



Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem

Doktori értekezés tézisei

Kajszi és őszibarack fajták vírusdiagnosztikai vizsgálata új generációs szekvenálással

Baráth Dániel

Gödöllő

2021

A doktori iskola

megnevezése: Biológiatudományi Doktori Iskola

Tudományága: Biológia tudomány

Vezetője: Dr. Nagy Zoltán
Intézet vezető, egyetemi tanár, DSc
Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem
Mezőgazdaság-és Környezettudományi
Kar
Növényteni és Ökofiziológiai Intézet

Témavezető: Dr. Várallyay Éva
Csoportvezető, tudományos tanácsadó
Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem
Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani
Tanszék
Genomikai Kutatócsoport

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŪZÖTT CÉLOK

A kajszi és az őszibarack ültetvényeink számos patogén kórokozó (gomba, baktérium, vírus, viroid) fertőzésének vannak kitéve. A vírusfertőzés a termés mennyiségének csökkenését, minőségének romlását eredményezheti, látens fertőzés esetén viszont nem jelentkeznek a vírus jelenlétére utaló tünetek. A vírusok, viroidok elleni védekezés során a megelőzésre helyeződik a hangsúly. Kiemelkedően fontos a vírusmentes szaporítóanyag előállítása, illetve az ellenőrzésére hatékony vírusdiagnosztikai eszközök használata, fejlesztése.

Magyarországon a bioteszt, PCR és ELISA módszerekkel végeznek hatósági virológiai vizsgálatokat. A nagy áteresztőképességű szekvenálási (high-throughput sequencing - HTS) technikák segítségével viszont a vizsgált mintában jelen lévő összes kórokozó kimutatható. A HTS-alapú technikák segítségével egyre több kórokozó került leírásra olyan országokból, ahonnan előfordulásáról korábban nem rendelkezünk adatokkal.

A HTS alapú vírusdiagnosztika egy speciális ága az RNS interferencia során keletkező kis RNS-ek szekvenálása. Az RNS interferencia az eukarióták konzervált antivirális

védekezési mechanizmusa. A vírusok replikációja során duplaszálú RNS-ek keletkeznek, melyeket az RNáz aktivitású DICER enzimek 21-24 nukleotid hosszúságú kis interferáló RNS-ekre (small interfering RNA - siRNS) hasítanak (Csorba & Burgyán, 2016). A kis RNS HTS alapú vizsgálatokkal lehetőség adódik a vizsgált minta viromjának meghatározására, ezáltal a bővebb ismereteket szerezhetünk egyes vírusok/viroidok lehetséges gazdanövényeiről, illetve elterjedtségének mértékéről. Kutatásunk során az Érdi Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet kajszii- és őszibarack fajtáin végeztünk kis RNS HTS alapú vírusdiagnosztikai vizsgálatokat.

PhD munkám céljaként tűztem ki, hogy:

1. Optimalizáljuk a kis RNS HTS-t, mint vírusdiagnosztikai eszközt a kajszii- és őszibarack vizsgálatára.
2. Meghatározzuk a vizsgált egyedek viromját, különös tekintettel az esetlegesen hazánkban, vagy az adott fajon eddig még nem leírt vírusokra.
3. Az adott fajták izolátorházakban, szabadföldi ültetvényeken lévő egyedeinek vírusprofiljából következtethessünk a megjelenő fertőzések forrására.

4. Összehasonlítsuk a bioteszt és a kis RNS HTS, mint diagnosztika eszközök hatékonyságát.

5. Az azonosított vírusok variánsait is azonosítsuk, annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a tömegteszteléskor az RT-PCR vizsgálatok során használt primerek milyen hatékonysággal képesek kimutatni az adott vírus hazánkban előforduló variánsait.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatainkhoz szükséges levélmintákat kajszi és őszibarack fákról gyűjtöttük, a NAIK Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet Elvira majorban található izolátorházaiból és törzsültetvényeiről. Vizsgálatainkhoz Ligeti óriás, Pannónia és Magyar kajszi fajtákból gyűjtöttünk leveleket. Az őszibarack esetében Springcrest és Cresthaven őszibarack fajták izolátorházból, illetve törzsültetvényből származó egyedeiről gyűjtöttünk levélmintákat. Az izolátorház átfogóbb vírusdiagnosztikai vizsgálatához további 10 fajtáról (Flavortop, Nektár H, Venus, Incrocio Pieri, Cresthaven, Redhaven, Champion, Suncrest, Aranycsillag, Apolka) gyűjtöttünk levélmintákat, melyek a vizsgálat idejében a NÉBIH Velencei Virologiai Állomásán bioteszt vizsgálat alatt álltak.

A levélmintákból RNS izolálást végeztünk Gambino módosított CTAB-alapú protokollja alapján végeztük. (Gambino et al., 2008). Annak érdekében, hogy minél több egyed virológiai státuszáról információt gyűjthessünk, a kis RNS szekvenáláshoz mintakeverékeket (poolokat) készítettünk az egyedek RNS izolátumaiból. A poolok készítéséhez az egyedi RNS-eket egyenlő arányban

(koncentrációban) mértük össze. A kajszai esetében hat keverékeket készítettünk fajták (Ligeti óriás, Pannónia és a Magyar kajszai) izolátorházból, illetve törzsültetvényből származó egyedeiből. A Cresthaven és Springcrest őszibarack izolátorházból és törzsültetvényéből származó mintákból négy keveréket, az izolátorház tíz, bioteszt vizsgálat alatt álló fajtáiból (Flavortop, Nektár H, Venus, Incrocio Pieri, Cresthaven, Redhaven, Champion, Suncrest, Aranycsillag, Apolka) még egy keveréket készítettünk.

A kis RNS könyvtárakat az RNS keverékek felhasználásával, a Truseq Small RNA Library Preparation Kit (Illumina) optimalizált protokollja alapján készítettük (Czotter et al., 2018). Először a kisRNS frakciót izoláltuk az RNS kivontokból, majd 3' és 5' adaptereket ligáltunk a kis RNS-ekhez. Reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk, melyet PCR-rel amplifikáltunk. Végül gélből izoláltuk és tisztítottuk a kis RNS könyvtár megfelelő mérettartományba eső frakcióját.

A kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése során illesztettük a kis RNS szekvenciákat, illetve a kis RNS-ek átfedő szakaszaiból épített kontigokat az NCBI RefSeq adatbázisára. A kajszai és őszibarack kis RNS könyvtárak

bioinformatikai elemzése során pozitív vírustalálatként értékeltük, ha az adott vírusra illeszkedő nem redundáns readek és a normalizált redundáns readek (redundáns read szám / 1000000) száma elérte a küszöbértéket (200 read), kaptunk kontig találatot és a readek referencia genomra vetített lefedettsége 40% feletti értéket adott.

A kapott vírustalálatokat RT-PCR-rel igazoltuk vissza, a CVA, PaLV és PLMVd esetében Northern-blot visszaigazolást is végeztünk. A PCR reakciókhoz szakirodalomban publikált primerek mellett saját tervezésű primereket is használtunk. Annak érdekében, hogy a szekvencia vizsgálatokhoz a PCR reakció során sokszorozott vírus/viroid szekvenciáját a termék teljes hosszúságában meghatározhassuk, a Q5 polimerázzal felsokszorozott, Thermo Scientific GenJET Extraction Kittel izolált PCR terméket CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) pJET1.2/blunt vektorba klónoztuk. A szekvenált PCR-termékek és klónok nukleinsav, illetve aminosav szekvenciák illesztéséhez Clustal Omega, filogenetikai elemzéséhez pedig MEGA 6.0 szoftvereket használtunk.

EREDMÉNYEK

Kajszi fák kis RNS HTS-sel megállapított vírusfertőzöttsége

A kajszi minták elemzése során találatot kaptunk a következő vírusokra: *Cherry Virus A* (CVA), *Little cherry virus 1* (LChV-1) és *PLum pox virus* (PPV). A Pannónia fajta izolatótházból és törzültetvényből származó egyedei is CVA fertőzöttséget mutattak, melyet Northern-blottal és RT-PCR-rel is megerősítettünk. A Pannónia fajta egyedeinek vizsgálata esetében minden esetben kimutattuk a CVA fertőzést, továbbá két *in vitro* növényből is azonosítottuk a vírust. A filogenetikai elemzés során a kajsziról származó CVA klón szekvencia a nem cseresznye gazdanövényről származó izolátumokkal együtt klaszterizálódott, valamint közeli rokonságot mutatott kanadai, illetve japán kajszi gazdanövényből izolált CVA szekvenciákkal.

A Magyar kajszi törzültetvényből készített könyvtárból kimutattuk a LChV-1 jelenlétét. A vírus HSP70h és köpenyfehérjét kódoló szakaszának amplifikálására tervezett primerekkel végzett RT-PCR-rel a két szabadföldi minta közül csak az egyik esetében tapasztaltunk LChV-1 fertőzést. A Magyar kajszi klón filogenetikailag közeli rokonságot

mutatott a kajszai gazdanövényről származó amerikai és cseh izolátumokkal, valamint a Kwanzan satnyulás szindrómáért felelős Olaszországból, meggy gazdanövényről izolált LChV-1 szekvenciával. A Magyar kajszai törzsültetvényről származó izolátum CP és HSP70h szekvenciák nagymértékű homológiát mutattak a magyar nemesítésű, Csehországból származó Madarska és Magyar kajszai fajtákból izolált LChV-1-el.

A Ligeti óriás és a Magyar kajszai törzsültetvényből kimutattuk a PPV fertőzést. A vírus RT-PCR-rel történő visszaigazolása során a Ligeti óriás és a Magyar kajszai esetében a 2-2 vizsgált egyedből csak 1-1 esetben detektáltuk a vírust, a Magyar kajszai esetében a PPV mellett LChV-1 fertőzést is kimutattunk.

Őszibarack fajták kis RNS HTS-sel megállapított vírusfertőzöttsége

Az őszibarack könyvtárak bioinformatikai elemzése során kimutattuk a következő vírusokat: *Peach-associated luteovirus* (PaLV), *Nectarine stem-pitting-associated virus* (NSPaV), *Plum pox virus* (PPV), és viroidok közül pedig a *Peach latent mosaic viroid*-ot (PLMVD).

A PaLV-t azonosítottuk a Springcrest izolátorházból és törzsületvényből, a Cresthaven törzsületvényből készített könyvtárakból, valamint az őszibarack izolátorház 10 fajtájából készített könyvtárból. A PaLV RT-PCR alapú visszaigazolása során a vírus 1132 bp hosszú régióját amplifikáltuk, mely a vírus ORF3a, köpenyfehérjéjét és mozgási fehérjéjét kódoló géneket fedi le. A Springcrest izolátorházból készített keverék egyedeinél 4-ből 3 esetben, a törzsületvény esetében a két egyed közül csak egy esetben, az *in vitro* növények vizsgálata során mindkét növényből kimutattuk a PaLV fertőzést. A Cresthaven fajta izolátorházban található egyedek között 2 esetben kaptunk pozitív találatot. Az izolátorház 10 fajtáját reprezentáló keverék 10 egyede közül a Cresthaven, Champion, Suncrest és Aranycsillag fajtákból kaptunk pozitív PCR terméket, amit Northern blottal is megerősítettünk.

Az NSPaV vírus jelenlétét kimutattuk az Springcrest izolátorházból és a Cresthaven törzsületvényből, valamint az őszibarack izolátorház 10 fajtájából készített könyvtárakból. A NSPaV RT-PCR alapú visszaigazolása során a vírus 1752 bp hosszúságú, köpenyfehérjéjét és a read-through fehérjéjét kódoló régióját amplifikáltuk. A Springcrest izolátorház

mintakeverék mind a 4 egyede, valamint mindkét tesztelt *in vitro* növény fertőzöttnek bizonyult, míg a Cresthaven törzsültetvény mintakeverék egyedei közül csak egy esetben detektáltuk a vírust.

A Springcrest izolátorházból és törzsültetvényből detektáltuk a PPV jelenlétét, melyet a köpenyfehérje amplifikálására tervezett primerek segítségével RT-PCR-rel megerősítettük.

A Cresthaven izolátorházból és törzsültetvényből készített kis RNS könyvtárakból kimutattuk a PLMVd-t. A PLMVd jelenlétét visszaigazoltuk RT-PCR-rel és Northern blot analízissel a Cresthaven izolátorházból, törzsültetvényből származó egyedek keverékeiből. A próbát és a PCR-primereket a teljes viroid genom kimutatására, amplifikálására terveztük. A Cresthaven mintakeverékek minden egyede PLMVd fertőzöttséget mutatott.

A Cresthaven izolátorházból és törzsültetvényéből származó PLMVd klónok szekvenciájában előforduló pontmutációkat a referencia genom szerkezeti ábrájára illesztve azt tapasztaltuk, hogy a pontmutációk jelentős része a kihurkolódott szerkezeti elemekben található, melyek a molekula stabilitásának fenntartásában nem rendelkeznek

jelentős szereppel. A viroid duplaszálú karjain azonosítottunk olyan pontmutáció párokat, melyek továbbra is képesek egymással bázispárosodásra, azaz nem eredményeznek változást a viroidra jellemző másodlagos szerkezetben.

Az őszibarack izolátorház 10 fajtáját reprezentáló keverék RT-PCR és Northern-blot vizsgálata alapján 6 fajta mutatott PLMVd fertőzést.

Az őszibarack izolátorházban vizsgálataink során jelentős mértékű fapusztulást tapasztaltunk. Az izolátorház virológiai státuszának meghatározása érdekében az őszibarack mintákban a kis RNS könyvtárak HTS vizsgálatokkal detektált vírusok jelenlétét RT-PCR-rel vizsgáltuk az izolátorház egyedeiben. Az izolátorház 89 egyedéből 65 fa esetében detektáltunk vírus/viroid fertőzést, 15 fában PPV-t, 19 fánál PaLV-t, 17 egyedben NSPaV-t, 15 esetben PPV-t és 59 fában PLMVd-t mutattunk ki.

A PaLV klónozott szekvenciák filogenetikai vizsgálata során egyes fajták esetében megfigyeltük, hogy az adott fajta egyedeiből izolált PaLV szekvenciák együtt klaszterizálódnak (Michelini, Springcrest, Cresthaven), míg más esetekben az egyedeknél nem tapasztaltunk fajta szerinti szeparációt a filogenetikai fán.

Az NSPaV köpenyfehérjéjét kódoló klónozott szekvenciáit összevetve a GenBank adatbázis szekvenciáival az érdi NSPaV szekvenciák elkülönülten klaszterizálódtak a filogenetikai fán. A részleges köpenyfehérjét kódoló szekvenciák elemzése során a Szobról származó szekvenciákkal az érdi minták monofiletikus csoportot alkottak.

A PLMVd szekvenciákban jelentős genetikai heterogenitást tapasztaltunk, egyes egyedeken belül is számos viroid variáns volt megfigyelhető. Az Öb166/1 fajtából egy 12 nukleotid hosszúság inzerciót azonosítottunk, amely pozícióját tekintve megegyezett a peach calico fenotípus kialakításában fontos szerepet játszó mutációval, szekvenciáját tekintve viszont attól eltér.

Az őszibarack izolátorház 11 fajtájának (Flavortop, Nektár H, Venus, Incrocio Pieri, Cresthaven, Redhaven, Champion, Suncrest, Apolka, Aranycsillag, Elberta) egy-egy egyedét a NÉBIH Velelencei Virologiai Laboratóriumban bioteszttel vizsgálták a 2016-2019 közötti időszakban. A bioteszt során a hatóságilag vizsgálatköteles besorolású PLMVd-t a GF305 indikátornövényen megjelenő tünetek alapján vizsgálták, amely alapján a vizsgált minták esetében nem voltak

láthatóak a viroid jelenlétére utaló tünetek. A bioteszten lévő anyafák keverékéből kimutattuk HTS-sel a PLMVd-t, amit Northern-blottal is visszaigazoltunk. A Venus, Incrocio Pieri, Cresthaven, Champion, Suncrest, Elberta és Apolka fajtákkal szemzett GF305 indikátorból kimutattuk a PLMVd transzmisszióját. A GF305 indikátornövények Northern-blot vizsgálatokból látható, hogy a viroid fertőzött fajták szemzésével a GF305 indikátorok mindegyikébe átjutott a PLMVd.

Új tudományos eredmények

1. A kis RNS HTS alapú szekvenálás bioinformatikai elemzését, valamint az eredmények visszaigazolását követően megállapítottam, hogy a kis RNS HTS hatékony vírusdiagnosztikai módszer a kajszi- és őszibarack minták esetében is.
2. Kajszi minták vizsgálata során kimutattam a CVA és LChV-1 vírusokat, melyek magyarországi előfordulásáról eddig nem rendelkezünk ismeretekkel. A LChV-1 fertőzést kajszi gazdanövényről az elsők között írtuk le.
3. Őszibarack minták elemzése során először mutattam ki a PLMVd és a PaLV jelenlétét hazánkban.

4. A kajszai és őszibarack izolátorházban nevelt egyedek vizsgálata során kimutattam a CVA, LChV-1, PaLV, NSPaV és PLMVd kórokozókat, amely alapján fertőzött szaporítóanyaggal történő fertőzésre következtethetünk.
5. Az őszibarack izolátorházban megfigyelt jelentős fapusztulás okának vizsgálatokor megállapítottam, hogy nagymértékű PLMVd fertőzés önmagában nem tehető felelőssé az izolátorházban tapasztalt fapusztulásért.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A különböző szekvenálási technikák fejlődésének, valamint a vizsgálatok költségeinek csökkenésének köszönhetően egyre nagyobb teret hódítanak a metagenom szintű diagnosztikai eljárások. A csoportunk által optimalizált fásszárú növények kis RNS HTS-alapú vírusdiagnosztikai protokollját sikeresen alkalmaztuk kajszai és őszibarack minták virológiai vizsgálatához.

Az 5 kajszai könyvtár kis RNS HTS vizsgálata során kimutattuk a CVA, a LChV-1 és a PPV vírusok jelenlétét. A kis RNS HTS vizsgálatok során találatot kaptunk a CVA

vírusra a Pannónia fajta izolátorházából és törzsültetvényből, a LChV-1 vírusra pedig a Magyar kajszi törzsültetvényből készített könyvtárakból. Ezen eredményeink alapján a CVA és a LChV-1 magyarországi előfordulását elsőként írtuk le, a LChV-1 fertőzést kajszi gazdanövényen az elsők között detektáltuk. A CVA fertőzés vélhetőleg szaporítóanyagon keresztül történő fertőzéssel mehetett végbe, mivel nem csak a szabadföldi, hanem az izolátorházából származó Pannónia fajtából is kimutattuk, továbbá 2 minta esetében az *in vitro* növényekből is, míg a LChV-1 esetében nem szaporítóanyagon keresztül történő fertőzésre következtethettünk, ugyanis az izolátorházából nem, csak a Magyar kajszi törzsültetvényből készített keverékből mutattuk ki a vírust. A CVA és a LChV-1 szekvenciák filogenetikai elemzésével a vírusok gazdanövényhez való adaptációjára következtethettünk. A vizsgált szekvenciák homológiáját nagyobb mértékben befolyásolta a vírus gazdanövénye, mint az izolátum származási helye. A Ligeti óriás és Magyar kajszi fajták törzsültetvényeiből kimutattuk a PPV jelenlétét, az izolátorházából származó egyedekből viszont nem, ezért szabadföldi fertőződésére következtethettünk.

Az 5 ősziarack kis RNS könyvtár HTS vizsgálatával kimutattuk a PaLV, NSPaV, PPV vírusok és a PLMVd viroid jelenlétét. Magyarországon az NSPaV és a PPV előfordulásáról rendelkezünk korábbi ismeretekkel, a PaLV és a PLMVd fertőzését viszont csoportunk írta le először. A Springcrest fajtából mind az izolátorházból, mind pedig a törzsültetvényből visszaigazoltuk a PaLV-t, kimutattuk az *in vitro* növényekből is ezért szaporítóanyagon keresztül történő fertőzésre következtettünk. Az NSPaV fertőzés forrását nem tudtuk egyértelműen meghatározni a Springcrest és Cresthaven fajták kis RNS könyvtárainak elemzése alapján, mert a Springcrest esetében csak az izolátorházból, Cresthaven fajtából pedig csak a törzsültetvényből mutattuk ki a vírust. A PaLV és az NSPaV vírusokat csak pár éve azonosították ezért tünetek kialakításában való részvételükről, gazdasági jelentőségükről nem áll rendelkezésre kellő információ. A Springcrest izolátorházból és törzsültetvényből, és *in vitro* növényekből detektáltunk a PPV, Cresthaven izolátorházból és törzsültetvényből pedig a PLMVd fertőzést, melyek a 14/2017. (III.23.) FM rendelet értelmében vizsgálatköteles kórokozónak minősülnek. Azáltal, hogy izolátorházból és törzsültetvényből is

kimutattuk a kórokozók jelenlétét, szaporítóanyagon keresztüli fertőződésre következtethetünk. A Cresthaven izolátorházból és törzsültetvényből származó szekvenciákat a PLMVd térszerkezetére vetítve 11 pontmutáció párt azonosítottunk, melyek továbbra is képesek voltak bázispárosodásra, ezzel hozzájárulva a viroid stabilitásában jelentős elágazódásokban gazdag konformációjának fenntartásában. Az őszibarack izolátorházban jelentős fapusztulást tapasztaltunk, ezért a virológiai állapotának átfogóbb vizsgálata érdekében az izolátorház egyedeit RT-PCR-rel teszteltük PaLV, NSPaV és PPV vírusokra, Northern-blottal pedig PLMVd-re. Az izolátorházban tapasztalt fapusztulás kiváltó okát nem tudtuk egyértelműen meghatározni, hiszen az elpusztult egyedeket nem tudtuk bevinni a mintavételünkbe, valamint a pusztulást mutató fajták élő egyedeiből számos esetben nem mutattuk ki vírusok/viroid jelenlétét. Az izolátorház fáinak pusztulásában a magas vírus/viroid fertőzöttség ellenére vélhetőleg más patogén kórokozó is szerepet játszhat. A PLMVd szekvenciák vizsgálata során az Öb166/1 fajtából azonosítottunk egy 12 nukleotid hosszúságú inzerciót, ami lokalizációját tekintve megegyezik a peach calico fenotípust

eredményező inzercióval. Az Öb166/1 klónból azonosított inzerció szekvenciája a PC inzerció szekvenciájával nem mutatott homológiát, ezért a régióról keletkező siRNS-ek nem vezetnek a kloroplasztisz biogenezisében fontos szerepet játszó HSP90 mRNS-ének degradációjához, így albínó levéltünetek sem jelentek meg. Az őszibarack izolátorház fajtaiból készített kis RNS könyvtárból kimutattuk a PaLV-t, NSPaV-t és PLMVd-t, viszont a NÉBIH Velencei Virologiai Állomásán vizsgált fajták indikátornövényeken nem mutattak vírus/viroid fertőzésre utaló tüneteket. Vizsgálatunkkal igazoltuk, hogy a PLMVd képes átjutni a vizsgálati mintáról az indikátornövénybe, azonban a viroid számos esetben látens fertőzést eredményez, ezért tünetek hiányában az indikátornövények diagnosztikai alkalmazása téves negatív eredményhez vezethet.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Idegen nyelvű, Impact Factorral rendelkező lektorált tudományos közlemények

Baráth, D.; Jaksza-Czotter, N.; Molnár, J.; Varga, T.; Balássy, J.; Szabó, L.K.; Kirilla, Z.; Tusnády, G.E.; Preininger, É.; Várallyay, É. Small RNA NGS Revealed the Presence of Cherry Virus A and Little Cherry Virus 1 on Apricots in Hungary. *Viruses* 2018, 10, 318. doi.org/10.3390/v10060318

Czotter, N., Molnár, J., Pesti, R., Demián, E., **Baráth, D.**, Varga, T., Várallyay, É. (2018) Use of siRNAs for Diagnosis of Viruses Associated to Woody Plants in Nurseries and Stock Collections. In: *Viral Metagenomics: Methods and Protocols*. (Pantaleo, V. and Chiumenti, M., eds.). New York, NY: Springer New York, pp. 115-130. doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_9

Reuter, G., Várallyay, É., Baráth, D., Földvári, G., Szekeres, S., Boros, Á., Kapusinszky, B., Delwart, E., Pankovics, P. (2019) Analysis of a novel RNA virus in a wild northern white-breasted hedgehog (*Erinaceus roumanicus*). *Archives of Virology* 2019, 164, 3065–3071. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04414-7>

Idegen nyelvű, Impact Factorral nem rendelkező lektorált tudományos közlemények

Dániel Baráth, Éva Várallyay, László Gergely (2019) Repeated occurrence of maize redness disease in Hungarian post-control plots in Monorierdő, (Central Hungary) Georgikon for Agriculture 23 (1): 11-16.

Magyar nyelvű, lektorált tudományos közlemények

Baráth Dániel, Czotter Nikoletta, Bükki Alexandra, Oláh Beatrix, Balássy Júlia, Varga Tünde, Szabó Luca, Tóth Tímea, Kirilla Zoltán, Kocsis László, Preininger Éva, Lakatos Tamás, Várallyay Éva (2018): Új csonthéjasokat fertőző vírusok kimutatása Magyarországon, Georgikon for Agriculture, 22 (1): 28-33.

Czotter Nikoletta, Oláh Beatrix, Petres Martin, **Baráth Dániel**, Szabó Luca, Kirilla Zoltán, Kocsisné Molnár Gitta, Kocsis László, Preininger Éva, Lakatos Tamás, Szabó Zoltán és Várallyay Éva (2017) Fitoplazma fertőzöttség vizsgálata kajszi ültetvényeken Georgikon for Agriculture 21:22-26

Idegen nyelvű konferencia kiadványok

Dániel Baráth, Nikoletta Czotter, Júlia Balássy, Tünde Varga, Luca Szabó, Zoltán Kirilla, János Molnár, Gábor E. Tusnády, Éva Preininger, Éva Várallyay (2017) Undescribed viroid detection by metagenomic approach in Hungary 3rd Hungarian Molecular Life Sciences Conference Eger, 2017.március 31-április 2.

Dániel Baráth, Alexandra Bükki, Dávid Czakó, Nikoletta Czotter, Luca Krisztina Szabó, Zoltán Kirilla, Éva Preininger and Éva Várallyay (2018) Detection of CVA, LChV1 and PLMVd in Prunus sps in Hungarian stock collections. International Conference, Poreč, Croatia, May 16-18, 2018.

Dániel Baráth, Nikoletta Czotter, Alexandra Bükki, Luca Szabó, Zoltán Kirilla, Éva Preininger, Éva Várallyay (2018) First report of Peach latent mosaic viroid in Hungary. Advances in Plant Virology, Birmingham, Birmingham, UK 1April 11-13, 2018.

Dániel Baráth, Nikoletta Jaksá-Czotter, Tünde Varga, Luca Szabó, Zoltán Kirilla, Éva Preininger, Éva Várallyay (2019) Virome of hungarian peach plantations identified by small RNA NGS, LIFE Nemzetközi Élettudományi Konferencia, Eger, 2019 március 29-31.

Luca Krisztina Szabó, Nikoletta Czotter, **Dániel Baráth**, Zoltán Kirilla, Attila Hegedűs, Éva Várallyay, Éva Preininger (2018). Establishment of phytoplasma and virus infected in vitro shoot cultures of apricot cultivars. Fialat Biotechnológusok III. Országos Konferenciája, Budapest, 2018 március 28-29.

Alexandra Bükki, **Dániel Baráth**, Nikoletta Czotter, Júlia Balássy, Tünde Varga, Luca Szabó, Zoltán Kirilla, Éva Preininger, Éva Várallyay (2018) Detection of new, cherry

infecting viruses in apricot in Hungary. Fialtal Biotechnológusok III. Országos Konferenciája, Budapest, 2018 március 28-29.

Magyar nyelvű előadás

Baráth Dániel, Czotter Nikoletta, Balássy Júlia, Varga Tünde, Molnár János, Tusnády E. Gábor, Preininger Éva, Várallyay Éva (2017) Hazánkban új viroid kimutatása kis RNS szekvenálással Hazánkban új viroid kimutatása kis RNS szekvenálással Fialtal RNS kutatók fóruma, Gödöllő 2017 június 23

Czotter Nikoletta, Oláh Beatrix, Petres Martin, **Baráth Dániel**, Szabó Luca, Kirilla Zoltán, Kocsisné Molnár Gitta, Kocsis László, Preininger Éva, Lakatos Tamás, Szabó Zoltán és Várallyay Éva (2017) Fitoplazma fertőzöttség vizsgálata kajszi ültetvényeken XXVII Növényvédelmi Fórum, Keszthely, 2017 január 17-20.

Baráth Dániel, Czotter Nikoletta, Varga Tünde, Szabó Luca, Kirilla Zoltán, Balássy Júlia, Perininger Éva és Várallyay Éva (2018) Csonthéjasok vírusdiagnosztikai vizsgálata kis RNS-ek szekvenálásával, MBK Napok, Gödöllő, November 29-30. Czotter Nikoletta, Estefania Pena, **Baráth Dániel**, Csonka Gergely, Várallyay Éva (2018) Almafa boszorkányseprűsödés vizsgálata Olcsvaapátiban 64.

Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest 2017 február 20-21.

Baráth Dániel, Czotter Nikoletta, Bükki Alexandra, Oláh Beatrix, Balássy Júlia, Varga Tünde, Szabó Luca, Tóth Tímea, Kirilla Zoltán, Kocsis László, Preininger Éva, Lakatos Tamás, Várallyay Éva (2018): Új csonthéjasokat fertőző vírusok kimutatása Magyarországon. XXVIII Növényvédelmi Fórum, Keszthely, 2017 január 17-19.

Baráth Dániel, Jaksa-Czotter Nikoletta, Varga Tünde, Bükki Alexandra, Balássy Júlia, Oláh Beatrix, Szabó Luca, Kirilla Zoltán, Balássy Júlia, Preininger Éva Várallyay Éva (2019) Kajszi és őszibarack ültetvény vírusdiagnosztikai vizsgálata kis RNS-ek újgenerációs szekvenálásával, 65. Növényvédelmi Napok, Budapest, 2019 február 19-20

**A munkát bemutató szerzőt aláhúzással jelöltük*

FELHASZNÁLT IRODALOM

- Csorba, T., & Burgyán, J. (2016). Antiviral silencing and suppression of gene silencing in plants. In *Current Research Topics in Plant Virology* (pp. 1–33). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32919-2_1
- Czotter, N., Molnár, J., Pesti, R., Demián, E., Baráth, D., Varga, T., & Várallyay, É. (2018). Use of siRNAs for diagnosis of viruses associated to woody plants in nurseries and stock collections. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1746, pp. 115–130). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_9
- 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), 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>