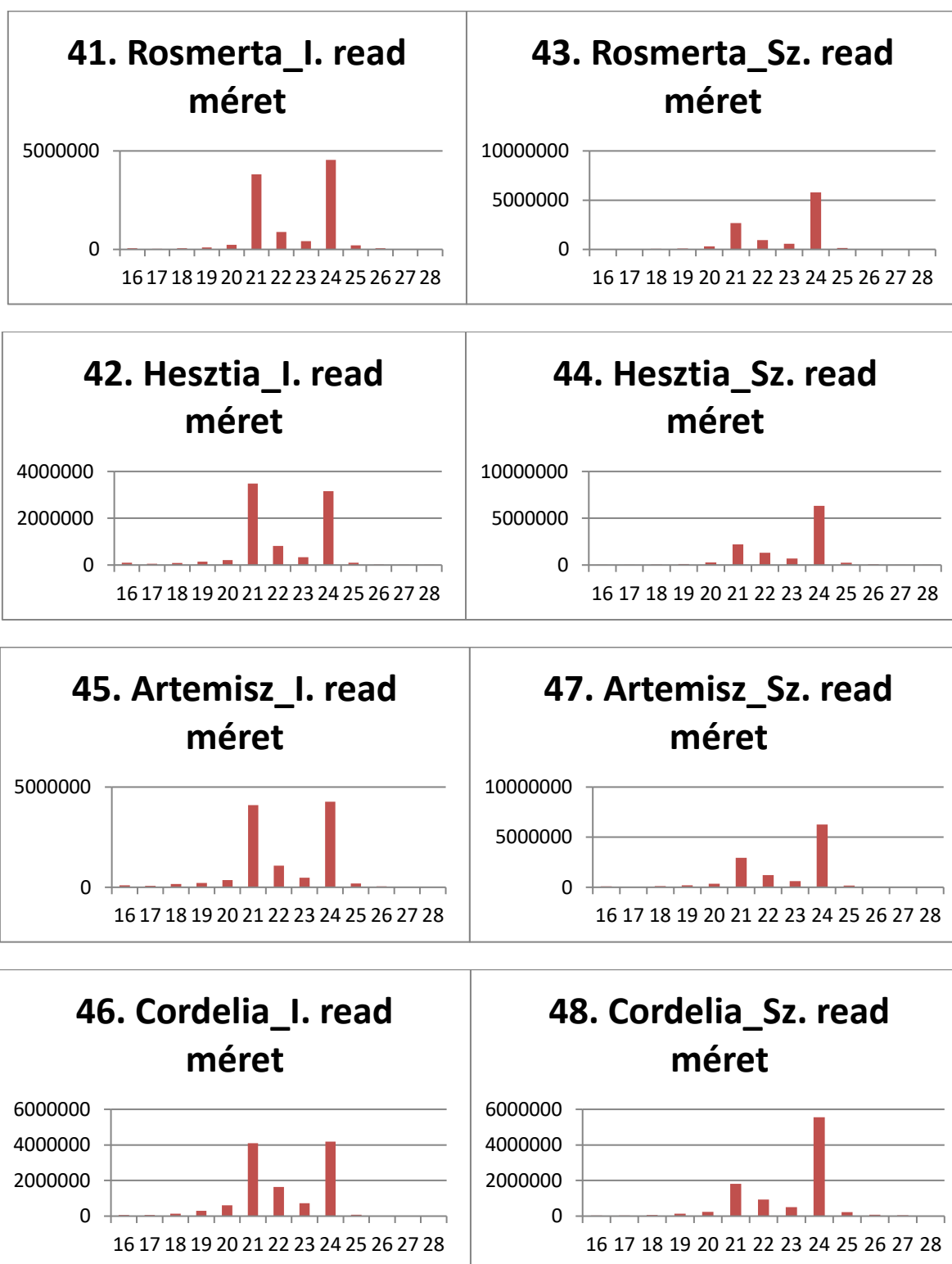
A könyvtárak szekvenciáit először trimmeltük, tehát eltávolítottuk az adaptereket a szekvenciavégekről. Így a kisRNS szekvenciák hossza már vélhetően megegyezik a növényben levő kisRNS-ekével. Ellenőrzésképpen összevetettük a nyers és a trimmelt readok számát (22. ábra). A diagramról leolvasható, hogy a trimmelés után a további munkára alkalmas readok száma könyvtáranként 8-14 millió, ami megfelelő.





22. ábra Trimmelés előtti és utáni read számok összehasonlítása

Következő lépésként megvizsgáltuk a kisRNS-ek méret szerinti eloszlását. A különböző fajtajelöltek izolátorházból és szabadföldről szedett mintáinak kisRNS méreteloszlását összehasonlítva azt találtuk, hogy az izolátorházban nevelt fák mintáinak esetében a 21-22 nukleotid hosszú kisRNS-ek aránya mindig sokkal nagyobb volt, mint a szabadföldi minták esetében (23. ábra). Ennek a jelenségnek a magyarázata az RNS interferencia hőmérséklet függésében kereshető. Az izolátorházakban melegebb a klíma, aminek a hatására a növényekben fokozódik az antivirális silencing mértéke (Chellappan és mtsai, 2005) (Romon és mtsai, 2013) (Szittyá és mtsai, 2003). E folyamatban ugyanis a 21 és 22 nukleotid hosszúságúra vágó Dicerek ( a DCL4 és DCL2) aktívak (Parent és mtsai, 2012).



23. ábra Fajtajelölt könyvtárak read-méret szerinti összehasonlítása

| Zalaszántó, Fuji |                           |                                       | Artemisz, izolátorház |                           |                                       | Artemisz, szabadföld |                           |                                       |
|------------------|---------------------------|---------------------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Sorrend          | Illeszkedő szekvenciaszám | Referencia genom neve                 | Sorrend               | Illeszkedő szekvenciaszám | Referencia genom neve                 | Sorrend              | Illeszkedő szekvenciaszám | Referencia genom neve                 |
| 1                | 21416                     | Citrus_yellow_mosaic_virus            | 1                     | 57013                     | Citrus_yellow_mosaic_virus            | 1                    | 53532                     | Citrus_yellow_mosaic_virus            |
| 2                | 23596                     | Cucumber_mosaic_virus_isolate         | 2                     | 12542                     | Apple_stem_grooving_virus             | 2                    | 13514                     | Apple_stem_grooving_virus             |
| 3                | 10155                     | Apple_stem_grooving_virus             | 3                     | 8118                      | Cucumber_mosaic_virus_isolate         | 3                    | 7440                      | Cucumber_mosaic_virus_isolate         |
| 4                | 7389                      | Grapevine_leafroll-associated_virus_1 | 4                     | 5214                      | Broad_bean_stain_virus                | 4                    | 3321                      | Grapevine_leafroll-associated_virus_1 |
| 5                | 2589                      | Apple_chlorotic_leaf_spot             | 5                     | 4599                      | Grapevine_leafroll-associated_virus_1 | 5                    | 3009                      | Broad_bean_stain_virus                |
| 6                | 2847                      | Apple_mosaic_virus_isolate            | 6                     | 3679                      | Apple_chlorotic_leaf_spot             | 6                    | 2696                      | Southern_bean_mosaic_virus            |
| 7                | 2144                      | Northern_cereal_mosaic_virus          | 7                     | 2665                      | Maize_yellow_dwarf_virus-RMV          | 7                    | 1075                      | Maize_yellow_dwarf_virus-RMV          |
| 8                | 1869                      | Avocado_sunblotch_viroid_isolate      | 8                     | 1575                      | Northern_cereal_mosaic_virus          | 8                    | 1069                      | Wheat_streak_mosaic_virus             |
| 9                | 1866                      | Broad_bean_stain_virus                | 9                     | 1397                      | Apple_stem_pitting_virus              | 9                    | 907                       | Northern_cereal_mosaic_virus          |
| 10               | 1726                      | Apple_mosaic_virus_partial            | 10                    | 1097                      | Avocado_sunblotch_viroid_isolate      | 10                   | 773                       | Avocado_sunblotch_viroid_isolate      |
| 11               | 1461                      | Apple_mosaic_virus_MP                 | 11                    | 857                       | Wheat_stripe_mosaic_virus             | 11                   | 747                       | Barley_stripe_mosaic_virus            |
| 12               | 1335                      | Mesta_yellow_vein_mosaic              | 12                    | 853                       | Southern_bean_mosaic_virus            | 12                   | 656                       | Red_clover_necrotic_mosaic            |
| 13               | 1244                      | Barley_stripe_mosaic_virus            | 13                    | 843                       | Red_clover_necrotic_mosaic            | 13                   | 606                       | Apple_stem_pitting_virus              |
| 14               | 1039                      | Wheat_streak_mosaic_virus             | 14                    | 764                       | Turnip_mosaic_virus_gene              | 14                   | 573                       | Turnip_mosaic_virus_gene              |
| 15               | 957                       | Apple_mosaic_virus_RNA                | 15                    | 583                       | Tomato_leaf_curl_virus                | 15                   | 519                       | Cherry_leaf_roll_virus                |
| 16               | 809                       | Apple_stem_pitting_virus              | 16                    | 572                       | Tomato_leaf_curl_virus-associated     | 16                   | 474                       | Tomato_leaf_curl_virus                |
| 17               | 741                       | Apple_mosaic_virus_CP                 | 17                    | 526                       | Rice_stripe_virus_isolate             | 17                   | 454                       | Tomato_leaf_curl_virus-associated     |
| 18               | 605                       | Apple_mosaic_virus_Met                | 18                    | 420                       | Citrus_tatter_leaf_virus              | 18                   | 449                       | Rice_stripe_virus_isolate             |
| 19               | 548                       | Apple_mosaic_virus_MP                 | 19                    | 393                       | Barley_stripe_mosaic_virus            | 19                   | 401                       | Grapevine_leafroll-associated_virus_5 |
| 20               | 486                       | Apple_mosaic_virus_segment            | 20                    | 387                       | Mesta_yellow_vein_mosaic              | 20                   | 399                       | Citrus_tatter_leaf_virus              |

A Velvet program segítségével a trimmelt read-eket 13, illetve 15 nukleotidos átfedő részszekvenciák alapján nagyobb, összefüggő szakaszokká, ún. kontigokká próbáltuk összeilleszteni. A kapott kontigokat illesztettük a vírusok szekvencia adatbázisára- és így módon is készítettünk egy találati listát.

A vírus találati lista és a Velvettel kapott eredményeim alapján a további munkámhoz kiválasztottam a leggyakoribbak közül 20 vírust, melyekre a legtöbb kisRNS read illeszkedett a mintákban és az ezekre kapott eredményeimet egy táblázatban foglaltam össze. Ez a 20 vírus tartalmazta azt a 4 alma vírust, melyekre kötelező szűréseket végezni fajtanemesítéskor.

A Függelék 8. ábrájának összegző táblázata tartalmazza a Velvet programmal kapott eredményeket a 20 általam választott vírusra. A program 19 esetben tudott felépíteni vírusgenomokat.

Zöld háttérrel emeltem ki minden könyvtárnál azokat a vírusokat, melyekre PCR-teszttel pozitív eredményt kaptam. Ezen kívül a táblázatból leolvasható, hogy az egyes vírusokra nézve mennyi volt a könyvtárakban az összes readek száma. Minden könyvtárra van millió read-re normált érték is számolva, ami az összehasonlítást segíti: ez a vírus könyvtárra vonatkozó összread-számának és trimmelést követő read-számának hányadosa, szorozva millióval.

A kisRNS szekvenálással és a PCR-el kapott eredmények között láthatók eltérések. Abban az egy esetben (Freedom,-ACLSV), mikor a read-ek alapján a Velvet programnak sikerült kontigokat építenie és a PCR mégse mutatta ki a fertőzést, valószínű, hogy a mintánkban levő vírusvariáns szekvenciája eltérhet attól a referenciagenom-részlettől, melyre a primert terveztem, így azok nem tudtak kitapadni a cDNS-hez. Ennek viszont a fordítottja gyakrabban figyelhető meg, nevezetesen hogy a PCR kimutatta a fertőzést, viszont a kisRNS szekvenálás eredményei ezt nem támasztják alá (mind a négy kötelezően tesztelendő vírus esetében találtam ilyet, pl. ASGV-Rosmerta szabadföld). Lehetséges, hogy ez az eredmények közti eltérés is a szekvencia adatbázis és a mintáimban rejlő vírusvariánsok szekvencia különbségeire vezethető vissza. Méretüknél fogva, ha a szekvenálás után visszakapott readek eltéréseket mutatnak az adatbázis szekvenciáival, akkor illesztéssel nem lehet megtalálni ezeket a read-eket. Másrészt az is lehetséges, hogy a mintán belül megtalálhatóak egy vírus különböző variánsai, és a Velvet program ebből kifolyólag nem tudott kontigokat felépíteni belőlük.

A legnagyobb kisRNS read-számot az RLMV vírusra kaptam. Ezt a kórokozót almafákon eddig még nem írták le, és bár a Velvet program nem tudott összerakni a róla genomot a readszekvenciák alapján, ennek a vírusnak a read-száma kimagaslóan nagy volt minden könyvtár esetében. A továbbiakban szerettem volna kideríteni, vajon valóban

megtalálható-e alma mintáinkban az RLMV, vagy esetleg a növény valamely RNS-én található az RLMV-éhez hasonló szekvencia.

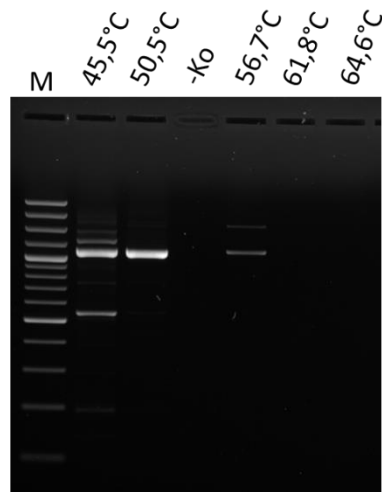
#### **4.6. Újgenerációs szekvenálással kapott vírusok jelenlétének visszaigazolása PCR alapú módszerrel**

A bioinformatikai elemzések során a vizsgált 20 vírusra egy-egy fasta formátumú, az adott könyvtár kisRNS-einek szekvenciáját tartalmazó ún. SAMtools fájlt is generáltunk. Ennek hossza megegyezik az adott vírussal, de csak azokban a pozíciókban tartalmaz N-től eltérő nukleotid jelölést, ahol illeszkedő kisRNS read-et találunk. Így ez a fájl nagyon jól használható olyan vírusspecifikus primerek tervezésére, melyek a mintáinkba jelenlevő vírusvariánsra specifikusak.

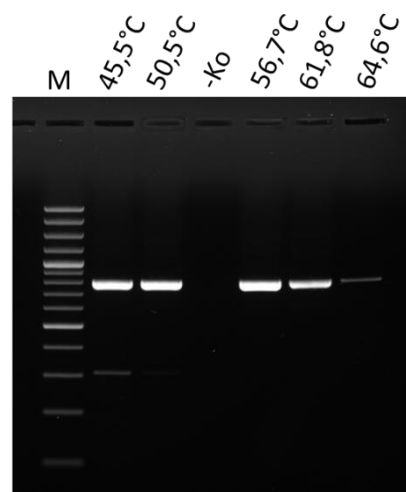
Az RLMV tesztelésére, további PCR-reakcióhoz a vírusra specifikus primereket terveztem a kisRNS szekvenálás adataiból generált speciális SAMtools fájlok felhasználásával. A legtöbb RLMV read-et tartalmazó könyvtárak (Zalaszentő, Fuji; Rosmerta izolátorház és Rosmerta szabadföld) SAMtools fájljait illesztettem a vírus referencia genomjához és ha volt, akkor a nagyfokú illeszkedést mutató szekvencia szakaszokra primereket terveztem. A specifikus vírusprimerek hozzáadásával PCR-reakciót mértem össze. A PCR termékeket gélből tisztítottam, majd szekvenáltatni küldtem, hogy a kapott szekvenciákat később Clustal Omegával RLMV referenciagenomra illesztve kiderítsem, az amplifikált PCR-termék a vírus egy darabja-e. A kutatás jelenlegi fázisában, a szekvenálás eredményét várjuk.

Gödöllőn, Diagnosztikai csoportunk csonthéjas gyümölcsfákon (szilván, őszibarackon és kajszin) is végzi ugyanazokat a kutatásokat, melyeket én almafákra a szakdolgozatomban leírtam. Munkatársaim csonthéjas gyümölcsfák kisRNS könyvtárait elkészítették, majd azok szekvenciáit hasonló bioinformatikai módszerekkel elemeztük, mint alma könyvtárait. A csonthéjas gyümölcsfák esetében is volt olyan, eddig csonthéjasokról még le nem írt vírus, melyet (az RLMV-hez hasonlóan) újgenerációs szekvenálás segítségével sikerült kimutatnunk. Ez a kórokozó a cseresznye aprógyümölcsűség vírus (Little Cherry Virus 1, LChV-1). Mintáinkból RT-PCR alapú módszerrel, illetve a mintáinkban talált LChV-1 variánsok köpenyfehérjét, ill. Hsp70 fehérjét kódoló genom részeire tervezett specifikus primerek segítségével sikerült igazolni, hogy az újgenerációs szekvenálással kimutatott LChV-1 cseresznyevírust csonthéjas mintáink valóban tartalmazzák (26. ábra).

LChV-1 genom köpenyfehérjét  
kódoló részére tervezett primerek



LChV-1 genom Hsp70-t kódoló  
részére tervezett primerek



26. ábra Újgenerációs szekvenálással ilyen módon bizonyítottan megtalálhatók olyan vírusok is, melyeket az adott növényről korábban még nem írtak le.

## 5. Összefoglaló

Haszonnövényeink a vírusok állandó támadásainak vannak kitéve, melyek ellen növényvédő szerekkel nem védekezhetünk. Gyümölcsfáink szaporítása a fajtafenntartás miatt vegetatívan történik, így ha az anyató fertőzött a vírus könnyen továbbvihető a szaporítóanyaggal. Magyarországon az almafák törzsültetvényeinek létrehozása előtt éppen ezért kötelező az anyanövények vizsgálata, és mentesítése a gyümölcsösöket fertőző RNS vírusokra.

Célom az volt, hogy olyan RT-PCR alapú módszert dolgozzak ki, melynek segítségével minél hatékonyabban, olcsóbban és gyorsabban lehet a kötelezően tesztelendő vírusokat diagnosztizálni az almafákból vett mintákból.

Munkámat azzal kezdtem, hogy az almára optimalizáltam egy RNS-kivonási eljárást, majd a tisztított RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t készítettem. A cDNS minőségét aktin primerekkel végzett PCR reakcióval ellenőriztem. Az alma vírusok kimutatásához az NCBI adatbázisban található vírusszekvenciák összehasonlítása alapján terveztem primereket. Gradiens PCR eljárással megkerestem a vírusprimerek működéséhez leginkább megfelelő hőmérsékletet, majd a specifikus primereket különböző kombinációkban is teszteltem. Ebből kiderült, hogy az almákat fertőző 4 vírus detektálására a duplex PCR jól használható módszer, így mintáim diagnosztikai kiértékelésére is ezt használtam. A különböző mintákból szintetizált PCR termékek bázissorrendjét DNS-tisztítás után határoztattam meg. A kapott szekvenciák alapján Clustal Omega programmal elvégeztem az egyes vírustörzsek szekvenciáinak összehasonlítását, és ez alapján vizsgáltam leszármazási viszonyait. A levélmintákból tisztított totál RNS frakciókból, melyekben a növényi gazda-RNS-en kívül az esetleges kórokozók RNS-ei is megtalálhatók, kisRNS könyvtárakat készítettem. A kisRNS-ek bázissorrendjét Illumina szekvenálással határoztuk meg. Ez a módszer lehetőséget ad akár új, eddig ismeretlen vírusok megtalálására, elemzésére. A kapott szekvenciaadatok alapján bioinformatikai módszerekkel a vírusgenomra lefedettségi ábrát, illetve vírus találati listát készítettem. A találati listákban a vírusok némelyikét almából korábban még nem írták le. Ezért saját mintáink szekvencia-adatai alapján egy ilyen vírusra specifikus primereket készítettem, melyek használatával PCR reakció során szeretném alma mintáinkból ezen vírust detektálni.

A fentiekben kidolgozott duplex PCR eljárás a vírusok szűrésének az általánosan használt ELISA módszernél hatékonyabb, és specifikusabb módja, mellyel almafáink a kötelezően

tesztelendő vírusok jelenlétére vizsgálhatóak. A PCR termékek bázissorrendjének összehasonlítása lehetővé tette a vizsgált vírusok különböző törzseinek elemzését is.

## 6. Summary

Our crop plants are exposed to permanent attack of viruses and against these plant protection methods are incapable to defend. Propagation of fruit trees is made in a vegetative way because of maintenance of species – if mother plant is infected, the virus can spread by the propagation material. That's why in Hungary, during foundation of apple stock nurseries, it's obligatory to examine mother plants for the presence of the most widespread viruses and use curative treatments to achieve virus free plant material

The aim of my research was to elaborate a diagnostic method based on RT-PCR reaction, in order to test the presence of these viruses efficiently, in a cheap and fast assay and to get a picture about the state of viral infection of Hungarian apple plantations.

My work started with the optimization of an RNA extraction method for apple. The extracted RNA was used to synthesize cDNA using reverse transcription. Quality of cDNA was tested by PCR reaction made with apple specific actin primers. To detect apple viruses, primers were designed based on the comparison of virus sequences present in NCBI database. Optimum annealing temperature of virus primers were determined by gradient PCR test, primer pairs were tested both individually and in combinations. Becoming evident that duplex PCR is a suitable method to detect apple viruses I used it on my samples for diagnostic evaluation. PCR products synthesized from different samples were purified and their sequence was determined. Alignments of virus sequences from different samples were investigated by Clustal Omega program to reveal their lineage relationship. I prepared siRNA-libraries using total RNA fractions purified from leaf samples. These RNA fractions can easily contain RNAs not only from the host plant but also from pathogens. Sequence of siRNAs was determined by Illumina sequencing method that can give us a possibility to identify total viral pathogens from our samples, and even to find and analyse new, unknown viruses. Based on the received sequence data I made viral genome coverage-figures and virus hit list by using bioinformatics methods. Some viruses of the hit lists have not been described previously from apple. Thus, based on sequence data of our samples, I designed specific primers for such a virus. In PCR reaction (with applying the new designed primers) I wanted to detect this virus from my apple samples.



According to my results duplex-PCR is an appropriate virus diagnostic method –more efficient and more specific than ELISA, and suitable for testing our apple trees for the presence of known viruses. The generated PCR product can serve as a base for analysis of different strains of examined viruses.

## 7. Függelék



1. ábra Az NCBI adatbázisban található 6 ASPV vírus szekvenciájának illesztése CLUSTAL Omega programmal (részlet), jelölve az irodalomban használt és az általam tervezett primereket.





Apple stem grooving virus, Referencia:AB004063  
Oligo tervezés

Sense:

asgv6021s: GAATTGAAAACCTTTGCTGCCAC

|            |                                                              |
|------------|--------------------------------------------------------------|
| JX080201.1 | CGACCTGTCAAATGTTGTACCCGAATTGAAAACCTTTTCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC |
| HE978837.1 | CGACCTGTCAAATGTTGTACCCGAATTGAAAACCTTTTCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC |
| AB004063.1 | CGACTTGTCAAATGTTGTACCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC |
| D14995.2   | CGATTGTCAAATGTTGTTCCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC  |
| JN701424.1 | CGACTTGTCAAATGTCGTGCCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC |
| JQ308181.1 | CGACTTGTCAAATGTCGTACCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC |
|            | *** ***** ** ** ***** ***** ***** *****                      |

|            |                                                             |
|------------|-------------------------------------------------------------|
| JX080201.1 | TTTGAACGAATGTACGTTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTGCTGATTTGGCTCGGGAATT |
| HE978837.1 | TTTGAACGAATGTACGTTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTGCTGATTTGGCTCGGGAATT |
| AB004063.1 | TTTGAATGAATGTACATTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTGCTGATTTGGCCCGTGAGTT |
| D14995.2   | TTTGAACGAATGTACGTTCAGAAAGCTTTGCGAGCCATTGCTGATTTGGCTCGGGAATT |
| JN701424.1 | TTTGAACGAATGTACGTTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTGCTGATTTGGCTCGTGAAAT |
| JQ308181.1 | TTTGAACGAATGTACGTTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTGCTGATTTGGCTCGTGAAAT |
|            | ***** ***** ,***** ,***** ***** ***** ** ** ***** ** ** ,** |

Antisense:

asgv6358as: GACTYCTAACCTCCAGTTCAG

CTGGAAGTGGAGGGTTAGTCT reverz komplementere: GACTYCTAACCTCCAGTTCAG

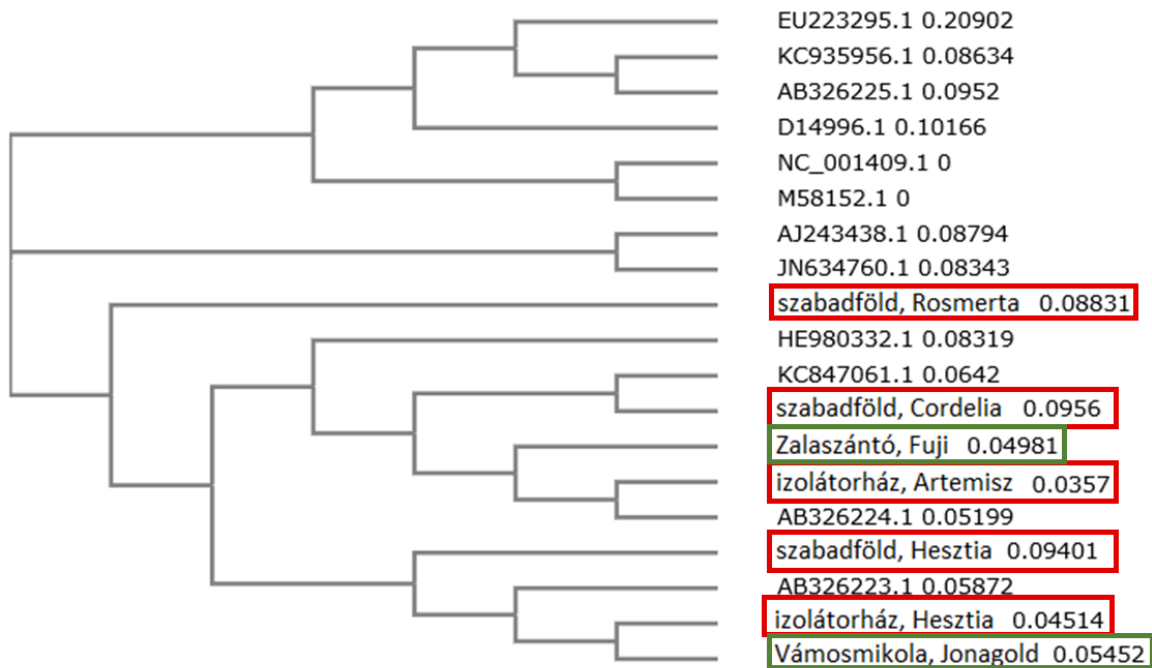
|            |                                                               |
|------------|---------------------------------------------------------------|
| JX080201.1 | AACGCCTGATGAAAAACAGGTAAATAGACAGAACTAAGAGGCTTTTTCGTACTGAAGG    |
| HE978837.1 | AACGCCTGATGAAAAACAGGTAAATAGACAGAACTAAGAGGCTTTTTCGTACTGAAGG    |
| AB004063.1 | AACACCTGATGAGAAACAGGTGATCGACAGGATGACCAAAAGGCTTTTTCGTACTGAAGG  |
| D14995.2   | AACACCTGATGAGAAACAGGTGATTGATAGAAATGACCAAAAGACTTTTTCGTACTGAAGG |
| JN701424.1 | AACACCTGATGAAAAGCAGGTGATTGATAGGATGACCAAGAGGCTTTTTCGCACTGAAGG  |
| JQ308181.1 | AACACCTGATGAAAAACAGGTGATTGATAGGATGACCAAAAGGCTTTTTCGTACTGAAGG  |
|            | *** ,***** ,** ,***** ,** ** ** ,***** ** ,** ,***** *****    |

|            |                                                            |
|------------|------------------------------------------------------------|
| JX080201.1 | ACAAAAGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCGGAGAGCAATCTGGAAGTGGAGGGTTAGTCT  |
| HE978837.1 | ACAAAAGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCGGAGAGCAATCTGGAAGTGGAGGGTTAGTCT  |
| AB004063.1 | ACAAAAGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCGGAGAGTAACTGGAAGTGGAGGGTTAGGAGTC |
| D14995.2   | ACAAAAGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCGGAGAGTAACTGGAAGTGGAGGGTTAGGAGTC |
| JN701424.1 | ACAAAAGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCGGAGAGTAACTGGAAGTGGAGGGTTAGGAGTC |
| JQ308181.1 | ACAAAAGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCAGAGAGTAACTGGAAGTGGAGGGTTAGTCT   |
|            | ***** ,***** ,***** ,** ** ** ***** ***** ***** ,****      |

4. ábra Az NCBI adatbázisban található 6 ASGV vírus szekvenciájának illesztése CLUSTAL Omega programmal (részlet), jelölve az irodalomban használt és az általam tervezett primereket.

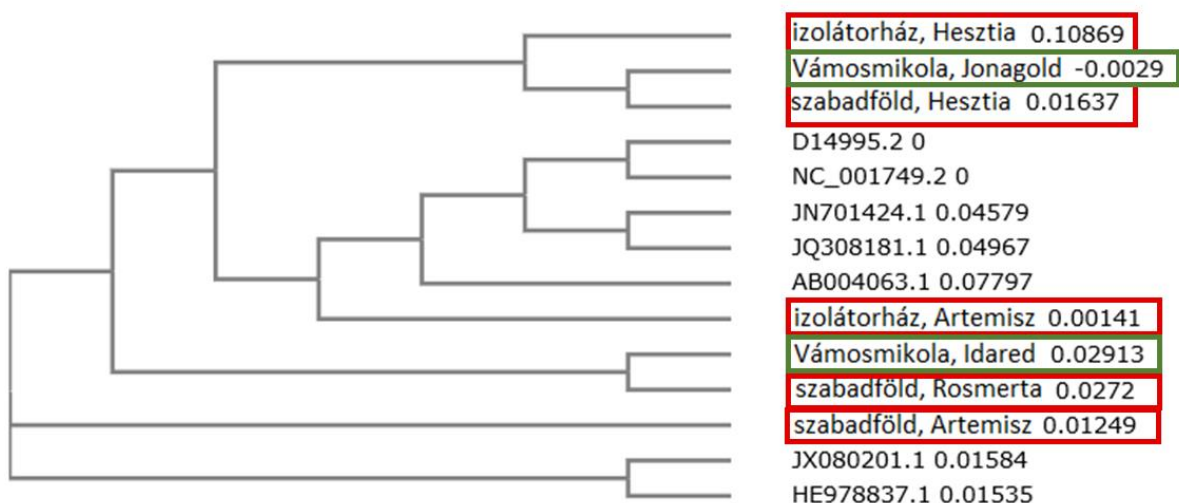


## Phylogram - ACLSV



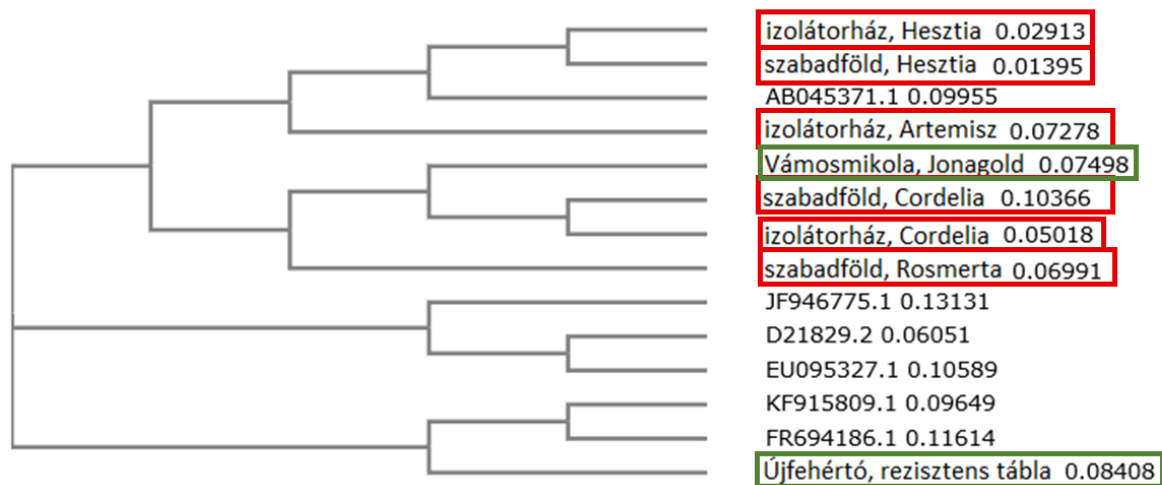
5. ábra Az ACLSV vírus különböző mintagyűjtési helyeken megtalált variánsainak filogenetikai összehasonlítása (ahol a fajtajelölteket pirosan, míg a termőültetvények mintáit zölden jelöltem).

## Phylogram - ASGV



6. ábra Az ASGV vírus különböző mintagyűjtési helyeken megtalált variánsainak filogenetikai összehasonlítása (ahol a fajtajelölteket pirosan, míg a termőültetvények mintáit zölden jelöltem).

## Phylogram - ASPV



7. ábra Az ASPV vírus különböző mintagyűjtési helyeken megtalált variánsainak filogenetikai összehasonlítása (ahol a fajtajelölteket pirosan, míg a termőültetvények mintáit zölden jelöltem).

| Név                  |               | ACGV    | AGGV   | ASGV   | APMV3   | APMV1  | ASGV   | APV    | APMV2  | APPCGV | PGV    | CMV    | RAV     | BVAV  | GLAV  | CV     | GLAV   | RAV   | LCV   |
|----------------------|---------------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|
| Idared               | v13           |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | v15           |         |        |        |         |        | 1      |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | b             |         |        |        |         |        | 718    |        |        |        |        |        |         | 145   | 175   | 138    | 148    | 130   | 125   |
| 10473770             | read/PCR      | 884     | 97     | 158    | 14      | 24     | 4623   | 121    | 51     | 470    | 92     | 93     | 12331   | 362   | 247   | 1418   | 1066   | 268   | 308   |
|                      | read/ million | 84,40   | 9,26   | 15,09  | 1,34    | 2,29   | 441,39 | 11,55  | 4,87   | 44,87  | 8,78   | 8,88   | 1177,32 | 34,56 | 23,58 | 135,39 | 101,78 | 25,59 | 29,41 |
| Golden D             | v13           |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | v15           |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | b             |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
| 10752678             | read/PCR      | 1117    | 113    | 155    | 31      | 45     | 126    | 86     | 40     | 113    | 93     | 71     | 12523   | 254   | 247   | 1764   | 1928   | 251   | 352   |
|                      | read/million  | 103,88  | 10,51  | 14,42  | 2,88    | 4,19   | 11,72  | 8,00   | 3,72   | 10,51  | 8,65   | 6,60   | 1164,64 | 23,62 | 22,97 | 164,05 | 179,30 | 23,34 | 32,74 |
| Freedom              | v13           |         |        |        |         |        | 1      |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | v15           | 1       |        |        |         |        | 1      |        |        |        |        |        | 1       |       |       |        |        |       |       |
|                      | b             | 2196    | 661    | 736    |         |        | 994    | 432    |        | 514    | 433    | 336    | 286     | 283   | 273   | 270    | 266    | 261   | 260   |
| 9764379              | read/PCR      | 16929   | 1370   | 1502   | 47      | 139    | 9595   | 742    | 76     | 1975   | 1647   | 1006   | 12100   | 502   | 439   | 3278   | 1919   | 812   | 811   |
|                      | read/million  | 1733,75 | 140,31 | 153,82 | 4,81    | 14,24  | 982,65 | 75,99  | 7,78   | 202,27 | 168,67 | 103,03 | 1239,20 | 51,41 | 44,96 | 335,71 | 196,53 | 83,16 | 83,06 |
| Vackor               | v13           |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | v15           |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | b             |         |        | 100    |         |        |        | 106    |        |        |        |        |         | 189   | 199   | 200    | 186    | 179   | 214   |
| 12397265             | read/PCR      | 205     | 395    | 157    | 37      | 94     | 189    | 178    | 50     | 139    | 207    | 203    | 6167    | 379   | 443   | 2873   | 846    | 620   | 425   |
|                      | read/million  | 16,54   | 31,86  | 12,66  | 2,98    | 7,58   | 15,25  | 14,36  | 4,03   | 11,21  | 16,70  | 16,37  | 497,45  | 30,57 | 35,73 | 231,74 | 68,24  | 50,01 | 34,28 |
| Szarkahegy T56/13-2  | v13           |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | v15           |         |        |        |         |        | 1      |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | b             |         |        |        |         |        | 731    |        |        |        |        |        |         | 107   |       | 108    | 108    | 104   | 115   |
| 13702704             | read/PCR      | 90      | 99     | 89     | 18      | 20     | 5545   | 126    | 42     | 412    | 106    | 124    | 4966    | 200   | 146   | 415    | 487    | 196   | 244   |
|                      | read/million  | 6,57    | 7,22   | 6,50   | 1,31    | 1,46   | 404,66 | 9,20   | 3,07   | 30,07  | 7,74   | 9,05   | 362,41  | 14,60 | 10,65 | 30,29  | 35,54  | 14,30 | 17,81 |
| Jonagold T55         | v13           | 1       |        |        | 1       | 1      |        |        | 1      |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | v15           |         |        | 1      | 1       | 1      | 1      |        | 1      |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | b             | 804     | 1525   | 1396   | 1034    | 1034   | 523    | 726    | 652    | 202    | 162    | 127    | 118     | 133   | 127   | 135    | 128    | 148   | 117   |
| 9135224              | read/PCR      | 2868    | 3482   | 3283   | 19021   | 4794   | 2125   | 1484   | 2365   | 411    | 319    | 185    | 11873   | 333   | 220   | 1308   | 1219   | 299   | 263   |
|                      | read/million  | 313,95  | 381,16 | 359,38 | 2082,16 | 524,78 | 232,62 | 162,45 | 258,89 | 44,99  | 34,92  | 20,25  | 1299,69 | 36,45 | 24,08 | 143,18 | 133,44 | 32,73 | 28,79 |
| Soroksári T56/1-6    | v13           |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | v15           |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | b             |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
| 7731441              | read/PCR      | 52      | 56     | 65     | 9       | 24     | 40     | 37     | 17     | 43     | 45     | 44     | 3945    | 110   | 90    | 221    | 189    | 85    | 94    |
|                      | read/million  | 6,73    | 7,24   | 8,41   | 1,16    | 3,10   | 5,17   | 4,79   | 2,20   | 5,56   | 5,82   | 5,69   | 510,25  | 14,23 | 11,64 | 28,58  | 24,45  | 10,99 | 12,16 |
| Zalaszentő, Fuji T56 | v13           |         |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | v15           |         |        |        | 1       | 1      | 1      |        |        |        |        |        |         |       |       |        |        |       |       |
|                      | b             | 406     | 129    | 181    | 850     | 572    | 605    |        | 384    | 105    |        |        |         | 113   |       | 104    | 104    |       |       |
| 13193366             | read/PCR      | 1213    | 231    | 265    | 6068    | 1591   | 2653   | 121    | 1138   | 255    | 191    | 101    | 18148   | 269   | 136   | 402    | 384    | 161   | 227   |
|                      | read/million  | 91,94   | 17,51  | 20,09  | 459,93  | 120,59 | 201,09 | 9,17   | 86,26  | 19,33  | 14,48  | 7,66   | 1375,54 | 20,39 | 10,31 | 30,47  | 29,11  | 12,20 | 17,21 |



| Név         |              | ACSV   | AGCV  | ASPV   | APMV3 | APMV1 | ASGV   | APLV  | APMV2 | APPCSV | PeMV  | CMLV  | RaLMV   | BVpAV | GLAV1 | CTLV   | BVA    | CTV   | GLA3  | RUBAV | LCV1  |
|-------------|--------------|--------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Rosmerta_i  | v13          |        |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | v15          |        |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | b            |        |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       | 100    |        |       |       |       |       |
| 10962883    | read/PCR     | 105    | 65    | 42     | 14    | 23    | 82     | 63    | 17    | 54     | 69    | 71    | 16445   | 210   | 108   | 427    | 425    | 113   | 171   | 125   | 126   |
|             | read/million | 9,58   | 5,93  | 3,83   | 1,28  | 2,10  | 7,48   | 5,75  | 1,55  | 4,93   | 6,29  | 6,48  | 1500,06 | 19,16 | 9,85  | 38,95  | 38,77  | 10,31 | 15,60 | 11,40 | 11,49 |
| Hesztia_i   | v13          |        |       |        |       |       | 1      |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | v15          |        |       |        |       |       | 1      |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | b            | 595    | 114   | 101    |       |       | 649    | 104   |       | 116    | 120   |       | 104     | 110   | 112   |        | 109    | 111   |       |       |       |
| 8914740     | read/PCR     | 1993   | 284   | 132    | 11    | 56    | 3832   | 174   | 21    | 352    | 310   | 209   | 16023   | 198   | 157   | 776    | 902    | 196   | 167   | 159   | 120   |
|             | read/million | 223,56 | 31,86 | 14,81  | 1,23  | 6,28  | 429,85 | 19,52 | 2,36  | 39,49  | 34,77 | 23,44 | 1797,36 | 22,21 | 17,61 | 87,05  | 101,18 | 21,99 | 18,73 | 17,84 | 13,46 |
| Rosmerta_sz | v13          |        |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | v15          |        |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | b            |        |       |        |       |       | 587    |       |       |        |       |       |         | 105   | 100   |        |        |       |       |       |       |
| 11016007    | read/PCR     | 88     | 133   | 104    | 10    | 20    | 3740   | 93    | 6     | 188    | 74    | 89    | 24827   | 138   | 180   | 412    | 287    | 145   | 200   | 132   | 115   |
|             | read/million | 7,99   | 12,07 | 9,44   | 0,91  | 1,82  | 339,51 | 8,44  | 0,54  | 17,07  | 6,72  | 8,08  | 2253,72 | 12,53 | 16,34 | 37,40  | 26,05  | 13,16 | 18,16 | 11,98 | 10,44 |
| Hesztia_sz  | v13          |        |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | v15          |        |       |        |       |       | 1      |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | b            |        | 110   | 106    |       |       | 718    | 101   |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
| 11779442    | read/PCR     | 179    | 388   | 172    | 5     | 23    | 7291   | 256   | 15    | 307    | 69    | 75    | 7496    | 109   | 140   | 213    | 369    | 107   | 130   | 116   | 110   |
|             | read/million | 15,20  | 32,94 | 14,60  | 0,42  | 1,95  | 618,96 | 21,73 | 1,27  | 26,06  | 5,86  | 6,37  | 636,36  | 9,25  | 11,89 | 18,08  | 31,33  | 9,08  | 11,04 | 9,85  | 9,34  |
| Artemisz_i  | v13          |        |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | v15          |        |       |        |       |       | 1      |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | b            | 421    | 117   | 151    |       |       | 619    | 111   |       | 112    |       |       | 126     | 126   | 134   | 130    | 144    | 133   |       | 105   | 121   |
| 11524420    | read/PCR     | 1272   | 351   | 363    | 31    | 46    | 3951   | 167   | 26    | 434    | 177   | 148   | 6864    | 262   | 221   | 2139   | 371    | 296   | 264   | 205   | 246   |
|             | read/million | 110,37 | 30,46 | 31,50  | 2,69  | 3,99  | 342,84 | 14,49 | 2,26  | 37,66  | 15,36 | 12,84 | 595,60  | 22,73 | 19,18 | 185,61 | 32,19  | 25,68 | 22,91 | 17,79 | 21,35 |
| Cordelia_i  | v13          |        |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | v15          |        |       | 1      |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | b            | 628    | 550   | 705    |       |       |        | 289   |       | 145    | 114   | 117   | 131     | 131   | 140   | 123    | 123    | 131   | 107   | 119   | 124   |
| 12559253    | read/PCR     | 2589   | 1188  | 1729   | 16    | 56    | 217    | 532   | 47    | 351    | 230   | 238   | 6136    | 237   | 265   | 1185   | 279    | 269   | 255   | 191   | 232   |
|             | read/million | 206,14 | 94,59 | 137,67 | 1,27  | 4,46  | 17,28  | 42,36 | 3,74  | 27,95  | 18,31 | 18,95 | 488,56  | 18,87 | 21,10 | 94,35  | 22,21  | 21,42 | 20,30 | 15,21 | 18,47 |
| Artemisz_sz | v13          |        |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | v15          |        |       |        |       |       | 1      |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | b            |        |       | 104    |       |       | 634    |       |       |        |       |       | 129     | 130   | 145   | 142    | 126    | 147   | 108   | 135   | 113   |
| 12471169    | read/PCR     | 285    | 223   | 194    | 25    | 49    | 4140   | 123   | 26    | 324    | 162   | 104   | 6569    | 229   | 239   | 1380   | 579    | 275   | 254   | 229   | 167   |
|             | read/million | 22,85  | 17,88 | 15,56  | 2,00  | 3,93  | 331,97 | 9,86  | 2,08  | 25,98  | 12,99 | 8,34  | 526,73  | 18,36 | 19,16 | 110,66 | 46,43  | 22,05 | 20,37 | 18,36 | 13,39 |
| Cordelia_sz | v13          |        |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | v15          |        |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |         |       |       |        |        |       |       |       |       |
|             | b            | 188    | 305   | 405    |       |       |        | 156   |       |        |       |       | 107     |       |       |        | 100    |       |       |       | 105   |
| 10083778    | read/PCR     | 438    | 533   | 764    | 18    | 22    | 75     | 239   | 27    | 91     | 101   | 88    | 3369    | 137   | 157   | 438    | 394    | 140   | 181   | 107   | 158   |
|             | read/million | 43,44  | 52,86 | 75,77  | 1,79  | 2,18  | 7,44   | 23,70 | 2,68  | 9,02   | 10,02 | 8,73  | 334,10  | 13,59 | 15,57 | 43,44  | 39,07  | 13,88 | 17,95 | 10,61 | 15,67 |

8. ábra Összefoglaló táblázat a kisRNS könyvtárak 20 különböző vírusra kapott read számai és a genomösszerakás eredménye alapján.

## 8. Irodalom

1. Adams I. P., Glover R. H., Monger W. A., Mumford R., Jackeviciene E., Navalinskiene M., Samuitiene M., Boonham N. (2009) Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10(4), 537-545.
2. Ahlquist P. (2002) RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 296:1271
3. Bach I., Szőnyegi S. (1996) A szaporítóanyag certifikációs rendszere és követelményei. OMMI, BFNTÁ Budapest
4. Barba M., Czosnek H., Hadidi A. (2014). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6(1), 106–36.
5. Berniak H., Malinowski T., Kamińska M. (2009) Comparison of ELISA and RT-PCR assays for detection and identification of cucumber mosaic virus (CMV) isolates infecting horticultural crops in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* Vol. 17/(2), 5-20
6. Boonham N., Kreuze J., Winter S., van der Vlugt R., Bergervoet J., Tomlinson J., Mumford R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186, 20–31.
7. Bos L. (1999) Beijerinck's work on tobacco mosaic virus: historical context and legacy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 354, 675-685
8. Bunikis J., Barbour A. G. (2002). Laboratory testing for suspected Lyme disease. 86(2), 311–340.
9. Chellappan P., Vanitharani R., Ogbe F., Fauquet C. M. (2005.) Effect of Temperature on Geminivirus-Induced RNA Silencing in Plants. *Plant Physiology* 138 (4): 1828–41.

10. Gambino G. (2015) Multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of nine grapevine viruses . *Methods Mol Biol.*,1236, 39-47.
11. Gambino G., Perrone I., Gribaudo I. (2008.) A Rapid and Effective Method for RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants. *Phytochemical Analysis*, 19 (6), 520–25.
12. Hassan M., Myrta A., Polak J. (2006) Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 133(2), 124-129.
13. Horváth J., Gáborjányi R. (1999.) *Növényvírusok és Virologiai Vizsgálati Módszerek.* Budapest, Mezőgazda Kiadó.
14. Kiss P. (1998) Szaporítóanyagok EU-minősítési rendszere és meghonosítása Magyarországon. *Agroinform Kiadó és Nyomda Kft FM EU-Integrációs Sorozat.* 17, Budapest, 1–34
15. Kreuze J. F., Perez A., Untiveros M., Quispe D., Fuentes S., Barker I., Simon R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388(1), 1–7.
16. Malinowski T. (2005) Potential problems with the reliability of PCR based diagnostic methods related to plant viruses sequence variation. *Phytopathologia polonica* ,35, 125–139
17. Massart S., Olmos A., Jijakli H., Candresse T. (2014). Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research*, 188, 90–96.
18. Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99(1-2), 81-92.

19. Molnár A., Csorba T., Lakatos L., Várallyay É., Lacomme C., Burgyán J. (2005) Plant Virus-Derived Small Interfering RNAs Originate Predominantly from Highly Structured Single-Stranded Viral RNAs. *Journal of Virology*, 79(12), 7812–7818.
20. Parent J. S., Martínez de Alba A. E., Vaucheret H. (2012.) The Origin and Effect of Small RNA Signaling in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 1–9.
21. Romon M., Soustre-Gacougnolle I., Schmitt C., Perrin M., Burdloff Y., Chevalier E., Mutterer J., Himber C., Zervudacki J., Montavon T., Zimmermann A., Elmayan T., Vaucheret H., Dunoyer P., Masson J. E. (2013.) RNA Silencing Is Resistant to Low Temperature in Grapevine. *PLoS ONE*, 8(12), 1–7
22. Roossinck M. J. (2015). Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology*. 479-480, 271-7.
23. Salamon P. (2007) Növényvírusok, viroidok és szatellitek osztályozása és nevezéktana. *Növényvédelem 2007 különszám*
24. Szittya Gy., Silhavy D., Molnár A., Havelda Z., Lovas Á., Lakatos L., Bánfalvi Zs., Burgyán J. (2003.) Low Temperature Inhibits RNA Silencing-Mediated Defence by the Control of siRNA Generation. *EMBO Journal*, 22(3), 633–40.
25. Visser M., Maree H. J., Rees D. J., Burger J. T. (2014) High-throughput sequencing reveals small RNAs involved in ASGV infection. *BMC Genomics* 15, 568.
26. Vos P., Verver J., Wezenbeek P., Kammen A., Goldbach G. (1984) Study of the genetic organisation of a plant viral RNA genome by in vitro expression of a full-length DNA copy. *The EMBO Journal*, (3)13, 3049-3053.
27. Zechmann B., Graggaber G., Zellnig, G. (2011). Microwave Assisted Rapid Diagnosis of Plant Virus Diseases by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, (56), 1–6.

28. Zerbino D. R., Birney E. (2008.) Velvet: Algorithms for de Novo Short Read Assembly Using de Bruijn Graphs. Genome Research, 18(5), 821–29.

## 9. Internetes források:

1. <http://viralzone.expasy.org/cgi-bin/viralzone/search?query=Apple+chlorotic+leaf+spot+virus+%28ACLSV%29&commit=search+virus>
2. <http://viralzone.expasy.org/cgi-bin/viralzone/search?query=Apple+mosaic+virus+%28ApMV%29&commit=search+virus>
3. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=386>
4. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=376>
5. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=83>

## 10. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Varga Tünde a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül az alábbiakat magam végeztem el:

- Alma minták RNS tisztítása után RT-PCR alapú módszerrel cDNS-t készítettem, melynek minőségét saját, specifikus alma aktin mRNS-re tervezett primereimmel ellenőriztem.
- Specifikus vírusprimereket terveztem ACLSV, APMV, ASPV és ASGV almavírusokhoz, melyek optimális annealálási hőmérsékletét Gradiens PCR módszerrel állapítottam meg.
- PCR reakcióval kipróbáltam hogyan működnek vírus primereim egyedi PCR-ben, illetve különböző kombinációkban multiplex PCR-ben.
- Az optimalizált duplex-PCR módszert alkalmaztam különböző hazai izolátorházban tartott, valamint szabadföldi termő- és törzsültetvények almafáin.
- A fertőzöttnek mutatózó mintákból felszaporítottam PCR-reakcióval az adott vírusok egy-egy darabját, majd a PCR termékeket tisztítottam.
- A PCR termékek bázissorrendjének ismeretében filogenetikai elemzést végeztem.
- Alma mintáimból kisRNS könyvtárakat készítettem.
- KisRNS könyvtárain szekvencia adatai alapján elvégeztem a minták bioinformatikai elemzését (vírus találati listákat, lefedettség ábrákat generáltam).
- Újgenerációs szekvenálással csonthéjas mintáinkról kimutatott LChV-1 vírusra specifikus primereket terveztem, melyek segítségével PCR-reakcióval sikerült igazolnunk mintáinkban a vírus jelenlétét.

Budapest, 2016. május 10.

## **11. Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Várallyay Évának, aki lépten-nyomon követi, és nagy odafigyeléssel segíti fejlődésemet, munkám során mindig lelkesít és hasznos tanácsokkal lát el.

Ezúton szeretném megköszönni Molnár Jánosnak bioinformatikai értékelésben, illetve Carmen Iliescunak, Czotter Nikolettának és Diagnosztikai csoportunk többi tagjának laborban nyújtott segítségét.

Hálás vagyok családomnak és barátaimnak támogatásukért, és nem utolsósorban Kovács Október gimnáziumi biológiatanáromnak, aki nem csak tanította, hanem meg is szeretettette velem ezt a tudományterületet.

## NYILATKOZAT

Név: Varga Tünde

Neptun azonosító: R8M0WG

ELTE Természettudományi Kar, **biológus mesterszak**

Diplomamunka címe: RNS alapú diagnosztikai módszer kidolgozása az alma vírusfertőzöttségének kimutatására

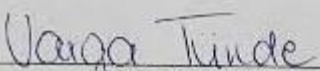
A diplomamunka szerzőjeként feylelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam.

Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi hivatkozás a forrás megjelölése nélkül;
- más személy publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Kijelentem továbbá, hogy a diplomamunka leadott nyomtatott példányai és elektronikus változata szövegükben, tartalmukban megegyeznek.

Budapest, 2016 május

  
hallgató aláírása



2015 február 17-én részt vettem az „RNS alapú diagnosztikai módszer kidolgozása és felhasználása alma ültetvények virológiai felmérésében” című poszteremmel a Magyar Növényvédelmi Társaság által meghirdetett 61. Növényvédelmi Tudományos Napokon a Magyar Tudományos Akadémián (Budapest). A poszter kiállításra az alábbi absztrakttal neveztem.

## **„RNS ALAPÚ DIAGNOSZTIKAI MÓDSZER KIDOLGOZÁSA ÉS FELHASZNÁLÁSA ALMA ÜLTETVÉNYEK VIROLÓGIAI FELMÉRÉSÉBEN**

VARGA TÜNDE<sup>1</sup>, CZOTTER NIKOLETTA<sup>1</sup>, PÁJTLI ÉVA<sup>2</sup>, BURGYÁN JÓZSEF<sup>1</sup> és VÁRALLYAY ÉVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Diagnosztikai Csoport, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, NAIK, Gödöllő

<sup>2</sup>Növénykórtani Tanszék, Kertészettudományi Kar, Corvinus Egyetem, Budapest

Haszonnövényeink a vírusok állandó támadásának vannak kitéve, melyek ellen növényvédőszerrel nem védekezhetünk. Gyümölcsfáink szaporítása a fajtafenntartás miatt vegetatíván történik, ha az anyató fertőzött a vírus továbbterjed a szaporítóanyaggal. Magyarországon az almafák törzsültetvényeinek létrehozása előtt éppen ezért kötelező az anyanövények vírusdiagnosztikai vizsgálata, melyet ELISA módszerrel végeznek. A fertőzést mutató növényeket a szaporítás előtt vírusmentesíteni kell. A diagnosztikai módszerek érzékenységének növelésével megbízhatóbban tesztelhetjük a vírusmentesítési folyamat hatékonyságát, így csökkenthetjük a szaporítóanyaggal terjedő vírusfertőzések előfordulását.

Diagnosztikai laboratóriumunkban a használt módszereknél (pl. bioteszt, ELISA teszt) érzékenyebb, pontosabb vírusdiagnosztikai módszerek kidolgozását tűztük ki célul.

Munkánk során RT-PCR alapú módszert dolgoztunk ki az almafajták vírusmentes anyatóvein kötelezően tesztelendő vírusok diagnosztizálására.

Az optimalizált teszt kidolgozásához az ország különböző részeiről származó termő almaültetvényekről, izolátor házban és törzsültetvényen fenntartott fajtajelöltekről szedtünk mintákat. Az RNS kivonás optimalizálása után a tisztított RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk, melynek minőségét aktin primerekkel végzett PCR reakcióval ellenőriztük. Az alma vírusok kimutatásához az NCBI adatbázisban található vírusszekvenciák összehasonlítása alapján terveztünk primereket az almafákon kötelezően vizsgálandó vírusokra: alma klorotikus levélfoltosság - ACLSV, az alma mozaik vírus -APMV, az almafa törzsbarázdáltság vírus -ASGV és az almafa törzsgödrösödés vírus – ASPV. A vírus primerek működésének legoptimálisabb hőmérsékletét gradiens PCR-rel határoztuk meg, majd a specifikus primereket különböző

kombinációkban is teszteltük. Ebből kiderült, hogy az almákat fertőző 4 vírusra a duplex PCR jól használható módszer, így mintáim diagnosztikai kiértékelésére is ezt használtam.

Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált mintavételi helyeken gyakori a karantén vírusok jelenléte, így a vírusmentesítési folyamat hatékonyságának javítására van szükség. Az általunk kidolgozott duplex PCR eljárás a vírusok szűrésének az általánosan használt ELISA módszernél hatékonyabb és specifikusabb módja, mellyel a vírusmentesítési folyamat monitorozható és ültetvényeink almafái a karantén vírusok jelenlétére tesztelhetők.

Varga Tünde az ELTE 1.éves biológus MSc hallgatója. A projekt a Magyar Kormány támogatásával, a Kutatási és Technológiai Innovációs Alap finanszírozásával valósul meg (KTIA\_AIK\_12-1-2013-0001: Korszerű genomikai és biotechnológiai technikák bevezetése a szőlő és gyümölcs (fásszárúak) egészséges szaporítóanyag előállításban, növényvédelemben és a fajta nemesítésben) .”

A módszer lehetővé teszi, kiharzálva szeretnénk további, az almafajtkában jelenlevő, eddig még nem leírt patogéneket azonosítani.

2015 április 9-én szerepeltem a Pécsi Tudományegyetemen által megrendezett XXXII. OTDK-n (Biológiai szekció, Pécs) az „RNS alapú diagnosztikai módszer kidolgozása az alma vírusfertőzöttségének kimutatására” című dolgozatommal és előadásommal, mellyel 3. helyezést értem el.

A konferenciára az alábbi rezümével neveztem.

„ Haszonnövényeink a vírusok állandó támadásának vannak kitéve, melyek ellen növényvédő szerekkel nem védekezhetünk. Gyümölcsfáink szaporítása a fajtafenntartás miatt vegetatívan történik, ha az anyató fertőzött a vírus továbbterjed a szaporítóanyaggal. Magyarországon az almafák törzsültetvényeinek létrehozása előtt éppen ezért kötelező az anyanövények vizsgálata, és mentesítése a gyümölcsösöket fertőző RNS vírusokra.

Célom az volt, hogy olyan RT-PCR alapú módszert dolgozzak ki, melynek segítségével minél hatékonyabban, olcsóbban és gyorsabban lehet a kötelezően tesztelendő vírusokat diagnosztizálni az almafákból vett mintákból, illetve hogy képet kapjak a magyarországi ültetvények vírussal való fertőzöttségéről.

Munkámat azzal kezdtem, hogy az almára optimalizáltam egy RNS-kivonási eljárást, majd a tisztított RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t készítettem. A cDNS minőségét aktin primerekkel végzett PCR reakcióval ellenőriztem. Az alma vírusok kimutatásához az NCBI adatbázisban található vírusszekvenciák összehasonlítása alapján terveztem primereket. Gradiens PCR eljárással megkerestem a vírus primerek működéséhez leginkább megfelelő hőmérsékletet, majd a specifikus primereket különböző kombinációkban is teszteltem. Ebből kiderült, hogy az almákat fertőző 4 vírusra a duplex PCR jól használható módszer, így mintáim diagnosztikai kiértékelésére is ezt használtam. A különböző mintákból szintetizált PCR termékeket bázissorrendjét DNS-tisztítás után határoztattam meg. A kapott szekvenciák alapján Clustal Omega programmal elvégeztem az egyes vírustörzsek szekvenciáinak összehasonlítását, és ez alapján vizsgáltam leszármazási viszonyaikat.

A fentiekben kidolgozott duplex PCR eljárás a vírusok szűrésének az általánosan használt ELISA módszernél hatékonyabb és specifikusabb módja, mellyel almáink a kötelezően tesztelendő vírusok jelenlétére vizsgálhatóak. A PCR termékek bázissorrendjének összehasonlítása lehetővé tette a vizsgált vírusok különböző törzseinek elemzését is.

További terveimben szerepel, hogy az alma mintákból kisRNS-könyvtárakat készítsék, melyekben a növényi gazda-RNS-en kívül az esetleges kórokozók RNS-ei is megtalálhatók. A kis RNS könyvtárak újgenerációs (Illumina platformon történő) szekvenálása és annak

kiértékelése lehetőséget ad a mintákban előforduló összes virális kórokozó azonosítására, és akár új, eddig ismeretlen vírusok megtalálására, elemzésére.”

2016. március 21-22-én munkatársammal, Balássy Júliával közösen részt vettünk a gödöllői Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Karán megrendezett Fiatal Biotechnológusok II. Országos Konferenciáján (FIBOK 2016) az alábbi poszterünkkel.

### **„CSONTHÉJAS GYÜMÖLCSFÁK VÍRUSFERTŐZÖTTségÉNEK VIZSGÁLATA METAGENOMIKAI MÓDSZEREKKEL**

BALÁSSY JÚLIA<sup>1</sup>, VARGA TÜNDE<sup>1</sup>, CZOTTER NIKOLETTA<sup>1</sup>, MOLNÁR JÁNOS<sup>2</sup>, KIRILLA ZOLTÁN<sup>3</sup>, TUSNÁDY E. GÁBOR<sup>2</sup>, PREININGER ÉVA<sup>3</sup> ÉS VÁRALLYAY ÉVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Diagnosztikai Csoport, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, NAIK, Gödöllő

<sup>2</sup>Enzimológiai intézet, MTA Természettudományi Kutatóközpont, Budapest

<sup>3</sup>Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet, Érdi Kutatóállomás, NAIK, Budapest

Gazdaságilag fontos növényeink folyamatosan ki vannak téve növényvírusok támadásának, melyek ellen a növényvédőszeres nem hatásosak. A vírusok a növényt fertőzve és megbetegítve évről évre jelentős gazdasági károkat okoznak. Gyümölcsfáink szaporítása a fajtafenntartás érdekében vegetatívan történik, így ha vírusdiagnosztikai módszereink nem elég érzékenyek, a vírusok már magával a szaporítóanyaggal könnyen átjuthatnak az új növényekbe. Magyarországon a hatóságok az új gyümölcsfafajták nemesítésekor főként ELISA és PCR módszerekkel végzik a kötelező vírusszűréseket. Ily módon csak a már ismert szekvenciájú vírusok mutathatók ki. Munkánk célja az volt, hogy izolátorházakban és törzsültetvényeken nevelt csonthéjas gyümölcsfák vírusfertőzöttségét kisRNS-ek új generációs szekvenálása révén mérjük fel. Ezzel a metagenomikai módszerrel eddig ismeretlen, hazánkban, illetve az adott növényben még le nem írt vírusokat is megtalálhatunk.

A kutatáshoz az Érdi Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet izolátorházban és törzsültetvényen nevelt, valamint in vitro tenyésztetből származó kajszibarack és szilva fákról szedtünk mintát, melyből RNS kivonást végeztünk és kisRNS könyvtárat hoztunk létre. A kisRNS-ek szekvenálása után, a kapott szekvenciákat bioinformatikai módszerek segítségével értékeltük.

Kis RNS könyvtárunkat egyrészt az NCBI vírus referenciagenomokat tartalmazó adatbázisára illesztve vírus találati listát generáltunk, másrészt egy adott vírus referencia genomszekvenciájára illesztve lefedettségi ábrát kaptunk, amivel a hibás illesztéseket tudtuk kiszűrni. Velvet programmal a leolvasott szekvenciákat 13 és 15 nukleotidos átfedő



részszekvenciák alapján nagyobb, összefüggő szakaszokká illesztettük össze. Ezeket az ún. kontigokat ismert vírusok adatbázisára illesztve ismét kaptunk egy találati listát.

Ezen módszer segítségével egyes mintáinkban Magyarországon eddig még le nem írt vírusokat, a Cherry vírus A-t (CVA) és a Little cherry vírus-t (LChV) azonosítottuk. A kisRNS szekvenálásból származó szekvenciainformációk ismeretében e vírusokra specifikus indítószekvenciákat terveztünk, majd gradiens PCR-rel optimalizált PCR segítségével a prediktált mintákból felszaporítottuk a vírusokat és hagyományos Sanger szekvenálással meghatározva a termék bázissorrendjét visszaigazoltuk jelenlétüket. A PCR terméket klónozva radioaktív próba készítésére alkalmas konstrukciót állítottunk elő, és a CVA jelenlétét pozitív mintáinkból Northern blottal is sikerült kimutatnunk.

Eredményeink azt mutatják, hogy a kisRNS-ek új generációs szekvenálásával mintáinkban valóban detektálhatunk a kötelezően tesztelt vírusokon kívül megjelenő egyéb, akár eddig még nem ismert vírusokat is. A CVA és a LChV vírusok előfordulása hazánkban eddig nem volt ismert, a tünetek kialakításában, illetve más vírusokkal együtt előfordulva, módosításában betöltött szerepének megállapítása még további vizsgálatokat igényel.

Munkánkat az FM céltámogatásával végeztük.”

# Vírusfertőzöttség vizsgálata csonthéjas gyümölcsfákon metagenomikai módszerek segítségével

VARGATÜNDE<sup>1</sup>, BALÁSSY JÚLIA<sup>1</sup>, CZOTTER NIKOLETTA<sup>1</sup>, MOLNÁR JÁNOS<sup>2</sup>, KIRILLA ZOLTÁN<sup>3</sup>, TUSNÁDY E. GÁBOR<sup>2</sup>, PREININGER ÉVA<sup>3</sup> ÉS VÁRALIYAY ÉVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Diagnosztikai Csoport, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, NAIK, Gödöllő, <sup>2</sup>Enzimológiai Intézet, MTA Természettudományi Kutatóközpont, Budapest <sup>3</sup>Gyümölcs-termesztési Kutatóintézet, Erdi Kutatóállomás, NAIK, Budapest



NAIK MBK  
Diagnosztikai Csoport

A gyümölcsfáink fertőző vírusok ellen növényvédőszerrel nem védekezhetünk. Ezen növényeinket a fajtatulajdonosság fenntartása miatt vegetatíván szaporítjuk, így azonban az anyanövényben jelenlévő vírusokat is továbbvihetjük. A védekezés kulcsa a vírusmentes szaporítóanyag előállítása és használata, ehhez a szaporítóanyagot megfelelő érzékenységgel vírusdiagnosztikai módszerekkel kell tesztelnünk. A hagyományos diagnosztikát ELISA és PCR módszerekkel végzik, amelyekkel azonban csak a már ismert vírusokat tudjuk kimutatni. Ezzel szemben az ügenerációs szekvenáláson alapuló metagenomikai módszerek alkalmasak a növényben levő összes virális kórokozó kimutatására. Kísérleteink során a metagenomikai módszerek egy speciális fajtáját, az RNS interferencia jelenségén alapuló, kisRNS-ek ügenerációs szekvenálását használtuk gyümölcsfákon jelenlévő vírusok kimutatására.



A képek forrása: <http://www.visszaszoborbert.hu/>, <http://www.vivibot.hu/>, <http://www.pcsinfo.hu/>

## Mintagyűjtés:

A NAIK Gyümölcs-termesztési Kutatóintézet Erdi Kutatóállomásán:  
• izolátorházban és  
• törzsültetvényen nevelt, valamint  
• *in vitro* tenyésztéssel származó  
• ősz, kajsi és szilva mintákat gyűjtöttünk.

## RNS kivonás, cDNS készítés

A mintákból CTAB alapú módszerrel RNS-t tisztítottunk, majd az RNS templátkörű reverz transzkriptió segítségével komplementer cDNS-t készítettünk.

## Anyagok és módszerek

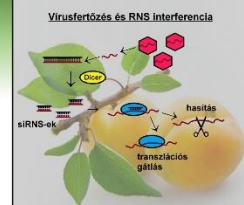
### KisRNS könyvtár készítés

A totál RNS-t tartalmazó kivonatot, ureát tartalmazó poliakrilamid gélen elválasztottuk, majd kivágtuk a kisRNS frakciót.  
A kisRNS-ekhez adaptereket ligáltunk, majd indexelt primerek segítségével amplifikáltuk őket.  
A kapott terméket natív poliakrilamidgélben méret alapján tisztítottuk.  
Az így elkészült kisRNS könyvtárakat Illumina platformon szekvenáltattuk.

### Bioinformatika

A kapott szekvenciákat bioinformatikai módszerek segítségével értékeltük.

A mintáinkban jelenlévő vírusokra két módszerrel készítettünk találati listát: Velvet program segítségével kisRNS találatainkból hosszabb, átfedő szakaszokat (kontigokat) építettünk, majd ezeket a kontigokat, illetve közvetlenül a kisRNS readokat illesztettük az NCBI vírus Referencia genom adatbázisához BLAST programmal.



## Vírusok jelenlétének igazolása

- Virusspecifikus primerek tervezése saját könyvtáraink, a referencia vírusgenomok és az irodalomban használt primerek összevetésével
- PCR optimalizálása: primerek anélkülési hőmérsékletének megállapítása
- PCR reakció
- Termékek tisztítása és szekvenálása
- Klónozásuk plazmidba (pBluescript)
- A klónozott vírusdarab szekvenciájának meghatározása
- A vírus jelenlétének igazolása Northern biotál

## Eredmények

Az kisRNS-ek méreteloszlását vizsgálva az izolátorházakból és törzsültetvényekről gyűjtött minták között eltérést találtunk.



Azt gondoljuk, hogy ennek oka, hogy az izolátorházakban a melegebb körülmények miatt fokozódott az antivirális silencing – amely folyamatban a 21 és 22 nt hosszúságúra vágó Dicer (DCL4 és DCL2) aktív.

Az elemzések eredményét egy táblázatban foglaltuk össze, mely információt ad 17 vírus és egy viroid valószínűsített jelenlétéről. Felhúztuk a Velvet programmal kapott, illetve a direkt BLAST-olt találatokat is. Utóbbi esetben az egyedi read jele, hogy hány különböző, az adott vírus genomjára illeszthető readet kaptunk. Az összevethetőség érdekében minden könyvtárra millió read-re normált értéket is számoltunk, melyhez az adott vírus összes read számának és a könyvtárra vonatkozó teljes trimelés utáni read számának hányadosát szoroztuk egy millióval. Ennek alapján szűrve jelöltük azokat a mintákat, ahol az adott vírus nagy valószínűséggel előfordul a mintában.

| Se | 31/12/2016 | 01/01/2017 | 02/01/2017 | 03/01/2017 | 04/01/2017 | 05/01/2017 | 06/01/2017 | 07/01/2017 | 08/01/2017 | 09/01/2017 | 10/01/2017 | 11/01/2017 | 12/01/2017 | 13/01/2017 | 14/01/2017 | 15/01/2017 | 16/01/2017 | 17/01/2017 | 18/01/2017 | 19/01/2017 | 20/01/2017 | 21/01/2017 | 22/01/2017 | 23/01/2017 | 24/01/2017 | 25/01/2017 | 26/01/2017 | 27/01/2017 | 28/01/2017 | 29/01/2017 | 30/01/2017 | 31/01/2017 | 01/02/2017 | 02/02/2017 | 03/02/2017 | 04/02/2017 | 05/02/2017 | 06/02/2017 | 07/02/2017 | 08/02/2017 | 09/02/2017 | 10/02/2017 | 11/02/2017 | 12/02/2017 | 13/02/2017 | 14/02/2017 | 15/02/2017 | 16/02/2017 | 17/02/2017 | 18/02/2017 | 19/02/2017 | 20/02/2017 | 21/02/2017 | 22/02/2017 | 23/02/2017 | 24/02/2017 | 25/02/2017 | 26/02/2017 | 27/02/2017 | 28/02/2017 | 29/02/2017 | 01/03/2017 | 02/03/2017 | 03/03/2017 | 04/03/2017 | 05/03/2017 | 06/03/2017 | 07/03/2017 | 08/03/2017 | 09/03/2017 | 10/03/2017 | 11/03/2017 | 12/03/2017 | 13/03/2017 | 14/03/2017 | 15/03/2017 | 16/03/2017 | 17/03/2017 | 18/03/2017 | 19/03/2017 | 20/03/2017 | 21/03/2017 | 22/03/2017 | 23/03/2017 | 24/03/2017 | 25/03/2017 | 26/03/2017 | 27/03/2017 | 28/03/2017 | 29/03/2017 | 30/03/2017 | 31/03/2017 | 01/04/2017 | 02/04/2017 | 03/04/2017 | 04/04/2017 | 05/04/2017 | 06/04/2017 | 07/04/2017 | 08/04/2017 | 09/04/2017 | 10/04/2017 | 11/04/2017 | 12/04/2017 | 13/04/2017 | 14/04/2017 | 15/04/2017 | 16/04/2017 | 17/04/2017 | 18/04/2017 | 19/04/2017 | 20/04/2017 | 21/04/2017 | 22/04/2017 | 23/04/2017 | 24/04/2017 | 25/04/2017 | 26/04/2017 | 27/04/2017 | 28/04/2017 | 29/04/2017 | 30/04/2017 | 01/05/2017 | 02/05/2017 | 03/05/2017 | 04/05/2017 | 05/05/2017 | 06/05/2017 | 07/05/2017 | 08/05/2017 | 09/05/2017 | 10/05/2017 | 11/05/2017 | 12/05/2017 | 13/05/2017 | 14/05/2017 | 15/05/2017 | 16/05/2017 | 17/05/2017 | 18/05/2017 | 19/05/2017 | 20/05/2017 | 21/05/2017 | 22/05/2017 | 23/05/2017 | 24/05/2017 | 25/05/2017 | 26/05/2017 | 27/05/2017 | 28/05/2017 | 29/05/2017 | 30/05/2017 | 31/05/2017 | 01/06/2017 | 02/06/2017 | 03/06/2017 | 04/06/2017 | 05/06/2017 | 06/06/2017 | 07/06/2017 | 08/06/2017 | 09/06/2017 | 10/06/2017 | 11/06/2017 | 12/06/2017 | 13/06/2017 | 14/06/2017 | 15/06/2017 | 16/06/2017 | 17/06/2017 | 18/06/2017 | 19/06/2017 | 20/06/2017 | 21/06/2017 | 22/06/2017 | 23/06/2017 | 24/06/2017 | 25/06/2017 | 26/06/2017 | 27/06/2017 | 28/06/2017 | 29/06/2017 | 30/06/2017 | 01/07/2017 | 02/07/2017 | 03/07/2017 | 04/07/2017 | 05/07/2017 | 06/07/2017 | 07/07/2017 | 08/07/2017 | 09/07/2017 | 10/07/2017 | 11/07/2017 | 12/07/2017 | 13/07/2017 | 14/07/2017 | 15/07/2017 | 16/07/2017 | 17/07/2017 | 18/07/2017 | 19/07/2017 | 20/07/2017 | 21/07/2017 | 22/07/2017 | 23/07/2017 | 24/07/2017 | 25/07/2017 | 26/07/2017 | 27/07/2017 | 28/07/2017 | 29/07/2017 | 30/07/2017 | 31/07/2017 | 01/08/2017 | 02/08/2017 | 03/08/2017 | 04/08/2017 | 05/08/2017 | 06/08/2017 | 07/08/2017 | 08/08/2017 | 09/08/2017 | 10/08/2017 | 11/08/2017 | 12/08/2017 | 13/08/2017 | 14/08/2017 | 15/08/2017 | 16/08/2017 | 17/08/2017 | 18/08/2017 | 19/08/2017 | 20/08/2017 | 21/08/2017 | 22/08/2017 | 23/08/2017 | 24/08/2017 | 25/08/2017 | 26/08/2017 | 27/08/2017 | 28/08/2017 | 29/08/2017 | 30/08/2017 | 31/08/2017 | 01/09/2017 | 02/09/2017 | 03/09/2017 | 04/09/2017 | 05/09/2017 | 06/09/2017 | 07/09/2017 | 08/09/2017 | 09/09/2017 | 10/09/2017 | 11/09/2017 | 12/09/2017 | 13/09/2017 | 14/09/2017 | 15/09/2017 | 16/09/2017 | 17/09/2017 | 18/09/2017 | 19/09/2017 | 20/09/2017 | 21/09/2017 | 22/09/2017 | 23/09/2017 | 24/09/2017 | 25/09/2017 | 26/09/2017 | 27/09/2017 | 28/09/2017 | 29/09/2017 | 30/09/2017 | 01/10/2017 | 02/10/2017 | 03/10/2017 | 04/10/2017 | 05/10/2017 | 06/10/2017 | 07/10/2017 | 08/10/2017 | 09/10/2017 | 10/10/2017 | 11/10/2017 | 12/10/2017 | 13/10/2017 | 14/10/2017 | 15/10/2017 | 16/10/2017 | 17/10/2017 | 18/10/2017 | 19/10/2017 | 20/10/2017 | 21/10/2017 | 22/10/2017 | 23/10/2017 | 24/10/2017 | 25/10/2017 | 26/10/2017 | 27/10/2017 | 28/10/2017 | 29/10/2017 | 30/10/2017 | 31/10/2017 | 01/11/2017 | 02/11/2017 | 03/11/2017 | 04/11/2017 | 05/11/2017 | 06/11/2017 | 07/11/2017 | 08/11/2017 | 09/11/2017 | 10/11/2017 | 11/11/2017 | 12/11/2017 | 13/11/2017 | 14/11/2017 | 15/11/2017 | 16/11/2017 | 17/11/2017 | 18/11/2017 | 19/11/2017 | 20/11/2017 | 21/11/2017 | 22/11/2017 | 23/11/2017 | 24/11/2017 | 25/11/2017 | 26/11/2017 | 27/11/2017 | 28/11/2017 | 29/11/2017 | 30/11/2017 | 01/12/2017 | 02/12/2017 | 03/12/2017 | 04/12/2017 | 05/12/2017 | 06/12/2017 | 07/12/2017 | 08/12/2017 | 09/12/2017 | 10/12/2017 | 11/12/2017 | 12/12/2017 | 13/12/2017 | 14/12/2017 | 15/12/2017 | 16/12/2017 | 17/12/2017 | 18/12/2017 | 19/12/2017 | 20/12/2017 | 21/12/2017 | 22/12/2017 | 23/12/2017 | 24/12/2017 | 25/12/2017 | 26/12/2017 | 27/12/2017 | 28/12/2017 | 29/12/2017 | 30/12/2017 | 31/12/2017 |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|

| Se | 31/12/2016 | 01/01/2017 | 02/01/2017 | 03/01/2017 | 04/01/2017 | 05/01/2017 | 06/01/2017 | 07/01/2017 | 08/01/2017 | 09/01/2017 | 10/01/2017 | 11/01/2017 | 12/01/2017 | 13/01/2017 | 14/01/2017 | 15/01/2017 | 16/01/2017 | 17/01/2017 | 18/01/2017 | 19/01/2017 | 20/01/2017 | 21/01/2017 | 22/01/2017 | 23/01/2017 | 24/01/2017 | 25/01/2017 | 26/01/2017 | 27/01/2017 | 28/01/2017 | 29/01/2017 | 30/01/2017 | 31/01/2017 | 01/02/2017 | 02/02/2017 | 03/02/2017 | 04/02/2017 | 05/02/2017 | 06/02/2017 | 07/02/2017 | 08/02/2017 | 09/02/2017 | 10/02/2017 | 11/02/2017 | 12/02/2017 | 13/02/2017 | 14/02/2017 | 15/02/2017 | 16/02/2017 | 17/02/2017 | 18/02/2017 | 19/02/2017 | 20/02/2017 | 21/02/2017 | 22/02/2017 | 23/02/2017 | 24/02/2017 | 25/02/2017 | 26/02/2017 | 27/02/2017 | 28/02/2017 | 29/02/2017 | 30/02/2017 | 31/02/2017 | 01/03/2017 | 02/03/2017 | 03/03/2017 | 04/03/2017 | 05/03/2017 | 06/03/2017 | 07/03/2017 | 08/03/2017 | 09/03/2017 | 10/03/2017 | 11/03/2017 | 12/03/2017 | 13/03/2017 | 14/03/2017 | 15/03/2017 | 16/03/2017 | 17/03/2017 | 18/03/2017 | 19/03/2017 | 20/03/2017 | 21/03/2017 | 22/03/2017 | 23/03/2017 | 24/03/2017 | 25/03/2017 | 26/03/2017 | 27/03/2017 | 28/03/2017 | 29/03/2017 | 30/03/2017 | 31/03/2017 | 01/04/2017 | 02/04/2017 | 03/04/2017 | 04/04/2017 | 05/04/2017 | 06/04/2017 | 07/04/2017 | 08/04/2017 | 09/04/2017 | 10/04/2017 | 11/04/2017 | 12/04/2017 | 13/04/2017 | 14/04/2017 | 15/04/2017 | 16/04/2017 | 17/04/2017 | 18/04/2017 | 19/04/2017 | 20/04/2017 | 21/04/2017 | 22/04/2017 | 23/04/2017 | 24/04/2017 | 25/04/2017 | 26/04/2017 | 27/04/2017 | 28/04/2017 | 29/04/2017 | 30/04/2017 | 01/05/2017 | 02/05/2017 | 03/05/2017 | 04/05/2017 | 05/05/2017 | 06/05/2017 | 07/05/2017 | 08/05/2017 | 09/05/2017 | 10/05/2017 | 11/05/2017 | 12/05/2017 | 13/05/2017 | 14/05/2017 | 15/05/2017 | 16/05/2017 | 17/05/2017 | 18/05/2017 | 19/05/2017 | 20/05/2017 | 21/05/2017 | 22/05/2017 | 23/05/2017 | 24/05/2017 | 25/05/2017 | 26/05/2017 | 27/05/2017 | 28/05/2017 | 29/05/2017 | 30/05/2017 | 31/05/2017 | 01/06/2017 | 02/06/2017 | 03/06/2017 | 04/06/2017 | 05/06/2017 | 06/06/2017 | 07/06/2017 | 08/06/2017 | 09/06/2017 | 10/06/2017 | 11/06/2017 | 12/06/2017 | 13/06/2017 | 14/06/2017 | 15/06/2017 | 16/06/2017 | 17/06/2017 | 18/06/2017 | 19/06/2017 | 20/06/2017 | 21/06/2017 | 22/06/2017 | 23/06/2017 | 24/06/2017 | 25/06/2017 | 26/06/2017 | 27/06/2017 | 28/06/2017 | 29/06/2017 | 30/06/2017 | 01/07/2017 | 02/07/2017 | 03/07/2017 | 04/07/2017 | 05/07/2017 | 06/07/2017 | 07/07/2017 | 08/07/2017 | 09/07/2017 | 10/07/2017 | 11/07/2017 | 12/07/2017 | 13/07/2017 | 14/07/2017 | 15/07/2017 | 16/07/2017 | 17/07/2017 | 18/07/2017 | 19/07/2017 | 20/07/2017 | 21/07/2017 | 22/07/2017 | 23/07/2017 | 24/07/2017 | 25/07/2017 | 26/07/2017 | 27/07/2017 | 28/07/2017 | 29/07/2017 | 30/07/2017 | 31/07/2017 | 01/08/2017 | 02/08/2017 | 03/08/2017 | 04/08/2017 | 05/08/2017 | 06/08/2017 | 07/08/2017 | 08/08/2017 | 09/08/2017 | 10/08/2017 | 11/08/2017 | 12/08/2017 | 13/08/2017 | 14/08/2017 | 15/08/2017 | 16/08/2017 | 17/08/2017 | 18/08/2017 | 19/08/2017 | 20/08/2017 | 21/08/2017 | 22/08/2017 | 23/08/2017 | 24/08/2017 | 25/08/2017 | 26/08/2017 | 27/08/2017 | 28/08/2017 | 29/08/2017 | 30/08/2017 | 31/08/2017 | 01/09/2017 | 02/09/2017 | 03/09/2017 | 04/09/2017 | 05/09/2017 | 06/09/2017 | 07/09/2017 | 08/09/2017 | 09/09/2017 | 10/09/2017 | 11/09/2017 | 12/09/2017 | 13/09/2017 | 14/09/2017 | 15/09/2017 | 16/09/2017 | 17/09/2017 | 18/09/2017 | 19/09/2017 | 20/09/2017 | 21/09/2017 | 22/09/2017 | 23/09/2017 | 24/09/2017 | 25/09/2017 | 26/09/2017 | 27/09/2017 | 28/09/2017 | 29/09/2017 | 30/09/2017 | 01/10/2017 | 02/10/2017 | 03/10/2017 | 04/10/2017 | 05/10/2017 | 06/1 |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
|----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|