



## **Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**

Szőlőültetvények virológiai vizsgálata kis RNS alapú nagy  
átersztőképességű szekvenálással, valamint a Grapevine Pinot gris vírus  
új gazdanövényeinek azonosítása Magyarországon

Demián Emese

Gödöllő

2026

**A doktori iskola**

**megnevezése:**

**Természettudományok Doktori Iskola**

**Vezetője:**

**Csákiné Prof. Dr. Michéli Erika**

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

MATE, Környezettudományi Intézet

**Doktori program:**

**Biológiai tudományi Doktori program**

**tudományága:**

biológiai tudományok

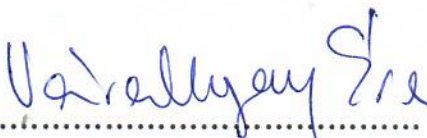
**Témavezető(k):**

**Dr. Várallyay Éva, DSc**

tudományos tanácsadó, az MTA levelező tagja

MATE, Növényvédelmi Intézet

.....  
**Az iskolavezető jóváhagyása**

  
.....

**A témavezető(k) jóváhagyása**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....</b>	<b>6</b>
<b>1. BEVEZETÉS.....</b>	<b>10</b>
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>12</b>
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>13</b>
3.1. Szőlőtermesztés Magyarországon.....	13
3.1.1. Filoxéra vész és a szőlő alanyok használata.....	14
3.1.2. Magyarországon jelentős szőlő alanyfajták.....	15
3.1.3. Szőlő szaporítóanyag előállítása és helyzete Magyarországon.....	16
3.2. Szőlőt fertőző vírusok és viroidok.....	17
3.2.1. Magyarországon előforduló szőlővírusok.....	17
3.2.1.1. Vizsgálatköteles vírusok Magyarországon.....	18
3.2.1.2. Nem vizsgálatköteles vírusok Magyarországon.....	18
3.2.2. Magyarországon előforduló szőlőt fertőző viroidok.....	19
3.3. Növényi vírusok fertőzésének molekuláris jellemzői.....	20
3.3.1. Vírusfertőzés folyamata.....	20
3.3.2. Növények védekezési lehetőségei a vírusfertőzés ellen.....	21
3.3.2.1. Az RNS interferencia, mint védekezési mód.....	21
3.4. Vírusdiagnosztikai módszerek.....	22
3.4.1. Biotesztelés.....	22
3.4.2. Szerológiai vizsgálatok.....	23
3.4.3. Nukleinsav-hibridizációs technikák.....	24
3.4.4. PCR és azon alapuló módszerek.....	25
3.4.5. Nagy áteresztőképességű szekvenálási technikák (HTS) diagnosztikai alkalmazása.....	25
3.5. Növényvédelmi lehetőségek vírusok ellen.....	27
3.5.1. Vírusmentesítési módszerek.....	27
3.5.1.1. Hőkezelés.....	27
3.5.1.2. Merisztéma tenyészetek.....	28
3.5.1.3. Szomatikus embriogenezis.....	28
3.5.2. Vírusok elleni védekezés szőlőültetvényekben.....	28

3.6.	Vírusok terjedése és evolúciója.....	29
3.6.1.	Új vírusok megjelenése.....	30
<b>4.</b>	<b>ANYAG ÉS MÓDSZER.....</b>	<b>33</b>
4.1.	Mintagyűjtés.....	33
4.1.1.	Szőlőalany minták begyűjtése.....	33
4.1.2.	Szőlő és gyomnövény minták gyűjtése a GPGV vizsgálatához.....	34
4.1.3.	A GVT kimutatásához használt növényi minták.....	37
4.2.	RNS izolálás.....	37
4.2.1.	RNS izolálás fás szárú növényekből.....	37
4.2.2.	RNS izolálás lágy szárú növényekből.....	38
4.3.	RNS keverékek (pool-ok) előállítása.....	39
4.4.	Kis RNS könyvtár készítése.....	39
4.5.	A kis RNS HTS eredményeinek bioinformatikai elemzése.....	42
4.6.	Bioinformatikai elemzés eredményeinek igazolása RT-PCR módszerrel.....	43
4.6.1.	cDNS szintézis.....	43
4.6.2.	PCR vizsgálat.....	43
4.7.	PCR termék tisztítása és klónozása.....	45
4.8.	Sanger szekvenálás.....	45
4.9.	Szekvencia és filogenetikai elemzés.....	45
4.10.	Northern hibridizáció.....	46
<b>5.</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGVITÁSA.....</b>	<b>48</b>
5.1.	Szőlő alany ültetvények vírusfertőzöttségének felmérése kis RNS HTS-sel.....	48
5.1.1.	Kis RNS HTS eredményeinek bioinformatikai elemzése.....	48
5.1.2.	A szekvenálási eredmények igazolása RT-PCR módszerrel.....	49
5.1.2.1.	Vizsgálatköteles vírusok előfordulása az alanyültetvényeken és alany fajtagyűjteményekben.....	51
5.1.2.2.	Viroidok előfordulása az alanyültetvényeken és alany fajtagyűjteményekben..	54
5.1.2.3.	Nem vizsgálatköteles vírusok jelenléte.....	57
5.1.2.3.1.	A GRSPaV vizsgálata.....	57
5.1.2.3.2.	A GSyV-1 vizsgálata.....	58
5.1.2.3.3.	A GPGV vizsgálata.....	62

5.2.	Szőlőültetvények és gyomnövények GPGV fertőzöttségének vizsgálata.....	67
5.2.1.	A GPGV kimutatása RT-PCR módszerrel .....	67
5.2.2.	A GPGV kimutatása Northern hibridizációval .....	70
5.2.3.	A GPGV szekvenciák elemzése és filogenetikai összehasonlítása .....	71
5.3.	A termő szőlőültetvényekből készített kis RNS HTS eredményeinek elemzése .....	76
5.3.1.	A kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése .....	77
5.3.2.	A GVT jelenlétének visszaigazolása RT-PCR módszerrel .....	77
5.3.3.	A GVT szekvenciák elemzése és filogenetikai összehasonlítása.....	80
<b>6.</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....</b>	<b>84</b>
6.1.	Hazai alanyültetvények vírus és viroid fertőzöttségének felmérése kis RNS HTS-sel..	84
6.2.	GPGV kimutatása és vizsgálata különböző növényi gazdáknban.....	86
6.3.	Korábbi HTS adatok újra elemzése a GVT hazai jelenlétének kimutatására.....	87
<b>7.</b>	<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>90</b>
<b>8.</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>91</b>
<b>9.</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>94</b>
<b>10.</b>	<b>MELLÉKLETEK.....</b>	<b>110</b>
<b>11.</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>118</b>



## JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AGO	argonaute – argonaute (fehérjecsald)
AGVd	Australian grapevine viroid – ausztrál szőlőviroid
AMV	Alfalfa mosaic virus – lucerna mozaik vírus
ArMV	Arabis mosaic virus - arabisz mozaik vírus
BSA	bovine serum albumin – szarvasmarha szérumalbumin
cDNS	complementary DNA – komplementer DNS
CEVd	Citrus exocortis viroid – citrom-kéregelhalás viroid
CP	coat protein – burokfehérje / köpenyfehérje / kapszidfehérje
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide – cetil-trimetil-ammónium-bromid
DAS-ELISA	double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay – kettős ellenanyagos rögzítésen alapuló enzimhez kapcsolt immunológiai vizsgálat
DCL	Dicer-like – Dicer-szerű (enzim)
dsRNS	double-stranded RNA – duplaszálú RNS
EB	extraction buffer – extrakciós puffer
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay – enzimhez kapcsolt immunológiai próba
EtBr	ethidium bromide – etídium-bromid
FDE	formamide denaturing electrophoresis buffer – formamidot tartalmazó denaturáló elektroforézis puffer
GBLV	grapevine Bulgarian latent virus – szőlő bulgáriai látens vírus
GCMV	grapevine chrome mosaic virus – szőlő krómsárga mozaik vírus
GDefV	grapevine deformation virus – szőlő deformációs vírus
GFVA	grapevine foveavirus A – szőlő foveavírus A
GFkV	grapevine fleck virus - szőlő foltosodás vírus

GFLV	grapevine fanleaf virus - szőlő páfránylevelűség vírus
GLMD	grapevine leaf mottling and deformation – szőlő levélfoltosság és deformáció
GLPV	grapevine line pattern virus – szőlő vonalas mintázottság vírus
GLRaV-1	grapevine leafroll associated virus 1 - szőlő levélsodródással társult vírus 1
GLRaV-2	grapevine leafroll associated virus 2 - szőlő levélsodródással társult vírus 2
GLRaV-3	grapevine leafroll associated virus 3 - szőlő levélsodródással társult vírus 3
GLRaV-4	grapevine leafroll associated virus 4 - szőlő levélsodródással társult vírus 4
GPGV	grapevine Pinot gris virus – szőlő Pinot gris vírus
GRGV	grapevine red globe virus – szőlő red globe vírus
GRSPaV	grapevine rupestris stem pitting-associated virus – szőlő rupestris törzsgödrösödés betegséggel-társult vírus
GRVfV	grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus – szőlő Roditis levélszíneződéshez társuló vírus
GSyV-1	grapevine Syrah virus 1 – Szőlő Syrah vírus 1
GVA	grapevine virus A – szőlő A-vírus
GVB	grapevine virus B – szőlő B-vírus
GVT	grapevine virus T – szőlő T-vírus
GYSVd-1-2-3	grapevine yellow speckled viroid 1-2-3 – szőlő sárgafoltosság viroid 1-2-3
HSVd	hop stunt viroid – komlótörpülés viroid
HTS	high-throughput sequencing – nagy áteresztőképességű szekvenálás
LAMP	loop-mediated isothermal amplification – hurokirányított izotermális amplifikáció
LB	Luria-Bertani – Luria–Bertani táptalaj
MAE puffer	morpholinoacetate-EDTA buffer – morfolinoacetát–EDTA puffer
ME	meristem culture – merisztéma tenyésztés

MOPS	3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid – 3-(N-morfolino)-propánszulfonsav
MP	movement protein – mozgási fehérje
PVP-40	polyvinylpyrrolidone (40 kDa) – polivinil-pirrolidon (40 kDa)
qPCR	quantitative polymerase chain reaction – valós idejű (kvantitatív) polimeráz láncreakció
RBDV	raspberry bushy dwarf virus – málna bokrostörpülés vírus
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase – RNS-függő RNS-polimeráz
RISC	RNA-induced silencing complex – RNS-indukálta csendesítő komplex
RNSi	RNS-interferencia
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction – reverz transzkripció polimeráz láncreakció
SDS	sodium dodecyl sulfate – nátrium-dodecil-szulfát
SE	somatic embryogenesis – szomatikus embriogenezis
siRNS	small interfering RNA – kis interferáló RNS
SNP	single nucleotide polymorphism – egy pontos nukleotid polimorfizmus
SSC	saline-sodium citrate – só-nátrium-citrát puffer
SSTE puffer	sodium chloride–SDS–Tris–EDTA buffer – nátrium-klorid–SDS–Tris–EDTA puffer
TBE	Tris-borate-EDTA – Trisz-borát-EDTA puffer
TBRV	tomato black ring virus – paradicsom fekete gyűrűs vírus
UTR	untranslated region – nem transzlálódó régió

# 1. BEVEZETÉS

A szőlőtermesztés világszerte jelentős szerepet tölt be, nemcsak gazdasági, hanem kulturális szempontból is. Az emberiség évezredek óta foglalkozik ezzel a növényvel, és a szőlő ma is az egyik legelterjedtebb és legsokoldalúbban hasznosított gyümölcskultúra. Európa meghatározó régiójának számít a szőlőtermesztés és a borkészítés tekintetében is. Magyarországon is évszázados hagyománya van, amelyet a jól ismert borvidékek és a gazdag kulturális örökség is megerősít.

A szőlőt nemcsak friss gyümölcsként fogyasztják, hanem többféle feldolgozott formában is megjelenik az élelmiszer- és a feldolgozóiparban. A legfontosabb termék a bor, de ide tartozik még a mazsola, a must, a gyümölcslé, a szőlőmagolaj és különféle ipari alapanyagok is. Értékes beltartalmi tulajdonságai miatt a szőlő iránti érdeklődés az utóbbi években az egészségtudatos táplálkozás és a gyógyszeripar részéről is fokozódott.

A szőlőtermesztésben számos abiotikus és biotikus stresszfaktorról kell megküzdeni, azonban a kórokozók közül a legnehezebb a vírusok és viroidok elleni védekezés. Ha a telepített növényanyag fertőzött volt, utólag már csak a tünetet mutató tőkék eltávolításával lehet meggátolni a vírus elterjedését. Telepítés utáni fertőzés esetében is ugyanez a helyzet. Így a vírusokkal való küzdelemben a legfontosabb a megelőzés, a patogénmentes szaporítóanyag használata és a növényvédelmi kezelések során a fokozott figyelem a potenciális vírus vektorok távoltartására. A vírusok és viroidok termés hozam-csökkenést és minőségromlást, súlyosabb esetben jelentős gazdasági károkat okozhat az ültetvények leromlása, pusztulása által.

Magyarországon a hatóság több módszert használ a vírusok és viroidok kimutatására. Ezek között van a biológiai indexelés, a szerológiai tesztelés ELISA módszerrel vagy a molekuláris biológia eljárások közül a PCR vagy RT-PCR. Ez utóbbi módszer az, amely a legnagyobb érzékenységet és specifikusságot biztosítja. Azonban nagy hátránya ezeknek a módszereknek, hogy csak már ismert kórokozók azonosítására használhatóak. Az utóbbi években egyre népszerűbb diagnosztikai módszernek bizonyult a nagy-áteresztőképességű szekvenálás (high throughput sequencing, HTS) technika, amely lehetővé teszi a vizsgált minták teljes virom elemzését. A HTS vírusdiagnosztikai célú felhasználásának egyik első irányzata a kis RNS-ek szekvenálása (small RNA sequencing) volt. Ennek alapja, hogy a kis RNS-ek teljes molekulaként szekvenálhatók és így felhasználhatók a kórokozók azonosítására. A technológia kezdeti időszakában, amikor még csak rövid szekvenciákat tudtak olvasni, a kis RNS-HTS bizonyult a legalkalmasabb megközelítésnek. A szekvenálási technológiák fejlődésével lehetővé vált hosszabb szekvenciák olvasása és bioinformatikai

feldolgozása, így a kis RNS-alapú módszer diagnosztikai alkalmazása mára háttérbe szorult, napjainkban elsősorban a ribodepleted RNS-szekvenálás vált elterjedtté a növényi viromok meghatározásában. Ez a technológia különösen értékes a gyors, pontos és komplex diagnosztika területén, amely hozzájárulhat a szőlőt hatékonyabb növényvédelméhez is.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk során a hazai szőlőalany-ültetvényeket és alany fajtagyűjteményeket vizsgáltuk vírusos és viroidos fertőzöttség szempontjából, elsődlegesen kis RNS-alapú nagy áteresztőképességű szekvenálással. Ugyanezt a diagnosztikai megközelítést alkalmaztuk a további vizsgálatok során is és az alábbi célokat tűztük ki:

- kis RNS HTS-sel meghatározzuk a magyarországi szőlőalany-ültetvények és alany fajtagyűjtemények viromját;
- megvizsgáljuk a szőlő Pinot gris vírus (GPGV) potenciális gazdanövényeit;
- a szőlő termőültetvények és az alanyültetvények HTS adatainak bioinformatikai újraelemzésével megvizsgáljuk a szőlő T-vírus (GVT) lehetséges hazai előfordulását, variánsainak genetikai sokféleségét, és értékeljük a HTS és RT-PCR módszerek érzékenységét a vírus detektálásában.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. Szőlőtermesztés Magyarországon

Magyarországon a szőlő őshonos növény, 2000 éves leletek bizonyítják, hogy már szőlőtermesztéssel is foglalkoztak az akkor itt élő emberek. A középkorban a rossz minőségű ivóvíz és a járványok miatt a bor közkedvelt ital volt. Mátyás király uralkodásának idejében Magyarország Európa első számú szőlő- és bortermelő államai közé tartozott. A 150 éves török hódoltság ugyan lelassította a szőlőtermesztést az elfoglalt területeken, de ezekben az időkben fejlesztették ki például a tokaji szamorodni és tokaji aszú előállításának speciális technikáját. Erre az időszakra tehető a vörösborkészítés módszerének elsajátítása és néhány vörösbor szőlőfajta behozatala, köztük a Kadarka szőlőfajtáé (Feyér, 1970). A 19. századra Magyarország bortermelő nagyhatalomnak számított, azonban 1875-ben hazánkat is elérte az Amerikából behurcolt filoxéra, ami óriási károkat okozott. Emellett még a peronoszpóra és lisztharmat gombás betegségek megjelenése is súlyosbította a károkat (Beck, 2005). A filoxéra-vész után az ország szőlőterületeinek mintegy 80%-át újraterelítették, ám ekkor a homoki szőlőültetvények váltak meghatározóvá a kötött talajú, hegyvidéki ültetvényekkel szemben (Rohály, 2001). A következő nagy változás az első világháború után jelentkezett, a trianoni békeszerződés következményeképpen a bortermelő területek 2/3-a Magyarországon maradt, azonban a borfogyasztók fele határon túlra került. A második világháború jelentős károkat okozott a magyar szőlő- és bortermelésben: számos ültetvény elpusztult vagy elöregedett, a gondozás elmaradása és a gazdasági nehézségek pedig tovább rontották a termelés biztonságát és a bor minőségét (Rakonczás, 2014).

1949-ben a hegyközségi rendszer megszüntetésével és az állami gazdaságok, illetve a termelészövetkezetek kialakításával új korszak kezdődött a magyar szőlő- és bortermelésben. A politikai és gazdasági környezet erőteljesen meghatározta a gazdálkodást: a kötelező beszolgáltatás, a többszöri földosztás és a kisüzemi gazdaságok ellehetetlenítése következtében a hagyományos paraszti tudás és a termelési biztonság fokozatosan visszaszorult, az ültetvények állapota romlott. Az 1950-es években a mennyiségi termelés került előtérbe, amelyet a Szovjetunió hatalmas borfelvétele ösztönzött, így a minőség háttérbe szorult (Csoma, 2004). Az 1960-as évektől indult meg a szőlőrekonstrukció: 1962-től jelentős, 70%-os állami támogatással nagy telepítések zajlottak, és a borászati nagyüzemek korszerűsítése is megkezdődött (Rakonczás, 2014). Bár sok esetben központilag kijelölt, kevésbé alkalmas területekre telepítettek rossz fajtaszerkezetű szőlőket, az ágazat

exportlehetőségei gyorsan bővültek. A magyar borok túlnyomó része szocialista országokba került, elsősorban a Szovjetunióba, az NDK-ba és Lengyelországba, és az 1980-as évek elején az éves borexport elérte a 2 millió hektolitert (Csoma, 2004). A KGST időszak Magyarország számára folyamatos és biztonságos értékesítési piacot jelentett, ahol marketing nélkül is sikeres volt az értékesítés. Ennek hatására a szőlőtermesztés és a borászati feldolgozás nem a minőségre, hanem a mennyiségre fektette a hangsúlyt (Holczapfel, 2022).

1990 után, a rendszerváltozás következtében Magyarország elveszítette keleti fogyasztói piacait, ami túltermelési válsághoz vezetett. Az évtized végére az éves bortermelés mindössze 15%-át, mintegy 600 000 hl-t tett ki az export (Holczapfel, 2022). A keleti piacok megszűnésével Magyarország kénytelen volt a nyugati piacok felé fordulni, amelyhez azonban az egész szőlő-bor ágazat megújítása vált szükségessé. Ennek érdekében a korábbi állami borgazdaságokat privatizálták, külföldi befektetők és hazai vállalkozók tőkeinjekciója, valamint korszerű technológiák alkalmazása segítette az ágazat modernizációját (Pallás, 2016). A minőségorientált termesztéstechnológia, a marketing fontossága, a piaci versenyhelyzet és a terroir-szemlélet új irányokat jelöltek ki a magyar borászat számára (Rakonczás, 2014).

A korábbi szőlőültetvény-összeírások és a HEGYIR adatai alapján a borvidékek és a borvidéken kívüli ültetvények területe a 91 ezer hektárról 62 ezer hektárra csökkent 2001 és 2020 között. A csökkenés főként a borvidékeken kívüli ültetvényeket érintette. A jelen tendenciák azt mutatják, hogy a szőlőültetvények minőségjavító szerkezetváltása zajlik. A területcsökkenés mellett a gazdák igyekeznek gazdaságosan művelhető ültetvényeket kialakítani, emellett pedig minőségi árut termelni (KSH, 2020).

### 3.1.1. Filoxéra vész és a szőlő alanyok használata

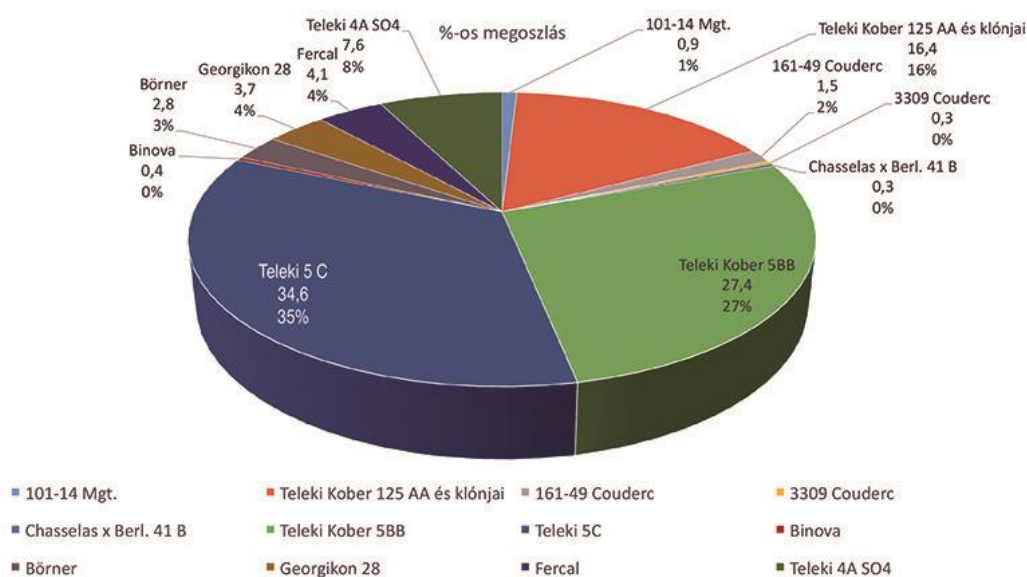
*„Elmúltak immár a régi jó idők, midőn apraja-nagyja kiköltözött a hegyre s a szorgos munka végzése után jó kedvre és vigasságra is maradt idő. (...) Ma már szomorúan döcög ki a tulajdonos egy-két hordócskával a hegyre, s sok helyt maga ki se megy, hogy ne lássa az elszomorító látványt. S mindennek oka az a szabad szemmel láthatatlan szörnyeteg, melyet phylloxérának neveznek.”* - kesergett a Gyakorlati Mezőgazda cikkírója 1888-ban (Beck, 2005).

1875-ben Pancsován (Torontál vármegye) jelent meg először a filoxéra és gyorsan terjedni kezdett. A válság mélypontja 1890-es évek első felében volt. A szőlőfelújítási törvény megjelenése után lendületet kapott az újratelepítés. Így összességében a filoxéravész és az utána következő események egy új, modern szőlő- és borkultúra alapjait teremtették meg (Beck, 2005).

Az ültetvények megújítása során kezdetben a saját gyökérzetükön is termeszthető, észak-amerikai fajok keresztezéseivel előállított, úgynevezett direkt termő fajtákban látták a megoldást. Azonban az ezekből a fajtákból készült borok minősége nem érte el a *Vitis vinifera* L. fajták terméséből készítették termékek minőségét, a 19. század végétől a szőlőalanyok használatát kezdték szorgalmazni. Francia kutatók olyan szőlőfajokat választottak ki, melyeknek gyökérzete a szőlőgyökértetűvel szemben megfelelő ellenállósággal rendelkezett, valamint a szaporíthatóság és a szőlőtermesztés szempontjából is alkalmasak voltak a hazai kötött talajra. Az elmúlt 120-125 évben a *Vitis rupestris*, a *Vitis riparia* és a *Vitis berlandieri* fajok különböző kombinációival előállított alanyok használata volt jellemző (Kocsis, 2019).

### 3.1.2. Magyarországon jelentős szőlő alanyfajták

Magyarországon elsősorban a *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* származású szőlőalanyokat használnak, mivel Teleki Zsigmond szőlőalany nemesítő ezeket a fajtákat találta meszes talajhoz legjobban alkalmazkodónak (Kocsis, 2018). Teleki a filoxéravész pusztítását követően kezdte meg nemesítői munkáját, és több évtizedes kutatással, kitartó kísérletezéssel hozta létre azokat az alanyhibrideket, amelyek hosszú távon biztosították a magyar szőlőtermesztés fennmaradását. Nevéhez fűződnek olyan világszerte ismert és máig használt fajták, mint a 'Teleki 5C', a 'Teleki-Kober 125AA', a 'Teleki-Fuhr. S.O.4' valamint a 'Teleki Kober 5BB', amelyek nemcsak a meszes talajokhoz való kiváló alkalmazkodásukkal, hanem ellenálló képességükkel is kiemelkedtek (Bakonyi & Bakonyi, 2002). A szőlőültetvény-rekonstrukciók alkalmával, az 1960-as években született kutatási eredmények figyelembevételével a *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* 'Teleki 5C' és a *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* 'Teleki Kober 5BB' alanyfajták váltak uralkodóvá (1. ábra) (Kocsis, 2018).



**1. ábra A Magyarországon termesztett szőlőalanyfajták törzsültetvényben található százalékos részesedésük szerint (Kocsis, 2018)**

Magyarországon az utóbbi évtizedben némileg kibővült az alanyfajta-használat. Az Európában általánosan termesztett szőlőalanyok hozzáférhetőek a hazai szőlőtermesztők számára is, így az utóbbi évtizedben Magyarországon is nagyobb alanyfajta választék áll rendelkezésre. A hazai termesztek leginkább a következő alanyfajtákat használják: *Berlandieri x Riparia* T. 5C, *Berlandieri x Riparia* T.K. 5BB, *Berlandieri x Riparia* T. 4A SO4, *Berlandieri x Riparia* T. 125AA, Georgikon 28, Fercal, 140 Ruggeri, Börner, 3309 C, 101-14 Mgt (Kocsis, 2018). A fontosabb alanyfajtáink tulajdonságait az M1 melléklet foglalja össze.

### 3.1.3. Szőlő szaporítóanyag előállítása és helyzete Magyarországon

A szőlő szaporítása hazánkban vegetatív úton, jellemzően fás alanyra végzett oltással történik. Az oltás biztosítja a nemes és az alany közötti tartós kapcsolatot: az alany veszi fel a vizet és a tápanyagokat, míg a nemes biztosítja a termést. A szaporítás legelterjedtebb módja a kézi fásoltás, amelyet előhajtás és iskolázás követ. Az iskolázás során történik meg az oltványok meggyökeresedése, az oltási hely fásodása és a nemes hajtás fejlődése. Erre jellemzően április 15. és május 10. között kerül sor, amikor a talajhőmérséklet eléri a 12 °C-ot. A folyamat élettani szempontból legérzékenyebb szakaszai az oltás, az előhajtás és az iskolázás (Szabó, 2019).

A szőlő szaporítóanyag-termesztés minősége számos tényezőtől függ: meghatározó a fajtainnováció, a törzsültetvények egészségi állapota, a termesztéstechnológia fejlettsége, a növényegészségügyi

helyzet, valamint a hatósági ellenőrzés rendszere (Molnár, 2019). Magyarország már a múlt század második felében felismerte az egészséges szaporítóanyag fontosságát, és korán megteremtette a víruseszteztelt szaporítóanyagok előállításának feltételeit. Ugyanakkor az uniós csatlakozással járó szabad áruforgalom új növényegészségügyi kockázatokat hozott, például fitoplazmák és vírusok behozatalát, amelyek fertőzött szaporítóanyaggal is terjedhetnek. Molnár (2019) szerint elengedhetetlen, hogy a termesztés során gyors, olcsó és gyakorlatban is jól használható diagnosztikai módszerek álljanak rendelkezésre, amelyek a látenszen jelenlévő fertőzéseket is megbízhatóan kimutatják. Emellett szükség lenne egy egységes, minden termelő által elérhető és az ellenőrzést támogató informatikai rendszer kiépítésére is. A korábbi hatósági ellenőrzési rendszer szétaprózódása, valamint az elodázott feladatok kezelése nélkül a szőlő szaporítóanyag ágazat hosszú távon is veszélybe kerülhet.

### 3.2. Szőlőt fertőző vírusok és viroidok

A termesztett növényfajok közül a szőlőnek van a legtöbb ismert vírusa. A HTS módszerek fejlődése újabb vírusok azonosítását tette lehetővé, így eddigi ismereteink alapján világszerte 102 szőlőt fertőző vírust azonosítottak (Fuchs et al., 2025). Jelenleg kilenc szőlőt fertőző viroidot ismerünk. Nyolcat a *Pospiviroidae* családból, valamint a besorolás nélküli grapevine hammerhead viroidot (GHVd). Közülük kettőről ismert, hogy betegséget okozhat szőlőben, a grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd1) és a grapevine yellow speckle viroid 2 (GYSVd2) (Fuchs et al., 2025).

#### 3.2.1. Magyarországon előforduló szőlővírusok

A hazánkban előforduló szőlővírusokat több szempont alapján csoportosíthatjuk (például melyik víruscsoportba tartoznak), azonban a kutatási eredmények és azok tárgyalása szempontjából fontos, hogy a jelenlegi hatósági szabályozás szerint melyek azok a vírusok, amelyeket kötelezően kell vizsgálni és melyek, amelyek jelenléte nincs korlátozva a szőlő növényben. A dolgozat szempontjából a következő csoportosítást használom: vizsgálatköteles és nem vizsgálatköteles vírusok, valamint a Magyarországon újonnan leírt vírusok. Szőlővírusok között a hatályos szabályozás szerint vizsgálatköteles nemzárlati károsítók vannak. Ez azt jelenti, hogy a vírus megtalálható az EU-ban, így akár Magyarországon is, azonban gazdasági hatása miatt jelenléte a szaporítóanyagban nem elfogadható (Implementing Regulation (EU) 2019/2072., 2019).

### 3.2.1.1. Vizsgálatköteles vírusok Magyarországon

Magyarországon a szőlő szaporítóanyagok vírusmentességének ellenőrzését a 87/2006. (XII. 28.) FVM rendelet szabályozza. A rendelet 6. és 7. melléklete szerint a vizsgálatköteles vírusok köre a szaporítóanyag előállításának szintjétől függően eltérő. A kiindulási (prebázis) állományok létrehozására szolgáló növényeken vizsgálandó károsítók közé tartozik az arabisz mozaik vírus (arabis mosaic virus, ArMV), szőlő páfránylevelűség vírus (grapevine fanleaf virus, GFLV), szőlő levélsodródással társult vírus 1 (grapevine leafroll associated virus 1, GLRaV-1), szőlő levélsodródással társult vírus 3 (grapevine leafroll associated virus 3, GLRaV-3), a szőlő króm-mozaik vírus (grapevine chrome mosaic virus, GCMV), paradicsom fekete gyűrűs vírus (tomato black ring virus, TBRV), a szőlő A, B, D vírusok (grapevine virus A, B, D, GVA, GVB, GVD) és szőlő foltosodás vírus (grapevine fleck virus, GFkV). A szőlő certifikációs rendszerében vizsgálandó károsítók köre szűkebb, az alábbi vírusokat foglalja magában: ArMV, GFLV, GLRaV-1,-2,-3, valamint a GVA, GVB, GVD és GFkV (87/2006. (XII. 28.) FVM Rendelet, 2006).

### 3.2.1.2. Nem vizsgálatköteles vírusok Magyarországon

- Lucerna mozaik vírus (alfalfa mosaic virus, AMV)

Hazánkban először 1980-ban azonosították és kezdték el vizsgálni. A szőlő levelén különböző mintázatokban levél elszíneződést okoz (sárga foltok, gyűrűk és vonalas minták) (Lehoczky & Beczner, 1980).

- Szőlő levélsodródással-társult vírus 4 (grapevine leafroll- associated virus 4, GLRaV-4)

Szintén Lázár és munkatársai (Lazar et al., 1995) azonosították magyarországi jelenlétét a GLRaV-4-nek is. A szekvencia meghatározására végül majdnem 30 évet kellett várni (Olah et al., 2024).

- Szőlő A-vírus (grapevine virus A, GVA) és szőlő B-vírus (grapevine virus B, GVB)

A „rugose wood” komplex betegségről 1967-ben Martelli és munkatársai (1967) számoltak be Magyarországon. Akkor még nem a GVA és a GVB azonosítása történt, de azóta már tudjuk, hogy ennek a betegségnek a kialakításában a GVA és a GVB is részt vesznek (Pierce & Gohen, 1998; Velasco et al., 2005).

- Szőlő rupestris törzsgödörösödés betegséggel-társult vírus (grapevine rupestris stem pitting-associated virus, GRSPaV).

A harmadik vírus, ami részt vesz a „rugose wood” komplex kialakításában. 1998-ban Meng és munkatársai azonosították molekuláris szinten (Meng et al., 1998).

- Szőlő bulgáriai látens vírus (grapevine Bulgarian latent virus, GBLV)

A GBLV-t Magyarországon először 1980-ban mutatták ki szerológiai módszerrel, 25 különböző szőlőfajtában. A megfigyelések alapján a vírus jelenléte tünetmentes fertőzéssel is társulhatott (Pocsai, 1981).

### 3.2.1.3. Magyarországon újonnan leírt szőlővírusok

- Szőlő Pinot gris vírus (grapevine Pinot gris virus, GPGV)

A GPGV-t először Magyarországon 2018-ban a hazai szőlőültvények virológiai felmérése során azonosította csoportunk kis RNS-ek nagy áteresztőképességű szekvenálásával (Czotter, et al., 2018a).

- Szőlő red globe vírus (grapevine red globe virus, GRGV)

Szintén a hazai szőlőültvények felmérése során került Magyarországon első alkalommal azonosításra a GRGV (Czotter, et al., 2018a).

- Málna bokros törpülés vírus (raspberry bushy dwarf virus, RBDV)

Magyarországon 2012-ben mutatták ki szőlőből első alkalommal (Pleško et al., 2012), később a hazai szőlőültvények átfogó vizsgálata során csoportunk is talált RBDV pozitív szőlőtőkét (Czotter, et al., 2018a).

- Szőlő vonalas mintázottság vírus (grapevine line pattern virus, GLPV)

A vírust 1980-as években azonosította Lehoczky János és vizsgálatai szerint az *Ilarvirus* nemzetségbe sorolta. A szőlőleveleken megjelenő sárga gyűrűs foltos mintázat jellemző a fertőzés akut fázisában (Lehoczky et al., 1987). A vírus szekvencia meghatározására 2020-ban került sor. A csoportunk olasz és belga munkatársakkal együtt HTS (kis RNS, dsRNS és RNA-Seq) és Sanger szekvenálás segítségével határozta meg a vírus nukleotid sorrendjét (Elbeaino et al., 2020). Ez alapján a GLPV az ilarvirusokkal közeli rokonságban álló *Amulavirus* nemzetségbe sorolható (Thompson et al., 2025).

- Szőlő Syrah vírus 1 (grapevine Syrah virus 1, GSyV-1)

A GSyV-1-et Magyarországon 2015-ben írta le először a csoportunk (Czotter et al., 2015).

### 3.2.2. Magyarországon előforduló szőlőt fertőző viroidok

Jelenlegi ismereteink szerint 9 szőlőt fertőző viroidot azonosítottak: komlótörpülés viroid (hop stunt viroid, HSVd), citrom-kéregelhalás viroid (citrus exocortis viroid, CEVd), szőlő sárgafoltosság viroid 1-2-3 (grapevine yellow speckled viroid 1-2-3, GYSVd-1-2-3), ausztrál szőlőviroid (Australian grapevine viroid, AGVd), Japanese grapevine viroid (JGVd), grapevine latent viroid (GLVd), grapevine hammerhead viroid (GHVd) (Fuchs et al., 2025). Eddigi ismereteink szerint ezek közül hazánkban a HSVd, a GYSVd-1 és a CEVd fordulnak elő (Lázár & Bisztray, 2011). A hatályos

rendelet nem szabályozza a viroidok vizsgálatát szőlő szaporítóanyagban (87/2006. (XII. 28.) FVM Rendelet, 2006).

### 3.3. Növényi vírusok fertőzésének molekuláris jellemzői

#### 3.3.1. Vírusfertőzés folyamata

A vírusok passzív módon fertőzik a növényeket, amihez először be kell jutniuk valamilyen úton a növényi sejtekbe. A belépés történhet mechanikai sérülésen keresztül, vektorok segítségével vagy például a sztomákon átjutva (Kumar et al., 2020). A vírus gazdaszervezeten belüli mozgását a mozgási fehérjék segíthetik. Lokálisan a plazmodezmákon keresztül tudnak sejtről sejtre terjedni, szisztemikus terjedésről akkor beszélünk, ha a vírusok elérik a szállítóyalábokat (Lucas, 2006). A vírusok sokszorozódásának és terjedésének hatására tünetek alakulhatnak ki a fertőzött növényen, de nem minden esetben. Azokat a vírusokat és viroidokat, amelyek nem okoznak tünetet az elsődleges gazdáikon „látens”, „tünetmentes” vagy „kriptikus” vírusokként írják le (Chofong et al., 2021). Ezen kívül az endogén pararetrovírusok a gazdanövény genomjába integrálódva gyakran úgynevezett alvó állapotban vannak, így ilyenkor a fertőzött növények tünetmentesek maradhatnak (Richert-Pöggeler & Minarovits, 2014). A szekvenálási és diagnosztikai módszerek fejlődése megerősítette, hogy a vírusok mindenütt jelen vannak a bioszférában még akkor is, ha a fertőzés jelei vagy tünetei nem nyilvánvalóak (Chofong et al., 2021). Lokális fertőzés esetén a tünetek meghatározott területre korlátozódnak és általában a vírus behatolásának helyén alakulnak ki. Ezek jellemző tünete a nekrozis (kis tűszúrás mérettől a nagyobb foltokig), klorózis (ilyenkor a fertőzött sejtek elveszíthetik a klorofilljukat vagy az egyéb pigmentjeiket) és van olyan eset, amikor gyűrűs foltok jelennek meg, amelyek lehetnek klorotikusak vagy nekrotikusak is. Szisztemikus fertőzés esetén a vírus az egész növényre átterjed a xilémen vagy a floémen keresztül, ami a tünetek széles skáláját okozhatja. Ilyenkor a tünetek megjelenése együtt járhat megbetegedéssel is, ami a gazdanövény egészségének leromlásával és akár elhalásával végződhet. Szisztemikus tünetek közé tartoznak a növény méretének változása (pl. törpülés), a mozaik mintázat, a sárgulásos tünetek, a levélsodródás, a gyűrűs foltosság, a nekrotikus foltosság, a fejlődési rendellenességek és a hervadás (Hull, 2014). A szisztemikus fertőzések további két típusba sorolhatók: az akut és perzisztens (tartós). A fertőzés kezdeti szakaszában akut, gyors szaporodást és súlyos tüneteket okozó fertőzésről beszélünk. Ha a vírus hosszú távon jelen marad a növényben, perzisztens fertőzésről beszélhetünk, amely nem feltétlenül

tünetmentes, és a vírus jelenléte hosszú távú kapcsolatot jelent a gazdanövényt (Palukaitis & García-Arenal, 2003; Roossinck, 2010).

### 3.3.2. Növények védekezési lehetőségei a vírusfertőzés ellen

A vírusfertőzésekkel szemben a növények változatos molekuláris mechanizmusokat alakítottak ki.

- **Veleszületett immunválaszok:** A növények veleszületett immunrendszere képes felismerni a vírus részeit, ezáltal elindítani egy védekezési reakciót. Ilyen védekezési reakciók lehetnek a reaktív oxigénformák (ROS) termelése, proteázok aktiválása, védekezéssel kapcsolatos gének indukciója, valamint szignalizációs molekulák felszabadítása (szalicilsav, jázmonsav és etilén) (Dodds & Rathjen, 2010).
- **Fehérjék lebontása:** a növények az ubiquitin-proteozóma rendszerrel a virális fehérjéket is le tudják bontani. Ehhez a vírusfehérjéket ubiquitinnel jelölik, így a proteozóma felismeri és lebontja őket (Hohn & Vazquez, 2011).
- **Hiperszenzitív reakció (HR):** a hiperszenzitív reakció olyan védekezési mechanizmus, ami a fertőzött növényi sejtek gyors halálához vezet. Ezt a vírusfertőzésre adott választ az váltja ki, hogy a növény immunrendszere felismeri a virális effektorokat és a gyors sejthalállal korlátozhatja a vírus terjedését a növény többi részébe (Cole et al., 2001).
- **Szisztémikus szerzett rezisztencia (SAR):** A szisztémikus szerzett rezisztencia olyan védekezési mechanizmus, ami egy lokalizált fertőzésre aktiválja a növény védekezésre adott reakcióit. Ilyen válaszreakciók lehetnek a jelzőmolekulák, mint például a szalicilsav termelése, ami aztán képes a védekezéssel kapcsolatos gének expressziójának beindítására a növény még nem fertőzött részein (Vlot et al., 2009).
- **RNS interferencia vagy RNS csendesítés:** A növényekben RNS csendesítési útvonal a vírusokkal szemben a virális RNS-eket célozza és bontja le, ezzel megakadályozva a vírus RNS-ek terjedését és transzlációját (Ding & Voinnet, 2007).

#### 3.3.2.1. Az RNS interferencia, mint védekezési mód

Az RNS-interferencia (RNSi) egy konzervált biológiai folyamat, amelyben a kettős szálú RNS (dsRNS) szekvensspecifikus módon aktiválja a homológ RNS-molekulák lebontását. Az RNSi alapú antivirális védekező rendszer működésének első lépése, hogy a gazda DICER enzimjei felismerik a vírusreplikáció során keletkező dsRNS-eket, majd azokat kis kettős szálú RNS-fragmensekre (siRNS-ekre) hasítják. Ezek az siRNS-ek beépülnek az RNS-indukált csendesítő

komplexbe (RISC), ahol az egyik szál lebomlik, a másik pedig irányítóként működik. A RISC olyan RNS-molekulákhoz kötődik, amelyek komplementerek a vezető szál szekvenciájával és ez a cél-RNS lebontását vagy transzlációjának gátlását eredményezi (Ding & Voinnet, 2007).

A dsRNS felismerésében a Dicer-szerű enzimek (DCL) játszanak szerepet. Növényekben a DCL2 és a DCL4 vesz részt az antivirális RNSi-folyamatokban, és RNáz aktivitásuk révén 22, illetve 21 nukleotid hosszúságú kis RNS-eket hoznak létre. Ezek az RNS-ek a RISC komplexbe épülnek be, amelynek katalitikusan aktív alegysége az Argonauta (AGO) fehérje. Növényekben több AGO fehérjét is azonosítottak, amelyek részt vesznek az antivirális géncsendesítésben, köztük az AGO1, AGO2, AGO4 és AGO5 (Carbonell & Carrington, 2015). Az AGO-ba beépült kis RNS alakítja ki az aktív RISC komplexet, amely a komplementer szekvenciájú virális RNS-t célozza, és az AGO endonukleáz aktivitása révén hasítja és lebontja azt (Pumplin & Voinnet, 2013).

Az antivirális válaszban kulcsszerepet játszanak továbbá az RNS-helikázok, különösen a DEAD-boksz helikázok, amelyek érzékelik a virális RNS-t és effektor funkciókat is ellátnak (Taschuk & Cherry, 2020), valamint az RNS-függő RNS-polimerázok, amelyek erősítik az siRNS-jelátvitelt (Baulcombe, 2004).

### 3.4. Vírusdiagnosztikai módszerek

A vírusok jelentős gazdasági károkat okozhatnak a mezőgazdaságban és a kertészeti kultúrákban, ezért alapvető fontosságú, hogy hatékony diagnosztikai módszerek álljanak rendelkezésre a vírusfertőzések gyors és pontos azonosításához.

#### 3.4.1. Biotesztelés

A biotesztelés, más néven biológiai indexelés, a vírusok és egyéb oltással átvihető kórokozók, például viroidok, fitoplazmák kimutatására használt módszer. A vizsgálat során a tesztelni kívánt, potenciálisan fertőzött növényből származó szaporítóanyaggal (oltással), illetve egyes vírusok esetében növényi kivonattal vagy nedvvel inokulálnak egy egészséges tesztnövényt. A vizsgálni kívánt növényt a tesztnövényre közvetlenül rá is lehet oltani. A beoltott növényeket ezt követően megfigyelés alatt tartják és vírusos tünetek megjelenését figyelik rajtuk. A módszer előnye, hogy a fertőzést akkor is kimutathatóvá teszi, ha a vizsgált növényben a vírus tünetmentesen van jelen, mivel a fogékony tesztnövényen jellegzetes tünetek alakulhatnak ki. Hátránya, hogy munka-, hely- és időigényes, a vizsgálatok elvégzése és kiértékelése szakszerű tudást és tapasztalatot igényel, valamint nem szolgáltat elég információt a kórokozó pontos azonosításához (Legrand, 2015).

A biológiai indexelés egy másik felhasználási módja a vírusrezisztens növényfajták keresése. Az adott vírussal való fertőzés után a rezisztenciát mutató egyedeket fel lehet használni rezisztencia gének azonosítására és új, vírusrezisztens fajták nemesítésére (Sanfaçon, 2015).

#### 3.4.2. Szerológiai vizsgálatok

A szerológiai tesztek széles körben használják a növények vírusfertőzöttségének diagnosztizálására. Ezek a tesztek a növényi kivonatokban található vírusantigének kimutatására szolgálnak, specifikus antitestek segítségével (Clark & Adams, 1977).

A leggyakrabban használt szerológiai teszt az ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) vagy magyarul az enzimhez kapcsolt immunológiai próba. Két típusát is használhatjuk, a direkt (közvetlen) vagy az indirekt (közvetett) ELISA tesztet. A növényi vírusdiagnosztikában leggyakrabban az úgynevezett DAS-ELISA tesztet (double-antibody sandwich-ELISA) használják, ami az indirekt ELISA-hoz hasonlóan két antitestet használ a vírus antigének kimutatására. Ennek során először az úgynevezett befogó antitestet egy szilárd hordozóhoz kötik, például mikrotiter lemezhez. A növényi kivonatot ezután a lemez lyukaiba töltik, így az immobilizált antitestekhez kapcsolódnak a vírus antigének. Ezt követően egy adott vírust specifikusan felismerő antitestet adnak a lemezhez, ami egy enzimmel van megjelölve. Az enzim szubsztrátjának hozzáadásával létrejövő enzimreakció (például színreakció) detektálhatóvá és mérhetővé válik, ezáltal a keresett vírus kimutatható (Gibbs & Ohshima, 2010). A vizsgált vírust specifikusan felismerő antitest lehet poli- vagy monoklonális (Karasev & Gray, 2013).

A DAS-ELISA előnye, hogy nagy az érzékenysége, akár 1 ng/ml koncentrációban is képes kimutatni a vírusokat és viszonylag egyszerűen elsajátítható a használata (Clark & Adams, 1977). Mindemellett gyors és nagyon specifikus teszt, képes rokon vírusok megkülönböztetésére is (Gibbs & Ohshima, 2010). Viszont hátránya, hogy hamis negatív eredményeket adhat, ha a növényi mintában alacsony a vírus mennyisége, vagy ha a minta olyan inhibitorokat tartalmaz, amelyek zavarhatják a reakciókat és az antigén specifitása miatt előfordulhat, hogy a vizsgált vírus nem minden variánsát vagy változatát képes kimutatni (Karasev & Gray, 2013). Ál-pozitív eredményt akkor is kaphatunk, ha az antitest kapcsolódik más növényi komponensekkel vagy akár közeli rokon vírusokkal (Clark & Adams, 1977). A dot-blot egy széles körben alkalmazott módszer, amely fehérjék vagy nukleinsavak kimutatására egyaránt alkalmas és vírusfertőzések detektálására is használható. A szerológiai dot-blot esetében a vírusfehérjéket nitrocellulóz membránra rögzítik, majd specifikus antitest próbákkal tesztelik. A vírus jelenlétét a membránon képződő színes folt jelzi (Powell, 1987).

Egy még érzékenyebb és specifikusabb szerológiai teszt a Western-blot, ami egyesíti a szerológia specifitását az elektroforézis fehérjelválasztó tulajdonságával, amivel a legkisebb fehérje mennyiséget is hatékonyan lehet mérni. Először SDS-gélelektroforézissel méret szerint elválasztják a vírusfehérjéket, majd blotolási technikával nitrocellulóz membránra rögzítik azokat. A vírusfehérjékre specifikus antitestekkel mutatják ki a vírus jelenlétét, amely során meghatározható a vírusfehérje mérete is (Bhardwaj & Kulshrestha, 2020).

### 3.4.3. Nukleinsav-hibridizációs technikák

A nukleinsav-hibridizációs technikák a vírusdiagnosztikában klasszikus molekuláris módszerek, amelyek a cél-RNS vagy DNS specifikus, komplementer nukleinsav próbával történő azonosításán alapulnak. E módszerek előnye, hogy lehetővé teszik a vírus jelenlétének kimutatását, valamint az RNS- vagy DNS-fragmentumok méretének és mennyiségének meghatározását, ami fontos a vírusvariánsok azonosításában és a fertőzés dinamikájának vizsgálatában. A növényi vírusdiagnosztikában a nukleinsav-hibridizációs technikák közül a Northern blot rendelkezik kiemelkedő jelentőséggel, mivel a legtöbb növényi vírus RNS-genommal rendelkezik. A Northern blot során a vizsgálandó RNS-mintát gélelektroforézissel méret szerint elkülönítik, majd membránra átviszik, ahol egy komplementer, jelölt próbával hibridizál. Ez a megközelítés lehetővé teszi a vírus RNS specifikus és érzékeny detektálását, így még tünetmentes növényekben is kimutatható a fertőzés (Nikolaeva, 2017).

A Northern blot hibridizáció megbízható és nagy specifitású módszer, amely pontos információt ad a transzkript méretéről, valamint a hibridizációs membránok hosszú távon tárolhatók és újrahibridizálhatók, így többszöri vizsgálatra is felhasználhatók (Kwon et al., 2012). Hátránya ugyanakkor, hogy érzékenysége alacsonyabb a PCR-alapú technikákhoz képest, nagy mennyiségű jó minőségű RNS-t igényel, idő- és munkaigényes, továbbá a minták különösen érzékenyek a ribonukleázok általi degradációra, ezért szigorú laboratóriumi körülmények szükségesek (Zhang et al., 2022).

Összességében a Northern blot a nukleinsav-hibridizációs technikák közül leggyakrabban alkalmazott módszer a növényi vírusdiagnosztikában, különösen az RNS-vírusok kimutatására, és ezért tárgyaljuk ezt a technikát részletesebben a dolgozatban (Gallitelli, 2004; Nikolaeva, 2017).

#### 3.4.4. PCR és azon alapuló módszerek

A polimeráz láncreakció (PCR) világszerte áttörést jelentett a növényi vírusdiagnosztikában. Már az 1990-es évek elején bevezették a módszert a gyakorlatba, és azóta is alapvető eszköze a fertőző vírusok korai, érzékeny és specifikus kimutatásának (Boonham et al., 2014). A PCR során több millió DNS-másolat készül a vírusgenom egy specifikus régiójáról. A reakcióhoz használható templátként genomi DNS vagy RNS vírusok esetében komplementer DNS (cDNS), amit az RNS reverz transzkripciójával lehet előállítani (ilyenkor RT-PCR-t, azaz reverz transzkripció PCR-t használnak). A vizsgálni kívánt vírusgenom egy régiójára specifikus indító szekvenciák (primerek) szükségesek, az amplifikált termék kimutatása pedig gélelektroforézissel vagy fluoreszcens próbákkal történhet (Mullis & Faloona, 1987). A valós idejű kvantitatív PCR (qPCR vagy real-time PCR) ennek a technikának egy olyan változata, ahol a reakció előrehaladását egy fluoreszcens riporter detektálásával lehet figyelni és alkalmas a vírusok mennyiségi meghatározására is (Mirmajlessi et al., 2015).

Egy újabb nukleinsav amplifikáción alapuló módszer a LAMP (loop-mediated isothermal amplification), ami egy izotermális (állandó hőmérséklet) körülmények között végzett nukleinsav amplifikáció. A LAMP módszer nem igényel speciális berendezést, csak egy olyan eszközt, amely állandó hőmérsékletet képes tartani. Nagy specifitását a reakció során használt hat primer biztosítja, amelyek hat független régiót ismernek fel a templáton, ezeket jellemzően F3, B3, FIP, BIP, LoopF és LoopB jelzéssel látják el. A reakcióban használt enzim robosztussága előnyt jelent inhibitorokat tartalmazó minták esetében, így akár nyers növényi extraktumot is lehet templátként használni (Panno et al., 2020; Tomita et al., 2008). OmniAmp polimeráz például használható LAMP vizsgálatokban RNS és DNS genommal rendelkező vírusok kimutatására is, mivel reverz transzkriptáz aktivitással is rendelkezik (Chander et al., 2014).

A közelmúltban a hordozható LAMP eszközök fejlesztése lehetővé tette a kórokozók „valós idejű” kimutatását közvetlenül a terepen (Wilisiani et al., 2019).

#### 3.4.5. Nagy áteresztőképességű szekvenálási technikák (HTS) diagnosztikai alkalmazása

A hagyományos diagnosztikai módszerek alkalmazásához szükség van valamilyen előzetes információra a víusról, például PCR alapú módszerek esetében a genom legalább részleges nukleotid sorrendjének ismeretére a primerek tervezéséhez, vagy a szerológia vizsgálatok elvégzéséhez a specifikus antitestek előállítása céljából virionok tisztítására van szükség (Ward et al., 2004). A HTS technológiák fejlődése a növényi vírusok kimutatásában új lehetőséget nyújtott (Roossinck, 2017). A

HTS-hez nincs szükség semmilyen előzetes információra a vírusról, mivel a vizsgált mintában az összes nukleinsav egyidejű szekvenálását teszi lehetővé (Adams et al., 2009). A szekvenálható könyvtárak elkészítése előtt bizonyos esetekben szükség lehet a vírusok mennyiségének növelésére valamilyen módszerrel, mivel a gazdaszervezetből származó szekvenciák elnyomhatják a vírus szekvenciákat. Ehhez több módszer is rendelkezésre áll, így a könyvtárak készítéséhez használhatunk teljes RNS-t vagy ribodepléciós eljárással riboszomális RNS-től megtisztított RNS izolátumot, izolálhatunk kis RNS-eket, tisztíthatunk duplaszálú RNS-t (dsRNS), vagy virionból származó RNS-ek és poliadenilált RNS-ek is lehetnek a szekvenálás templátjai (Adams & Fox, 2016; Pecman et al., 2017).

A HTS speciális szekvenáló platformokat igényel, amelyeket többféle módon is csoportosíthatunk, de a fő szempontok például a nukleotidszekvencia kimutatási módja, a szekvenáláshoz használt nukleotid közvetlen forrása, vagy szekvenálásban alkalmazott kémiai folyamat (Levy & Myers, 2016). Jelenleg több HTS platform közül lehet választani és újabbak fejlesztése is folyamatban van.

Az Illumina szekvenálás a legszélesebb körben használt HTS platform, jól működik teljes genom szekvenáláshoz, RNS szekvenáláshoz és célzott génpanel szekvenáláshoz is. A szekvenálás kémiai módszere a szintézis alapú szekvenálás (sequencing-by-synthesis). Ez a módszer a reverzibilis terminátor technológián alapul, amely során egy adott nukleotid hozzáadása után a hozzáadott nukleotidot inaktívvá teszik, majd a következő ciklusban a folyamat ismétlődik (Metzker, 2010).

A HTS használata a növényi vírusdiagnosztikában az elmúlt évtizedben számos új vírus azonosításához vezetett, mivel képes kimutatni ismert és új vírusokat, ráadásul olyanokat is, amelyeket más hagyományos módszerekkel nem sikerült azonosítani (Villamor et al., 2019). Ezen felül fontos szerepe van a vírus metagenomikában vagy a vírusjárványok monitorozásában is (Roossinck, 2010).

A HTS alapú növényi vírusdiagnosztikának még mindig vannak korlátai, a szekvenálásnak a hagyományos módszerekkel szemben még mindig magasabb a költsége, bár ez folyamatosan csökken, a szekvencia adatok bioinformatikai elemzése szaktudást igényel, amit azonban az ehhez fejlesztett felhasználóbarát szoftverek egyre könnyebbé tesznek. Sok esetben ad ál-pozitív vagy negatív eredményt, így mindenképpen szükséges más diagnosztikai módszerrel is megerősíteni az eredményeket (Fox et al., 2025).

### 3.5. Növényvédelmi lehetőségek vírusok ellen

A szőlővírusok és viroidok elleni védekezés jelentős kihívást jelent, mivel a fertőzött növények gyógyítása nem lehetséges, és a kórokozók hosszú távon fennmaradnak a szaporítóanyagban és az ültetvényekben (Fuchs, 2020). A hatékony növényvédelem ezért több szinten valósulhat meg: egyrészt *in vitro* technikákkal, például hőkezeléssel, merisztéma-tenyészetekkel vagy szomatikus embriogenezissel előállítható vírusmentes szaporítóanyag (Bragard et al., 2013). Másrészt az ültetvényben alkalmazott stratégiák – a vírusmentes szaporítóanyag használata, a vektorok elleni védekezés, a fertőzött tőkék eltávolítása és az integrált növényvédelmi gyakorlatok – segíthetnek a fertőzések terjedésének visszaszorításában és a termésbiztonság megőrzésében (Fuchs, 2020).

#### 3.5.1. Vírusmentesítési módszerek

A fás szárú, telepítésre szánt növények szaporítóanyagainak patogénmentességét, majd később a telepített ültetvény egészségét és termőképességét alapozza meg a jól kiválasztott patogénmentesítési módszer és annak hatékony ellenőrzése a rendelkezésre álló diagnosztikai módszerekkel (Maree et al., 2018).

A szőlő szaporítóanyagok előállításáról, minősítéséről és forgalomba hozataláról szóló 87/2006. (XII. 28.) FVM rendelet szabályozza a jó minőségű, egészséges szaporítóanyag termesztésbe kerülését. A szaporításra szánt, vizuális szemrevételezést követően gyanús növényeket „A szaporítóanyag certifikáció rendszere és követelményei” című Módszertani Útmutatóban előírt, nemzetközileg elfogadott biológiai tesztelési és laboratóriumi (ELISA és PCR) vizsgálati eljárásoknak kell alávetni a zárlati károsítók, és a rendeletben meghatározott károsítók jelenlétére (87/2006. (XII. 28.) FVM Rendelet, 2006).

##### 3.5.1.1. Hőkezelés

A Módszertani útmutató előírja a szőlőszaporító-anyagok melegvizet fertőtlenítését (50 °C, 45 perc) (87/2006. (XII. 28.) FVM Rendelet, 2006), amely hatékony a fitoplazmák, valamint egyes baktériumok és gombák ellen, de a vírusok és viroidok eltávolításában korlátozott hatású (Morton & Waite, 2007). Bár az igazoltan vírusmentesnek nyilvánított szaporítóanyagokat ezzel a kezeléssel fertőtlenítik, a hagyományos diagnosztikai módszerekkel nem kimutatható, illetve a szabályozás által nem vizsgálatköteles vírusok és viroidok rejtve maradhatnak, amelyeket a hőkezelés sem képes eliminálni. Különösen a GRSPaV esetében bizonyított, hogy hőterápiával nem távolítható el (Gambino et al., 2006; Gribaudo et al., 2004; Skiada et al., 2013), és a viroidok esetében is hatástalannak bizonyult

(Gambino et al., 2011). Bár a hőterápia kombinálva a merisztéma-tenyésztéssel eredményesebb lehet (Savino et al., 1985), önmagában azonban nem biztosít teljesen vírus- és viroidmentes szaporítóanyagot.

#### 3.5.1.2. Merisztéma tenyészetek

A hajtáscsúcs és különösen a merisztéma csúcs tenyészetek régóta használatosak a növények vírusmentesítésére és klonális szaporítására. A merisztéma előnye, hogy az itt található sejtekbe a kórokozók többsége nem jut be, így a regenerált növények gyakran patogénmentesek és genetikai stabilitásukat is megőrzik (George et al., 2008). A módszer hatékonyságát befolyásolja a merisztéma mérete: minél kisebb, annál nagyobb a vírusmentesség esélye, viszont alacsonyabb a túlélési arány. A siker függ a szőlőfajtától, a vírus vagy viroid típusától és lokalizációjától, valamint a tenyésztési körülményektől (Miljanić et al., 2022).

#### 3.5.1.3. Szomatikus embriogenezis

A szomatikus embriogenezis során vegetatív vagy generatív szövetekből szomatikus sejtekből kallusz, majd embriogén sejtek és végül embriók indukálhatók, amelyekből vírusmentes növények fejlődhetnek (Maillet et al., 2006; Pais, 2019). Bár a módszer hatékonyságát genotípusfüggő tényezők és a táptalaj hormonkombinációja korlátozhatja, több vizsgálat szerint eredményes eljárás a szőlő vírusmentesítésére (Turcsan et al., 2020)

Egyéb, a szőlő vírus és viroid mentesítésére használt módszer még az oltás, a kemoterápia (Skiada et al., 2013), krioterápia (Bi et al., 2018), elektroterápia (Guță et al., 2016) és ezek különböző kombinációi (Hu et al., 2020; Salami et al., 2009; ZHANG & Fang, 2021).

### 3.5.2. Vírusok elleni védekezés szőlőültetvényekben

A növények vírusokkal szembeni védelmének lehetőségei sokrétűek, azonban hatékonyságuk és alkalmazhatóságuk függ a gazdanövény fajától, a vírus típusától, valamint a gazdasági és környezetvédelmi szempontoktól. Az egyik leghatékonyabb stratégia a genetikai rezisztencia, amely hagyományos nemesítési eljárásokkal (rezisztens genotípusok kiválasztása) vagy biotechnológiai módszerekkel (rezisztenciagének bevitelével) valósítható meg (Fraile & García-Arenal, 2010). A kémiai növényvédelem önmagában nem hat a vírusokra, csupán a vektorok szabályozásával képes csökkenteni a fertőzés terjedését (Bragard et al., 2013). A biológiai védekezési lehetőségek közé tartozik a vektorok természetes ellenségeinek (ragadozó rovarok, parazitoidok) alkalmazása, valamint a hasznos mikroorganizmusokkal (pl. rizobaktériumok) kiváltott indukált szisztémikus rezisztencia

(Ramamoorthy et al., 2001; Roudine et al., 2023). A természetstechnológiai módszerek, például a vetésforgó és a kedvező talajállapot fenntartása szintén hozzájárulhatnak a vírusok előfordulásának mérsékléséhez (Darriaut et al., 2022; Graham & Strauss, 2021).

A szőlő esetében a védekezés alapvető kiindulópontja a vírusmentes szaporítóanyag előállítása és felhasználása, mivel a fertőzések többsége ezzel kerül be az ültetvényekbe. A telepítés során külön figyelmet kell fordítani a talaj kedvező fizikai, kémiai és biológiai állapotának fenntartására, valamint a benne élő vektorok, elsősorban a fonálférgék szabályozására. A *Xiphinema index*, amely a GFLV vektora, például kiéheztetéssel gyéríthető, ha a területen több éven keresztül nem termesztik a tápnövényét (Giffard et al., 2022). Hosszabb távon hatékony és környezetkímélő megoldást jelenthet a fonálférgéknek ellenálló alanyfajták nemesítése (Esmenjaud & Bouquet, 2009). A rovar vektorok – többek között levéltetvek, pajzstetvek és púposkabócák – elleni védekezés kombinálhatja a kíméletes kémiai beavatkozásokat és a biológiai módszereket (Fuchs, 2020).

Az ültetvényben fontos a rendszeres megfigyelés és a vírusos tünetek korai felismerése. A fertőzött egyedek eltávolítása lokalizált fertőzés esetén lassíthatja a vírus terjedését, azonban mivel a tünetek sokszor csak későn jelentkeznek, a szűrőpróbaszerű diagnosztikai vizsgálatok elengedhetetlenek a tünetmentes, de fertőzött növények kiszűréséhez. Súlyos esetben a fertőzött parcellák teljes felszámolása válhat szükségessé a másodlagos vírusfertőzések megakadályozására (Fuchs, 2020)

Összességében a szőlőültetvények vírusok elleni védelme többszintű megközelítést igényel, amelyben kulcsszerepet játszik a vírusmentes szaporítóanyag előállítása, a vektorok elleni védekezés, a rendszeres diagnosztikai ellenőrzés, valamint az integrált növényvédelmi stratégiák alkalmazása.

### 3.6. Vírusok terjedése és evolúciója

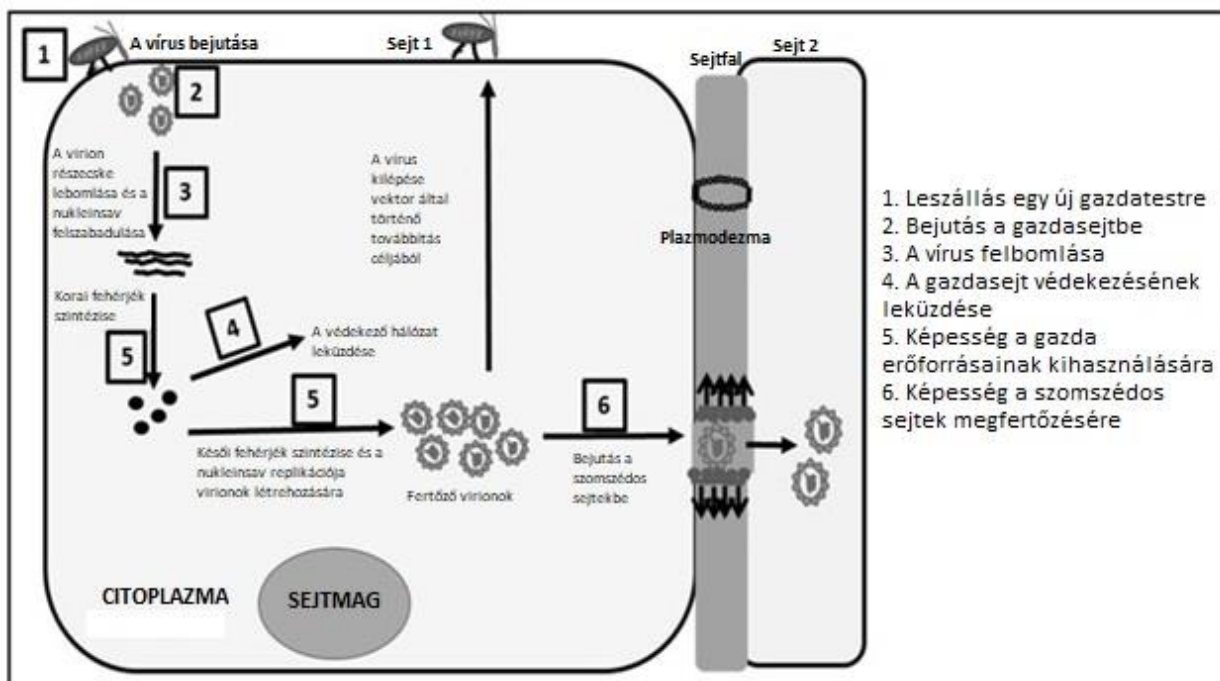
A vírusok sokszorozódása során gyakran olyan genetikai variánsok keletkeznek, amelyek genomja eltér a kiindulási vírusszekvenciától. Ezeket mutánsoknak, esetleg változatoknak nevezhetjük. Ezért a növényi vírusok populációi genetikailag heterogének, a genetikai változatok gyakoriság eloszlása a populáción belül idővel változhat. Ezt a folyamatot nevezzük a vírusok evolúciójának (García-Arenal & Fraile, 2008). Három fő erő mozgatja a vírusok evolúcióját: a mutáció, a rekombináció és az átrendeződés. Ez sokféleséget eredményez a vírusgenomokban, amely változatok a természetes szelekció hatására kiválasztódásra kerülnek (Roossinck, 1997).

Epidemiológiai szempontból a növényi vírusos megbetegedések kialakulásában a rovarok a legfontosabb tényezők, mivel a vírusok átvitele egyik növényről a másikra 80%-ban a

rovarvektoroktól függ. A terjesztésnek többféle módja van. Attól függően, hogy a rovar mennyi ideig képes befogadni a fertőző részecskét, a terjesztés lehet nem perzisztens (percek-órák), félig-perzisztens (napok) és perzisztens (teljes élettartam, akár örökíthető is). A nem perzisztens terjedésnél a vektor szájszervén tapad meg a vírus, a fél-perzisztens átvitelnél az előbélbe kerül, míg a perzisztens módon terjedő vírusok esetében a keringési rendszerbe is bejut a vírus (Hohn, 2007).

### 3.6.1. Új vírusok megjelenése

A kialakulóban levő, új vírusos betegségek gyakran a vírusok gazdaszervezetek közötti ugrásának eredményei, amikor a vírus egy új gazdafaj fertőzésére lesz képes. A gazdafajok közötti ugrás nem ritka a növényi vírusok között (Martínez-Turiño et al., 2021). Egy vírus egy vagy több gazdaszervezetet is megfertőzhet, ezt a vírus gazdanövényköre határozza meg. Egyes vírusok nagyon specifikusak és egy gazdát vagy rokon gazdaszervezetet fertőznek csak meg (specialista vírus), míg mások egynél több, nem rokon gazdanövényt is képesek fertőzni (generalista vírus). A vírusok gazdaváltás során új gazdaszervezettel találkoznak, amihez alkalmazkodhatnak. Ez lehetővé teszi, hogy egy specialista vírus generalistává válhasson a gazdanövénykörének kiterjesztésével. Ilyen vírusok például a Pepino mosaic virus, a Tomato leaf curl New Delhi virus, a begomovírusok és a tospovírusok, amelyek gyorsan bővítik a gazdanövénykörüket, ezáltal komoly veszélyt jelentenek a mezőgazdasági termelésre (Kumar et al., 2020). Ha egy vírus több növényfajt is képes fertőzni, akkor az egyik gazdaszervezet rezervoárként működhet az elsődleges gazdanövény hiányában, amíg az nem elérhető. Ez növeli a generalista vírus sikeres elterjedésének esélyét. A Potato leafroll virus és a Potato virus Y esetében a szőrös nádalytő (*Solanum sarrachoides*) rezervoár növényként szolgálhat, ami hozzájárul a burgonya vírusfertőzéseinek fennmaradásához és terjedéséhez (Cervantes & Alvarez, 2011; Srinivasan et al., 2008). A generalista vírusok egynél több gazdaszervezetben szaporodnak. A különböző gazdaszervezetek eltérő szelekciós nyomást gyakorolnak a vírusra, ami adaptálódásra kényszeríti a vírust a különböző környezetben (gazdában). Ez pedig a vírus egyedi genotípusainak szelekciójához fog vezetni minden gazdaszervezetben, ami ezután egy új vírusfaj kialakulását eredményezheti. Az evolúció célja tehát az, hogy a vírus fitnessét javítsa egy adott gazdában (Froissart et al., 2005).



**2. ábra Egy növényi vírus fertőzésének lépései és a sikeres gazdaváltás kihívásai (saját szerkesztés Kumar et al. 2020 alapján)**

A sikeres gazdaváltáshoz a vírusnak le kell győznie bizonyos akadályokat, melyeket az ábrán számok (1-6) jelölnek.

A vírus gazdaváltásának első lépése, hogy sikeres átjusson egy új gazdanövényre (2. ábra) (Kumar et al., 2020) Miután a vírusok befejezték az életciklusukat, ki kell szabadulniuk a gazdából és új gazdanövényre kell átjutniuk. Ehhez különböző közvetítőket használhatnak, mint például levegő, víz, fizikai kapcsolat a gazdaszervezetek között, vektorok stb. (Payne, 2022; Whitfield et al., 2015). A sikeres gazdaváltás legnagyobb kihívást jelentő lépése, hogy a vírus be tudja juttatni magát vagy a nukleinsavat a sejt belsejébe. Mivel a növényi sejtfa merev, a bejutáshoz szükség van mechanikai sérülésre. Ez kialakulhat a növényen táplálkozó vektortól, vagy mezőgazdasági munkák következtében (Balique et al., 2015). A gazdasejtek védekező mechanizmusai és a vírus között elindul egy verseny, ahol a gazdaszervezet olyan védekezésre törekszik, amely képes megszüntetni, ártalmatlanná vagy kevésbé károsítóvá tenni a vírust. A vírus célja pedig az evolúció, amivel ellensúlyozhatja a gazdaszervezet védekező mechanizmusait és optimalizálhatja a virulenciáját úgy, hogy a gazdaszervezetet ne pusztítsa el, de kellőképp növelni tudja a fitnessét az új gazdában a sikeres szaporodás érdekében (Rosenzweig et al., 1987). A fitness a vírus kumulatív képessége ahhoz, hogy a gazdaszervezet erőforrásait felhasználhassa a szaporodásához, a gazda sejt védekező mechanizmusainak ellensúlyozásához, valamint a virulenciájához és átviteli potenciáljához. A növényi vírusok többsége RNS vírus, amelyeknek a legnagyobb a mutációs rátája (RNS-függő RNS-

polimeráz magas hibaaránya miatt). Így viszont a mutációk olyan eltéréseket eredményezhetnek, amelyek a természetes szelekció hatására megmaradó, életképesebb variánsokkal javíthatják a vírus alkalmasságát az új környezetben (Kumar et al., 2020). A növényi sejtekben a plazmodezmákon keresztül mozognak, amihez mozgási fehérjék szükségesek. Így eljuthatnak a floém rostasejtjeihez, ezáltal a növény távolabbi sejtjeit is elérhetik és szisztemikusan fertőzhetik a gazdanövényt (Benitez-Alfonso et al., 2010). A különböző sejtípusok eltérő környezetet biztosítanak a vírus számára, így sejtípusonként is változhat a vírus fitnessze egy növényen belül. A vírus így megtalálhatja magának azt a sejtípust, ahol magasabb a fitnessze, így növelni tudja a sikeres gazdaváltás esélyeit (Kumar et al., 2020).

A növényi vírusok esetében a gazdaváltások és az új vírusos betegségek megjelenése jóval gyakoribb, mint az állati vírusok esetében. Ebben közrejátszik a vektorok vírus átvitele, ami növeli annak esélyét, hogy nem gazdafajokra is átkerüljön a vírus. Emellett a növényi immunrendszernek vannak hiányosságai az állatival szemben és a vírus gazdasejtbe jutásához sokszor csak egy mechanikai sérülés szükséges. Ráadásul a legtöbb növényi vírus RNS vírus, amelyek magas mutációs rátával rendelkeznek, ami lehetővé teszi egy víruspopuláción belül a genetikai sokféleséget, ezzel segítve az új gazdához való alkalmazkodást. Ezeknek a mechanizmusoknak a megértése kulcsfontosságú az új vírusok előrejelzésében és a növényi betegségek terjedésének kezeléséhez, mivel jelentős gazdasági és környezeti hatásaik lehetnek (Kumar et al., 2020).

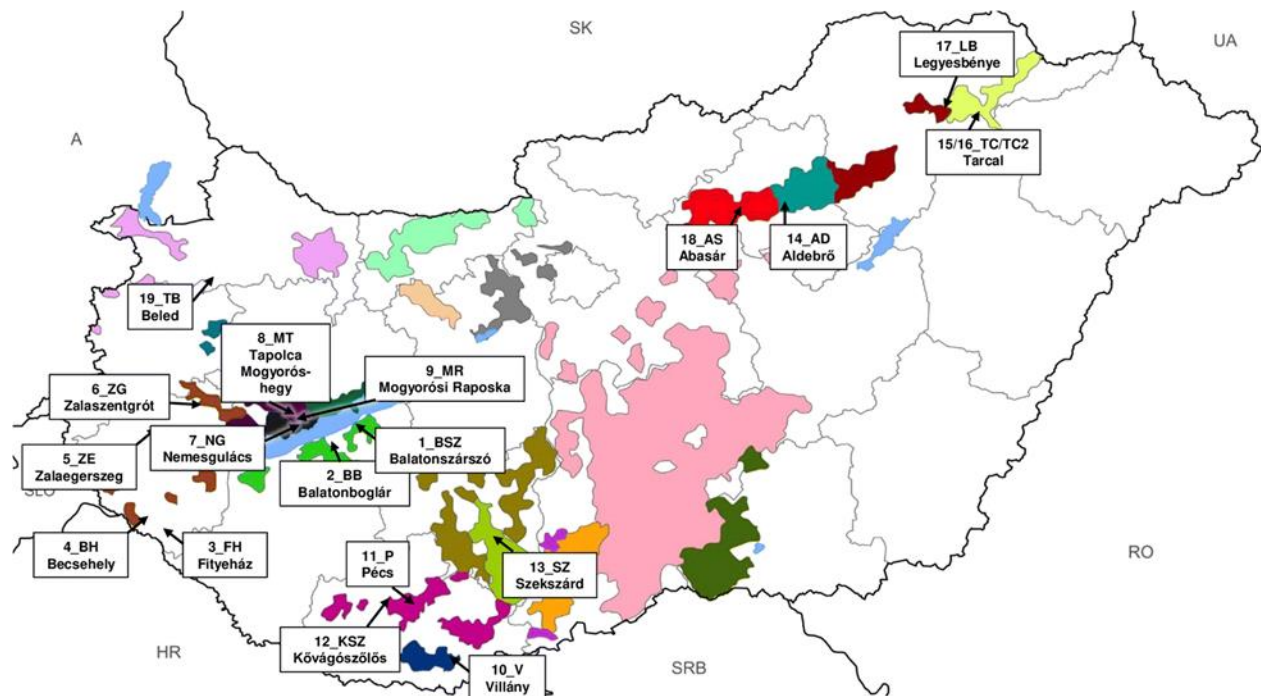
## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. Mintagyűjtés

A növényi anyagok begyűjtése a kutatócsoport által végzett terepi mintázásokból származott. A kutatási témák szerint csoportosítva ismertetem a mintázásokat.

#### 4.1.1. Szőlőalany minták begyűjtése

A növényi anyagokat 2015 júliusában gyűjtöttük be Magyarország 9 különböző szőlőtermesztő régiójából, Összesen 17 alanyültetvényről és két szőlő alany fajtagyűjteményből (3. ábra).



### 3. ábra Magyarország bortermő régióit ábrázoló térkép, a mintázott szőlő alany ültetvények jelölésével

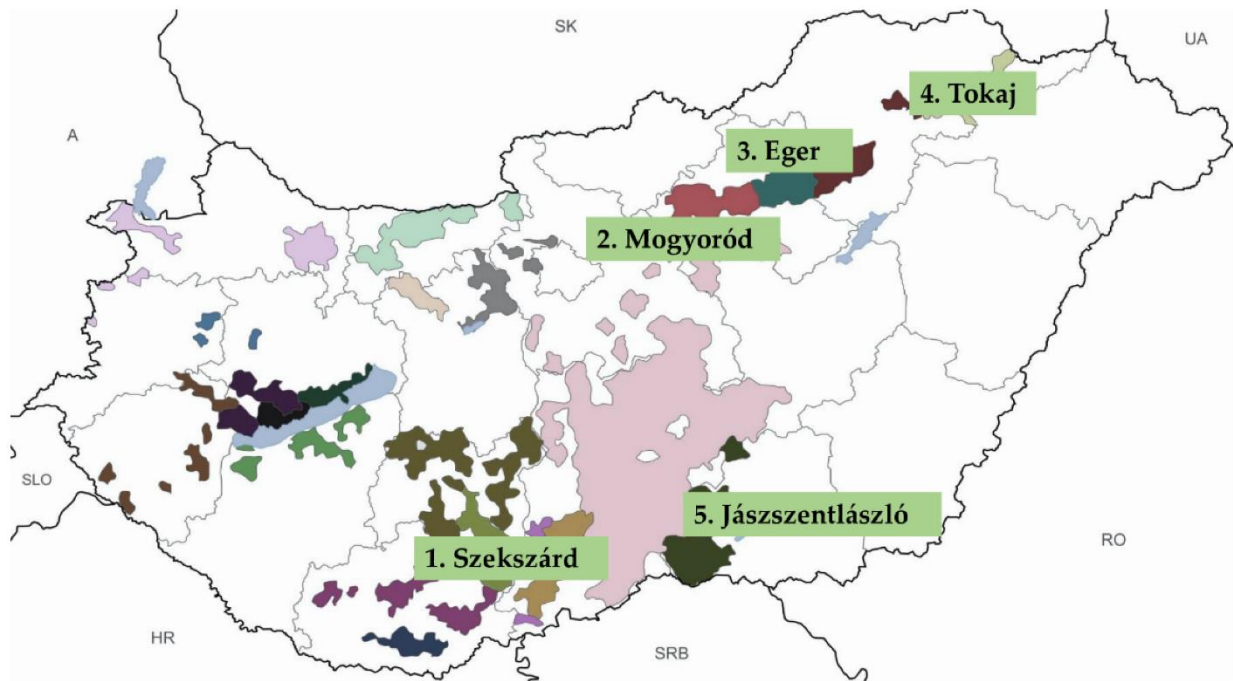
A helységnevek feletti szám plusz betű kombinációk megegyeznek a kis RNS könyvtárak neveivel.

Minden helyszínen véletlenszerűen választottuk ki a mintázott egyedeket, ugyanakkor az összes fajta képviselve volt (az alanyültetvények esetében 12 fajta). Összesen 7–18 egészségesnek tűnő, tünetmentes tőkéről származó különböző szövet gyűjtöttünk, köztük fiatal és idős leveleket, hajtáscsúcsot, kacsot, és amennyiben elérhető volt, virágzatot is. A Beledről származó 5BB fajtaból vett minták hajtattott vesszőről származtak. A fajtagyűjtemények esetén Pécsről 34, Tardosról pedig 33 növényt mintáztunk, hogy mindkét helyszínen az összes alanyfajta képviseletet nyerjen. A fajták és a begyűjtött minták részletes leírását az M2 melléklet tartalmazza.

#### 4.1.2. Szőlő és gyomnövény minták gyűjtése a GPGV vizsgálatához

A mintagyűjtést az ország különböző részein végeztük, öt szőlőültetvény bevonásával. A mintavételi helyek földrajzi elhelyezkedését a 4. ábra szemlélteti. Minden esetben szőlőleveleket és az ültetvények környezetében található, vírusos tüneteket mutató gyomnövényeket gyűjtöttünk be.

Három különböző évben is történt mintavételezés (2015, 2016 és 2017), de minden területről csak egy alkalommal. A mogyoródi ültetvény művelését körülbelül 10 éve felhagyták, így ez a terület a többi ültetvénnyel ellentétben elhanyagolt állapotban volt. A különböző helyszínekről gyűjtött növényanyagok részletezését a 1. táblázat tartalmazza.



**4. ábra A mintavételezési helyek elhelyezkedése Magyarország bortermő vidékein.**

Három különböző évben történt mintavételezés (2015, 2016, 2017), azonban minden területről csak egy alkalommal. A mogyoródi ültetvény művelését körülbelül tíz éve felhagyták, így ez a terület a többi ültetvénnyel ellentétben elhanyagolt állapotban volt. Ezzel szemben a szekszárdi, egri, tokaji és jászszentlászlói ültetvényeket rendszeresen művelték, a gyomnövényeket eltávolították és növényvédelmi kezeléseket is végeztek. Az egyes ültetvények általános állapotát és környezeti jellemzőit az 5. ábra mutatja be.



5. ábra A szekszárdi, egri, tokaji és mogyoródi ültetvények látképe

A különböző helyszínekről gyűjtött növényanyagok részletezését az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat A mintagyűjtés helye, ideje és a szőlő mellett begyűjtött növényfajok

Mintagyűjtés helyszíne	Gazdanövény	Mintagyűjtés ideje
Szekszárd	<i>Vitis vinifera</i> 'Kadarka'	2015. május
	<i>Chenopodium album</i>	
Mogyoród	<i>Vitis vinifera</i> 'Furmint'	2016. június
	<i>Asclepias syriaca</i>	
	<i>Ailanthus sp.</i>	
	<i>Rosa canina</i>	
	<i>Crataegus sp.</i>	
Eger	<i>Vitis vinifera</i> 'Kadarka'	2016. május
	<i>Rosa canina</i>	
Tokaj	<i>Vitis vinifera</i> 'Furmint'	2015. június
	<i>Rubus sp.</i>	
Jászszentlászló	<i>Vitis vinifera</i>	2017. augusztus
	<i>Fraxinus sp.</i>	

Az ültetvények szomszédságában, illetve egyes esetekben az ültetvényeken belül is különböző gyomnövényfajok fordultak elő, amelyekről levélmintát gyűjtöttünk a GPGV esetleges jelenlétének

vizsgálatához. A vizsgált növényfajok közé tartoztak többek között a fehér libatop (*Chenopodium album*), a selyemkóró (*Asclepias syriaca*), a bálványfa (*Ailanthus* sp.), a vadrózsa (*Rosa canina*), a galagonya (*Crataegus* sp.), a bodza (*Sambucus* sp.), a szeder (*Rubus* sp.) és a kőris (*Fraxinus* sp.). A mintázott növényfajokat és azok jellegzetes megjelenését a 6. ábra szemlélteti.



**6. ábra A Szekszárdról (1), Mogyoródról (2-6), Egerből (7), Jászszentlászlóról (8) és Tokajból (9) begyűjtött növények képei**

A begyűjtött növények levelein különböző levélfoltosodások, klorózisok és fejlődési rendellenességek voltak megfigyelhetők, azonban egyik esetben sem észleltünk a szőlőlevél foltosodás és deformáció (GLMD) betegségre jellemző, specifikus tüneteket.

#### 4.1.3. A GVT kimutatásához használt növényi minták

A GVT kimutatásához már meglévő kis RNS könyvtárakat elemeztünk újra. Ezek a könyvtárak a szőlő alany minták és a termőültetvényből származó minták felhasználásával készültek. Az utóbbi mintagyűjtésének részleteit a M3 melléklet tartalmazza.

#### 4.2. RNS izolálás

Az RNS izolálást kétféle módszerrel végeztük az alapján, hogy fás szárú vagy lágú szárú növény volt a kiindulási anyag. Fás szárú növények esetében előfordulhat magas polifenol és poliszacharid koncentráció, ami gátolja a jó minőségű és nagyobb mennyiségű RNS tisztítását. Mivel a kis RNS könyvtárak készítéséhez nagy mennyiségű és tiszta RNS-re van szükség, egy módosított RNS extrakciós protokollt használtunk (Gambino et al., 2008). A lágyszárú növényi mintákhoz hagyományos fenol-kloroformos RNS tisztítási módszert alkalmaztunk (White & Kaper, 1989).

##### 4.2.1. RNS izolálás fás szárú növényekből

A protokollhoz kétféle puffert állítottunk elő az alábbi összetételben: az extrakciós puffer 2% CTAB-ot, 2,5% PVP-40-et, 100 mM Tris-HCl-t (pH 8,0), 25 mM EDTA-t (pH 8,0) és 2 M NaCl-t tartalmazott, míg az SSTE puffer 0,5% SDS-ből, 10 mM Tris-HCl-ből (pH 8,0) és 1 M NaCl-ből állt. Ha  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt növényanyaggal dolgoztunk, a mintákat a mechanikai feltárás megkezdéséig folyékony nitrogénben tartottuk. Körülbelül 150–200 mg növényi anyagot dörzsoszárban, folyékony nitrogén jelenlétében finom porrá őröltünk. Az így kapott port 850  $\mu\text{l}$ ,  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra előmelegített extrakciós pufferhez adtuk  $\beta$ -merkaptoetanol hozzáadásával, amelynek végső koncentrációja 2% volt. A mintákat 2 ml-es steril Eppendorf csövekbe helyeztük, vortex segítségével homogenizáltuk, majd 10 percig  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben, folyamatos mozgatás mellett inkubáltuk. A fehérjék és szennyeződések eltávolításához a mintákhoz 850  $\mu\text{l}$  jéghideg kloroform-izoamil-alkohol (24:1, v/v) elegyet adtunk, amelyet óvatosan, fel-le forgatással kevertünk, majd 12000 g-n,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 10 percig centrifugáltuk. A felső fázist új csövekbe vittük át, ahol ismét kloroform-izoamil-alkoholos kezelést végeztünk, majd a fázisokat újabb centrifugálással választottuk szét az előző paraméterekkel. A tisztított felső fázist előre elkészített, 250  $\mu\text{l}$  jéghideg 9 M LiCl oldatot tartalmazó 1,5 ml-es csövekbe pipettáltuk, majd a nukleinsav kicsapódását 30 percig jégen történő inkubálással segítettük elő. A mintákat ezt követően 15000 g-n,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 20 percen keresztül centrifugáltuk. A keletkezett csapadékot 450  $\mu\text{l}$ ,  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra előmelegített SSTE pufferben oldottuk fel erőteljes keveréssel. Ezután

450 µl kloroform-izoamil-alkohollal (24:1, v/v) tisztítottuk, amely során a keverés óvatos forgatással történt, majd ezt 12000 g-n, 4 °C-on, 10 percig tartó centrifugálás követte. Az így kapott felső fázist előkészített 1,5 ml-es csövekbe vittük át, amelyek 280 µl izoamil-alkoholt és 30 µl 4 M nátrium-acetátot tartalmaztak. Az elegyet óvatosan fel-le forgattuk, majd az RNS kicsapódása érdekében 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A csapadékot 15000 g-n, 4 °C-on, 20 percen keresztül centrifugáltuk, majd a pelletet 1 ml jéghideg 70%-os etanollal mostuk. Az etanolos mosást 15000 g-n, 4 °C-on, 5 percig tartó centrifugálás követte. A felülúszót eltávolítottuk, a pelletet levegőn 10 percig szárítottuk, majd a maradék etanol elpárolgása után 25 µl steril Milli-Q vízben oldottuk vissza. Az RNS-mintákat felhasználásig jégen, hosszabb távra –70 °C-on tároltuk.

#### 4.2.2. RNS izolálás lágy szárú növényekből

A minták feldolgozása során végig jégen dolgoztunk, és minden lépést elszívó fülke alatt végeztünk. A protokollhoz szükséges törzsoldatok az alábbiak szerint készültek: 10× EB puffer (pH 9,5), 1 M glicin, 0,5 M EDTA és 1 M NaCl. A kivonó puffert közvetlenül a nukleinsav-tisztítás előtt állítottuk össze 1× EB puffer (pH 9,5) és 2% SDS felhasználásával.

Az extrakcióhoz először 1,5 ml-es Eppendorf csöveket feliratoztunk, amelyek mindegyikébe 600 µl fenolt pipettáltunk. A dörzsmozsarakat használat előtt jégen hűtöttük, majd 150–200 mg növényi mintát szárazon, néhány dörzsöléssel homogenizáltunk, és azonnal 650 µl kivonó puffert adtunk hozzá. A mintát további alapos dörzsöléssel feltártuk, majd a fenolt tartalmazó Eppendorf csőbe vittük át. A csöveket vortex segítségével homogenizáltuk, és 12000 g-n, 20 °C-on, 5 percig centrifugáltuk. A centrifugálás után előkészítettünk tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csöveket, amelyek mindegyike 300 µl fenolt és 300 µl kloroform-izoamil-alkohol (24:1, v/v) elegyet tartalmazott. A centrifugált minták felső, vizes fázisát óvatosan leszívtuk, ügyelve arra, hogy az interfázist ne érintsük, és a keveréket az előkészített csövekbe pipettáltuk. Az elegyet megkevertük, majd ismét 5 percig centrifugáltuk 12000 g-n, 20 °C-on. Az így kapott felső fázist újabb, előkészített csövekbe vittük át, amelyekbe a felső fázissal azonos térfogatú kloroform-izoamil-alkohol (24:1, v/v) oldatot mértünk. A mintákat ismét homogenizáltuk és 5 percig centrifugáltuk az előző feltételek mellett. A nukleinsavak kicsapásához tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csöveket készítettünk elő, amelyekbe 1 ml 96%-os etanolt és a végső koncentrációban 0,2 M-ot biztosító nátrium-acetátot (4 M törzsoldatból 20 µl) adtunk. A centrifugálás után nyert vizes fázist óvatosan leszívtuk és a sós-alkoholos oldathoz adtuk, majd a csöveket fel-le forgatással homogenizáltuk. A nukleinsavak kicsapódását 5–10 percig jégen történő inkubálással segítettük elő, majd a mintákat 12000 g-n, 4 °C-on, 30 percen keresztül centrifugáltuk. A csapadék

feletti felülűszót óvatosan eltávolítottuk, és a pelletet 70%-os etanollal mostuk. A mosást 12000 g-n, 20 °C-on, 3 percig tartó centrifugálással végeztük, majd az alkoholt leöntöttük. A pelletet levegőn szárítottuk körülbelül 5 percig, vagy addig, amíg a maradék etanol teljesen elpárologott. A kapott csapadékot végül 30–50 µl steril Milli-Q vízben oldottuk fel, erőteljes keveréssel elősegítve a feloldódást.

A visszaoldott nukleinsavat jégen tároltuk, hosszú távon pedig -70 °C-on. Az RNS minőségét agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük. Ehhez 2 µl mintát, 3 µl steril milli-Q vizet és 5 µl FDE-t használtunk, amiket a géltre való felvitel előtt 5 percig, 65 °C-on denaturáltunk.

### 4.3. RNS keverékek (pool-ok) előállítása

Kis RNS HTS esetében jól alkalmazható módszer, ha a szekvenálható könyvtárat a tisztított RNS-ek keverékéből állítjuk elő. Annak érdekében, hogy minél több egyed vírusdiagnosztikáját elvégezhessük költséghatékonyan, RNS keverékeket, úgynevezett RNS pool-okat készítettünk. Az egyedi mintákból izolált RNS-t külön is megőriztük, hogy a diagnosztikai eredményeket egyedi szinten is visszaigazolhassuk.

A szőlő alany minták esetében a következőképp állítottuk össze a szekvenáláshoz szükséges RNS keverékeket. Minden növény esetében először az egyes szervekből származó RNS-eket egyenlő mennyiségben összekevertük, hogy elkészítsük az adott egyed RNS-keverékét. Majd az egy ültetvényről származó egyed pool-ok RNS-eit kevertük össze szintén egyenlő mennyiségben, létrehozva az ültetvény pool-okat, melyek egy adott ültetvényről származó összes mintavételezésen átesett növényből származó RNS-t tartalmazták. Ennek a módszernek köszönhetően összesen 19 kis RNS könyvtár elkészítéséhez szükséges RNS keverékünk lett, amely 17 alanyültetvényből és két alany fajtagyűjteményből készült.

### 4.4. Kis RNS könyvtár készítése

A kis RNS könyvtárakat a TruSeq Small RNA Library Preparation Kit (Illumina) használatával, csoportunk optimalizált protokolljával készítettük el (Czotter, et al., 2018b). Mivel a fás szárú növényekben a teljes RNS-hez képest a kis RNS-ek mennyisége nagyon alacsony, ezért nem a teljes RNS kivonatot használjuk a könyvtárkészítéshez, hanem az abból tisztított kis RNS-eket.

### Kis RNS tisztítás teljes RNS izolátumból

A kis RNS-ek tisztításához ureát tartalmazó, 8%-os denaturáló poliakrilamid gélt készítettünk. A megfelelő mennyiségű kis RNS-hez 10–30 µg teljes RNS szükséges, amelyhez egyenlő térfogatú FDE-t adtunk, majd a keveréket 65 °C-on, 20 percen keresztül denaturáltuk. A denaturálás után a mintákat azonnal jégre helyeztük. A poliakrilamid gélt először 100 V-on 20–30 percig előfuttattuk, majd a zsebeket 1× TBE pufferrel alaposan átmostuk. Az elválasztást 100 V-on 1–1,5 órán keresztül végeztük, amíg az FDE-ben található brómfenolkék festék a gél aljára nem ért. Az RNS vizualizálásához a gélt 1× TBE pufferben, etídium-bromid jelenlétében (60 ml 1× TBE-hez 3 µl EtBr) 5 percig áztattuk, majd UV-transzilluminátor segítségével ellenőriztük az elválasztás eredményét. A kis RNS-eket tartalmazó tartományt, amely a 15–30 nukleotid mérettartományban található (a megadott körülmények között ez a brómfenolkék festék feletti 0,8–1,0 cm-es régió), steril szikével vágtuk ki. A kivágott gél darabot egy 0,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük, amelynek alját 18G injekciós tűvel (1,2 mm átmérő) 4–5 helyen kilyukasztottuk, majd ezt a csövet egy 2 ml-es Eppendorf csőbe illesztettük. A gél aprítását centrifugálással végeztük, a mintát szobahőmérsékleten, maximális sebességen, 2 percig centrifugáltuk, szükség esetén a folyamatot megismételtük. A géltörmelékhez 400 µl 0,3 M NaCl oldatot adtunk, majd a csöveket rázógépen óvatosan, egy éjszakán keresztül kevertettük az RNS-ek kioldódásának elősegítésére. A géltörmelékes oldatot Spin-X típusú, cellulóz-acetát membránnal ellátott mikrocentrifuga csőbe töltöttük, és 16000 g-n, 2 percig centrifugáltuk. A szűrőegységet eltávolítottuk, majd az RNS-t tartalmazó oldathoz azonos térfogatú 100% izopropanolt és 1 µl GlycoBlue-t (Thermo Fisher Scientific) adtunk, hogy a csapadék látható legyen. A mintákat – 70 °C-on 2–2,5 órán keresztül inkubáltuk a kis RNS-ek kicsapásának elősegítésére. A kicsapódott RNS-t centrifugálással ülepítettük (maximális sebesség, 20 perc, 4 °C), majd a felülúszót óvatosan eltávolítottuk. A pelletet kétszer mostuk jéghideg 70%-os etanollal, minden mosást 12 000 g-n, 20 °C-on, 3 perces centrifugálással végeztünk. Az etanol eltávolítása után a pelletet SpeedVac vákuumcentrifugában szárítottuk 3–5 percig szobahőmérsékleten, majd 12 µl steril Milli-Q vízben oldottuk vissza.

### 3' adapter ligálás

A tisztított kis RNS-ből 2,5 µl-t jégen tartott steril PCR-csőbe pipettáltunk, majd 0,5 µl 3' RNS adaptert (RA3) adtunk hozzá. A keveréket 70 °C-on 2 percig denaturáltuk, majd azonnal jégre helyeztük. Egy másik PCR-csőben 1 µl ligálási puffert (HML), 0,5 µl RNáz-inhibítort és 0,5 µl trunkált T4 RNS-ligázt mértünk össze, majd ehhez 2 µl-t adtunk a denaturált kis RNS–adapter elegyből. A reakcióelegyet óvatos pipettázással homogenizáltuk, és 28 °C-on 1 órán keresztül

inkubáltuk. A ligálási reakciót 0,5 µl STOP oldat (STP) hozzáadásával állítottuk le, majd a mintákat további 15 percig inkubáltuk.

#### 5' adapter ligálás

Egy steril PCR-csőbe 0,5 µl 5' RNS adaptert (RA5) pipettáltunk, majd a mintát 70 °C-on 2 percig denaturáltuk, ezt követően azonnal jégre helyeztük. A denaturált adapterhez 0,5 µl 10 mM ATP-t és 0,5 µl T4 RNS-ligázt adtunk, majd a reakcióelegyet a korábban 3' adapterrel ligált kis RNS-mintához kevertük. Az elegyet óvatos pipetázással homogenizáltuk, és 28 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk, ezt követően jégre tettük.

#### Reverz transzkripció

A 3'–5' adapterrel ellátott kis RNS-mintához 1 µl RT primert (RTP) adtunk, óvatosan megkevertük, majd a keveréket 70 °C-on 2 percig denaturáltuk, ezt követően azonnal jégre helyeztük. Egy tiszta PCR-csőben összeállítottuk az RT reakcióelegyet, amely 1 µl RNáz-mentes vizet, 2 µl 5× reakciópuffert, 0,5 µl 12,5 mM dNTP-keveréket, 1 µl RNáz-inhibitort és 1 µl RevertAid H reverz transzkriptáz enzimet tartalmazott. Az így elkészített RT elegyet az RT-primerrel denaturált kis RNS-mintához adtuk, majd pipetázással homogenizáltuk, és 50 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk.

#### DNS amplifikáció (PCR)

A PCR reakcióelegy 4,25 µl steril Milli-Q vizet, 12,5 µl PCR mixet (PML), 1 µl RNS PCR primert (RP1) és 1 µl indexelt PCR RNS primert (RPIX) tartalmazott. Ehhez 6,25 µl cDNS-t adtunk, majd pipetázással óvatosan homogenizáltuk. A PCR-t az alábbi program szerint végeztük: kezdeti denaturáció 98 °C-on 30 másodpercig, ezt követően 16 ciklus, melynek lépései: denaturáció 98 °C-on 10 másodpercig, annealing 60 °C-on 30 másodpercig és elongáció 72 °C-on 15 másodpercig. A ciklusokat végső elongáció követte 72 °C-on 10 másodpercig.

#### Kis RNS könyvtár tisztítása

A kis RNS könyvtár tisztításához 8%-os TBE poliakrilamid gélt készítettünk, amelyet 100 V-on 20–30 percig előfuttattunk. A gél zsebeit mintafelvitel előtt 1× TBE pufferrel alaposan átmostuk. A 25 µl térfogatú PCR-termékhez 5 µl 6× Orange DNS futtató festéket adtunk. Méretkontrollként a két legszélső zsebbe 20 bp-os DNS létrát, illetve 50 bp-os alacsony molekulatömegű markert töltöttünk, míg a mintákat a középső zsebekbe vittük fel. 100 V-on 1,5–2 órán keresztül futtattuk, amíg a xilén-cianol festék a gél aljára ért. A nukleinsavak vizualizálásához a gélt 1× TBE pufferben (60 ml) 3 µl etídium-bromid jelenlétében 5 percig áztattuk, majd UV-transzilluminátor segítségével ellenőriztük az elválasztást. A 145–160 nukleotid mérettartományban található kis RNS könyvtár sávját steril szikével vágtuk ki, majd a géldarabot egy 0,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük, amelynek alját 18G

injekciós tűvel (1,2 mm átmérő) 4–5 helyen kilyukasztottuk. A kilyukasztott csövet egy 2 ml-es Eppendorf csőbe illesztettük, és a mintát szobahőmérsékleten, maximális sebességen, 4 percig centrifugáltuk. A teljes gélátvitel után a 0,5 ml-es csövet eltávolítottuk, és a géltörmelékre 400 µl 0,3 M NaCl oldatot adtunk. Az RNS kioldódását 4 °C-on, rázógépen, éjszakai inkubációval segítettük elő. Az oldatot Spin-X típusú, cellulóz-acetát membránnal ellátott mikrocentrifuga csőbe töltöttük, majd 16000 g-n, 2 percig centrifugáltuk. Az eljárást megismételtük, ezután a szűrőt eltávolítottuk, és a mintához 1 ml 100% etanolt adtunk. A csapadék vizualizálásának megkönnyítésére 1 µl GlycoBlue-t (Thermo Fisher Scientific) adagoltunk. A nukleinsavak kicsapódását –70 °C-on, legalább 2–2,5 órás inkubációval segítettük elő. A pelletet 4 °C-on, maximális sebességen, 20 perces centrifugálással ülepítettük, majd a felülúszót óvatosan eltávolítottuk. A pelletet kétszer mostuk jéghideg 70%-os etanollal, mindkét mosást 12 000 g-n, 20 °C-on, 3 percig centrifugáltuk. A szárítást SpeedVac vákuumcentrifugában, 3–5 percig, szobahőmérsékleten végeztük, végül a pelletet 12 µl steril 1× TE pufferben oldottuk fel. A tisztított kis RNS könyvtárat –70 °C-on helyeztük el. A kis RNS könyvtárak nagy áteresztőképességű szekvenálását az UD-Genomed Kft. végezte Illumina platformon.

#### 4.5. A kis RNS HTS eredményeinek bioinformatikai elemzése

A bioinformatikai elemzéshez CLC Genomics Workbench (Qiagen) szoftvert használtuk. A kis RNS szekvenciák (úgynevezett read-ek) minőségellenőrzése után a trimmelési eljárással eltávolítottuk az adaptereket, így megkaptuk a redundáns kis RNS szekvenciákat. Ezután megvizsgáltuk ezeknek a redundáns read-eknek a méreteloszlását, hogy meggyőződhessünk, hogy a kis RNS-ek mérettartományába tartozó 21-24 nt hosszúságú szekvenciák alkotják-e nagy többségben a könyvtárat. Következő lépésben a rövid read-ekből hosszabb szekvenciákat, úgynevezett kontigokat építettünk a CLC-be ágyazott, de novo assembly algoritmus használatával. A keletkezett kontigokat a BLASTn programmal illesztettük az NCBI adatbázisból letöltött növényi gazdával rendelkező vírusok referencia genomjára. Azokra a vírus genomokra, amelyekre legalább egy kontig illeszkedett, a redundáns és nem redundáns (ismétlődéseket nem tartalmazó, egyedi szekvenciák) read-eket is felillesztettük a map to the reference parancs használatával. Az adott referenciagenomra felilleszkedő read-ekből konszenzus szekvenciát generáltunk, amely segítségével meg tudtuk állapítani milyen arányban (hány százalékban) fedik le a könyvtárban található kis RNS szekvenciák a vizsgált vírus teljes genomját. Ezt az adatot hívjuk lefedettségnek, amelyet százalékban adtunk meg. A szőlővírusokkal kapcsolatos korábbi munkáink során szerzett tapasztalatok alapján három kritériumot

állítottunk fel, amelyek közül kettő teljesülése esetén nagy valószínűséggel a vizsgált vírus jelenlétét feltételeztük. Az ilyen mintákat RT-PCR módszerrel ellenőriztük a továbbiakban.

- I. Legalább egy vírus specifikus kontig jelenléte
- II. A normalizált redundáns read-ek száma (redundáns read szám/1000000) elérte a küszöbértéket (200)
- III. A vírus genom lefedettsége >60% (viroid esetében >80%).

#### 4.6. Bioinformatikai elemzés eredményeinek igazolása RT-PCR módszerrel

A kis RNS HTS elemzésével kapott vírusok és viroidok jelenlétének megerősítésére RT-PCR módszert használtunk.

##### 4.6.1. cDNS szintézis

A könyvtárak elkészítéséhez használt RNS keverékekkel és ezen kívül egyedi RNS kivonatokkal is végeztünk cDNS szintézist. A reverz transzkripcióhoz a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kitet (Thermo Fisher Scientific) használtuk.

A denaturálási lépésben 2,75 µl RNS-templátot kevertünk össze 0,25 µl 10 µM random primerrel egy 0,5 ml-es PCR-csőben, majd a mintát 65 °C-on 5 percig denaturáltuk, ezt követően azonnal jégre helyeztük. A reverz transzkripció reakcióhoz az elegyet 1 µl 5× reakciópufferből, 0,5 µl 10 mM dNTP-keverékből, 0,25 µl RiboLock RNáz-inhibitorból és 0,25 µl RevertAid reverz transzkriptáz enzimből állítottuk össze, amelyet az előzőleg denaturált RNS-hez és primerhez adtunk. A reakció a gyártó protokollja szerint zajlott: 25 °C-on 10 perc, 42 °C-on 60 perc, 45 °C-on 10 perc, végül 70 °C-on 10 perc inkubáció.

A GPGV gyomnövényekből történő kimutatásához a jászszentlászlói mintáknál oligo(dT) primert alkalmaztunk. Az előzőekben ismertetett módon ment végbe a denaturálás, a reakció elegyet is változatlanul állítottuk össze, azonban a reverz transzkripciót eltérő hőmérsékleti programmal végeztük: 42 °C-on 60 perc, majd 45 °C-on 10 perc inkubáció. A cDNS-eket -20 °C-on tároltuk.

##### 4.6.2. PCR vizsgálat

A PCR tesztelést szakirodalomban használt és saját tervezésű primer párok segítségével végeztük. A primerek tervezéséhez a kis RNS HTS szekvenciák elemzése során létrehozott konszenzus szekvenciákat használtuk, ahol igyekeztünk a vírus konzervatív régióját kiválasztani a forward és

reverz primer tervezése esetében is. Körülbelül 21 nt hosszú, a 3' végen citozint vagy guanint tartalmazó, bázisisméltlődésektől mentes oligonukleotidok tervezésére törekedtünk. Az NCBI primer-BLAST segítségével ellenőriztük a tervezett primerek minőségét, hogy kizárhassuk az önmagukkal és egymással történő anellációt, valamint, hogy csökkentsük annak esélyét, hogy a primerek a gazdanövény mRNS-éhez tapadjanak, és emiatt téves PCR-termékek jöjjenek létre. Ezen kívül arra is figyeltünk, hogy a két primer olvadási hőmérséklete között 3 °C-nál ne legyen nagyobb különbség. A PCR tesztekben használt összes primer párt az M4 melléklet tartalmazza.

A PCR tesztek két különböző célból végeztük:

Diagnosztikai célból, amikor kizárólag a vírusok és viroidok kimutatása volt a cél, Phire Green Hot Start II DNS polimeráz enzimet (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk. Sanger-szekvenálás esetén Q5 High-Fidelity DNS polimeráz enzimet (NEB) használtunk, amely nagy pontosságot és alacsony hibaarányt biztosít az adott DNS-szakasz amplifikálásában.

A szőlőből tisztított RNS templáttal készült cDNS-ek minőségét minden esetben szőlő aktin teszteléssel ellenőriztük Phire Green Hot Start II DNS polimeráz enzimmel.

A reakcióelegyek összetétele és térfogata az adott polimeráztól függően eltért: a Phire esetében 10 µl-es reakciót állítottunk össze, amely 2 µl 5× Phire Green reakciópuffert, 0,2 µl 10 mM dNTP-keveréket, 0,5–0,5 µl 10 µM koncentrációjú forward és reverz primert, 0,2 µl polimeráz enzimet, 0,2 µl cDNS templátot és 6,4 µl steril Milli-Q vizet tartalmazott. A Q5 polimerázzal végzett reakciókat 25 µl végső térfogatra állítottuk össze, 5 µl 5× Q5 reakciópuffer, 0,5 µl 10 mM dNTP, 1,25–1,25 µl 10 µM koncentrációjú forward és reverz primer, 0,25 µl Q5 enzim, 1 µl cDNS templát és 15,75 µl steril Milli-Q víz felhasználásával.

Mindkét polimerázzal azonos PCR-ciklusbeállítást alkalmaztunk: a kezdeti denaturáció 98 °C-on 30 másodpercig tartott, ezt 40 ciklus követte, melyek lépései: denaturáció 98 °C-on 10 másodpercig, primer-annealing primer-specifikus hőmérsékleten, majd elongáció 72 °C-on (Phire esetében 20 másodperc, Q5 esetében a fragment méretétől függően 20–30 másodperc/kb). A végső elongáció mindkét polimerázzal 72 °C-on 2 percig zajlott. Az annealing-hőmérsékletek a Q5 polimeráz esetében minden primerpárhoz az M4 mellékletben kerültek feltüntetésre.

A PCR-termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, minden esetben 5 µl reakcióelegyet felhasználásával.

#### 4.7. PCR termék tisztítása és klónozása

A PCR reakciót agaróz gélen elválasztottuk, majd UV illuminátor alatt steril szikével kivágtuk a megfelelő méretű termékeket. Ezután a GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével, a gyártó utasításai szerint nyertük vissza a PCR termékeket.

A klónozáshoz a CloneJET PCR Cloning Kit-et (Thermo Fisher Scientific) használtuk, amely során a PCR termékünket egy pJET1.2/blunt vektorba ligáltuk a gyártó utasításai szerint.

A transzformálást hősokkos módszerrel végeztük. Ehhez 100 µl DH5α kompetens sejtet kevertünk össze 5 µl ligált plazmiddal, majd 20 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően a mintát 42 °C-on 30 másodpercig hősokkoltuk, majd 2 percig jégen tartottuk. Ezután 0,5 ml steril SOC táptalaj hozzáadása után 37 °C-on, rázatva 40 percig inkubáltuk. A sejtekből 150 µl-t ampicillint tartalmazó LB agar táptalajra szélesztettünk, és a lemezeket 37 °C-on, éjszakán át inkubáltuk. Másnap az inzertet tartalmazó plazmiddal transzformált baktériumtelepek megjelentek, míg a nem transzformált sejtek és az üres plazmidot tartalmazó sejtek nem voltak életképesek. Minden klónozásból három telepet választottunk ki, amelyeket 3 ml ampicillines LB táptalajba oltottunk, és 37 °C-on, rázatva éjszakán át tenyésztettünk.

A plazmidok izolálását a baktériumtenyészetekből a Plasmid DNA Purification Kit (MACHEREY-NAGEL) segítségével, a gyártó utasításai szerint végeztük. A folyamat végén 50 µl milli-Q vízben oldott tisztított plazmidot kaptunk, amelyből 2 µl-t XhoI és XbaI restrikciós endonukleázokkal emésztettünk 1 órán át, 37 °C-on. Az emésztés eredményét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, amellyel meghatároztuk, hogy a vektor megfelelő méretű inzertet tartalmazott-e.

#### 4.8. Sanger szekvenálás

A Sanger szekvenálást a BIOMI Kft. végezte két irányból a pJET1.2 Forward Sequencing Primer (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') és pJET1.2 Reverse Sequencing Primer (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') használatával.

#### 4.9. Szekvencia és filogenetikai elemzés

A Sanger szekvenciák ellenőrzését a Chromas program (Technelysium Pty Ltd, Australia) használatával végeztük el. A nukleinsav szekvenciákat az NCBI BLASTn program segítségével azonosítottuk. A nukleotid szekvenciák összehasonlításához és a többszörös illesztéshez a Clustal Omega programot használtuk. A filogenetikai elemzéseket és a filogenetikai fákat a MEGA7 és

MEGA11 programmal (Kumar et al., 2016; Tamura et al., 2021) készítettük. A vizsgált vírusgenom szakaszokat egységes hosszúságúra vágtuk, majd az illesztéseket a MUSCLE algoritmus segítségével készítettük el.

Az alanyültetvényekből és szőlőültetvényekből származó vírusizolátumok esetében neighbor-joining módszert (Saitou & Nei, 1987) alkalmaztuk, az evolúciós távolságokat a Jukes-Cantor modell (Jukes & Cantor, 1969) alapján számítottuk. A filogenetikai fák megbízhatóságát bootstrap analízissel értékeltük 500 ismétlés alkalmazásával.

A szőlőből és gyomnövényekből származó GPGV szekvenciák SNP és filogenetikai elemzéséhez a Geneious Prime 2022.0.2 szoftvert alkalmaztuk. Az illesztett szekvenciák filogenetikai elemzését MEGA11 programmal végeztük. Az evolúciós kapcsolatok rekonstruálása maximum likelihood (Felsenstein, 1981) módszerrel történt a Tamura-Nei modell (Tamura & Nei, 1993) alkalmazásával. A filogenetikai fák megbízhatóságát bootstrap analízissel értékeltük 1000 ismétlés alapján, az 50% alatti bootstrap támogatottságú ágakat összevontuk.

A GVT variánsok filogenetikai elemzését a GPGV szekvenciák esetében alkalmazott módszertannal azonos elvek szerint végeztük, a MEGA7 szoftver felhasználásával, neighbor-joining algoritmust (Saitou & Nei, 1987) alkalmazva. Az evolúciós távolságokat a Jukes-Cantor modell alapján számítottuk, a filogenetikai fák megbízhatóságát pedig bootstrap analízissel értékeltük 500 ismétlés alkalmazásával.

#### 4.10. Northern hibridizáció

A Northern hibridizációs vizsgálathoz mintánként 2-4 µg RNS kivonatot használtunk. Az RNS-ek elválasztásához 17 v/v% formaldehid tartalmú 1× MAE puffer tartalmú (20 mM MOPS, 2 mM Na-acetát pH: 7,0, 5 mM EDTA) 1,5%-os agaróz gélt öntöttünk. Az RNS-t mintakezelő pufferben (1× MAE puffer, 17 v/v% formaldehid, 50 v/v% formamid) 20 percen keresztül 65 °C-on denaturáltuk. A gélelektroforézist 1× MAE pufferben, 4 °C-os helyiségben végeztük. A blotolási folyamat kapilláris módszerrel történt, amivel az RNS-eket Amersham HyBond-NX membránhoz (GE Healthcare) kötöttük. A blotolás 20× SSC puffer (3 M NaCl, 0,3 M nátrium-citrát (pH 7,2)) használatával egy éjszakán keresztül zajlott. Ezután UV fényt használtunk a nitrocellulóz membrán és az RNS-ek között keresztkötés létrehozására. A membránt 15 percig mostuk 65 °C-on 2× SSC pufferben (0,3M NaCl, 30mM nátrium-citrát (pH 7,2)), ezt követően pedig prehibridizálást végeztünk 1 órán keresztül, szintén 65 °C-on, Church pufferben (0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2), 1% BSA, 1 mM EDTA, 7% SDS). DecaLabel Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével vírus specifikus, radiokatív P32 jelzett próbát

készítettünk. Ehhez 5  $\mu$ l 5 $\times$  DecaLabel puffert, 1  $\mu$ l tisztított, vírus specifikus PCR terméket és 19  $\mu$ l Milli-Q vizet használtunk. Az elegyet 10 percen keresztül forraltuk, amit ezt követően azonnal jégre helyeztünk. Lehűlés után hozzáadtunk 1,5  $\mu$ l MixC oldatot, 0,5  $\mu$ l Klenow DNS polimerázt és 3  $\mu$ l [ $\alpha$ -P32] -dCTP-t és 1 órára 37 °C -os vízfürdőbe tettük. Ezután 2  $\mu$ l dNTP-t (10 Mm) mértünk a mintához, amit további 5 percre 37 °C-ra tettünk, majd 95 °C-on denaturáltuk, befejezéséppen pedig jégre helyeztük. Az így elkészített vírusspecifikus DNS próbát 15 ml hibridizáló Church pufferben hígítottuk és ebben a hibridizáló oldatban inkubáltuk egy éjszakán keresztül 65 °C-on. Másnap egymás után csökkenő koncentrációjú sóoldatokkal mostuk a membránt (sorrendben: 2 $\times$  SSC, 0,1 $\times$  SSC és 0,1% SDS). A membránra röntgenfilmet helyeztünk és a jel erősségétől függően pár órát vagy pár napot exponáltuk. A filmet sötétszobában hívtuk elő.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGVITÁSA

### 5.1. Szőlő alany ültetvények vírusfertőzöttségének felmérése kis RNS HTS-sel

A szőlő alanyültetvények vírus- és viroid-fertőzöttségét kis RNS HTS-sel vizsgáltuk, az eredményeket RT-PCR-rel igazoltuk.

#### 5.1.1. Kis RNS HTS eredményeinek bioinformatikai elemzése

A begyűjtött mintákból tisztított RNS-ekből a szekvenálható kis RNS könyvtárakat a laborunkban használt protokoll alapján készítettem el (Czotter, et al., 2018b; Jaksá-Czotter et al., 2023). A 19 kis RNS könyvtár szekvenálásának eredményeképp 12866384 és 26439791 közötti olvasatot (read-et) kaptunk. A minőség-ellenőrzés után a kis RNS szekvenciákat úgy kaptuk meg, hogy az 50 bp hosszan szekvenált readekből trimmeléssel eltávolítottuk az adapter szekvenciákat. Ezzel a redundáns, azaz ismétlődő readek számát kaptuk meg, melyek között egy egyedi kis RNS szekvencia több kópiában is előfordulhat. A redundáns read-ek száma 12686109 és 25601262 között volt, átlagosan 19143685. Az ismétlődések kiszűrésével a nem redundáns readek számát számoltuk, mely azt mutatja meg, hogy hány darab egyedi kis RNS szekvencia található meg a szekvenált könyvtárban. 2011245 és 5048896 közötti nem redundáns read számokat kaptunk, ez átlagosan 3530070 volt. A kis RNS readekből az átfedő, azonos szekvenciájú szakaszok felhasználásával, de novo assembly algoritmussal készítettünk hosszabb szekvenciákat, ún. kontigokat. Az így létrehozott kontigok száma, amelyek hossza minimum 35 nt volt, 3148 és 16594 közé esett, átlagosan könyvtáranként 9871 kontigot kaptunk. A mintában jelenlevő vírusok azonosításához a kontigokat felillesztettük a növényi gazdával rendelkező vírusok és viroidok referenciagenomjaira, aminek eredményeképpen kaptunk egy vírus találati listát. A kapott találatokat növekvő E-érték (E-value) alapján sorba rendeztük, és csak azokkal a vírusokkal dolgoztunk tovább, amelyek esetében legalább egy olyan kontig volt jelen, amely alacsony E-értékkel ( $E \leq 1 \times 10^{-5}$ ) mutatott egyezést az adott vírussal. A határértéken belül kapott kontigokat vírusok szerint csoportosítottuk és megszámláltuk. Az így kapott találati listán szereplő vírus vagy viroid találatok referenciagenomjára felillesztettük a redundáns és nem redundáns read-eket, ahhoz, hogy összehasonlíthatóak legyenek, a redundáns read számot a szekvenált readek számára normalizáltuk (RPM= read per million read), és konszenzus szekvenciákat hoztunk létre. Az így kapott részletes bioinformatikai elemzés eredményét az M5 melléklet tartalmazza. A táblázatban azokat az értékeket jelöltük szürke kiemeléssel, amelyekre az alábbi három megállapítás valamelyike igaz volt:

- I. Legalább egy vírus specifikus kontig jelenléte
- II. A normalizált redundáns read-ek száma (vírus specifikus redundáns read szám/1 millió szekvenált read) elérte az általunk állított küszöbértéket (200)
- III. A vírus genom lefedettsége >60% (viroid esetében >80%)

A csoport korábbi, szőlőminták kis RNS HTS-sel történt virom meghatározásának tapasztalati alapján akkor úgy értékeltük, hogy az adott vírus vagy viroid nagy valószínűséggel megtalálható a vizsgált mintában, ha a fent felsorolt kritériumokból bármelyik kettő teljesült (2. táblázat, M5 melléklet). A kis RNS HTS bioinformatikai elemzése alapján megállapítottuk, hogy az alanyültetvényekből származó könyvtárakban a vizsgálatköteles szőlővírusok a GFkV kivételével (GFLV, ArMV, GLRaV1, GLRaV2, GLRaV3, GVA, GVB) valószínűleg nincsenek jelen. Analízisünk azonban több olyan vírus és viroid jelenlétét mutatta, amelyeket a hatóság nem vizsgál. Ezek közül a GRSPaV-t 13 könyvtárban, a GPGV-t egy kivétellel (7\_NG) az összes könyvtárban, a GDefV-t pedig a pécsi fajtagyűjteményben (11\_P) detektáltuk. Viroidok közül a HSVd mindegyik a GYSVd-1 pedig 13 könyvtárban volt kimutatható. Hat esetben (1\_BSZ, 3\_FH, 5\_ZE, 7\_NG, 8\_MT, 13\_SZ) a GSYVd-1 genomjának a lefedettsége nagyobb volt, mint 80%, annak ellenére, hogy nem volt jelen egy GSYVd-1 specifikus kontig sem és a normalizált redundáns readek száma is kevesebb volt, mint 200. A pécsi fajtagyűjteményben (11\_P) találatot kaptunk egy, hazánkban eddig még ki nem mutatott viroid, az AGVd jelenlétére.

#### 5.1.2. A szekvenálási eredmények igazolása RT-PCR módszerrel

A kis RNS könyvtárak szekvenálása során kimutatott vírusok és viroidok visszaigazolását RT-PCR módszerrel végeztük, amihez a könyvtárak elkészítéséhez használt RNS keveréket, illetve a keverék alapját képező, az egyedi növényekből tisztított RNS-t használtuk templátként és a már előzőleg bemutatott M4 mellékletben található indítószekvenciákat. A HTS és RT-PCR eredmények összevetését a 2. táblázat foglalja össze.

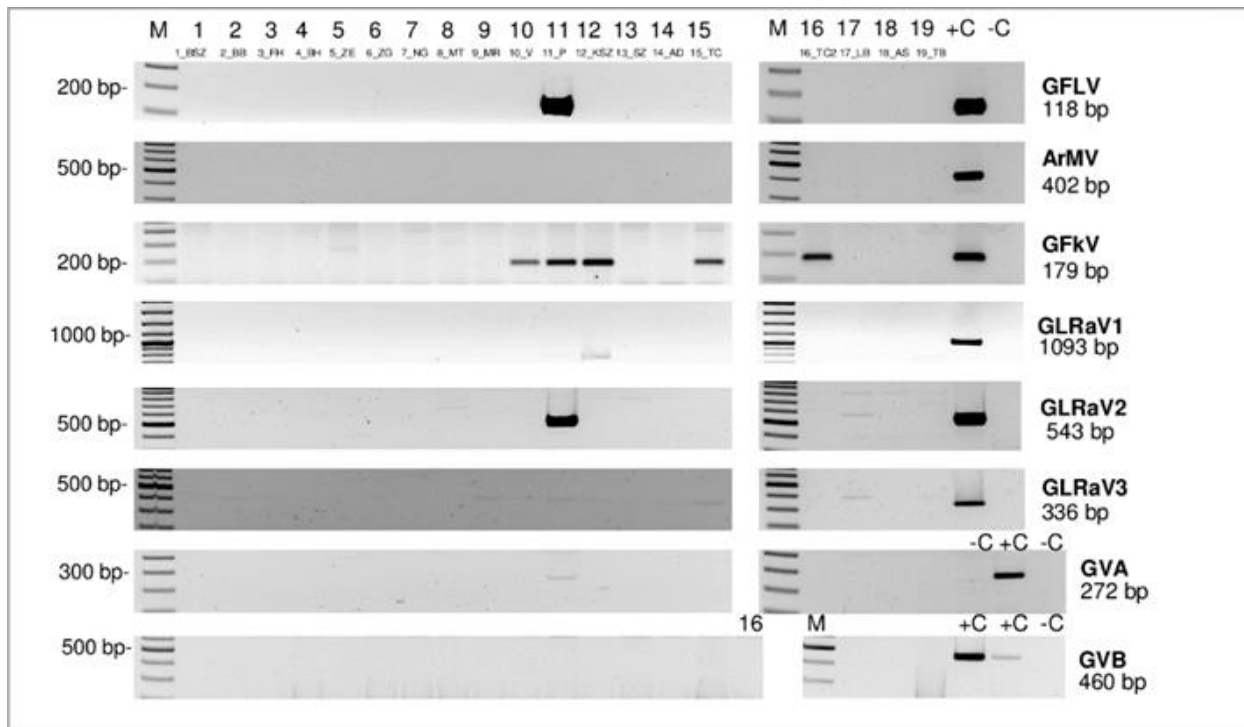
2. táblázat A vizsgált szőlővírusok kimutatásának összehasonlítása HTS és RT-PCR alapján

Könyvtár kód	Analízis	Vizsgálatköteles vírusok								Viroidok			Nem vizsgálatköteles vírusok			
		GFLV	ArMV	GFkV	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GVA	GVB	HSVd	GYSVd-1	AGVd	GRSPaV	GSyV-1 (SK30)	GPGV	GDefV
1_BSZ	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
2_BB	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
3_FH	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
4_BH	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
5_ZE	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
6_ZG	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
7_NG	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
8_MT	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
9_MR	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
10_V	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	RT-PCR	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
11_P	HTS	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
	RT-PCR	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
12_KSZ	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
	RT-PCR	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
13_SZ	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
14_AD	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
15_TC	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	RT-PCR	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
16_TC2	HTS	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	RT-PCR	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
17_LB	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
18_AS	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
19_TB	HTS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-

A ‘+’ jel a vizsgált vírus jelenlétét, a ‘-’ jel annak hiányát jelzi. A piros háttér azokat az eseteket emelik ki, ahol a két módszer eredménye eltérést mutatott. A \* jelzés a 16\_TC2 könyvtár GFkV oszlopában technikailag fals pozitív eredményt jelez.

### 5.1.2.1. Vizsgálatköteles vírusok előfordulása az alanyültetvényeken és alany fajtagyűjteményekben

A vizsgálatköteles vírusokat eredetileg minden ültetvényben tesztelik DAS-ELISA módszerrel. A 11\_P és 15\_TC jelzésű könyvtárak alany fajtagyűjtemények növényeiből készültek, ahol nincs rendszeres ellenőrzés. Összesen 8 hatóságilag előírt szőlővírusra (GFLV, ArMV, GFkV, GLRaV1, GLRaV2, GLRaV3, GVA, GVB) teszteltük le a mintákat RT-PCR-rel (7. ábra).

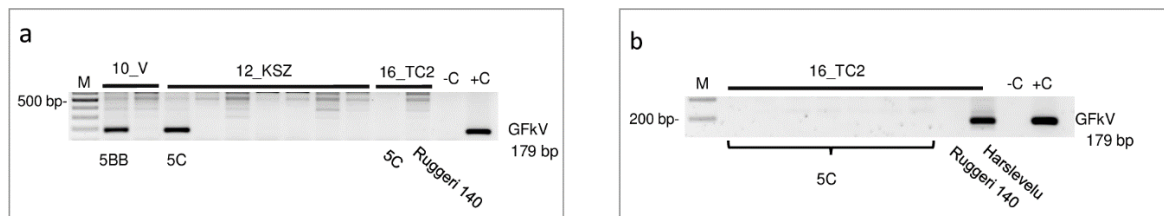


**7. ábra A vizsgálatköteles vírusok kimutatása RT-PCR módszerrel**

A PCR teszthez az M4 melléklet primer párjai közül a következőket használtuk sorszám szerint: 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra, +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A -C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

Az alanyültetvényeket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az RT-PCR eredmények majdnem teljesen megegyeztek a bioinformatikai elemzés eredményével, kivétel ez alól a 10\_V és a 12\_KSZ minták (2. táblázat). A 10\_V és 12\_KSZ könyvtárak a HTS elemzés alapján negatívnak bizonyultak, ugyanakkor az RT-PCR alapján GFkV fertőzést mutatott. Ebben az esetben ennél a két könyvtárnál megvizsgáltuk, hogy a kis RNS tisztításhoz használt RNS keverék milyen szőlőfajtákat és azon belül hány egyed RNS-ét tartalmazták, majd a fajta pool-okat is leteszteltük GFkV jelenlétére. A 10\_V keverék összesen 11 egyedből lett összeállítva: hét egyed 5BB fajta és négy egyed 5C fajta. Mivel a fajta pool-okból csak az 5BB volt pozitív, így annak az egyedeit is külön tesztelve végül csak egy

egyed volt pozitív a GFkV-ra (8. ábra „a” panel). A 12\_KSZ minta 17 egyedből állt össze, ami nyolc különböző fajtát tartalmazott (5C – 8 db, Fercal – 1 db, S.O.4 – 2 db, 125AA – 2 db, Paulsen – 2 db, Ruggeri – 1 db, Richter – 1 db). Ebben az esetben is csak egy fajta, az 5C bizonyult GFkV fertőzöttnek. Ezért ennek a keveréknek a nyolc egyedét külön is teszteltük RT-PCR-rel, ahol szintén egy egyed volt GFkV fertőzött (8. ábra „a” panel). A 10\_V és 12\_KSZ mintákban a nem fertőzött növények RNS-e hígította a keveréket, így a GFkV specifikus read-ek száma a küszöbérték alatt maradt az elemzésünkben. A 16\_TC2 könyvtár a bioinformatikai elemzés alapján tartalmazott GFkV eredetű kontigot, így ebben az esetben is megnéztük külön a fajta és egyed számot, majd teszteltük külön-külön a fajta és egyed RNS keverékeket is. Itt hét egyed 5C fajtájú és egy egyed Ruggeri 140 fajtájú volt, amelyek mind negatívak voltak az RT-PCR teszt során. Azonban a mintagyűjtéskor az alany fajták mellől begyűjtött, vírusos tüneteket mutató, Hárslevelű fajtájú egyed RNS kivonata is belekerült a teljes ültetvény keverékbe, ami GFkV pozitív eredményt adott az RT-PCR tesztek alapján (8. ábra „b” panel). Így végeredményben a 16\_TC2 jelzésű könyvtárban láttuk a GFkV jelenlétét jelző kontigot, azonban nem az ültetvényről szedett alany minták, hanem csak a velük együtt tesztelt Hárslevelű egyed volt GFkV fertőzött.



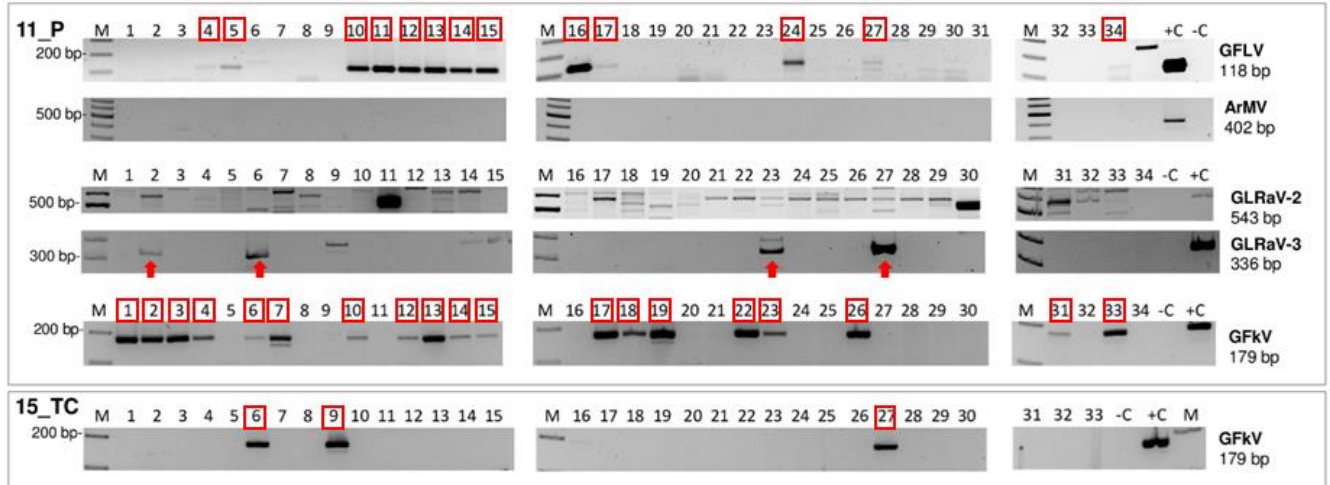
**8. ábra A 10\_V, 12\_KSZ és 16\_TC2 minták egyedeinek RT-PCR tesztje GFkV-ra**

A PCR teszthez az M4 melléklet primer párjai közül a következőt használtuk sorszám szerint: 10. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A –C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

Az alany fajtagyűjtemények esetében nincs rendszeres ellenőrzés, mint az ültetvényekben, ezért nagyobb eséllyel fordulhatnak elő olyan vírusok is, amelyek vizsgálatkötelesek, ezért az ide tartozó eredményeket külön tárgyaljuk. A pécsi fajtagyűjtemény (11\_P) körülbelül 20 éves és a bioinformatikai elemzés GFLV, ArMV, GFkV, GLRaV-2 és GLRaV3 jelenlétét mutatta ki. A tokaji fajtagyűjtemény viszonylag fiatal, csak két éves és egyedül GFkV fertőzést mutatott az elemzésünk (2. táblázat, M5 melléklet).

Az RT-PCR tesztek majdnem minden esetben tükrözték a bioinformatikai elemzés eredményét (7. ábra). A pécsi mintáknál 34 egyedből 13 GFLV pozitív, 19 egyed GFkV pozitív és négy egyed

GLRaV-2 pozitív volt. A tokaji ültetvényben a GFkV fertőzés 33 egyedből háromban volt kimutatható (9. ábra).



### 9. ábra A pécsi (11\_P) és tokaji (15\_TC) fajtagyűjteményekben található egyedek PCR tesztjei

A PCR teszthez az M4 melléklet primer párjai közül a következőt használtuk sorszám szerint: 1, 2, 6, 7, 10. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A -C a negatív kontroll (templát nélküli minta). A piros négyzetek és nyilak a pozitív mintákat jelzik.

A 11\_P könyvtár elemzésekor ArMV specifikus kontigokat is kaptunk, azonban az RT-PCR segítségével mégsem tudtuk amplifikálni a vírusspecifikus genomrészletet sem az ültetvény RNS keverékéből, sem az egyedek RNS-eiből (7. és 9. ábra).

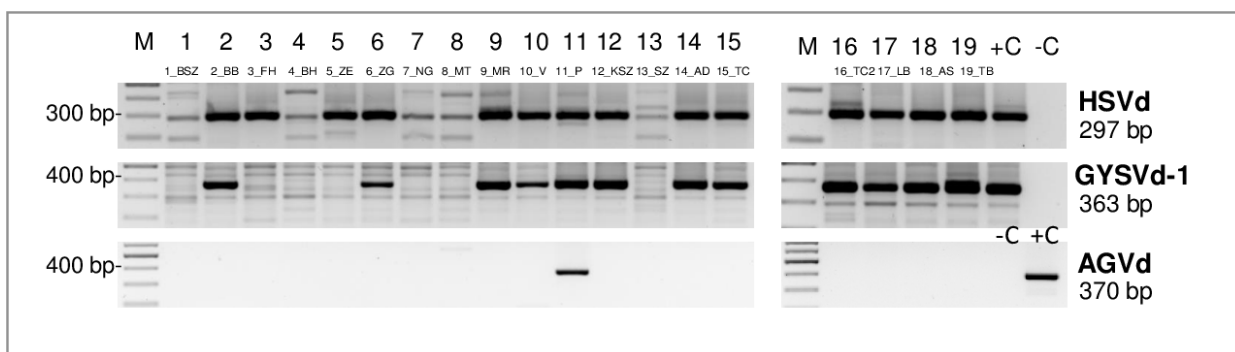
Ennek az ellentmondásnak a feltárásához azon a vonalon indultunk el, hogy a mintánk GFLV fertőzött volt. Az ArMV és GFLV nepovírusok és nagy a homológia a szekvenciájuk között. A két vírus referenciagenomjának összehasonlítása azt mutatta, hogy az RNS1 és RNS2 is 72%-ban azonos. Ahhoz, hogy kiszűrjük, a 11\_P könyvtár esetleg tévesen ArMV-nek azonosított kontigjait, ezeket NCBI BLASTn algoritmus segítségével illesztettük az adatbázisban található genom szekvenciákhoz és azt az eredményt kaptuk, hogy a legtöbb kontig nagyobb hasonlóságot mutatott az egyik GFLV variánssal (GFLV-GHu: EF426852.1), mint az ArMV referenciagenommal (M6 melléklet). Érdekes, hogy ez a referenciagenom egy Magyarországról begyűjtött mintából származik (Vigne et al., 2008) és egy olyan esettanulmányban szerepel, ami az ArMV és a GFLV RNS2 genomi régiói között létrejövő rekombinációról szól. Tovább vizsgálva az ArMV megjelenését a mintánkban, kiválogattuk az összes kis RNS read-et a könyvtárból, amely illeszkedett az ArMV RNS2 referenciagenomjára (8599 read). Ezeket felillesztettük a fent említett GFLV-GHu variáns RNS2 genomjára. Azt tapasztaltuk, hogy az összesen 8599-ből 6161 kis RNS szekvencia illeszkedett is. Ezen

kívül ugyanebben a könyvtárban szőlő deformációs vírusként (GDefV) azonosított kontigokat is találtunk (64 kontig GDefV RNS1-re, kilenc kontig GDefV RNS2-re illesztve). A GDefV a GFLV-GHu-hoz hasonlóan egy GFLV és ArMV rekombináns vírus (Elbeaino et al., 2012). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy ebben a fajtagyűjteményben ezek vagy ezekhez a vírusokhoz hasonló rekombinánsok lehetnek jelen. Az RT-PCR-hez használt GFLV primerek vizsgálata azt mutatta, hogy a mintánkban található vírusvariáns szekvenciája a primer illeszkedési helyénél jobban hasonlít a GFLV szekvenciájához, mint az ArMV azonos genom szakaszához és így kaphattunk a GFLV specifikus RT-PCR során pozitív jelet. Összesítve ezeket az eredményeket és megfigyeléseket biztosan csak annyit állíthatunk, hogy a pécsi fajtagyűjteményben található egy rekombináns nepovírus is.

A GLRaV-3 kontig nem volt jelen a 11\_P könyvtárban, de a GLRaV-3 referenciagenomjának lefedettsége a kis RNS szekvenciákkal 87,1%-os volt, ami utalhat a vírus jelenlétére a mintában (M5 melléklet). A teljes fajtagyűjteményből származó RNS keveréket használva templátként az RT-PCR-es teszteléshez nem kaptunk PCR terméket (7. ábra). Ugyanezzel a módszerrel az RNS keveréket alkotó egyedek RNS-eit is leteszteltük, így négy egyedből kimutattuk a GLRaV-3 jelenlétét (9. ábra). Ebben az esetben a fajtagyűjteményre végzett RT-PCR hamis negatív eredménye annak tudható be, hogy a virális RNS kihígult a teljes fajtagyűjteményt reprezentáló RNS keverékben.

#### 5.1.2.2. Viroidok előfordulása az alanyültetvényeken és alany fajtagyűjteményekben

A könyvtárak elemzése az mutatta, hogy mindegyik minta tartalmazza a HSVd-t (M5 melléklet), mivel annak ellenére, hogy néhány esetben a normalizált redundáns read-ek száma nem érte el a küszöbértéket (200), a viroid genom lefedettsége mindegyiknél 100% volt. Az RT-PCR-es tesztelés során az összes mintában kimutattuk a HSVd jelenlétét (10. ábra).

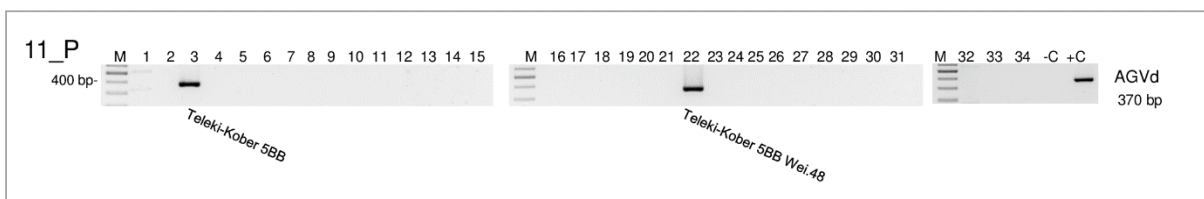


### 10. ábra Viroidok kimutatása RT-PCR módszerrel a kis RNS könyvtárakhoz felhasznált RNS-ekből

A PCR teszthez az M4 melléklet primer párijai közül a következőket használtuk sorszám szerint: 22, 23, 24. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott viroiddal fertőzött minta). A -C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

A GYSVd-1 13 mintában volt jelen. Az 1\_BSZ, 3\_FH, 5\_ZE, 7\_NG, 8\_MT, és 13\_SZ könyvtárakban csak a genom lefedettség (>80%) utalt a jelenlétére, mivel se kontig, se pedig az elegendő mennyiségű normalizált redundáns read szám nem támasztotta alá a GYSVD-1 jelenlétét (M5 melléklet). Ezt az erősítette meg az RT-PCR tesztelés is egy kivétellel, mivel a 4\_BH esetében nem kaptunk PCR terméket (10. ábra).

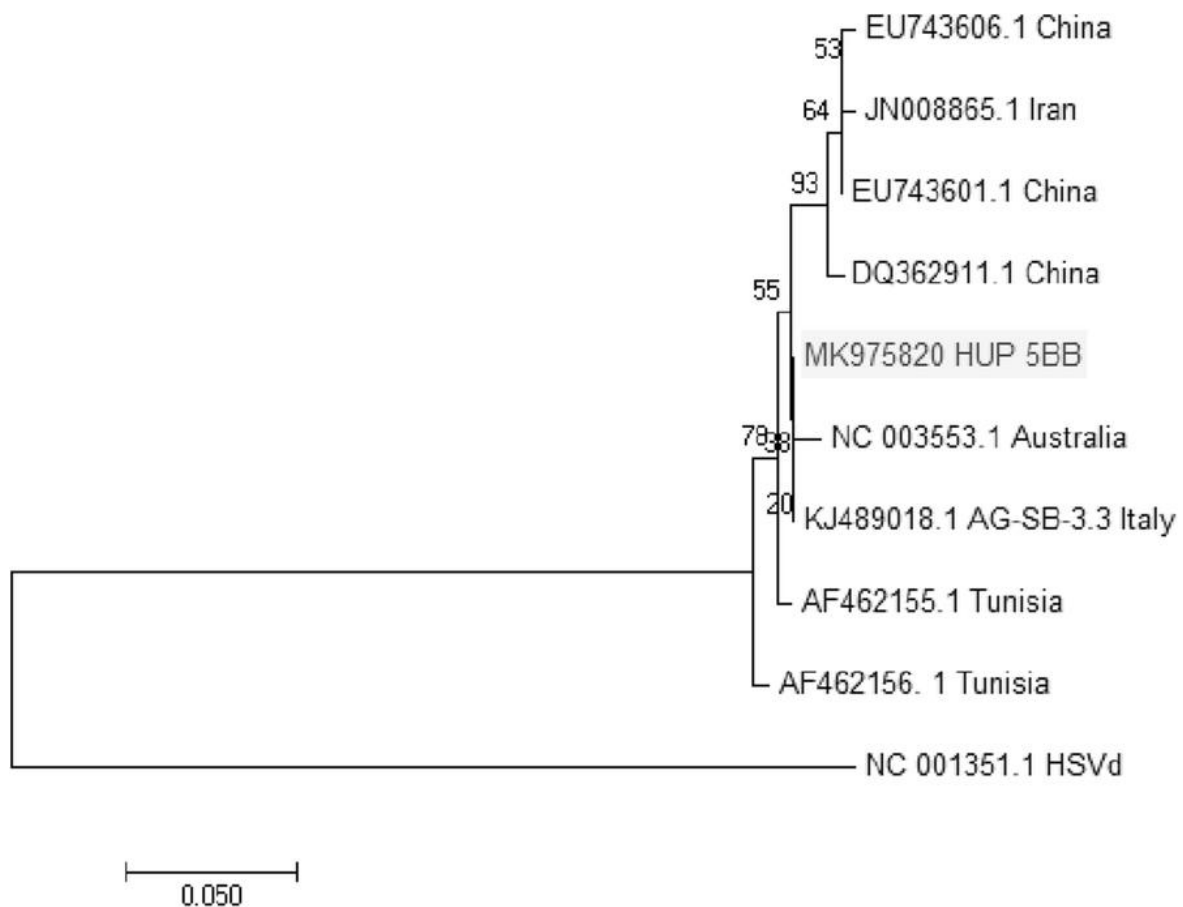
A 4\_BH könyvtárban volt egy GYSVd-1 specifikus kontig, de a normalizált redundáns read szám nem érte el a küszöbértéket és a lefedettség is csak 92% volt (szemben a pozitív könyvtáraknál tapasztalt minimum 98%-os lefedettséggel) (M5 melléklet). Előfordulhat, hogy másik GYSVd variáns (például GYSVd-2) található meg ebben a mintában, viszont ennek vizsgálatát már nem végeztük el. A pécsi fajtagyűjteményben a bionformatikai elemzés AGVd jelenlétére utalt: 5 kontigot, 225 normalizált read-et és 100%-os genom lefedettséget kaptunk (M5 melléklet). Mikor az AGVd előfordulását a különböző alanyfajtákban is megvizsgáltuk, két 5BB egyedben találtuk meg (11. ábra).



### 11. ábra Az AGVd kimutatása RT-PCR módszerrel a pécsi fajtagyűjtemény (11\_P) egyedeinek RNS-eiből

A PCR teszthez az M4 melléklet primer párijai közül a következőt használtuk sorszám szerint: 24. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott viroiddal fertőzött minta). A -C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

A két PCR terméket kitisztítottuk és Sanger szekvenálással meghatároztuk a szekvenciájukat. A két variáns teljesen egyformának bizonyult és a kis RNS-ekből generált konszenzus szekvenciával is 100%-os egyezést mutattak (emiatt csak az egyiket küldtük be az NCBI adatbázisba, MK975820). Szakirodalmi adatok alapján Magyarországon még nem mutatták ki az AGVd jelenlétét szőlőben. Mivel mi is csak a pécsi fajtagyűjteményben találtuk meg, így nem nagy a valószínűsége, hogy hazánk szőlőültetvényeiben jelen lenne. Sajnos nem ismerjük a két 5BB variáns eredetét, azonban a filogenetikai vizsgálatunk azt mutatta, hogy az általunk talált variáns egy olasz és egy ausztrál variánssal együtt klasztereződött, valamint távoli rokonságban áll a tunéziai és ázsiai variánsokkal (Gambino et al., 2014) (12. ábra).



**12. ábra A pécsi fajtagyűjteményből származó AGVd variáns szekvenciájának (MK975820) filogenetikai elemzése**

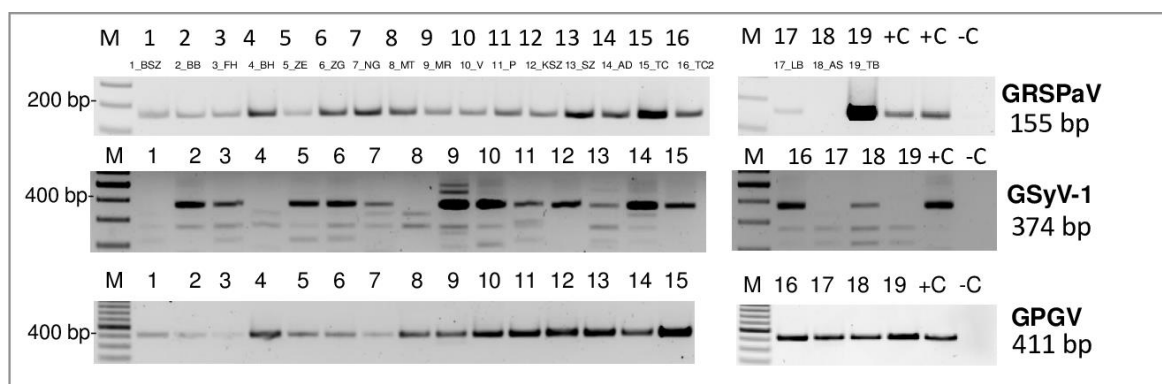
A filogenetikai fát a MEGA7 Neighbor-Joining módszerével készítettük, amelynek gyökeréhez a HSVd referencia szekvenciát használtuk.

### 5.1.2.3. Nem vizsgálatköteles vírusok jelenléte

A szekvenált kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése több, Magyarországon nem vizsgálatköteles vírus jelenlétét is kimutatta. A GRSPaV-t a 13 könyvtárban, a GPGV-t egy kivétellel (7\_NG) minden könyvtárban, a GDefV-t pedig a 11\_P könyvtárban tudtuk azonosítani legalább egy vírusspecifikus kontig alapján (2. ábra, M5 melléklet). Ezen felül külön vizsgáltuk a kis RNS könyvtárakat GSyV-1 jelenlétére is, mivel előzetes felméréseink alapján a hazai termő ültetvényekben nagy elterjedést mutatott ez a vírus (Czotter, et al., 2018a).

#### 5.1.2.3.1. A GRSPaV vizsgálata

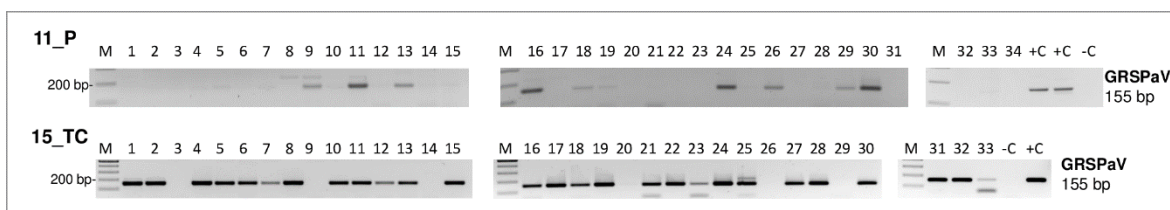
A kis RNS szekvenciák alapján 13 könyvtárban mutattunk ki GRSPaV fertőzést, azonban az RT-PCR teszt során egy kivétellel (18\_AS) az összes mintában kaptunk vírus specifikus PCR terméket (13. ábra). Ez az egy negatív PCR a 18\_AS esetében olyan könyvtárból származott, amely nyolc egyed kevert RNS-éből készült és amelyben a vírus alacsony mennyiségben volt jelen, illetve a jelen lévő szekvenciák eltérhettek az alkalmazott primerek kötőhelyeitől.



**13. ábra A nem vizsgálatköteles vírus RT-PCR tesztje a kis RNS könyvtárakból készült RNS-ek használatával**

A PCR teszthez az M4 melléklet primer párijai közül a következőket használtuk sorszám szerint: 12, 14, 16. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A -C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

A könyvtárak elkészítésében a 19\_TB esetében volt egy különbség a többitől, mégpedig az, hogy az RNS kivonáshoz nem közvetlenül az ültetvényen található egyedekről szedtük le a különböző növényi szerveket, hanem az ültetvényről származó vesszők hajtatása után gyűjtöttük be a növényanyagot. Az alany fajtagyűjtemények egyedeit külön tesztelve is azt láttuk, hogy a különböző fajták számos egyede fertőzött volt a vírussal (14. ábra).



**14. ábra A GRSPaV kimutatása RT-PCR módszerrel a pécsi (11\_P) és tokaji (15\_TC) fajtagyűjtemények egyedeiből.**

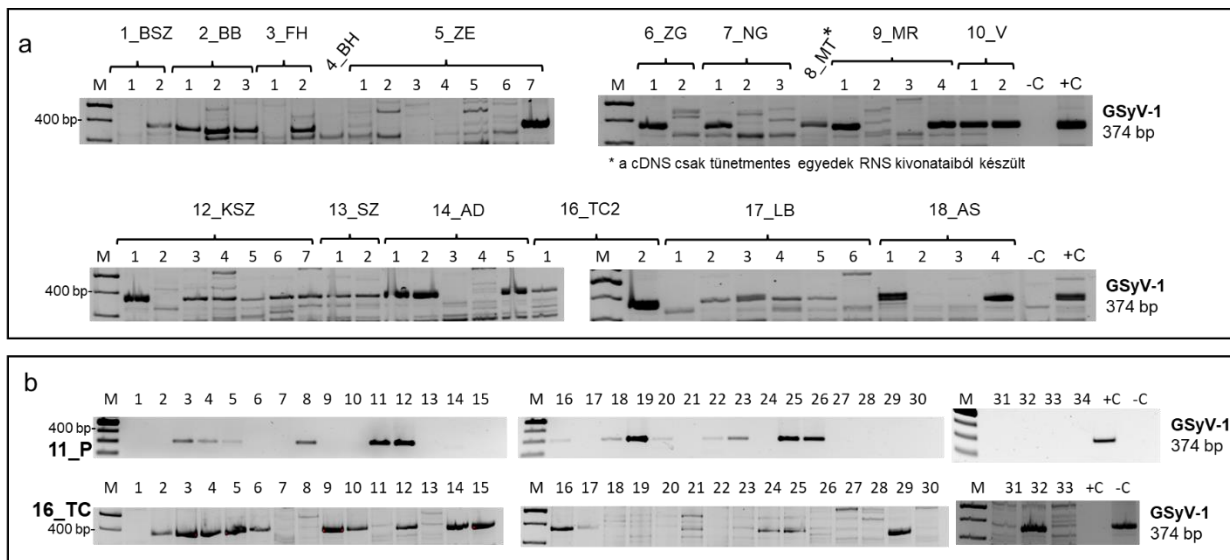
A PCR teszthez az M4 melléklet primer párai közül a következőt használtuk sorszám szerint: 14. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A -C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

A GRSPaV kimutatása során a kis RNS HTS és az RT-PCR módszer eredményei nem minden esetben egyeztek meg. Míg a THS alapú elemzés a vírus jelenlétét 13 könyvtárban jelezte, addig RT-PCR-rel a legtöbb vizsgált mintában sikerült a GRSPaV jelenlétét igazolni. Hasonló jelenséget korábbi hazai vizsgálatok során is leírtak, ahol a GRSPaV jelenlétét RT-PCR-rel igazolták, miközben a virális eredetű kis RNS-ek mennyisége nem minden esetben érte el a kimutatási küszöböt (Czotter et al., 2018a). A GRSPaV nagy genetikai variabilitása ismert, és alanyfajták esetében korábban azt figyelték meg, hogy az egyes alanyokban gyakran egyetlen, homogén vírusvariáns dominál, míg az oltványokban több együttes jelenléte jellemző (Meng et al., 2006). Vizsgálataink során a kis RNS könyvtárak eltérő genotípusú egyedekből származó RNS-keverékekből készültek, ami hozzájárulhatott ahhoz, hogy az egyes GRSPaV variánsokhoz tartozó kis RNS-ek koncentrációja a kimutatási küszöb alá csökkent. Emellett nem zárható ki az sem, hogy a szőlő és a GRSPaV hosszú együttélésük során kialakult kölcsönhatása az antivirális géncsendesítés csökkent aktivitásához vezetett, ami szintén befolyásolhatta a virális kis RNS-ek detektálhatóságát (Gambino et al., 2012). A vírus előfordulása mind az alanyültvényekben, mind az alany fajtagyűjteményekben több alanyfajta érintett.

#### 5.1.2.3.2. A GSyV-1 vizsgálata

Annak ellenére, hogy a kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése során nem találtunk egyetlen GSyV-1 specifikus kontigot sem, négy könyvtár esetében a GSyV-1 genom minimum 70%-os lefedettségét azonosítottuk (10\_V, 14\_AD és a két fajtagyűjteményben), amelyek jelezték a vírus lehetséges előfordulását (M5 melléklet). Azt már korábban megfigyelték, hogy az amerikai variánsoktól eltérően az európai GSyV-1 variánsok jobban eltérnek a Kaliforniában azonosított referencia genomtól (Glasa et al., 2015). Ezért a könyvtárakban található kontigokkal újabb BLASTn keresést indítottunk, de ezúttal az európai SK30 GSyV-1 variánst használtuk referencia genomként.

Így összesen 6 könyvtárban találtunk GSyV-1 specifikus kontigokat (5\_ZE, 6\_ZG, 12\_KSZ, 14\_AD, 17\_LB és 18\_AS) (M5 melléklet). Az RT-PCR teszt ebből a 6 könyvtárból 5-re volt GSyV-1 pozitív és ezen kívül még 9 könyvtár esetében kaptunk pozitív eredményt (13. ábra), ami a GSyV-1 nagyarányú elterjedésére utal az alanyültetvényekben. Ezután az ültetvényeken előforduló alanyfajtákat külön is teszteltük RT-PCR módszerrel (15. ábra). Ebből kiderült, hogy az ültetvények fertőzöttsége heterogén volt, mivel egyes fajtákból kimutattuk a GSyV-1-et, míg más fajtákból nem (15. ábra).

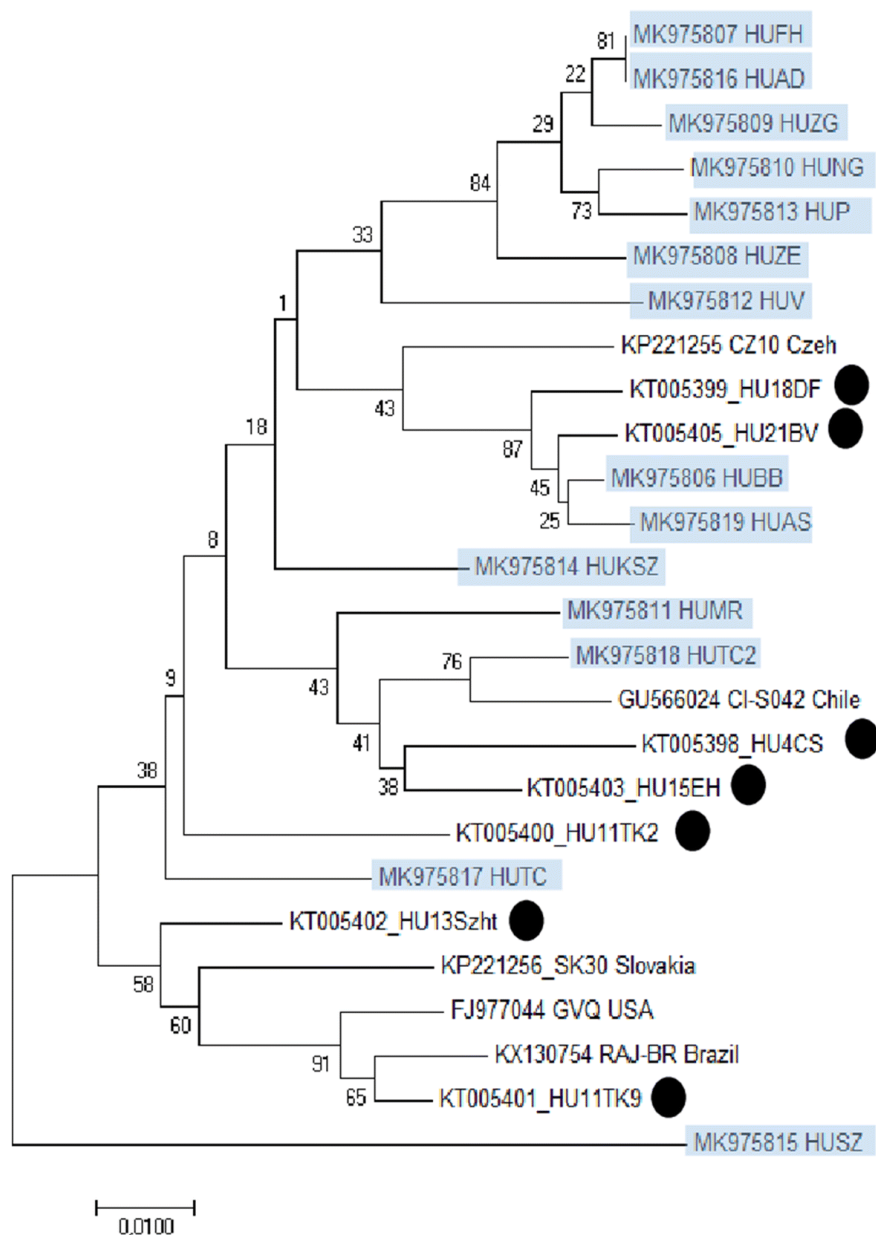


**15. ábra A GSyV-1 kimutatása RT-PCR módszerrel az ültetvények (a panel) és a fajtagyűjtemények (b panel) egyedeinek RNS-eiből.**

A PCR teszthez az M4 melléklet primer párai közül a következőt használtuk sorszám szerint: 12. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A –C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

Az egyedek szintjén végzett RT-PCR vizsgálatok alapján az 1\_BSZ, 8\_MT és 17\_LB ültetvényeken is azonosítottunk GSyV-1-fertőzött egyedet, így összesen két ültetvényben (4\_BH és 19\_TB) nem sikerült kimutatni a GSyV-1 jelenlétét (2. táblázat, 15. ábra).

A könyvtárakhoz használt RNS keverékekből származó tisztított GSyV-1 specifikus PCR termékek nukleotid sorrendjét Sanger szekvenálással meghatároztuk és feltöltöttük az NCBI adatbázisába, a GenBank-ba (MK975806-MK975819) és ezek rokonsági kapcsolatainak vizsgálatához filogenetikai elemzést végeztünk, ami azt mutatta, hogy ezek a vírusvariánsok távoli rokonságban állnak egymással. Ez megerősíti azt a megfigyelést, hogy a kis RNS HTS szekvenciák elemzése során az illesztéshez használt különböző GSyV-1 genomokkal teljesen eltérő eredményeket kaptunk (16. ábra).



**16. ábra Az alanyültetvényeken és fajtagyűjteményeken izolált és szekvenált GSYV-1 variánsok filogenetikai elemzése (MK975806 - MK975819).**

A magyar variánsok kék színnel vannak kiemelve. A fekete pontok a hazai szőlőültetvények felméréséből származó variánsokat mutatják (Czotter, et al., 2018a). A filogenetikai fa MEGA7 szoftver Neighbor-Joining módszerével készült.

A GSYV-1 esetében a kis RNS HTS bioinformatikai elemzése során kapott eredmények jelentős mértékben függték az illesztéshez használt referencia-genomtól. A GSYV-1 magas genetikai változatossága hozzájárulhatott ahhoz, hogy a kontigok BLAST-alapú azonosítása során eltérő eredményeket kaptunk attól függően, hogy mely GSYV-1 variáns teljes genomja szolgált referenciaként, és egy, a vizsgált mintákhoz közelebb álló variáns alkalmazásával lényegesen több egyezés volt kimutatható. A filogenetikai elemzések alapján a hazai GSYV-1 variánsok jelentős

genetikai diverzitást mutattak, ami korábbi vizsgálatok eredményeivel összhangban arra utal, hogy a fertőzés elsődlegesen fertőzött szaporítóanyag közvetítésével terjedhetett, nem pedig helyszíni fertőzés útján (Czotter et al., 2018a; Glasa et al., 2015).

Megvizsgáltuk, hogy a fertőzés összefüggésbe hozható-e bizonyos alany fajtákkal és azt találtuk, hogy az 5C egyedek 81,8%-a míg az 5BB egyedek 77,8%-a volt fertőzött, ezzel szemben a Fercal, amelyik a legelterjedtebb és széles körben használt alany fajta, csupán 26,7%-ban tartalmazta a GSYV-1-et (3. táblázat).

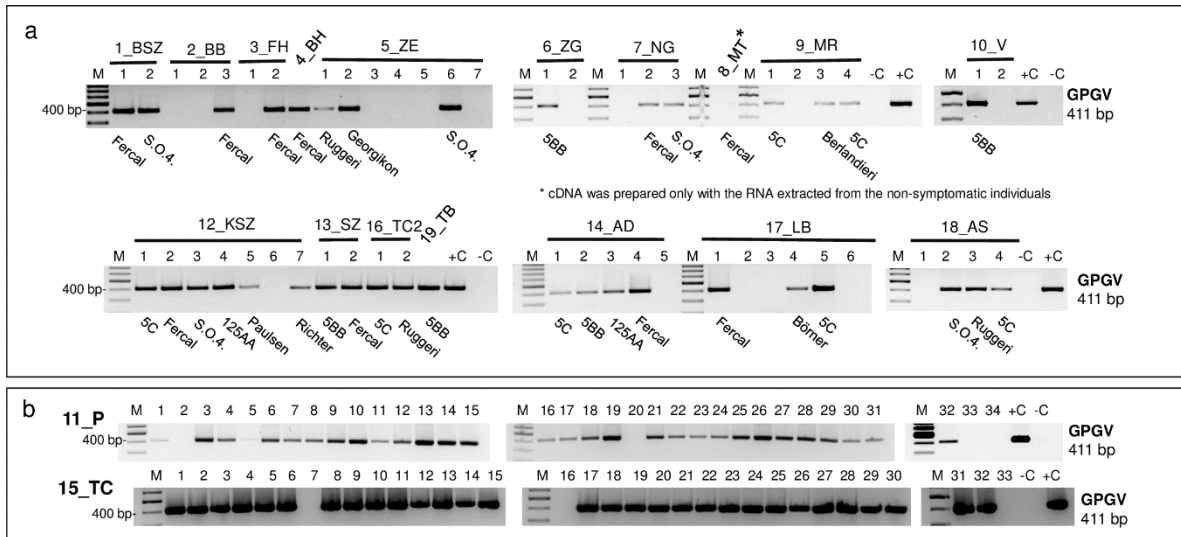
### 3. Táblázat A GSYV-1 előfordulása különböző alanyfajtákban.

Ültetvény/ könyvtár kódja	Fercal	5C	5BB	S.O.4	Ruggeri	125AA	Georgikon	Richter	Börner	Berlandieri	Paulsen
1_BSZ	+			+							
2_BB	+	+				+					
3_FH	+	-									
4_BH	-										
5_ZE	-	+		-	-	-	-				
6_ZG	-		+								
7_NG	-		+	-							
8_MT	+										
9_MR		+					-			-	
10_V		+	+								
11_P	-	6/4	8/3	+	-			-	-		
12_KSZ	-	+		+	+	+		+			-
13_SZ	+		+								
14_AD	-	+	+			-					
15_TC	-				-			-			
16_TC2		-			+						
17_LB	-	+	+	+			-		+		
18_AS		+		-	-						
19_TB			-								
Fajta előfordulás	14	11	9	7	6	4	3	3	2	1	1
GSyV-1 fertőzés aránya (%)	29	82	78	57	33	50	0	33	50	0	0

A sárga + jel a GSYV-1 fertőzöttséget jelöli, a szürke – jel pedig a GSYV-1 mentes alanyfajtákat. A narancssárga cellában található számok az adott fajtagyűjteményen belül az összes adott alany fajta számát és abból a fertőzött egyedek számát adja meg.

### 5.1.2.3.3. A GPGV vizsgálata

A könyvtárak elemzése során minden könyvtárban találtunk GPGV specifikus kontigot, amit az RT-PCR tesztelés minden esetben megerősített (M5 melléklet, 13. ábra). Ez az eredmény összhangban van korábbi felmérésünkkel, ahol a hazánkban vizsgált szőlőültetvények mindegyikében kimutattuk a GPGV jelenlétét (Czotter, et al., 2018a). Habár a GPGV minden ültetvényben jelen volt, a GSyV-1-hez hasonlóan nem minden alanyfajta volt fertőzött (17. ábra).



**17. ábra A GPGV kimutatása RT-PCR módszerrel az ültetvények („a” panel) és a fajtagyűjtemények („b” panel) egyedeinek RNS-eiből.**

A PCR teszthez az M4 melléklet primer párai közül a következőt használtuk sorszám szerint: 16. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A –C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

Ebben az esetben is kíváncsiak voltunk, hogy az alanyfajtákat vizsgálva milyen arányban fertőzöttek a GPGV-vel (4. táblázat).

#### 4. táblázat A GPGV előfordulása különböző alanyfajtákban

Ültetvény/könyvtár kódja	Fercal	5C	5BB	S.O.4	Ruggeri	125AA	Georgikon	Richter	Börner	Berlandieri	Paulsen
1_BSZ	CAA			CAA							
2_BB	CAA	-				-					
3_FH	CAA	-									
4_BH	CAA										
5_ZE	-	-	-	CAA	CAA	-	CAA				
6_ZG	-		CAA								
7_NG	CAA		-	CAA							
8_MI	CAA										
9_MR		CAA					-			CAA	
10_V		-	CAA								
11_P	CAA	-	-	-	-			-	-		
12_KSZ	CAA	CAA		CAA	-	CAA		CAA			TAA
13_SZ	CAA		CAA								
14_AD	TAA	CAA	CAA			CAA					
15_TC	-				-			-			
16_TC2		CAA			CAA						
17_LB	TAA	TAA	-	-			-		CAA		
18_AS		CAA		TAA	TAA						
19_TB			CAA								
Fajta előfordulása	14	11	9	7	6	4	3	3	2	1	1
GPGV fertőzés aránya (%)	79	55	56	71	50	50	33	33	50	100	100

A zöld cellák a GPGV fertőzöttséget jelölik, a szürke „-” jel pedig a GPGV mentes alanyfajtákat. A zöld cellában jelölt hármas nukleotidok a tünetet okozó és a tünetet nem okozó GPGV variánsok közötti egyik fontos nukleotid cserét jelölik, ahol jellemzően a CAA kodon a tünetet nem okozó, a TAA kodon a tünetet okozó variánsokban fordul elő. A C-T tranzíció egy korai stop kodont hoz létre a mozgási fehérjét kódoló régióban.

Összesítve a Fercal egyedek 79%-a, az 5C egyedek 54%-a, az 5BB egyedek 56%-a, az S.O.4 egyedek 71%-a, valamint a Ruggeri és 125AA egyedek 50%-a volt fertőzött GPGV-vel.

A GPGV fertőzés a GSYV-1-hez hasonlóan igen elterjedt Európában. A vírus tüneteket nem okozó, úgynevezett látens változatát Magyarország mellett a környező országokban is megtalálták (Szlovákia, Csehország) (Czotter, et al., 2018a; Eichmeier et al., 2018; Glasa et al., 2014). Habár még mindig nem teljesen tisztázott, hogy mely szekvencia változások okozzák a tünetek megjelenését és a szőlő megbetegedését GPGV fertőzés esetében, azt azonban megfigyelték, hogy azok a tüneteket

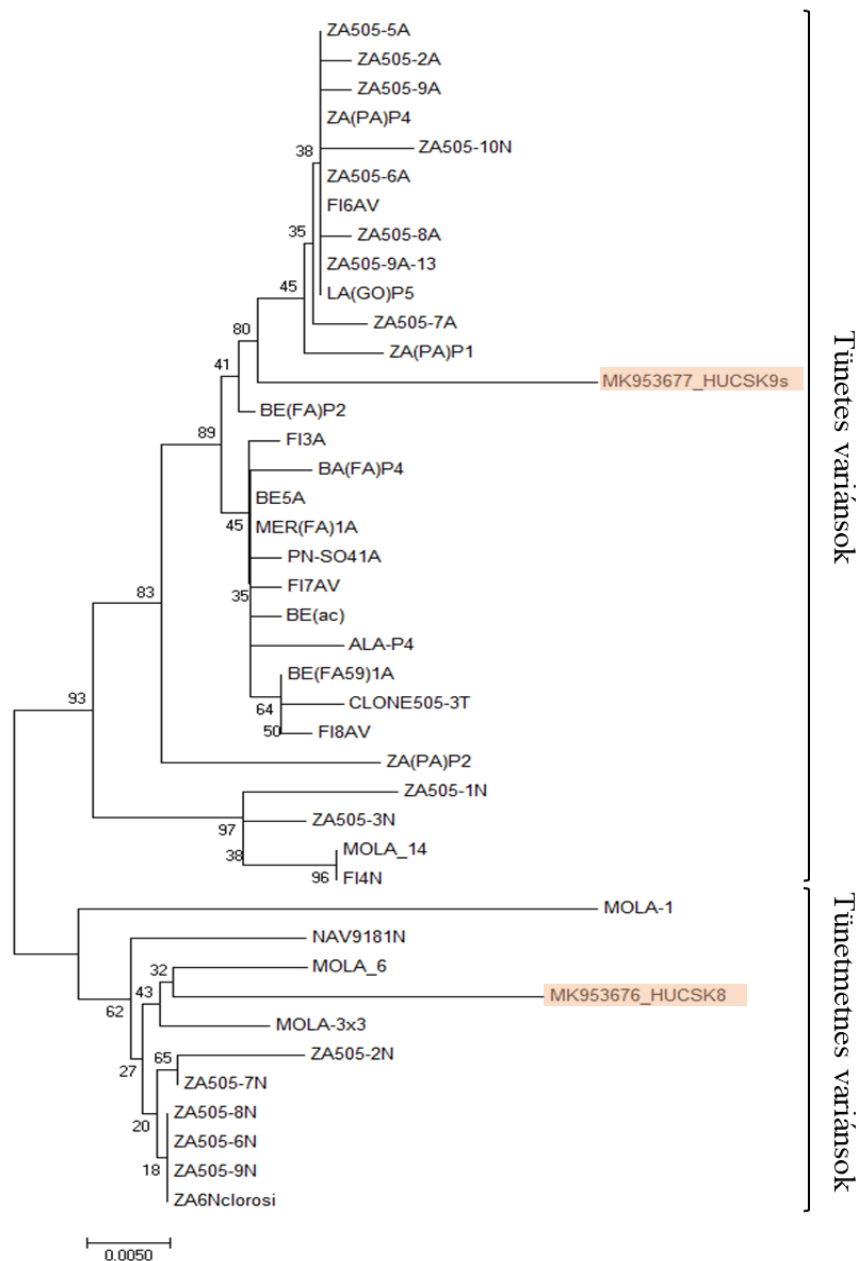
okozó variánsok, amelyek együtt csoportosulnak a filogenetikai vizsgálatokban, hat aminosavval rövidebb mozgási fehérjét kódolnak, mint a látens variánsok (Saldarelli et al., 2015).

Korábbi felméréseink során nem találtunk tünetet okozó változatot, azonban egy csókakői szőlőültetvényben egy 'Pinot gris' fajtájú szőlőtőke a szőlőlevél foltosodás és deformációs betegség tüneteit mutatta (18. ábra) Mivel ez volt az első ilyen tüneteket produkáló növény a mintagyűjtéseink során, a GPGV specifikus PCR terméket szekvenáltattuk. A szomszédos, tünetmentes növényről is mintát vettünk, majd ennek a teszteléséből származó GPGV specifikus PCR terméket is szekvenáltattuk összehasonlítás céljából. Mind a kettő szekvenciát elhelyeztük a GenBank-ban (tünetet okozó variáns: HuCSK9s: MK953676, tünetet nem okozó variáns: HUSK8: MK953677).



**18. ábra A csókakői GLMD tüneteket mutató növény, amely a GPGV tünetet okozó variánsával fertőződött**

A HuCSK9s elnevezésű tünetet okozó variáns nukleotid szekvenciája tartalmazta a korai stop kodont (CAA helyett TAA) a mozgási fehérjét kódoló régióban és a publikált tünetet okozó variánsokkal együtt csoportosult a filogenetikai elemzésünkben, míg a tünetet nem okozó HUSK8as variáns a tünetet nem okozó variánsokhoz kapcsolódott (19. ábra).

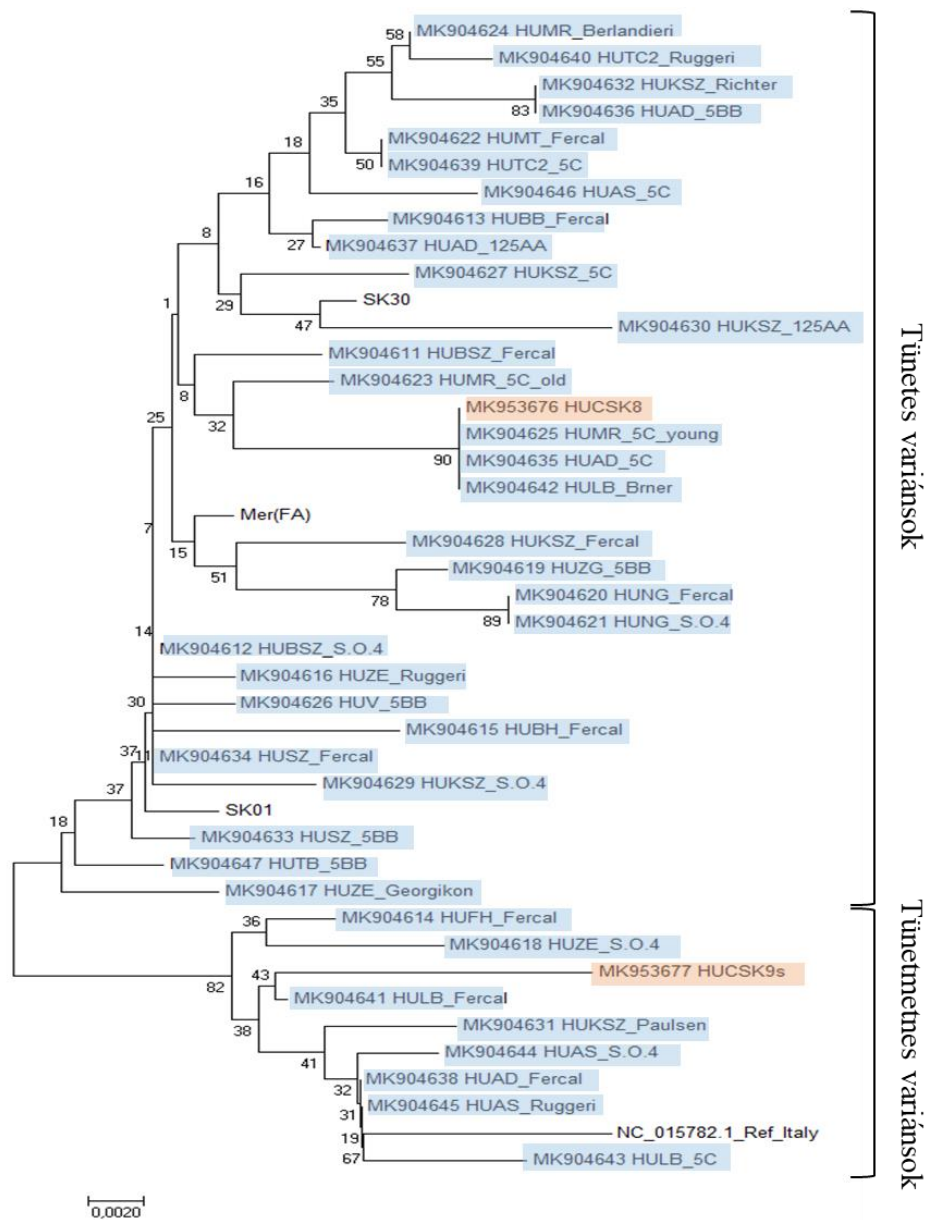


**19. ábra A csókakői *Pinot gris* szőlőültetvényeken jelenlévő GPGV tünetet okozó változatának (HUCSK9s – MK953676) és tünetet nem okozó változatának (HUCSK8as – MK953677) filogenetikai elemzése más tünetet nem okozó és tünetet okozó GPGV variánsokkal együtt**

A filogenetikai fa a MEGA7 szoftver Neighbor-Joining módszerével készült. A színes kiemelés jelöli a két csókakői variánst. A GPGV-variánsok GenBank azonosító számai elérhetőek Saldarelli és munkatársai 2015-ös cikkében (Saldarelli et al., 2015).

A különböző alanyfajtából és ültetvényekből származó GPGV variánsokat szekvenáltattuk, a szekvenciákat feltöltöttük a GenBank adatbázisba (MK904611-MK904647). A nukleotid sorrendjüket vizsgálva azt találtunk, hogy 6 minta tartalmazta a tünetet okozó variánsokra jellemző

korai stop kodont (TAA) (4. táblázat). A filogenetikai elemzésben ezek az vírus variánsok nemcsak egymással alkottak egy csoportot, hanem a csókakői és olaszországi tünetet okozó variánsokkal is (20. ábra).



**20. ábra A vizsgált alany ültetvények és fajtagyűjtemények különböző alanyfajtáiból (MK904611 - MK904647) származó GPGV variánsok és a csókakői tünetet okozó és tünetet nem okozó variánsok szekvenciájának filogenetikai elemzése**

A filogenetikai fa a MEGA7 szoftver Neighbor-Joining módszerével készült. A narancssárga jelölés a csókakői variánsokat, a kék jelölések az alanyfajtákból izolált és szekvenált variánsokat mutatják.

Az korai stop kodont tartalmazó variáns 5 alanyfajtában fordult elő (Fercal, 5C, S.O.5, Ruggeri és Paulsen). Földrajzi elhelyezkedésüket tekintve ezek a tünetet okozó variánsok az országban szétszórva

voltak jelen (12\_KSZ, 14\_AD, 17\_LB és 18\_AS), bár az utolsó három ültetvény helyszíne közel található egymáshoz (Észak-Kelet Magyarország).

A tünetet okozó GPGV variáns hatására kialakuló szőlőlevél foltosodás és deformáció elnevezésű (GLMD – grapevine leaf mottling and deformation) betegségre a szőlőfajták érzékenysége eltérő (Saldarelli et al., 2015). A GPGV betegséget okozó variánsára érzékenyek a *Pinot gris*, *Traminer*, *Tocai* (Friulano) és a *Glera* fajták. A *Glera* esetében a fertőzés hatására bekövetkező egyenetlen bogyóérés gazdasági veszteségeket okoz az észak-olaszországi Prosecco előállításban (Bertazzon et al., 2017). Ezen kívül Franciaországban is találtak két olyan szőlőfajtát, ami GLMD-t okozott: a *Pinot Meunier* és a *Grenache* fajtákat (Spilmont et al., 2018). A tünetet okozó GPGV variánst tünetmentes alany tőkéken találtuk. Az általunk vizsgált Paulsen, Fercal, 5C, S.O.4 és Ruggeri fajtákon viszont nem jelentkeztek a jellegzetes GLMD tünetek.

Végeredményben az találtuk, hogy a hatóságilag vizsgált vírusokkal ellentétben a nem vizsgálatköteles vírusok a legtöbb vizsgált alanyültetvényben jelen voltak és a fertőzöttség mértéke az egyes alanyfajták között eltéréseket mutatott.

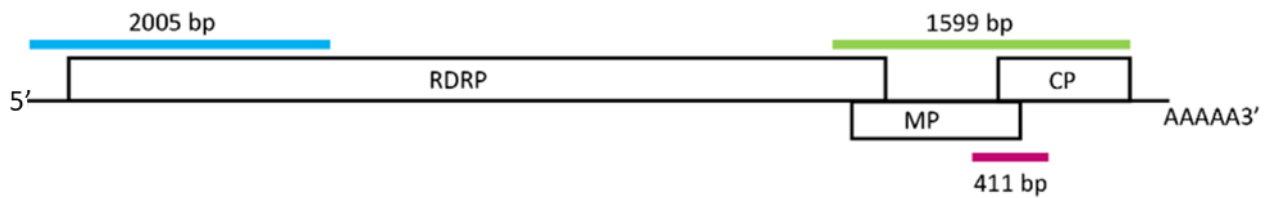
## 5.2. Szőlőültetvények és gyomnövények GPGV fertőzöttségének vizsgálata

A GPGV széles körű hazai elterjedtségére vonatkozó korábbi felmérések alapján (Czotter, et al., 2018a; Demian et al., 2020) jelen vizsgálatban annak feltárását tűztük ki célul, hogy a vírus tünetet nem okozó variánsaival fertőzött szőlőültetvények környezetében előforduló gyomnövények szerepet játszhatnak-e a GPGV fennmaradásában. Ennek érdekében több, eltérő művelési állapotú szőlőültetvényben és azok környezetében gyűjtött növények GPGV-fertőzöttségét vizsgáltuk. A továbbiakban 5 olyan szőlőültetvényt vizsgáltunk, melyeken a GPGV tünetet nem okozó variánsa volt jelen. A mintavételi helyeket, az ültetvények állapotát és a vizsgált növényfajokat a 4.1.2. fejezetben, a 7–9. ábrák szemléltetik.

### 5.2.1. A GPGV kimutatása RT-PCR módszerrel

A GPGV jelenlétét a mintákban RT-PCR teszt során vizsgáltuk. Első teszteléskor egy 411 bp hosszú régiót amplifikáló diagnosztikai primer párt (Glasa et al., 2014) használtunk a vírus kimutatására. A pozitív mintákból ezután a vírus két nagyobb szakaszát amplifikáltuk. A vírusgenom 5' UTR régióját és az RdRP kezdeti szakaszát lefedő 2005 nt hosszúságú szakaszt, valamint egy 1599 nt hosszú, a mozgási fehérjét és köpenyfehérjét kódoló régiót sokszorosítottunk (21. ábra, M4 melléklet). A PCR

termékeket tisztítás után klónoztuk, majd meghatároztuk a nukleotid sorrendjüket, majd a szekvenciákat feltöltöttük az NCBI GenBank adatbázisába (ON360679-ON360699).

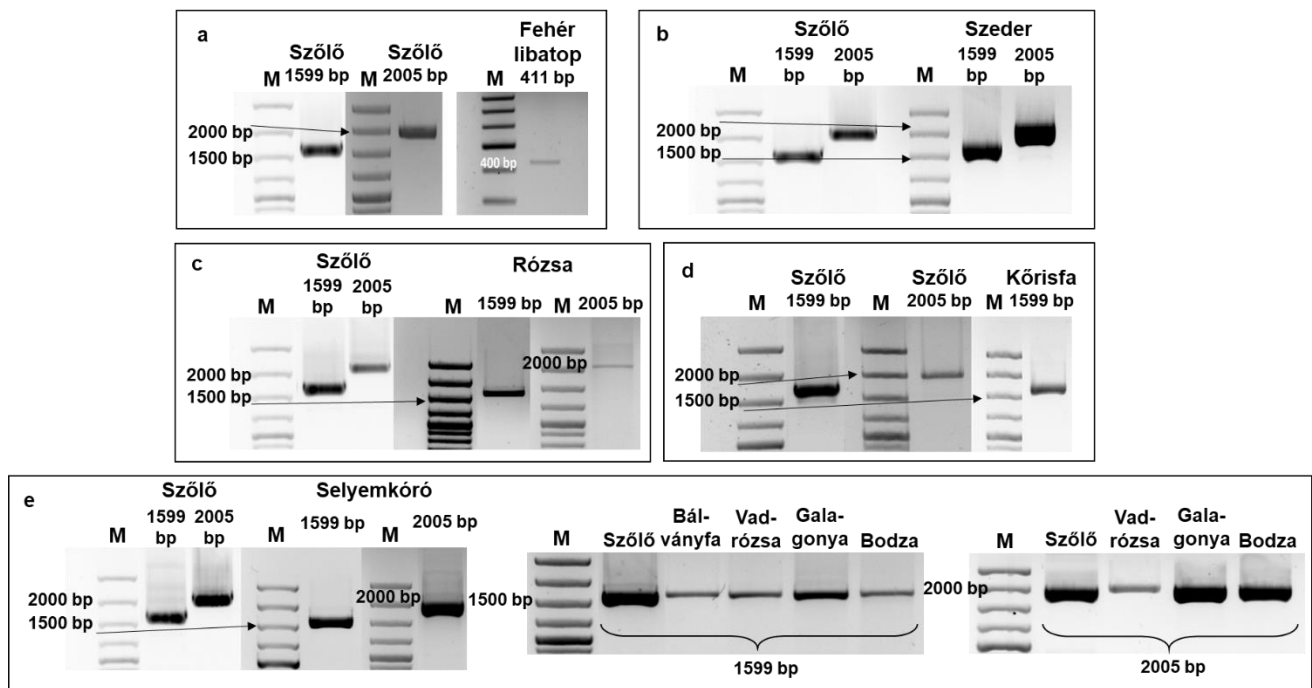


**21. ábra A GPGV klónozott régióinak sematikus ábrázolása a vírus genomon**

A színes szakaszok az amplifikált régiók genomon belüli elhelyezkedését és hosszát jelölik. A három szakasz felszaporítására az M4 mellékletben található primerpárok közül a következőket használtuk, sorszám szerint: kék-18, zöld-19, lila-16.

A GPGV-t minden vizsgált szőlőültetvényen kimutattuk, a szőlő mellett hét másik növényből is: *Ailanthus*, *Asclepias*, *Crataegus*, *Fraxinus*, *Rosa*, *Rubus* és *Sambucus* fajokból. A vírus ezeken a növényeken nem mutatott tipikus GPGV-hez köthető tüneteket (GLMD), mint levél torzulás, ér melletti klorózis, rövid internódiumok.

Annak ellenére, hogy a mintázott növényekben a diagnosztikai primerrel kimutattuk a GPGV-t, nem minden gazdanövényből sikerült amplifikálni a kijelölt szekvencia részeket. A libatop esetében a vírus kimutatására használt, 411 bp hosszú PCR terméket eredményező primer párral pozitív eredményt kaptunk, de a fent említett másik két primer párral ez nem sikerült. Ezt valószínűleg a növényben lévő alacsony vírus koncentráció okozta. Annak érdekében, hogy az esetlegesen alacsony koncentrációban jelenlevő vírust nagyobb valószínűséggel tudjuk kimutatni, a jászszentlászlói ültetvényről származó szőlő és kőrisfa mintáknál a cDNS szintézis során nem random hexamert, hanem oligo(dT) primert használtunk. Azonban ezzel a változtatással is csak a MP/CP régiót tudtuk amplifikálni. Más fás szárú fajok esetében is adódtak nehézségek, itt ugyancsak a vírusgenom 5' részén nem kaptunk PCR terméket, bár ezeknél a mintáknál az MP/CP régió egy szakaszát sikerült random hexamerrel átírt cDNS templát használatával is amplifikálni (22. ábra).



**22. ábra Sanger szekvenáláshoz amplifikált GPGV genom részletek szőlőből és egyéb növényekből**

Az „a” panel a szekszárdi, a „b” panel a tokaji, „c” panel az egri, a „d” panel a jászszentlászlói, az „e” panel a mogyoródi minták PCR eredményének agaróz gélelektroforézis képét mutatja. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A –C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

A géleképeken látható eredmények alapján az egyes vizsgált régiókban tapasztalt amplifikációs különbségeket összefoglalva, az 5. táblázat szemlélteti.

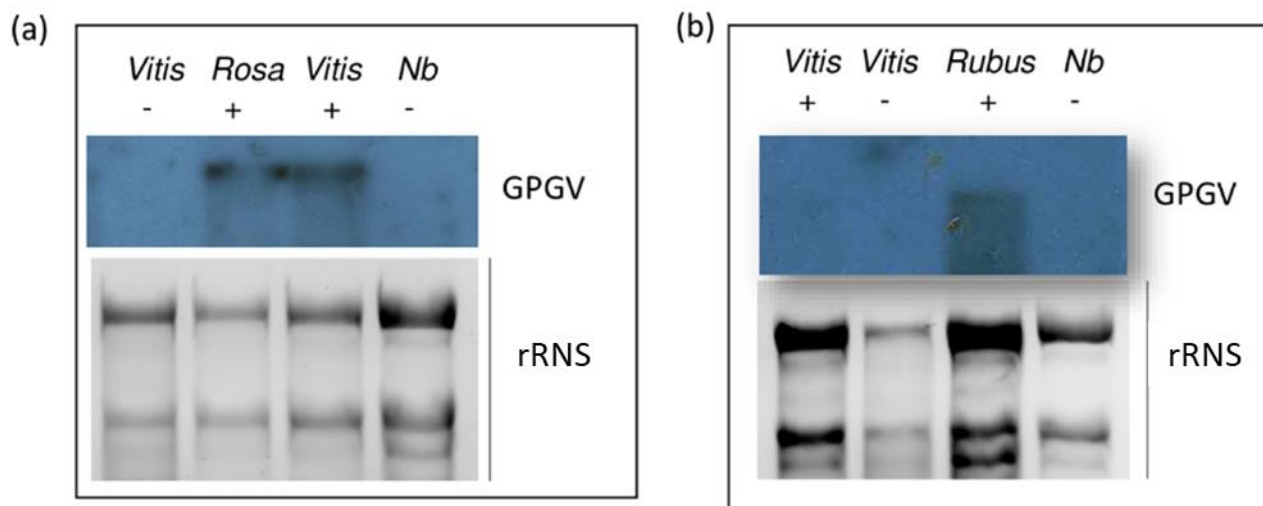
5. táblázat A szekvenált GPGV variánsok 5' végének hasonlósága a referencia genomhoz

Növény minta	Ültetvény helye	RT-PCR	
		RdRp	MP/CP
szőlő	Mogyoród	+	+
bodza		+	+
bálványfa		-	+
galagonya		+	+
rózsa		+	+
selyemkóró		+	+
szőlő	Eger	+	+
vadrózsa		+	+
szőlő	Tokaj	+	+
szeder		+	+
szőlő	Jászszentlászló	+	+
kőris		-	+
szőlő	Szekszárd	+	+
fehér libatop		-	+

A mintagyűjtési helyeket egyedi színekkel jelöltük, amelyeket a dolgozat további ábráiban és táblázataiban is következetesen alkalmazunk az áttekinthetőség érdekében.

5.2.2. A GPGV kimutatása Northern hibridizációval

Northern blot hibridizációval is megvizsgáltuk a növénymintáinkat, azonban ezzel a módszerrel csak két minta esetében sikerült kimutatni a GPGV jelenlétét: az egeri ültetvényről származó vadrózsából és a tokaji szeder mintából (23. ábra). Nagy valószínűséggel csak ebben a két növényben volt a virális RNS olyan mennyiségben jelen, ami a módszer érzékenységéhez elegendő.



23. ábra Az egeri vadrózsa (a) és a tokaji szeder (b) minta Northern blot vizsgálata GPGV jelenlétére. Negatív kontrollnak igazoltan GPGV mentes szőlőt (Vitis-) és GPGV mentes *Nicotiana benthamiana*-t (Nb-) használtunk.

### 5.2.3. A GPGV szekvenciák elemzése és filogenetikai összehasonlítása

A szekvenciákat nukleotid és aminosav szinten is elemeztük. A szőlőből származó szekvenciákat a referencia genommal (NC\_015782.2) vetettük össze, a más növényfajból származó szekvenciákhoz pedig a GenBank-ban található fehér mécsvirágból izolált GPGV genomot (KU312039) használtuk (6. és 7. táblázat).

**6. táblázat A GPGV variánsok 5' végi szekvenciáinak a referencia genomokkal való hasonlósága**

hasonlóság a referenciához							
hasonlóság az NC_015782.2_Vitis szekvenciához				hasonlóság a KU312039_Silene szekvenciához			
Törzs	GB azonosító	nt egyezés (%)	as egyezés (%)	Törzs	GB azonosító	nt egyezés (%)	as egyezés (%)
Sz_Vitis	ON360679	97.16	97.66				
M_Vitis	ON360680	97.21	97.34	M_Asyriaca	ON360681	97.36	98.28
E_Vitis	ON360682	97.91	98.28	E_Rosa	ON360683	97.91	97.66
T_Vitis	ON360684	97.16	97.19	T_Rubus	ON360685	96.86	98.44

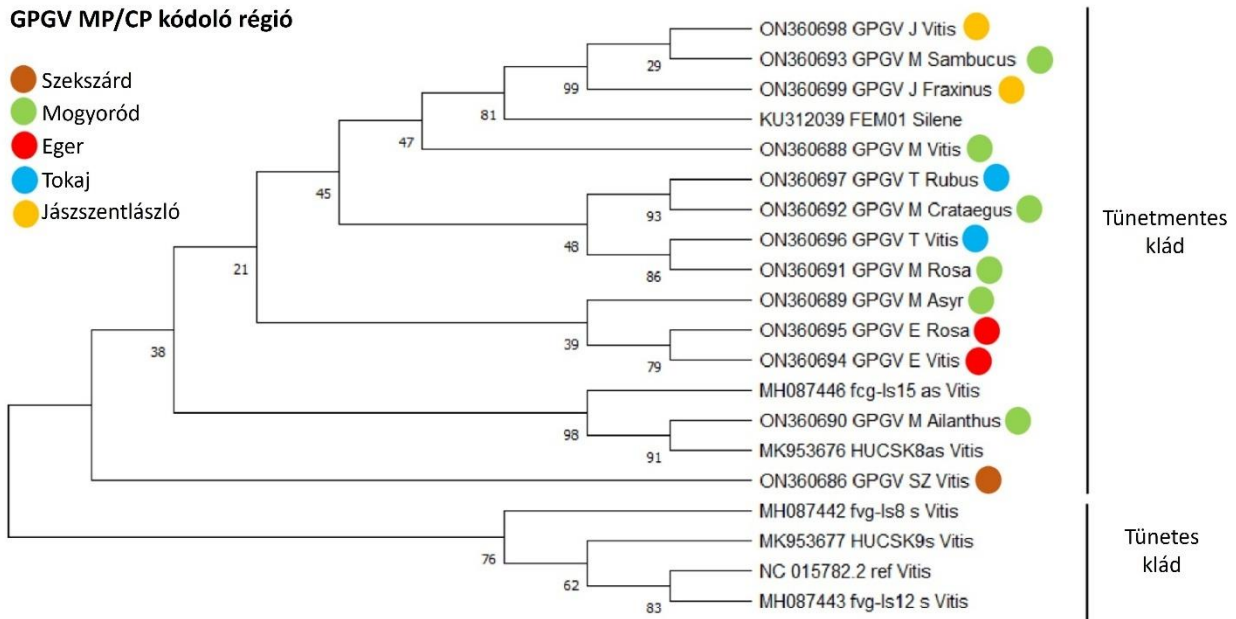
A szőlőből származó szekvenciákat a szőlő eredetű referencia genomhoz hasonlítottuk, míg a gyomnövényekből származó szekvenciákat a *Silene latifolia* növényből származó teljes GPGV genomhoz hasonlítottuk.

**7. táblázat A GPGV variánsok MP/CP régiót lefedő szekvenciáinak a referencia genomokkal való hasonlósága**

hasonlóság az NC_015782.2_Vitis szekvenciához				
Törzs	GB azonosító	nt egyezés (%)	MP as egyezés (%)	CP as egyezés (%)
Sz_Vitis	ON360686	96.94	96.21	99.49
M_Vitis	ON360688	96.62	95.39	98.46
E_Vitis	ON360694	97,06	95.66	100.00
T_Vitis	ON360696	97,12	96.21	99.49
J_Vitis	ON360698	96.75	95.66	99.49
hasonlóság a KU312039_Silene szekvenciához				
Törzs	GB azonosító	nt egyezés (%)	MP as egyezés (%)	CP as egyezés (%)
Sz_Calburn	ON360687	97.57		97.08
M_Asyriaca	ON360689	97.81	98.13	97.95
M_Ailanthus	ON360690	97.31	97.33	98.46
M_Rosa	ON360691	98.38	98.93	98.97
M_Crataegus	ON360692	97.94	98.67	98.46
M_Sambucus	ON360693	98.38	99.47	98.97
E_Rosa	ON360695	97.81	97.87	98.97
T_Rubus	ON360697	97.94	98.67	98.46
J_Fraxinus	ON360699	98.38	99.47	98.97

A szőlőből származó szekvenciákat a szőlő eredetű referencia genomhoz hasonlítottuk, míg a gyomnövényekből származó szekvenciákat a *Silene latifolia* növényből származó teljes GPGV genomhoz.

A GPGV szekvenciák és a referenciagenomok nukleotid és aminosav szintű összehasonlítása hasonló eredményeket adott. Minden vizsgált esetben legalább 95%-os hasonlóságot kaptunk (az RNS függő RNS polimerázt, a mozgási fehérjét vagy köpenyfehérjét vizsgálva) (6. és 7. táblázat). A GPGV variánsok evolúciós kapcsolatainak feltárásához filogenetikai rokonsági vizsgálatokat végeztünk (24. és 25. ábra). Az MP/CP kódoló régió elemzéséből kitűnik, hogy a legtöbb művelt szőlőültetvény tekintetében (Eger, Tokaj, Jászszentlászló) a különböző gazdákból (szőlő és egyéb fajok) származó GPGV variánsok földrajzi eredetük szerint csoportosultak, ami helyszíni fertőzésre utalhat (24. ábra).

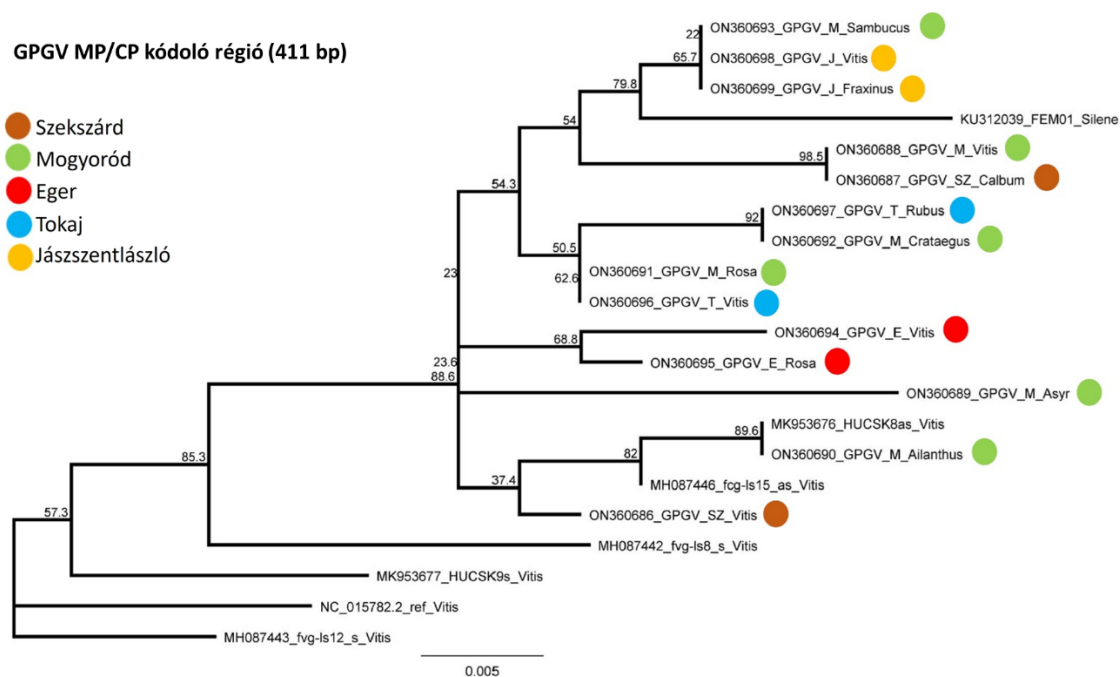


**24. ábra GPGV izolátumok MP/CP kódoló régiójának (5578-7178 nt) filogenetikai vizsgálata maximum likelihood módszerrel**

Az evolúciós történetet maximum likelihood módszerrel és Tamura–Nei modellel rekonstruáltuk. Az evolúciós analízist a MEGA11 programban végeztük. A színes körök a variánsok földrajzi eredetét jelölik. A HUCSK8as és HUCSK9s tünetet okozó és tünetet nem okozó GPGV variánsok Magyarországról származnak (Demian et al., 2020). A ref a szőlőből származó GPGV referencia genom; az FEM01 variánst *Silene latifolia* subsp. *alba* növényből azonosították (Gualandri et al., 2017). A tünetet okozó (s) és tünetet nem okozó (as) GPGV variánsokat (Fvg-is-8\_s, 12\_s és 15\_as) Tarquini és munkatársai írták le (Tarquini et al., 2019).

A legalább 10 éve elhagyatott mogyoródi szőlőültetvényben a GPGV variánsok a filogenetikai elemzés alapján jelentős genetikai változatosságot mutattak, és nem alkottak földrajzi eredetükhöz köthető, egységes csoportot (24. ábra). Ez azt sugallja, hogy ebben az esetben a fás szárú, évelő gazdáknál a vírus hosszabb ideje tartó evolúciós fejlődésen ment keresztül. Ennek eredményeképpen a vírusnak lehetősége volt többféle mutációt is beépíteni a genomjába. A Szekszárdon talált fehér libatopból csak a vírus 411 bp hosszú régióját tudtuk amplifikálni. Az ezt a szekvenciát is tartalmazó

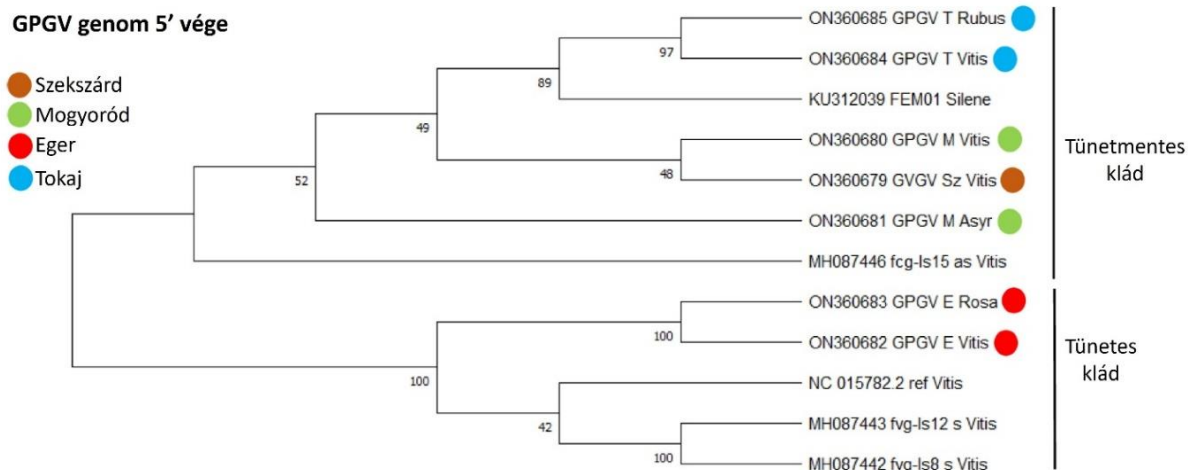
filogenetikai fa alapján a *C. album*-ból származó GPGV szekvencia nem csoportosult együtt az azonos földrajzi területről származó, szőlőből kimutatott GPGV variánsokkal (SZ\_Vitis) (25. ábra).



**25. ábra A GVPV-variánsok maximum likelihood filogenetikai fája**

Az evolúciós történetet maximum likelihood módszerrel és Tamura–Nei modellel rekonstruáltuk. Az evolúciós analízist a MEGA11 programban végeztük. A színes körök a variánsok földrajzi eredetét jelölik. A HUCSK8as és HUCSK9s tünetet okozó és tünetet nem okozó GPGV variánsok Magyarországról származnak (Demian et al., 2020). A ref a szőlőből származó GPGV referencia genom; az FEM01 variánst *Silene latifolia* subsp. *alba* növényből azonosították (Gualandri et al., 2017). A tünetet okozó (s) és tünetet nem okozó (as) GPGV variánsokat (Fvg-is-8\_s, 12\_s és 15\_as) Tarquini és munkatársai írták le (Tarquini et al., 2019).

A vírusgenom 5'UTR és RdRP kódoló része alapján is elvégeztük a filogenetikai elemzést (26. ábra).



**26. ábra A GPGV-genom 5' nukleotid régiójának evolúciós elemzése maximum likelihood módszerrel.**

Az evolúciós történetet a maximum likelihood (legnagyobb valószínűségű) módszer és a Tamura–Nei modell alkalmazásával rekonstruáltuk. Az evolúciós elemzéseket a MEGA11 szoftverrel végeztük. A színes körök a vizsgált variánsok földrajzi eredetét jelölik. A HUCSK8as és HUCSK9s minták Magyarországon leírt tünetet nem okozó, illetve tünetet okozó GPGV variánsok (Demian et al., 2020). A Ref jelölés a szőlőből származó GPGV referencia-genomot takarja; a FEM01 variánst *Silene latifolia* subsp. *alba* növényből azonosították (Gualandri et al., 2017) A tünetet okozó (s), illetve tünetet nem okozó (as) GPGV variánsokat (Fvg-is-8\_s, 12\_s és 15\_as) Tarquini és munkatársai írták le (Tarquini et al., 2019).

Ez alapján a tokaji és egri variánsok származási helyük szerint csoportosultak, ugyanazt a tendenciát mutatva, mint az MP/CP géneket kódoló régió vizsgálatának esetében. Azonban az Sz\_Vitis, M\_Asy, E\_Rosa és E\_Vitis elnevezésű GPGV variánsok másképpen csoportosultak, mint az MP/CP géneket kódoló szakasz elemzésekor, ami az evolúciójuk alatt egy lehetséges rekombinációs eseményre is utalhat. A legtöbb vizsgált variáns a tünetet nem okozó GPGV variánsokkal került egy csoportba, ami várható is volt, mivel a szőlőn a vírusfertőzés nem okozott specifikus tüneteket. Meglepő eredmény viszont, hogy az egri variánsok (a szőlőből és vadrózsából származó is) a tünetet okozó vírusvariánssal csoportosult az 5' végi szakasz elemzése során annak ellenére, hogy egyik növény esetében sem tapasztaltunk GLMD-hez hasonló tüneteket.

A tünetet okozó és tünetet nem okozó kládba tartozó variánsok genomjában specifikus SNP-k jelennek meg, amelyek jellemzően meghatározzák, hogy hogyan csoportosulnak ezek a variánsok a filogenetikai elemzések során. Ezeknek az SNP-knek a vizsgálata feltárta, hogy habár az E\_Rosa és az E\_Vitis variánsok (egri rózsából és szőlőből származó minták) a tünetet okozó GPGV variánsokkal csoportosultak az 5' végi szekvencia alapján készült filogenetikai fán, nem tartalmazták a korai stop kodont 6670 nt-nál, de a tünetet okozó variánsokra jellemző specifikus SNP-eket sem hordozták a mozgási fehérjét kódoló régióban (6400 nt-nál és 5693 nt-nál) (27. ábra).

	AGT(Ser)_as vs GGT(Gly)_s 6400	GTT(Val)_as vs GCT(Ala)_s 6593	CAA(Gln)_as vs TAA(STOP)_s 6670
Consensus	AAARGTACATCA	AGGAGTTGAGATCA	GAAGGC AACAAAGAT
Identity			
Tünetet okozó klád	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. ON360689_GPGV_M_Astyr</li> <li>2. ON360695_GPGV_E_Rosa</li> <li>3. ON360694_GPGV_E_Vitis</li> <li>4. MH087442_fvg-Is8_s_Vitis</li> <li>5. MK953677_HUCSK9s_Vitis</li> <li>6. MH087443_fvg-Is12_s_Vitis</li> <li>7. NC_015782.2_ref_Vitis</li> <li>8. GPGV_ALAP4_s_Vitis</li> <li>9. MH087446_fcg-Is15_as_Vitis</li> <li>10. ON360690_GPGV_M_Ailanthus</li> <li>11. MK953676_HUCSK8as_Vitis</li> </ul>		
Tünetet nem okozó klád	<ul style="list-style-type: none"> <li>12. ON360697_GPGV_T_Rubus</li> <li>13. ON360692_GPGV_M_Crataegus</li> <li>14. ON360696_GPGV_T_Vitis</li> <li>15. ON360691_GPGV_M_Rosa</li> <li>16. KU312039_FEM01_Silene</li> <li>17. ON360698_GPGV_J_Vitis</li> <li>18. ON360699_GPGV_J_Fraxinus</li> <li>19. ON360693_GPGV_M_Sambucus</li> <li>20. ON360688_GPGV_M_Vitis</li> <li>21. ON360686_GPGV_SZ_Vitis</li> <li>22. GPGV_MOLA6_as_Vitis</li> <li>23. ON360687_GPGV_SZ_Calburn</li> <li>24. GPGV_MOLA14_as_Vitis</li> </ul>		

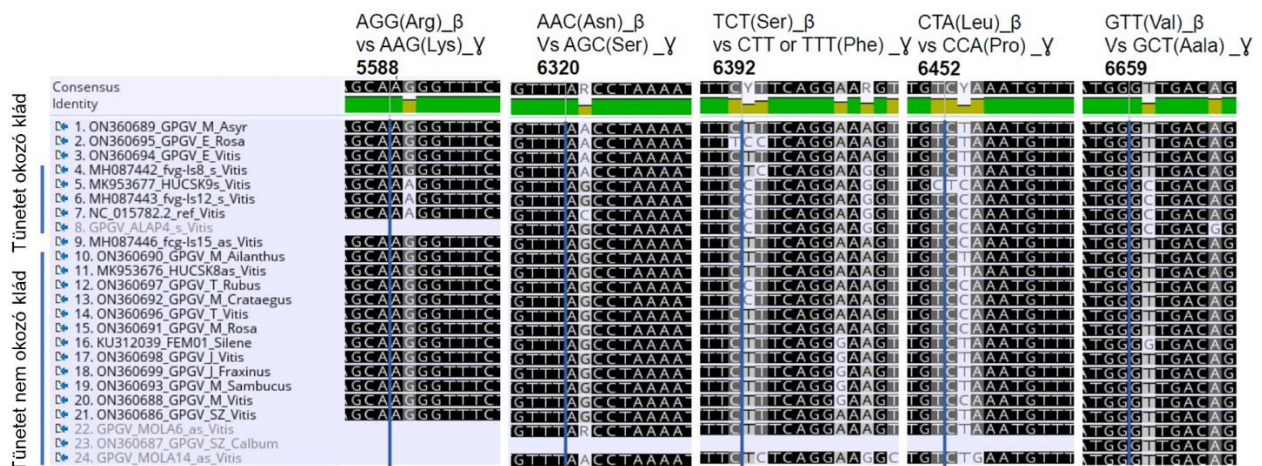
27. ábra Polimorfizmusok a tünetet nem okozó és tünetet okozó GPGV variánsok mozgási fehérjéj kódoló genomi régiójában

Érdeemes megjegyezni, hogy a 6593-as nukleotid pozícióban található, a tünetet okozó variánsokra jellemző polimorfizmus nincs jelen a HUCSK9s variánsban, ami viszont az egyetlen olyan Magyarországon azonosított tüneteket okozó GPGV variáns, melynek nukleotid szekvenciája a nemzetközi adatbázisban fellelhető (Demian et al., 2020). Az 1922-es nukleotid pozícióban levő jellegzetes SNP-t sajnos nem tudtuk ellenőrizni, mivel az egyik primer pont ezen a helyen illeszkedik a genomon (28. ábra).

	ATT(Ile)_as vs GTT(Val)_s 1360	GGA(Gly)_as vs GAA(Glu)_s 1922
Consensus	AAATGR TTGA	AACCTGRACA
Identity		
Tünetet okozó klád	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. ON360681_GPGV_M_Astyr</li> <li>2. MH087443_GPGVfvg-Is12_s_Vitis</li> <li>3. MH087442_GPGV_fvg-Is8_s_Vitis</li> <li>4. NC_015782.2_GPGVref_Vitis</li> <li>5. ON360683_GPGV_E_Rosa</li> <li>6. ON360682_GPGV_E_Vitis</li> <li>7. MH087446_GPGVfcg-Is15_as_Vitis</li> <li>8. ON360680_GPGV_M_Vitis</li> <li>9. ON360679_GPGV_Sz_Vitis</li> <li>10. KU312039_GPGVFEM01_Silene</li> <li>11. ON360685_GPGV_T_Rubus</li> <li>12. ON360684_GPGV_T_Vitis</li> </ul>	
Tünetet nem okozó klád		

28. ábra Polimorfizmusok a tünetet nem okozó és tünetet okozó GPGV variánsok replikázt kódoló genomi régiójában

Az 1360-as pozícióban, az RdRP-t kódoló régióban elhelyezkedő polimorfizmust megtaláltuk az E\_Rosa és az E\_Vitis esetében is. Tarquini és munkatársai további 5 SNP-t azonosítottak a mozgási fehérjét kódoló genom régióban (Tarquini et al., 2019), amelyek különbözőek a tüneteket okozó két klád, a  $\beta$  és  $\gamma$  között. Ezen polimorfizmusok vizsgálata kimutatta, hogy a mi két fent említett variánsunk genomján az 5588 és a 6659 pozíciókban a tüneteket nem okozó variánsokra jellemző nukleotidok találhatóak (29. ábra).



**29. ábra Polimorfizmusok a GPGV tünetet nem okozó és tünetet okozó variánsainak mozgásfehérjét kódoló genomi régiójában a  $\beta$  és  $\gamma$  kládokat elkülönítő pozícióban**

Az SNP6320 nukleotid pozícióban az E\_Rosa, az E\_Vitis és az M\_Asy variánsok a tünetet okozó  $\beta$ -kládra specifikus változatra jellemzően Asn-t kódolnak a  $\gamma$ -kládra jellemző Ser vagy a referenciára jellemző Thr helyett. SNP6452-nél a magyar variánsok többsége T-t tartalmaz, de a T\_Rubus, az M\_Crataegus, az M\_Vitis, az M\_Rosa, és a T\_Vitis variánsok esetében C található ebben a pozícióban, hasonlóan  $\gamma$ -klád variánsaihoz. Ezzel szemben a tünetet okozó HUCSK9s variáns egy másik SNP-t tartalmaz, ami a TCA kodon első nukleotidját (T) érinti, ami így Ser-t kódol. Az SNP6392 a kodon második nukleotidját érintette, és nagyfokú variabilitást mutatott: a  $\beta$ -kládra jellemző TCT kodon (szerin, Ser) mellett a TTT (fenilalanin, Phe), a CTT (leucin, Leu) és a CCT (prolin, Pro) kodonok is megjelentek, utóbbi az E\_Rosa variánsban is jelen volt.

### 5.3.A termő szőlőültetvényekből készített kis RNS HTS eredményeinek elemzése

A GVT olyan szőlővírus, amit az utóbbi években azonosítottak HTS eredmények elemzésével. Mivel korábbi kis RNS HTS alapú felméréseink értékelésekor a vírus még nem volt ismert, és mert Szlovákiában az újabb felmérések szerint elterjedt, kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon jelen van-e a

GVT hazánk szőlőültetvényein. A kérdés megválaszolására hazai termő szőlőültetvényekről (14 db) és alanyültetvényekről (17 db), valamint két alany fajtagyűjteményről készült adatainkat elemeztük újra, immár a GVT genom ismeretében (M3 melléklet).

#### 5.3.1. A kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése

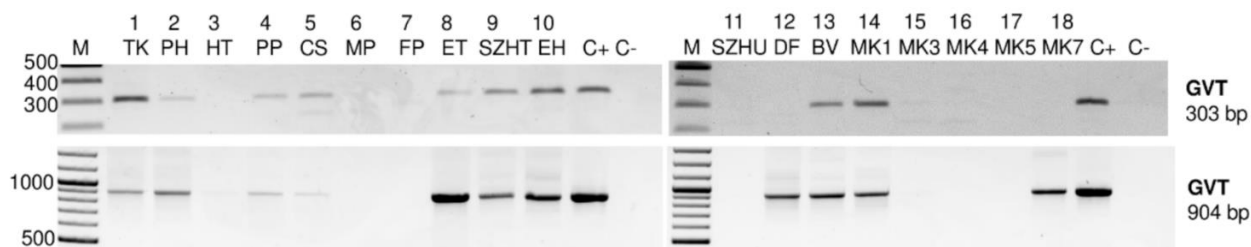
A szőlőültetvényekből készült 18 könyvtárból a bioinformatikai elemzés csupán háromban mutatta ki a GVT jelenlétét: 9\_SZHT (Furmint ültetvény), 13\_BV (5 ősi fajtát tartalmaz) és 18\_MK7 (Teleki Kober 5C alany egy szőlőültetvényből szedve) (M7 melléklet). Az alanyültetvényeket vizsgálva egyik esetben sem kaptunk GVT specifikus találatot (M8 melléklet). Mivel a GVT genom nagy variabilitású, ezért lehet, hogy a mintáinkban esetlegesen előforduló vírus specifikus kis RNS-ek annyira eltérnek a referenciagenomtól, hogy emiatt nem detektálhatók. Így létrehoztunk az eddig leírt, 27 db teljes hosszúságú GVT genom szekvenciából egy konszenzus szekvenciát. Ehhez illesztettük ezután a kontigokat, így két további kontig találatot kaptunk. Az egyik egy Furmint ültetvény volt (12\_DF) (M7 melléklet), a másik pedig az egyik alanyültetvény (14\_AD) (M8 melléklet). Az így illeszkedő kontigokat külön BLASTn-nel megvizsgálva azt találtuk, hogy a 14\_AD könyvtárból származó, GVT konszenzus szekvenciára illeszkedő kontig egy *Vitis vinifera* szekvenciával mutat 100%-os hasonlóságot. Az eredeti, első GVT genom összeállításakor lehetséges, hogy a gazdagenomból egy szekvenciadarab bekerült, így a mi általunk felilleszkedett kontig is a szőlő genomhoz tartozik, ami egy ál pozitív eredményhez vezetett. Mivel az eddigi munkánk során már tapasztaltuk, hogy nem csak a kontigok jelenléte utalhat egy vírusra egy mintában, ezért a GVT referenciagenomra és a létrehozott GVT konszenzus szekvenciára is direkt felillesztettük a könyvtárakban levő összes redundáns és nem redundáns kis RNS szekvenciát. Tapasztalatunk szerint, ebben az esetben akkor találtuk nagy valószínűséggel pozitívnak az eredményt, ha a normalizált redundáns read-ek száma nagyobb volt, mint 200 és/vagy a vírus genom lefedettsége kis RNS szekvenciákkal nagyobb volt, mint 60% és/vagy volt legalább egy vírusspecifikus kontig. Az így elvégzett elemzés után sem találtunk újabb GVT pozitív mintát.

#### 5.3.2. A GVT jelenlétének visszaigazolása RT-PCR módszerrel

Korábbi felméréseink azt mutatták, hogy a GVT közeli rokonának, a szintén foveavírusokhoz tartozó GRSPaV-nek a kimutatása kis RNS HTS-sel nehézségekbe ütközik (Czotter, et al., 2018a; Demian et al., 2020), azonban RT-PCR-rel kimutatható az adott mintából. Erre a megfigyelésre alapozva a GVT köpenyfehérjét kódoló régiójára specifikus primerek segítségével RT-PCR-t végeztünk, amelyek 303

bp és 904 bp hosszúságú terméket amplifikálnak. Az utóbbi primer párt módosítottuk a HTS szekvenciák alapján (Demian et al., 2021).

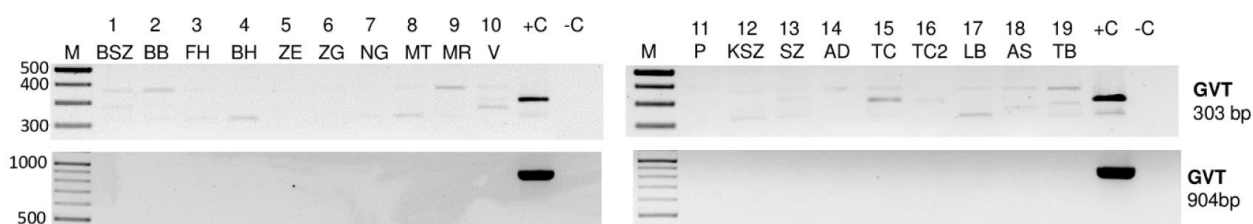
Az eddigi három ültetvényen felül (9\_SZHT, 13\_BV, és 18\_MK7) további kilenc könyvtár is pozitívnak mutatkozott (1\_TK, 2\_PH, 4\_PP, 5\_CS, 8\_ET, 10\_EH, 12\_DF, 14\_MK1 és 15\_TC). A két primer pár használatával kapott eredmények szinte minden esetben megegyeztek, kivéve a 12\_DF és 18\_MK7 könyvtárakat, ahol csak a hosszabb régiót amplifikáló primer párral kaptunk terméket (30. ábra).



**30. ábra Termő szőlőültetvények GVT fertőzöttségének tesztelése RT-PCR módszerrel**

A PCR teszthez az M4 melléklet primer párojai közül a következőt használtuk sorszám szerint: 20, 21. A minták sorszáma és az ültetvénykódok is feltüntetésre kerültek. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A –C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

Az alanyültetvényekről származó mintákból készített könyvtárak esetében a HTS nem mutatta a GVT jelenlétét, amit az RT-PCR is megerősített (31. ábra).

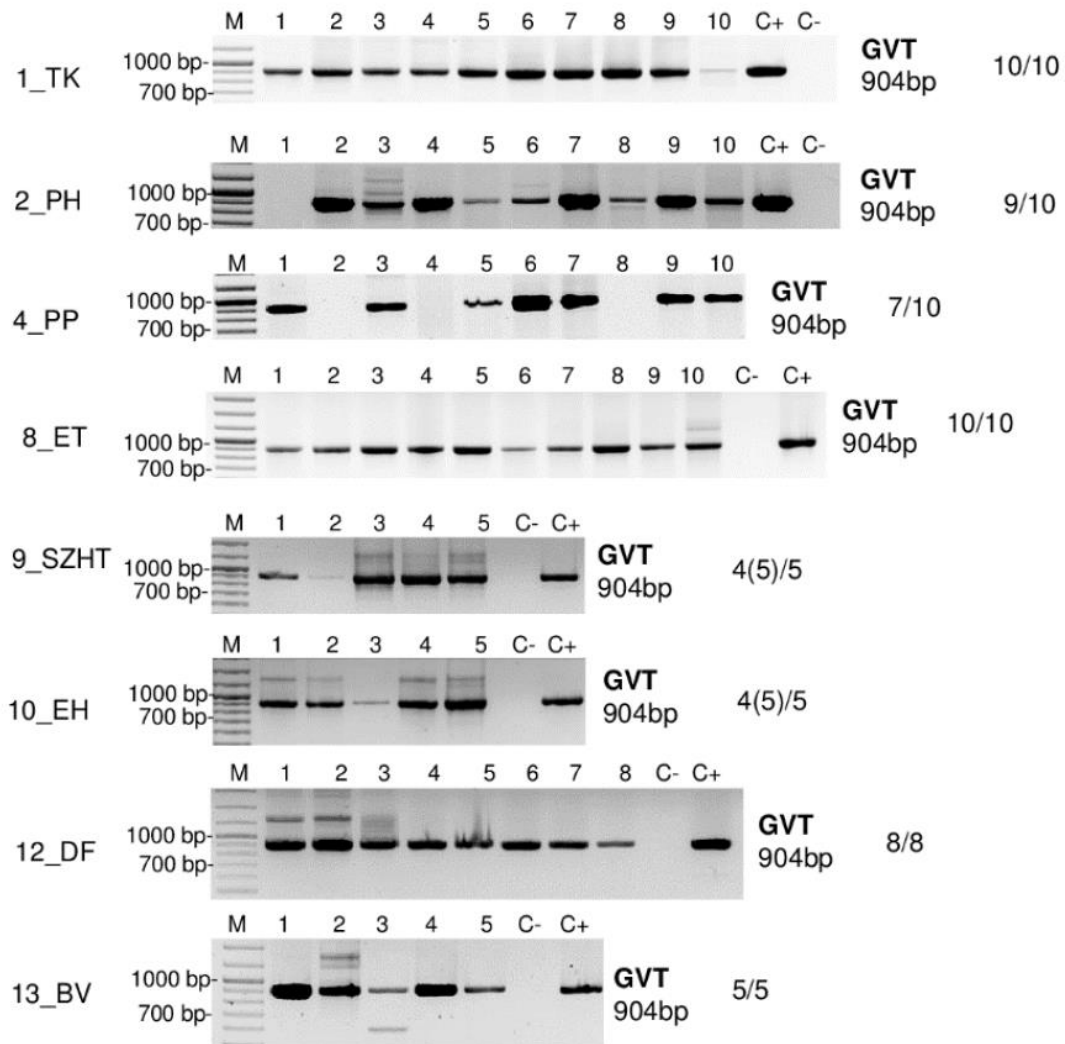


**31. ábra Alanyültetvények és alany fajtagyűjtemények GVT fertőzöttségének tesztelése RT-PCR módszerrel**

A PCR teszthez az M4 melléklet primer párojai közül a következőt használtuk sorszám szerint: 20, 21. A minták száma és az ültetvénykódok szerepelnek a jelölésben. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A –C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, mennyire elterjedt a GVT, a fertőzött területekről származó egyedeket külön-külön is leteszteltük a vírus jelenlétére (32. és 33. ábra). Ennek az eredménye azt mutatta, hogy

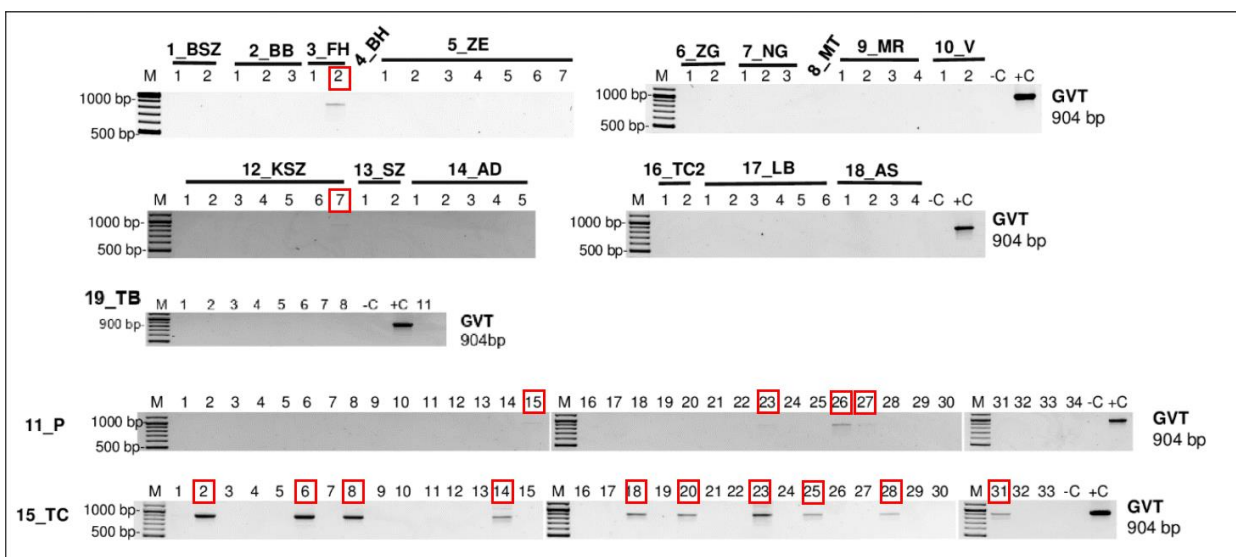
azon a szőlőültetvényen, ahol a vírus megtalálható volt, ott nagy elterjedést is mutatott, mivel a vizsgált szőlőtőkék 93%-a (59/63) fertőzött volt (32. ábra).



**32. ábra A termő ültetvények egyedi mintáinak GVT-specifikus RT-PCR vizsgálata**

A PCR teszthez a M4 melléklet primer páirjai közül a következőt használtuk sorszám szerint: 20, 21. A minták sorszáma és az ültetvénykódok is feltüntetésre kerültek. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A -C a negatív kontroll (templát nélküli minta).

Az alanyültetvényeket tekintve két ültetvényen (3\_FH, 12\_KSZ) 1-1 egyed volt csak fertőzött, az alany fajtagyűjtemények közül a pécsi helyszínen (11\_P) 34-ből 4, a fiatal tokaji gyűjteményben (15\_TC) pedig 33-ből 10 egyed volt GVT pozitív (33. ábra).



**33. ábra** Az alanyültetvények és alany fajtagyűjtemények egyedi mintáinak GVT-specifikus RT-PCR vizsgálata

A PCR teszthez a M4 melléklet primer párjai közül a következőt használtuk sorszám szerint: 20, 21. Az egyedek sorszáma és az ültetvénykódok is feltüntetésre kerültek. Az M a DNS létrát jelöli, ami GeneRuler 100 bp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific), +C a pozitív kontroll (igazoltan adott vírussal fertőzött minta). A –C a negatív kontroll (templát nélküli minta). A piros keretek a pozitív mintákat jelölik.

### 5.3.3. A GVT szekvenciák elemzése és filogenetikai összehasonlítása

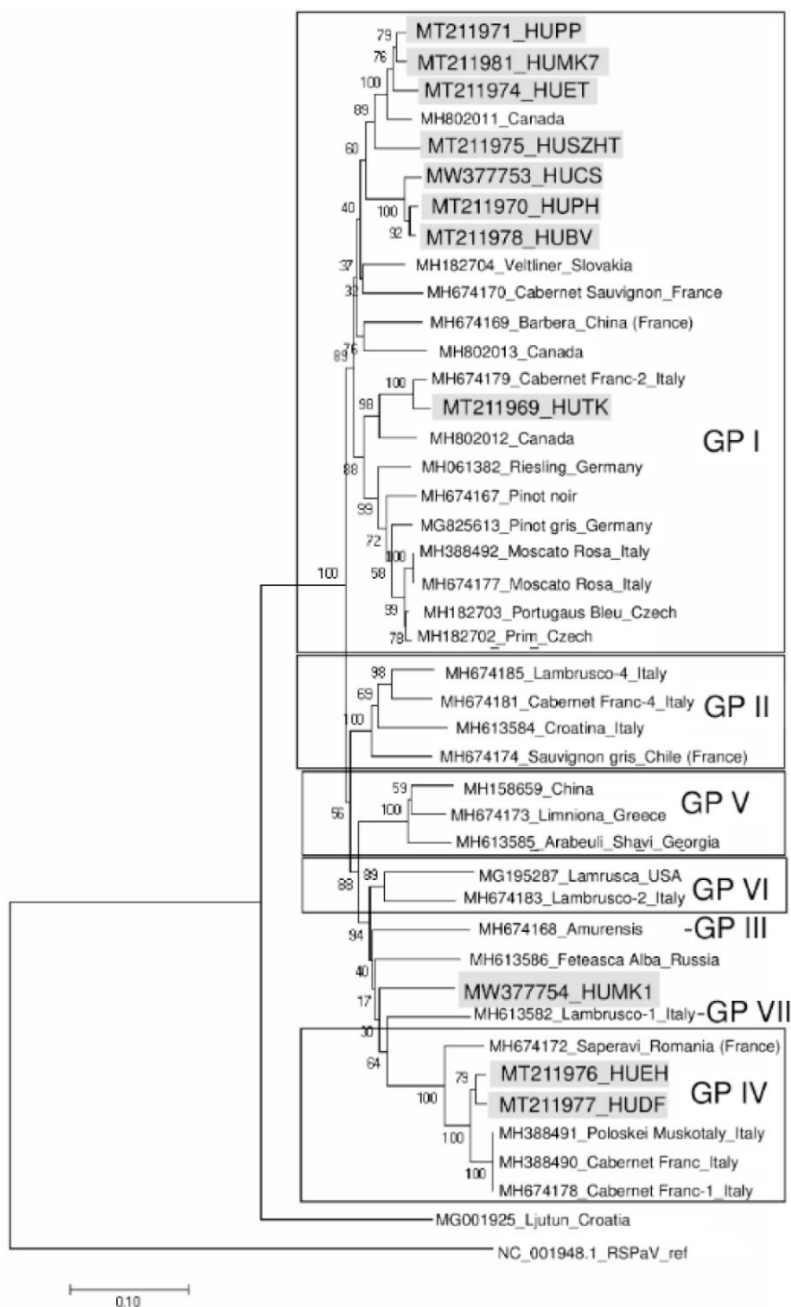
A GVT variánsok filogenetikai elemzéséhez a termő szőlőültetvények RT-PCR tesztjében pozitív minták PCR termékeit tisztítottuk és klónoztuk, majd elküldtük Sanger szekvenálásra. Ez összesen 11 mintát jelentett. A szekvenciák összehasonlításával arra jutottunk, hogy a Magyarországon jelenlévő változatok 82–89%-os nukleotid- és 92–96%-os aminosav-azonosságot mutattak az olasz GVT *Teldorego* variánssal, ami eltérő eredetre utalhat (8. táblázat).

## 8. táblázat A magyar GVT variánsok részleges nukleotid szekvenciájának összehasonlítása

Könyvtár neve	Izolátum neve	GenBank azonosító	GVT szekvenciaazonosság nukleotid szinten (%)	GFVA szekvenciaazonosság nukleotid szinten (%)	Szekvenciaazonosság / pozitivitás (%) a GVT köpenyfehérjéjéhez (CP) aminosavsztinten	Szekvenciaazonosság / pozitivitás (%) a GFVA köpenyfehérjéjéhez (CP) aminosavsztinten
TK	HUTK	MT211969	86	78	94/96	85/93
PH	HUPH	MT211970	89	77	96/98	86/93
PP	HUPP	MT211971	88	78	96/98	81/89
CS	HUCS	MW377753	88	78	96/98	82/89
ET	HUET	MT211974	87	78	95/98	85/92
SZHT	HUSZHT	MT211975	87	78	95/98	83/91
EH	HUEH	MT211976	82	77	93/96	82/91
DF	HUDF	MT211977	82	77	92/95	82/91
BV	HUBV	MT211978	89	76	96/98	85/93
MK1	HUMK1	MW377754	84	77	94/97	85/91
MK7	HUMK7	MT211981	88	78	96/99	81/90

Az összehasonlítást nukleinsav szinten a GVT (NC\_035203) és GFVA (MN553040) genomokhoz BLASTn algoritmussal, a CP aminosav sorrendjének összehasonlítását ugyanezen vírusok CP-inek aminosavsorrendjéhez BLASTp algoritmussal végeztük. GFVA – grapevine foveavirus A egy GVT-hez közeli rokon foveavirus.

A teljes hosszúságú GVT szekvenciák és a köpenyfehérjét kódoló régió előzetes filogenetikai vizsgálatai alapján hét klaszterbe rendeződtek az eddig leírt GVT variánsok (Nourinejad Zarghani et al., 2018). A magyar variánsok filogenetikai elemzése alapján a legtöbb variáns az I. csoportba, vagy a rokonságilag legtávolabb eső IV-es csoportba tartozott, valamint egy variáns, a HUMK1 egyik csoporthoz sem klasztereződött (34. ábra).



**34. ábra A GVT variánsok filogenetikai kapcsolatai**

Az evolúciós törzsfát a köpenyfehérjét kódoló 904 bp hosszúságú RT-PCR termék nukleotid szekvenciája alapján, a Neighbor-Joining módszerrel állítottuk össze. Az egyes elágazások mellett a bootstrap támogatottsági értékek (%) kerültek feltüntetésre, 500 ismétlés alapján. Az ágak hossza az evolúciós távolságokat tükrözi. Az elemzés 43 nukleotid szekvenciát tartalmazott, GenBank azonosítóik feltüntetésre kerültek. A magyarországi variánsokat szürke keret jelöli. A GRSPaV referencia genomját kívülálló csoportként (outgroup) használtuk a törzsfá gyökereztetéséhez.

A DF, EH és MK1 ültetvények az ország észak-keleti részén, Tokajban találhatóak és egy ősi magyar fajtát, a 'Furmint'-ot termesztik rajtuk. Az MK1 koráról nincs információnk, de a másik kettő több, mint 100 éves. A IV. csoportban levő MH388491 variáns egy 'Pölöskei muskotály' szőlőtőkéből

származik (1967-es telepítés), ami az sugallja, hogy ez a klád képviselheti az országban régóta jelenlevő GVT vonalakat. Az I. kládhoz tartozó variánsok különböző, széles körben termesztett szőlőfajtákról származnak, köztük az SZHT minta 'Furmint' fajtáról. Ezek nemzetközi piacról származó szaporítóanyagok lehettek és nem nagyon régi telepítésű ültetvények. Azok a termő szőlőültetvények, amelyeken nem mutattuk ki a GVT-t, 14 évnél nem idősebbek.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Magyarország szőlőültetvényeinek átfogó virológiai felmérése a kis RNS-ek nagy átteresztőképességű szekvenálásával (HTS) lehetővé tette a hazai szőlőültetvények virológiai állapotának megismerését, és egyben rámutatott a módszer hatékonyságára a növényi vírusdiagnosztikában (Czotter, et al., 2018a). Ezek az eredmények hangsúlyozták a szőlő szaporítóanyagok egészségi állapotának felmérését célzó vizsgálatok fontosságát, és megalapozták a jelen kutatás egyik fő témáját. Ennek megfelelően feltérképeztük a hazai szőlőalany-ültetvények vírus- és viroid fertőzöttségét, amely a szőlő szaporítóanyag-ellátás biztonsága szempontjából kiemelt jelentőségű. A HTS alkalmazása a növényi vírusdiagnosztikában hozzájárul a növényegészségügyi helyzet javításához. Különösen fontos a közelmúltban felfedezett vírusok, például a szőlő *Pinot gris* vírus (GPGV) terjedésének vizsgálata, amelynek jelenléte és lehetséges alternatív gazdanövényei új megvilágításba helyezik a GPGV ökológiáját és terjedési módjait. Emellett kulcsfontosságú a vírusmentes szaporítóanyag előállítását célzó patogénmentesítési eljárások hatékonyságának értékelése, különösen a természetbe bevonni kívánt új fajták esetében. Végezetül, a korábbi HTS adatok újraelemzése révén lehetőségünk nyílt a szőlőterületeinken eddig nem vagy alig dokumentált kórokozók, például a szőlő T vírus (GVT) jelenlétének kimutatására is, ami tovább bővíti a hazai virológiai ismereteinket.

### 6.1. Hazai alanyültetvények vírus és viroid fertőzöttségének felmérése kis RNS HTS-sel

Az alanyültetvények és fajtagyűjtemények diagnosztikai felmérése alapján megállapítható, hogy a hatóságilag szabályozott, vizsgálatköteles vírusoktól a legtöbb ültetvény mentes. Ez különösen igaz azokra az alanyültetvényekre, amelyeket a szaporítóanyag-előállítás részeként rendszeresen ellenőriznek. Ezzel szemben az alanyfajta-gyűjteményekben, ahol ilyen ellenőrzés nem történik, már kimutathatók voltak vizsgálatköteles vírusok is (pl. GFLV, GFkV, GLRaV-2, GLRaV-3), valamint a viroidok közül a HSVd és a GYSVd-1, a pécsi gyűjtemény esetében pedig az AGVd is. Ez alátámasztja, hogy a jelenleg alkalmazott hagyományos diagnosztikai módszerek (pl. DAS-ELISA) megfelelőek lehetnek a főbb, szaporítóanyag-minősítés szempontjából kritikus kórokozók kizárására, és a fertőzések bekerülése továbbra is ritka eseménynek számít.

Az RT-PCR-rel történő visszaigazolás során ugyanakkor több esetben eltérés mutatkozott a kis RNS HTS eredményeihez képest. Hasonló eltéréseket korábbi, hazai szőlőültetvények vírushatározottságát vizsgáló kis RNS HTS alapú felmérések során is megfigyeltek (Czotter et al., 2018a). Az eltérések

mögött technikai és biológiai okok egyaránt állhatnak, beleértve a vírusvariabilitást, a gazdanövény és vírus közötti kölcsönhatásokat, az eltérő genotípusú egyedekből származó RNS-keverékek hatását, valamint a bioinformatikai feldolgozás jellemzőit, például a felhasznált referencia-genomokat és a szűrési paramétereket. A kevert RNS-minták használata, illetve a különböző alanyfajták RNS-einek eltérő aránya a vizsgálatokban szintén befolyásolhatja a kimutathatóságot.

Az eredmények ugyanakkor aggodalomra adnak okot a nem vizsgálatköteles vírusok és viroidok esetében. A GRSPaV, GSyV-1 és GPGV vírusok, valamint a HSVd és a GYSVd-1 szinte minden vizsgált mintában előfordultak, ami arra utal, hogy ezek jelenléte a szőlő szaporítóanyag-termelés jelentős részében endémiás.

A viroidok, különösen a HSVd, szinte minden vizsgált mintában jelen voltak, ami a szőlő szaporítóanyagok széles körű viroid-fertőzöttségére utal. A GYSVd-1 esetében néhány mintában a kimutatás kizárólag a genom magas lefedettségén alapult, miközben viroid-specifikus kontig vagy elegendő számú kis RNS nem állt rendelkezésre. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy egyes esetekben más GYSVd variánsok (például GYSVd-2) lehetnek jelen, azonban ennek igazolására a jelen vizsgálat nem terjedt ki. A vizsgálatok során azonosítottunk egy további viroidot is, az AGVd-t, amelyet a rendelkezésre álló szakirodalmi adatok alapján korábban Magyarországon szőlőben még nem írtak le. Az AGVd kizárólag a pécsi alanyfajtagyűjtemény mintáiban volt kimutatható, míg az alanyültetvényekből származó mintákban nem detektáltuk jelenlétét. Az AGVd hazai előfordulásának és esetleges elterjedésének pontosabb megítéléséhez további, célzott vizsgálatok lennének szükségesek.

A GRSPaV esetében a kis RNS HTS és az RT-PCR módszerek eredményei nem minden esetben egyeztek meg, ami arra utal, hogy a vírus kimutathatósága jelentős mértékben függ az alkalmazott diagnosztikai megközelítéstől. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az alanyültetvények és az alanyfajta-gyűjtemények egyaránt fertőzöttek voltak GRSPaV-vel. Mindez rámutat arra, hogy a GRSPaV megbízható detektálásához a különböző diagnosztikai módszerek kombinált alkalmazása indokolt.

Az egyes alanyfajták között eltérő fertőzöttségi mintázat volt megfigyelhető, ami különösen a GSyV-1 esetében volt szembeutó. A vizsgálatok alapján a hazai GSyV-1 variánsok jelentős genetikai diverzitást mutattak, ami arra utal, hogy a vírus a szőlő szaporítóanyag-termelésben több, egymástól eltérő forrásból is jelen lehet.

Vizsgálataink során valamennyi elemzett alanyültetvényben kimutattuk a GPGV jelenlétét, ugyanakkor az egyes alanyfajták között eltérő fertőzöttségi arányokat figyeltünk meg. A filogenetikai

elemzések alapján olyan GPGV variánsok is jelen voltak, amelyek más szőlőfajtákban a szőlőlevél-foltosodás és deformáció (GLMD) tüneteivel hozhatók összefüggésbe, azonban az általunk vizsgált alanyfajtákon ezek a variánsok tünetmentesek maradtak. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a GPGV (a hatóságilag nem vizsgálatköteles vírusok közé tartozva) széles körben jelen lehet a szőlő szaporítóanyag-termelésben, terjedésében a fertőzött szaporítóanyag szerepe meghatározó lehet (Czotter et al., 2018a).

Összességében az eredmények azt mutatják, hogy bár a vizsgálatköteles vírusok hatékonyan kiszűrhetők a jelenlegi rendszerrel, és a helyszíni fertőződés továbbra is ritka eseménynek számít, a szőlő szaporítóanyag teljes egészségi állapotának értékeléséhez a nem vizsgált, de potenciálisan kockázatot jelentő vírusok és viroidok nyomon követése is elengedhetetlen.

## 6.2. GPGV kimutatása és vizsgálata különböző növényi gazdáiban

Az alanyültetvények vizsgálata során a GPGV széleskörű elterjedést mutatott, ahol a tünetet okozó variánsokat tünetmentes alanyfajtákban is megtaláltuk. Ez arra utal, hogy a GPGV bizonyos szőlőfajtákban és akár más gazdanövényekben is látens módon fennmaradhat, és a tünetek megjelenését valószínűleg több tényező együttesen befolyásolja. Ezek között szerepet játszhat a gazdanövény fajtája, de más kórokozókval való együttes fertőzés vagy környezeti hatások is hozzájárulhatnak.

A gyomnövények és más kísérő növényfajok vizsgálata során a GPGV jelenlétét olyan nem-szőlő gazdanövényekben is kimutattuk, mint a fehér libatop, a selyemkóró, a szeder, a vadrózsa, a bodza, a galagonya, a bálványfa és a kőris. Eredményeink azt mutatják, hogy ezek a növényfajok potenciálisan szerepet játszhatnak a vírus fenntartásában. Különösen fontos, hogy a négy fás szárú növény hosszú távon képes lehet megőrizni a vírust. Emellett a selyemkóró bár lágyszárú, gyökérsarjakkal vegetatív módon is képes szaporodni, így az új klónok is hordozhatják a vírust. A fehér libatop magról kelve idényjelleggel jelenik meg, de populációs szinten így is hozzájárulhat a vírus fennmaradásához.

Az ország különböző pontjairól származó vírus variánsok filogenetikai vizsgálata során a földrajzi csoportosulás volt megfigyelhető, ami helyszíni fertőzésre és lokális terjedésre utalhat. A több mint tíz éve műveletlen mogyoródi ültetvény variánsainak genetikai változatossága arra utalhat, hogy a vírus már hosszabb ideje jelen van a helyi vegetációban, és az ott fennmaradó víruspopuláció ez idő alatt több genetikai változáson is áteshetett. Az SNP analízis eredményei azt mutatták, hogy a tünetet okozó és tünetet nem okozó variáns nukleotid szinten is elkülöníthetők egymástól. Azok a variánsok, amelyek genomján nem voltak jelen az eddig azonosított SNP-k, mégis a tünetet okozó kláddal

csoportosultak, olyan genetikai eltéréseket hordozhatnak, amelyek felelősek lehetnek a tünetek kialakulásáért.

Összességében az eredmények azt mutatják, hogy a GPGV-t a szőlőn kívül érdemes a környező növényzetben is figyelni, mert az ültetvény szomszédságában növekvő növények szerepet játszhatnak a vírus terjedésében és fennmaradásában.

### 6.3. Korábbi HTS adatok újra elemzése a GVT hazai jelenlétének kimutatására

A GVT előfordulását célzó vizsgálatunkat a korábbi, hazai szőlő termőültetvények virológiai felmérésére készült kis RNS HTS szekvencia adataink újbóli elemzésével kezdtük. Az eredmények azt mutatták, hogy a vírus Magyarországon nem számít általánosan elterjedtnek, viszont bizonyos ültetvényekben, főként az észak-keleti (Tokaji) borvidéken, lokálisan magas a fertőzöttség. Míg a kis RNS HTS elemzés csak néhány könyvtárban mutatta a vírus jelenlétét, az RT-PCR-es vizsgálatok további ültetvények esetében is pozitív eredményeket adtak, ami megerősíti korábbi megfigyeléseinket arról, hogy a GVT a közeli rokon GRSPaV-hoz hasonlóan nehezen detektálható kizárólag kis RNS HTS-t használva. Ráadásul a bioinformatikai elemzéssel is pozitív eredményt is kaptunk, melyről később kiderült, hogy szőlő genomhoz tartozó szekvenciát azonosítottunk. A módszer érzékenységét jelentősen befolyásolta, hogy a GVT genetikai változatosságát mennyire fedte le a felhasznált referencia szekvencia. Ennek javítására egy olyan konszenzus szekvenciát hoztunk létre különböző GVT variánsokból, amelynek segítségével sikerült további pozitív könyvtárakat azonosítanunk. Az eredmények alapján a GVT hazai előfordulása összességében alacsonyabb gyakoriságúnak mutatkozott, mint a Csehországban és Szlovákiában korábban közölt adatok, ugyanakkor egyes ültetvényekben lokálisan magas fertőzöttségi szint volt megfigyelhető (Glasa et al., 2018).

A HTS-sel előre jelzett eseteken túl RT-PCR-rel további 9 ültetvényben tudtuk igazolni a vírus jelenlétét, ami rávilágít arra, hogy a HTS önmagában nem minden esetben elég érzékeny, különösen feltételezett alacsony vírusszint esetén. Az alanyültetvényeket is megvizsgáltuk, ahol a HTS egyetlen pozitív könyvtárat sem jelzett, azonban RT-PCR-rel három ültetvényben is kimutattuk a GVT jelenlétét. Ez arra utalhat, hogy a vírus alacsony koncentrációban van jelen, vagy inaktív formában és ezért maradt észrevétlen a HTS adatok elemzése során. Azokon a termő ültetvényeken, ahol jelen volt a GVT, a tőkék több mint 90%-a fertőzöttnek bizonyult. Ezzel szemben az alanyültetvényekben és a fajtagyűjteményekben ez az arány jóval alacsonyabb volt. Ez a különbség részben annak is köszönhető lehet, hogy a termő ültetvények akár évtizedekkel hosszabb ideje is a helyszínen lehetnek, mint az

alanyültetvények, így jóval hosszabb idő állt rendelkezésre a vírus felhalmozódására vagy vírushordozó szaporítóanyag ültetvénybe kerülésére.

Az RT-PCR során keletkezett PCR-termékek szekvenciáinak filogenetikai elemzése alapján megállapíthatjuk, hogy a hazai GVT variánsok több evolúciós vonalhoz tartoznak. Egy részük a nemzetközi szaporítóanyag-forrásokhoz köthető I. klaszterbe sorolható, míg mások (főként a Tokaji, régóta meglévő 'Furmint' fajtájú ültetvényekből származó variánsok) a IV. klaszterbe tartoznak vagy azon kívül helyezkednek el. Ez arra utalhat, hogy ezek a variánsok már régóta jelen lehetnek a helyi vegetációban, az idő során genetikai eltéréseket halmoztak fel, amelyek megkülönböztetik őket más régiók variánsaitól.

Az eltérő klaszterekbe sorolt magyarországi variánsok jelenléte arra utal, hogy a hazai GVT populáció több forrásból származhatott. Részben külföldről érkezett szaporítóanyag révén, részben pedig olyan helyi, régebb óta jelenlévő vírusvonalakból, amelyek az évek során önállóan alakultak tovább. Mindez rámutat arra, hogy egy szőlőültetvény vírusösszetételét nemcsak a jelenlegi növényállomány és annak kezelése, hanem a korábbi telepítések során használt szaporítóanyagok és a helyszínen korábban jelen lévő növényállomány is befolyásolhatja.

A dolgozat eredményei rámutatnak arra, hogy a szőlő-szaporítóanyag előállítás minden szintjén elengedhetetlen a korszerű és megbízható vírusdiagnosztikai módszerek alkalmazása. A különböző ültetvénytípusokban talált vírus- és viroidfertőzések, valamint egyes vírusok (GPGV) szélesebb gazdanövényköre és genetikai változatossága mind azt igazolják, hogy a hagyományos ellenőrzési eljárások nem mindig képesek teljes képet adni a fertőzöttségről. A HTS szerepe ebben kulcsfontosságú, mivel lehetőséget ad nemcsak a vizsgálatköteles, hanem a nem vizsgált és akár még ismeretlen kórokozók detektálására is.

Az eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a HTS alapú vírusdiagnosztika egyre fontosabb eszközzé válik a szőlő-szaporítóanyag ellenőrzésben és a patogénmentesítési eljárások hatékonyságának nyomon követésében. Mivel a HTS lehetővé teszi minden, a vizsgált mintában előforduló vírus és viroid azonosítását, függetlenül attól, hogy azok hatóságilag szabályozottak-e vagy sem, alkalmazása kulcsszerepet játszhat a növényegészségügyi kockázatok minimalizálásában.

A HTS megbízható diagnosztikai alkalmazásához elengedhetetlen a módszer standardizálása és validálása. Ennek hiányában a HTS eredmények értelmezése, különösen hatósági vagy szaporítóanyag-minősítési szempontból, nehézségekbe ütközhet. Ezért a jövő egyik legfontosabb feladata, hogy a HTS technológiát elfogadott és szabályozott diagnosztikai módszerré fejlesszék,

amely jól illeszthető a jelenlegi ellenőrzési rendszerekbe és képes kiegészíteni vagy adott esetben részben kiváltani a hagyományos tesztelési eljárásokat (Soltani et al., 2021).

Ezek a fejlesztések hosszú távon lehetőséget biztosíthatnak egy korszerűbb szaporítóanyag ellenőrzési rendszer kialakításához, amely elősegítheti az egészséges, vírus- és viroidmentes növényanyag előállítását. Ez nemcsak a hazai szőlőtermesztés fenntarthatóságát és versenyképességét támogatja, hanem segíthet abban is, hogy a hazai szaporítóanyag-előállítás megfeleljen a nemzetközi növényegészségügyi követelményeknek is.

## 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kis RNS HTS-sel meghatároztuk 17 hazai szőlő alanyültetvény és 2 hazai szőlő fajtagyűjtemény viromját.
2. Magyarországon először azonosítottuk az AGVd jelenlétét szőlőben.
3. A GPGV jelenlétét Magyarországon először mutattuk ki fehér libatopban (*Chenopodium album*), és a világon elsőként azonosítottuk a vírust további hét növényfajban: selyemkóró (*Asclepias syriaca*), szeder (*Rubus sp.*), vadrózsa (*Rosa canina*), bodza (*Sambucus sp.*), galagonya (*Crataegus sp.*), bálványfa (*Ailanthus sp.*) és kőris (*Fraxinus sp.*).
4. Magyarországi szőlőtermő ültetvényekből és alanyültetvényekből származó kis RNS HTS adatok újraelemzésével elsőként igazoltuk a szőlő T vírus (GVT) hazai jelenlétét.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A szőlőtermesztés az egyik legfontosabb kertészeti ágazat világszerte, így hazánkban is jelentős gazdasági és kulturális értéket képvisel. Az ültetvények hosszú távú fenntarthatósága, termésbiztonsága és minősége szorosan összefügg a szaporítóanyagok egészségi állapotával. A vírusok és viroidok a szőlő esetében is komoly veszélyt jelentenek, mivel évekig rejtve maradhatnak, ezáltal észrevétlenül kerülhetnek be új telepítésekbe. Emiatt kiemelkedő fontosságú, hogy a szőlő szaporítóanyagok előállítása megbízható, érzékeny diagnosztikai eljárásokra épüljön, amelyek nemcsak a hatóságilag szabályozott, hanem a nem vizsgálatköteles, potenciálisan jelentős vírusokat és viroidokat is képesek kimutatni. Az elmúlt években az új generációs szekvenálási technológiák, ezen belül is a kis RNS alapú nagy áteresztőképességű szekvenálás (kis RNS HTS), lehetőséget kínál minden kórokozó egyidejű azonosítására, függetlenül azok ismertségétől vagy tünetkeltő képességétől. Munkám célja az volt, hogy ezen korszerű módszer alkalmazásával pontos képet kapjak a hazai szőlő szaporítóanyag-előállítás szempontjából kulcsfontosságú alanyültetvények és a szőlő alany fajtagyűjtemények vírus- és viroid fertőzöttségéről, valamint az kis RNS HTS gyakorlati alkalmazhatóságát vizsgáljam a diagnosztika, a patogénmentesítés és a vírusok terjedésével kapcsolatos vizsgálatok területén.

A hazai szőlő alanyültetvények és alany fajtagyűjtemények virológiai állapotának feltárása során összesen 17 alanyültetvény és 2 fajtagyűjtemény mintáiból készítettem kis RNS könyvtárat, majd kis RNS HTS és az azt megerősítő RT-PCR alkalmazásával az alanyültetvényekben öt különböző vírust és viroidot azonosítottunk (GRSPaV, GPGV, GSyV-1, HSVd, GYSVd-1), amelyek egyike sem tartozik a hatóságilag vizsgálatköteles kórokozók közé, így jelenlétük rejtve maradhat a szaporítóanyag-előállítás során. A hatóságilag nem ellenőrzött alany fajtagyűjteményeket külön értékeltük, ahol összesen tízféle vírust és viroidot mutattunk ki: GFkV, GFLV, GLRaV-2, GLRaV-3, GRSPaV, GPGV, GSyV-1, HSVd, GYSVd-1, valamint Magyarországon először az AGVd viroidot is azonosítottuk.

A szőlő Pinot gris vírus (GPGV) esetleges alternatív gazdanövényeinek vizsgálata során nyolc gyomként növekvő növényfaj esetében igazoltuk a vírus jelenlétét szőlőültetvények környezetében. A vírus jelenlétét először mutattuk ki Magyarországon fehér libatopban (*Chenopodium album*), valamint világviszonylatban is először selyemkóróban (*Asclepias syriaca*), szederben (*Rubus sp.*), vadrózsában (*Rosa canina*), bodzában (*Sambucus sp.*), galagonyában (*Crataegus sp.*), bálványfában (*Ailanthus sp.*)

és kőrisben (*Fraxinus sp.*). Az eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy e fajok szerepet játszhatnak a vírus természetes körforgásában, fenntartásában vagy terjesztésében.

A szőlő T-vírus (GVT) hazai jelenlétének és elterjedésének feltérképezéséhez termő szőlőültetvények, alanyültetvények és fajtagyűjtemények HTS és RT-PCR alapú vizsgálatát végeztük el. Magyarországon elsőként igazoltuk e vírus előfordulását, egyes termőültetvényeken magas, míg az alanyállományokban alacsonyabb fertőzöttséget tapasztaltunk. A filogenetikai elemzés során a hazai GVT variánsokat többféle genetikai csoportba soroltuk, köztük olyanokba is, amelyek a nemzetközi referencia-variánsoktól elkülönültek, ami a vírus hazai jelenlétének hosszabb múltra visszanyúló történetére utalhat.

A bemutatott eredmények rávilágítanak arra, hogy a korszerű diagnosztikai módszerek, különösen a kis RNS alapú HTS alkalmazása alapvető fontosságú az egészséges szaporítóanyag biztosításában. A HTS előnye, hogy a vizsgálatköteles vírusokon túl a nem szabályozott, tünetet nem okozó, vagy akár újonnan felbukkanó vírusokat és viroidokat is képes kimutatni, ezáltal segít minimalizálni a növényegészségügyi kockázatokat. A jövő szempontjából kiemelt feladat e technológia szélesebb körű validálása és beépítése a hazai szaporítóanyag-ellenőrzési rendszerbe. Ez lehetővé tenné, hogy a vizsgálatok megbízhatóan minden jelenlévő vírusra és viroidra kiterjedjenek, ezzel is támogatva a fenntartható és versenyképes szőlőtermesztést, valamint a nemzetközi elvárásoknak megfelelő szaporítóanyag-előállítást.

## SUMMARY

Grapevine cultivation is one of the most important horticultural sectors worldwide and holds significant economic and cultural value in Hungary as well. The long-term sustainability, yield stability, and quality of vineyards are closely linked to the health status of propagation materials. Viruses and viroids are a serious threat to grapevines, as they can remain latent for years and may be introduced into new plantations without being detected. Therefore, it is highly significant that grapevine propagation relies on reliable and sensitive diagnostic methods capable of detecting not only officially regulated but also non-regulated, potentially harmful viruses and viroids. In recent years, next-generation sequencing technologies, particularly small RNA-based high-throughput sequencing (small RNA HTS), have made it possible to detect all pathogens simultaneously, regardless of their prior recognition or symptom expression.

This study aimed to apply this advanced method to precisely determine the virus and viroid infection status of rootstock vineyards and grapevine rootstock collections essential for domestic propagation,

and to evaluate the practical applicability of small RNA HTS in diagnostics, pathogen elimination, and studies on virus transmission.

During the virological survey of Hungarian rootstock vineyards and rootstock collections, small RNA libraries were prepared from samples originating from 17 rootstock vineyards and 2 rootstock collections. Using small RNA HTS and confirmatory RT-PCR, five viruses and viroids were identified in the vineyards (GRSPaV, GPGV, GSyV-1, HSVd, GYSVd-1), none of which are currently subject to mandatory testing by authorities, thus their presence may remain hidden during propagation. Rootstock collections, which are not subject to official monitoring, were evaluated separately, where ten different viruses and viroids were identified: GFkV, GFLV, GLRaV-2, GLRaV-3, GRSPaV, GPGV, GSyV-1, HSVd, GYSVd-1, and for the first time in Hungary, AGVd.

In the investigation of potential alternative hosts of grapevine Pinot gris virus (GPGV), the presence of the virus was confirmed in eight companion plant species in the surroundings of vineyards. The virus was detected for the first time in Hungary in *Chenopodium album*, and globally for the first time in *Asclepias syriaca*, *Rubus sp.*, *Rosa canina*, *Sambucus sp.*, *Crataegus sp.*, *Ailanthus sp.*, and *Fraxinus sp.* These findings raise the possibility that these species may play a role in the natural cycle, maintenance, or transmission of the virus.

To assess the presence and distribution of grapevine virus T (GVT) in Hungary, HTS and RT-PCR analyses were conducted on samples from fruiting vineyards, rootstock vineyards, and collections. This study represents the first confirmation of GVT in Hungary. The virus was found to be more prevalent in fruiting vineyards, while lower infection rates were observed in rootstock materials. Phylogenetic analysis revealed that Hungarian GVT isolates clustered into multiple genetic groups, including some that diverged from international reference strains, suggesting a longer-standing presence of the virus in the country.

These results highlight the fundamental importance of modern diagnostic technologies—especially small RNA-based HTS—in ensuring the health of propagation materials. The advantage of HTS lies in its ability to detect not only officially regulated pathogens but also non-regulated, asymptomatic, or newly emerging viruses and viroids, thereby helping to minimize phytosanitary risks. For the future, a key objective is the broader validation and integration of this technology into the national propagation material certification system. This would enable reliable detection of all present viruses and viroids, thus supporting sustainable and competitive viticulture, and propagation practices that meet international standards.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- 87/2006. (XII. 28.) FVM rendelet a szőlő szaporítóanyagok előállításáról, minősítéséről és forgalomba hozataláról—Hatályos Jogszabályok Gyűjteménye. (2006).  
<https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0600087.fvm>
- Adams, I., & Fox, A. (2016). Diagnosis of plant viruses using next-generation sequencing and metagenomic analysis. In *Current research topics in plant virology* (pp. 323–335). Springer.
- 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.
- Bakonyi, K., & Bakonyi, L. (2002). Magyar alanyemesítés története és eredményei. *International Journal of Horticultural Science*, 8(1), 13-17.
- Balique, F., Lecoq, H., Raoult, D., & Colson, P. (2015). Can plant viruses cross the kingdom border and be pathogenic to humans? *Viruses*, 7(4), 2074–2098.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), 356–363.
- Beck, T. (2005). A filoxéravész Magyarországon. *Mezőgazdaságtörténeti Tanulmányok*, 10.
- Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C., & Maule, A. J. (2010). Plasmodesmata: Gateways to local and systemic virus infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(11), 1403–1412.
- Bertazzon, N., Forte, V., Filippin, L., Causin, R., Maixner, M., & Angelini, E. (2017). Association between genetic variability and titre of Grapevine Pinot gris virus with disease symptoms. *Plant Pathology*, 66(6), 949–959.
- Bhardwaj, A., & Kulshrestha, S. (2020). Advance methods for the isolation and characterization of plant viruses infecting crops. In *Applied Plant Virology* (pp. 39–53). Elsevier.

- Bi, W.-L., Hao, X.-Y., Cui, Z.-H., Pathirana, R., Volk, G. M., & Wang, Q.-C. (2018). Shoot tip cryotherapy for efficient eradication of grapevine leafroll-associated virus-3 from diseased grapevine in vitro plants. *Annals of Applied Biology*, 173(3), 261–270.
- 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.
- Bragard, C., Caciagli, P., Lemaire, O., Lopez-Moya, J. J., MacFarlane, S., Peters, D., Susi, P., & Torrance, L. (2013). Status and prospects of plant virus control through interference with vector transmission. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 177–201.
- Carbonell, A., & Carrington, J. C. (2015). Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 111–117.
- Cervantes, F. A., & Alvarez, J. M. (2011). Within plant distribution of Potato Virus Y in hairy nightshade (*Solanum sarrachoides*): An inoculum source affecting PVY aphid transmission. *Virus Research*, 159(2), 194–200.
- Chander, Y., Koelbl, J., Puckett, J., Moser, M. J., Klingele, A. J., Liles, M. R., Carrias, A., Mead, D. A., & Schoenfeld, T. W. (2014). A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Frontiers in Microbiology*, 5, 395.
- Chofong, G. N., Minarovits, J., & Richert-Pöggeler, K. R. (2021). Virus latency: Heterogeneity of host-virus interaction in shaping the virosphere. In *Plant virus-host interaction* (pp. 111–137). Elsevier.
- Clark, M. F., & Adams, A. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34(3), 475–483.

- Cole, A. B., Király, L., Ross, K., & Schoelz, J. E. (2001). Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of *Nicotiana* species to Cauliflower mosaic virus infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(1), 31–41.
- Commission Implementing Regulation (EU) 2019/2072 of 28 November 2019 Establishing Uniform Conditions for the Implementation of Regulation (EU) 2016/2031 of the European Parliament and the Council, as Regards Protective Measures against Pests of Plants, and Repealing Commission Regulation (EC) No 690/2008 and Amending Commission Implementing Regulation (EU) 2018/2019, 319 OJ L (2019).  
[http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2019/2072/oj/eng](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2019/2072/oj/eng)
- Csoma, Z. (2004). Hagymány és modernizáció a magyar paraszti szőlő-és borgazdálkodásban (20. Század, 21. Század eleje).
- Czotter, N., Molnár, J., Pesti, R., Demián, E., Baráth, D., Varga, T., & Várallyay, É. (2018b). Use of siRNAs for diagnosis of viruses associated to woody plants in nurseries and stock collections. In *Viral metagenomics: Methods and protocols* (pp. 115–130). Springer.
- Czotter, N., Molnar, J., Szabó, E., Demian, E., Kontra, L., Baksa, I., Szittyá, G., Kocsis, L., Deak, T., Bisztray, G., Tusnady, G. E., Burgyan, J., & Varallyay, E. (2018a). NGS of Virus-Derived Small RNAs as a Diagnostic Method Used to Determine Viromes of Hungarian Vineyards. *Frontiers in Microbiology*, 9, 122. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00122>
- Czotter, N., Szabó, E., Molnar, J., Kocsis, L., Deák, T., Bisztray, G., Tusnady, G. E., Burgyan, J., & Várallyay, É. (2015). First description of Grapevine Syrah virus 1 in vineyards of Hungary.
- Darriaut, R., Lailheugue, V., Masneuf-Pomarède, I., Marguerit, E., Martins, G., Compant, S., Ballestra, P., Upton, S., Ollat, N., & Lauvergeat, V. (2022). Grapevine rootstock and soil microbiome interactions: Keys for a resilient viticulture. *Horticulture Research*, 9, uhac019.

- Demian, E., Holczbauer, A., Galbacs, Z. N., Jaksa-Czotter, N., Turcsan, M., Olah, R., & Varallyay, E. (2021). Variable Populations of Grapevine Virus T Are Present in Vineyards of Hungary. *Viruses*, 13(6), 1119. <https://doi.org/10.3390/v13061119>
- Demian, E., Jaksa-Czotter, N., Molnar, J., Tusnady, G. E., Kocsis, L., & Varallyay, E. (2020). Grapevine rootstocks can be a source of infection with non-regulated viruses. *European Journal of Plant Pathology*, 156(3), 897–912.
- Ding, S.-W., & Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130(3), 413–426.
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539–548.
- Eichmeier, A., Peňázová, E., & Muljukina, N. (2018). Survey of Grapevine Pinot gris virus in certified grapevine stocks in Ukraine. *European Journal of Plant Pathology*, 152(2), 555–560.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Ghebremeskel, S., & Martelli, G. P. (2012). Grapevine deformation virus: Completion of the sequence and evidence on its origin from recombination events between Grapevine fanleaf virus and Arabis mosaic virus. *Virus Research*, 166(1–2), 136–140.
- Elbeaino, T., Kontra, L., Demian, E., Jaksa-Czotter, N., Slimen, A. B., Fabian, R., Lazar, J., Tamisier, L., Digiario, M., & Massart, S. (2020). Complete sequence, genome organization and molecular detection of grapevine line pattern virus, a new putative anulavirus infecting grapevine. *Viruses*, 12(6), 602.
- Esmenjaud, D., & Bouquet, A. (2009). Selection and application of resistant germplasm for grapevine nematodes management. In *Integrated management of fruit crops nematodes* (pp. 195–214). Springer.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), 368–376.

- Feyér, P. (1970). Szőlő-és borgazdaságunk történetének alapjai. Akadémiai Kiadó.
- Fox, A., Botermans, M., Ziebell, H., Fowkes, A. R., Fontdevila Pareta, N., Massart, S., Rodoni, B., Chooi, K. M., Kreuze, J., & Kumar, P. (2025). Implications of high throughput sequencing of plant viruses in biosecurity—a decade of progress? *Peer Community Journal*, 5.
- Fraile, A., & García-Arenal, F. (2010). The coevolution of plants and viruses: Resistance and pathogenicity. *Advances in Virus Research*, 76, 1–32.
- Froissart, R., Roze, D., Uzest, M., Galibert, L., Blanc, S., & Michalakis, Y. (2005). Recombination every day: Abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection. *PLoS Biology*, 3(3), e89.
- Fuchs, M. (2020). Grapevine viruses: A multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *Journal of Plant Pathology*, 102(3), 643–653.
- Fuchs, M., Rwahnih, M. A., Blouin, A. G., Burger, J., Chooi, K. M., Constable, F., Ertunc, F., Fiore, N., Habili, N., Hily, J.-M., Katis, N., Lemaire, O., Maliogka, V. I., Maree, H. J., Minafra, A., Naidu, R., Pietersen, G., Saldarelli, P., Schmidt, A., ... Várallyay, É. (2025). A list of eclectic viruses, virus-like diseases and viroids of grapevines that should not be considered for regulatory oversight: A global plea from virologists. *Journal of Plant Pathology*, 107(2), 847–858. <https://doi.org/10.1007/s42161-025-01871-9>
- Gallitelli, D. (2004). Nucleic acid-based assay for the diagnosis of viral pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*. AUGUST, 2004, 1000–1007.
- Gambino, G., Bondaz, J., & Gribaudo, I. (2006). Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), 397–404.
- Gambino, G., Cuzzo, D., Fasoli, M., Pagliarani, C., Vitali, M., Boccacci, P., Pezzotti, M., & Mannini, F. (2012). Co-evolution between Grapevine *rupestris* stem pitting-associated virus and *Vitis*

- vinifera L. leads to decreased defence responses and increased transcription of genes related to photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 63(16), 5919–5933.
- Gambino, G., Navarro, B., Torchetti, E. M., La Notte, P., Schneider, A., Mannini, F., & Di Serio, F. (2014). Survey on viroids infecting grapevine in Italy: Identification and characterization of Australian grapevine viroid and Grapevine yellow speckle viroid 2. *European Journal of Plant Pathology*, 140(2), 199–205.
- Gambino, G., Navarro, B., Vallania, R., Gribaudo, I., & Di Serio, F. (2011). Somatic embryogenesis efficiently eliminates viroid infections from grapevines. *European Journal of Plant Pathology*, 130(4), 511–519.
- 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.
- García-Arenal, F., & Fraile, A. (2008). Questions and concepts in plant virus evolution: A historical perspective. In *Plant Virus Evolution* (pp. 1–14). Springer.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. de. (2008). *Plant propagation by tissue culture. Volume 1: The background.* (Issue Ed. 3).
- Gibbs, A., & Ohshima, K. (2010). Potyviruses and the digital revolution. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 205–223.
- Giffard, B., Winter, S., Guidoni, S., Nicolai, A., Castaldini, M., Cluzeau, D., Coll, P., Cortet, J., Le Cadre, E., & D’errico, G. (2022). Vineyard management and its impacts on soil biodiversity, functions, and ecosystem services. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 850272.
- Glasa, M., Predajňa, L., Komínek, P., Nagyová, A., Candresse, T., & Olmos, A. (2014a). Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Archives of Virology*, 159(8), 2103–2107.

- Glasa, M., Predajňa, L., Komínek, P., Nagyová, A., Candresse, T., & Olmos, A. (2014b). Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Archives of Virology*, 159(8), 2103–2107.
- Glasa, M., Predajňa, L., Sihelská, N., Šoltys, K., Ruiz-García, A. B., Olmos, A., Wetzell, T., & Sabanadzovic, S. (2018). Grapevine virus T is relatively widespread in Slovakia and Czech Republic and genetically diverse. *Virus Genes*, 54(5), 737–741.
- Glasa, M., Predajňa, L., Šoltys, K., Sabanadzovic, S., & Olmos, A. (2015). Detection and molecular characterisation of Grapevine Syrah virus-1 isolates from Central Europe. *Virus Genes*, 51(1), 112–121.
- Graham, J. H., & Strauss, S. L. (2021). Biological control of soilborne plant pathogens and nematodes. In *Principles and applications of soil microbiology* (pp. 633–654). Elsevier.
- Gribaudo, I., Gambino, G., & Vallania, R. (2004). Somatic embryogenesis from grapevine anthers: The optimal developmental stage for collecting explants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(4), 427–430.
- Gualandri, V., Asquini, E., Bianchedi, P., Covelli, L., Brilli, M., Malossini, U., Bragagna, P., Saldarelli, P., & Si-Ammour, A. (2017). Identification of herbaceous hosts of the Grapevine Pinot gris virus (GPGV). *European Journal of Plant Pathology*, 147(1), 21–25.
- Guță, I.-C., Buciumeanu, E.-C., Tătaru, L. D., Oprescu, B., & Topală, C. M. (2016). New approach of electrotherapy for grapevine virus elimination. III International Symposium on Horticulture in Europe-SHE2016 1242, 697–702.
- Hohn, T. (2007). Plant virus transmission from the insect point of view. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46), 17905–17906.

- Hohn, T., & Vazquez, F. (2011). RNA silencing pathways of plants: Silencing and its suppression by plant DNA viruses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(11–12), 588–600.
- Holczapfel, K. (2022). A magyar borok eredetvédelme. ppke.
- Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., & Ren, F. (2020). Efficiency of chemotherapy combined with thermotherapy for eliminating grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3). *Scientia Horticulturae*, 271, 109462.
- Hull, R. (2014). Symptoms and host range. *Plant Virology*, 145–198.
- Jaksa-Czotter, N., Nagyné Galbács, Z., Jahan, A., Demian, E., & Várallyay, É. (2023). Viromes of Plants Determined by High-Throughput Sequencing of Virus-Derived siRNAs. In *Viral Metagenomics: Methods and Protocols* (pp. 179–198). Springer.
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of Protein Molecules. In *Mammalian Protein Metabolism* (pp. 21–132). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7>
- Karasev, A. V., & Gray, S. M. (2013). Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 571–586.
- Kocsis, L. (2018, December 10). Magyarországon használt szőlőalanyfajták. *Agrofórum Online*. <https://agroforum.hu/szakcikkek/szolo-bor-szakcikkek/magyarorszagon-hasznalt-szoloalanyfajtak/>
- Kocsis, L. (2019). A szőlőalany használat több mint egy évszázados fejlődése. In *Innováció a Szőlőszaporításban* (pp. 15–22). Szabó Péter (DOSZ) Kiadó.
- KSH, K. S. H. (2020). Szőlőültetvények 2020.
- Kumar, M., Bharti, R., & Ranjan, T. (2020). The evolutionary significance of generalist viruses with special emphasis on plant viruses and their hosts. *Open Virol J*, 14, 22–29.

- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.
- Kwon, S.-J., Seo, J.-K., & Rao, A. L. N. (2012). Detection and quantification of viral and satellite RNAs in plant hosts. In *RNA Abundance Analysis: Methods and Protocols* (pp. 131–141). Springer.
- Lázár, J., & Bisztray, G. D. (2011). Virus and virus-like diseases of grapevine in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 17(3), 25-36.
- Lazar, J., Kolber, E., & Farkas, E. (1995). Testing GLRaV, the closterovirus causing grapevine leaf roll, in Hungary using woody indicators. *Novenyvedelmi Tudomanyos Napok (Hungary)*, (41).
- Legrand, P. (2015). Biological assays for plant viruses and other graft-transmissible pathogens diagnoses: A review. *EPPO Bulletin*, 45(2), 240–251.
- Lehoczky, J., & Beczner, L. (1980). Alfalfa mosaic virus infection on grapevines. 1. Transmission on woody indicators (indexing)[Chardonnay/5C vines, alfalfa mosaic virus (AIMV), woody indicators (FS-4, *Vitis rupestris* St. George, Chardonnay, Veltliner rouge precoce)]. *Kertgazdasag (Hungary)*, 12(2).
- Lehoczky, J., Boscia, D., Martelli, G. P., Burgyán, J., Castellano, M. A., Beczner, L., & Farkas, G. (1987). Occurrence of the line pattern hitherto unknown virus disease of grapevine in Hungary. *Horticulture*, 19(6), 61–79.
- Levy, S. E., & Myers, R. M. (2016). Advancements in next-generation sequencing. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17(1), 95–115.
- Lucas, W. J. (2006). Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, 344(1), 169–184.

- Maillot, P., Kieffer, F., & Walter, B. (2006). Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. *VITIS-GEILWEILERHOF-*, 45(4), 185.
- Maree, H. J., Fox, A., Al Rwahnih, M., Boonham, N., & Candresse, T. (2018). Application of HTS for routine plant virus diagnostics: State of the art and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1082.
- Martelli, G. P., Lehoczky, J., Quacquarelli, A., & Sarospataki, G. (1967). A disorder resembling «legno riccio»(rugose wood) of Grapevine in Hungary/Presenza in Ungheria di un deperimento della Vite riferibile al" legno riccio". *Phytopathologia Mediterranea*, 6(1/2), 110–112.
- Martínez-Turiño, S., Calvo, M., Bedoya, L. C., Zhao, M., & García, J. A. (2021). Virus host jumping can be boosted by adaptation to a bridge plant species. *Microorganisms*, 9(4), 805.
- Meng, B., Forsline, P. L., Gonsalves, D., Pang, S. Z., & McFerson, J. R. (1998). Nucleotide sequence and genome structure of grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to apple stem pitting virus. *Journal of General Virology*, 79(8), 2059–2069. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-8-2059>
- Meng, B., Rebelo, A. R., & Fisher, H. (2006). Genetic diversity analyses of grapevine Rupestris stem pitting-associated virus reveal distinct population structures in scion versus rootstock varieties. *Journal of General Virology*, 87(6), 1725–1733.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—The next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46.
- Miljanić, V., Rusjan, D., Škvarč, A., Chatelet, P., & Štajner, N. (2022). Elimination of eight viruses and two viroids from preclonal candidates of six grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) through in vivo thermotherapy and in vitro meristem tip micrografting. *Plants*, 11(8), 1064.

- Mirmajlessi, S. M., Loit, E., Maend, M., & Mansouripour, S. M. (2015). Real-time PCR applied to study on plant pathogens: Potential applications in diagnosis-a review. *Plant Protection Science*, 51(4), 177–190.
- Molnár, Á. (2019). A szaporítóanyag-előállítás helyzete. In *Innováció a Szőlőszaporításban* (pp. 11–14). Szabó Péter (DOSZ) Kiadó.
- Morton, L., & Waite, H. (2007). Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea*. APRIL, 2007, 1000–1013.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in enzymology* (Vol. 155, pp. 335–350). Elsevier.
- Nikolaeva, O. V. (2017). Nucleic acid hybridization methods in diagnosis of plant viruses and viroids. In *Molecular Methods in Plant Pathology* (pp. 133–144). CRC Press.
- Nourinejhad Zarghani, S., Hily, J. M., Glasa, M., Marais, A., Wetzel, T., Faure, C., Vigne, E., Velt, A., Lemaire, O., & Boursiquot, J. M. (2018). Grapevine virus T diversity as revealed by full-length genome sequences assembled from high-throughput sequence data. *PLoS One*, 13(10), e0206010.
- Olah, R., Turcsan, M., Jaksa-Czotter, N., Galbacs, Z. N., Olah, K., Sardi, D. N., Plesko, I. M., & Varallyay, E. (2024). First Report of Grapevine Leafroll-Associated Virus 4 Infecting Grapevine in Hungary. *Plant Disease*, 108(7), 2245.
- Pais, M. S. (2019). Somatic embryogenesis induction in woody species: The future after OMICs data assessment. *Frontiers in Plant Science*, 10, 240.
- Pallás, E. I. (2016). A szőlő-és borágazat helyzete, borfogyasztás, borturizmus. Szent István Egyetem (2000-2020).

- Palukaitis, P., & García-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62, 241–323.
- Panno, S., Matic, S., Tiberini, A., Caruso, A. G., Bella, P., Torta, L., Stassi, R., & Davino, S. (2020). Loop mediated isothermal amplification: Principles and applications in plant virology. *Plants*, 9(4), 461.
- Payne, S. (2022). *Viruses: From understanding to investigation*. Elsevier.
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N., & Ravnikar, M. (2017). Next generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids: Comparison of two approaches. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1998.
- Pierce, R. C., & Gohen, A. C. (1998). Rupestris stem pitting. In R. C. Pearson & A. C. Gohen (Eds), *Compendium of Grape Diseases* (p. 53). American Phytopathological Society.
- Pleško, I. M., Marn, M. V., Nyerges, K., & Lázár, J. (2012). First Report of Raspberry bushy dwarf virus Infecting Grapevine in Hungary. *Plant Disease*, 96(10), 1582–1582. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0383-PDN>
- Pocsai, E. (1981). Occurrence of grapevine Bulgarian latent virus in Hungary. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 16(3/4), 349–354.
- Powell, C. A. (1987). Detection of three plant viruses by dot-immunobinding assay. *Phytopathology*, 77(2), 306–309.
- Pumplin, N., & Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 745–760.
- Rakonczás, N. (2014). *Szőlőtermesztés*.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20(1), 1–11.

- Richert-Pöggeler, K. R., & Minarovits, J. (2014). Diversity of latent plant–virus interactions and their impact on the virosphere. In *Plant virus–host interaction* (pp. 263–275). Elsevier.
- Rohály, G. (2001). *Magyar borok könyve*. Akó Kiadó, Budapest.
- Roossinck, M. J. (1997). Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology*, 35(1), 191–209.
- Roossinck, M. J. (2010). Lifestyles of plant viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1548), 1899–1905.
- Roossinck, M. J. (2017). Deep sequencing for discovery and evolutionary analysis of plant viruses. *Virus Research*, 239, 82–86.
- Rosenzweig, M. L., Brown, J. S., & Vincent, T. L. (1987). Red Queens and ESS: the coevolution of evolutionary rates. *Evolutionary Ecology*, 1(1), 59–94.
- Roudine, S., Le Lann, C., Bouvaine, S., Le Ralec, A., & Van Baaren, J. (2023). Can biological control be a strategy to control vector-borne plant viruses? *Journal of Pest Science*, 96(2), 451–470.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Salami, S. A., Ebadi, A., Zamani, Z., & Habibi, M. K. (2009). Incidence of Grapevine Fanleaf Virus in Iran: A Survey Study and Production of Virus-Free Material Using Meristem Culture and Thermo-therapy.
- Saldarelli, P., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Malossini, U., Pirolo, C., Bianchedi, P., & Gualandri, V. (2015). Genetic variability of Grapevine Pinot gris virus and its association with grapevine leaf mottling and deformation. *Phytopathology*, 105(4), 555–563.
- Sanfaçon, H. (2015). Plant translation factors and virus resistance. *Viruses*, 7(7), 3392–3419.

- Savino, V., Boscia, D., & Martelli, G. P. (1985). Incidence of some graft-transmissible virus-like diseases of grapevine in visually selected and heat-treated stocks from Southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 204–207.
- Skiada, F. G., Maliogka, V. I., Katis, N. I., & Eleftheriou, E. P. (2013). Elimination of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars by in vitro chemotherapy. *European Journal of Plant Pathology*, 135(2), 407–414.
- Soltani, N., Stevens, K. A., Klaassen, V., Hwang, M.-S., Golino, D. A., & Al Rwahnih, M. (2021). Quality assessment and validation of high-throughput sequencing for grapevine virus diagnostics. *Viruses*, 13(6), 1130.
- Spilmont, A.-S., Sevin, A.-F., Guinard, J., Beuve, M., Alliaume, A., Marais, A., Faure, C., Candresse, T., & Lemaire, O. (2018). Occurrence of Grapevine Pinot gris virus (GPGV) and Grapevine Leaf Mottling and Deformation (GLMD) syndrome in France: Genetic diversity and field monitoring in diverse viticulture areas. *Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*, Santiago, Chile, 9–12.
- Srinivasan, R., Alvarez, J. M., Bosque-Pérez, N. A., Eigenbrode, S. D., & Novy, R. G. (2008). Effect of an alternate weed host, hairy nightshade, *Solanum sarrachoides*, on the biology of the two most important Potato leafroll virus (Luteoviridae: Polerovirus) vectors, *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Aphididae: Homoptera). *Environmental Entomology*, 37(2), 592–600.
- Szabó, P. (2019). A szőlő szaporítóanyag-előállítás európai és hazai helyzete és technológiája. In *Innováció a Szőlőszaporításban* (pp. 23–45). Szabó Péter (DOSZ) Kiadó.

- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Tarquini, G., De Amicis, F., Martini, M., Ermacora, P., Loi, N., Musetti, R., Bianchi, G. L., & Firrao, G. (2019). Analysis of new grapevine Pinot gris virus (GPGV) isolates from Northeast Italy provides clues to track the evolution of a newly emerging clade. *Archives of Virology*, 164(6), 1655–1660.
- Taschuk, F., & Cherry, S. (2020). DEAD-box helicases: Sensors, regulators, and effectors for antiviral defense. *Viruses*, 12(2), 181.
- Thompson, J. R., Canto, T., Carr, J. P., Pallás, V., & Šafářová, D. (2025). ICTV Virus Taxonomy Profile: Bromoviridae 2025. *Journal of General Virology*, 106(1), 002069.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5), 877–882.
- Turcsan, M., Demian, E., Varga, T., Jaksá-Czotter, N., Szegedi, E., Olah, R., & Varallyay, E. (2020). Hts-based monitoring of the efficiency of somatic embryogenesis and meristem cultures used for virus elimination in grapevine. *Plants*, 9(12), 1782.
- Velasco, L., García, B., Hita, I., & Padilla, V. (2005). Detection of Grapevine virus B associated with rugose wood (corky bark) symptoms in grapevine cv. Napoleon in Murcia (Spain). *Plant Pathology*, 54(2), 264–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01138.x>

- Vigne, E., Marmonier, A., & Fuchs, M. (2008). Multiple interspecies recombination events within RNA2 of Grapevine fanleaf virus and Arabis mosaic virus. *Archives of Virology*, 153(9), 1771–1776.
- Villamor, D. E. V., Ho, T., Al Rwahnih, M., Martin, R. R., & Tzanetakis, I. E. (2019). High throughput sequencing for plant virus detection and discovery. *Phytopathology*, 109(5), 716–725.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 177–206.
- Ward, E., Foster, S. J., Fraaije, B. A., & McCartney, H. A. (2004). Plant pathogen diagnostics: Immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology*, 145(1), 1–16.
- White, J. L., & Kaper, J. M. (1989). A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples. *Journal of Virological Methods*, 23(2), 83–93.
- Whitfield, A. E., Falk, B. W., & Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*, 479, 278–289.
- Wilisiani, F., Tomiyama, A., Katoh, H., Hartono, S., Neriya, Y., Nishigawa, H., & Natsuaki, T. (2019). Development of a LAMP assay with a portable device for real-time detection of begomoviruses under field conditions. *Journal of Virological Methods*, 265, 71–76.
- Zhang, X., Zhang, Q., Cheng, L., Liu, D., Wang, H., Zhou, Y., Ma, L., Wang, J., & Li, F. (2022). A new biotin labeling and high-molecular-weight RNA northern method and its application in viral RNA detection. *Viruses*, 14(12), 2664.
- ZHANG, Z., & Fang, R. E. N. (2021). Elimination of grapevine fleck virus and grapevine rupestris stem pitting-associated virus from *Vitis vinifera* 87-1 by ribavirin combined with thermotherapy. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9), 2463–2470.

## 10. MELLÉKLETEK

M1 A Magyarországon használt szőlőalanyfajták értékmérő tulajdonságainak összefoglalása (Kocsis, 2018)

Alany	Szárma- azása	Filoxéra- ellenállóság	Tolerancia		Hatása a nemesre		Talajhoz való alkalmazkod- ása	Egyéb
			Szárazság	Mész	Növekedési erély	Ásványi táplálkozás		
Teleki 5C	a	jó	gyenge	közepes	közepes- erős	N=gyenge, P,K=közepes	jó szerkezetű talajokat kedveli	–
Teleki Kober 5BB	a	kitűnő	közepes	jó	erős	N,P,K=közepes	jó szerkezetű talajokat kedveli	érést kitolja
Teleki Fuhr SO4	a	kitűnő	gyenge- közepes	közepes	közepes	N=gyenge- közepes, P=közepes, K=közepes	jó szerkezetű talajokat kedveli	hűvösebb klíma
Teleki Kober 125 AA	a	kitűnő	gyenge- közepes	közepes	közepes	N=közepes, P=gyenge- közepes, K=közepes-erős	Mg-hiány jelentkezhet rajta	hűvösebb klíma
Fercal	d	közepes	közepes	kitűnő	erős	N,P=közepes, K=gyenge	magas mész, jó vízgazdál- kodás	hosszabb vegetáció
Georgikon 28	d	jó	kitűnő	kitűnő	gyenge- közepes	N=gyenge, P,K=közepes- erős	meszes, száraz talaj	gyorsan fejlődik
140 Ruggeri	b	kitűnő	kitűnő	kitűnő	erős	N=közepes- erős, P=erős, K=közepes	sekély termőréteg	érés késik
Börner	c	kitűnő	jó	közepes	közepes- erős	N=közepes- erős, P,K=közepes	mély, jó vízgazdál- kodás	lassan fejlődik
3309 Couderc	e	kitűnő	gyenge- közepes	gyenge	közepes- erős	N=közepes- erős, P=gyenge, K=közepes	mély termőrétegű	látens vírus érzékeny, hideg érzékeny
Richter 110	b	kitűnő	kitűnő	közepes	közepes	N=közepes,	sekély, köves talaj	lassan fejlődik

M2 Az alanyültetvények és fajtagyűjtemények mintavételének részletes leírása a kis RNS könyvtárkódok feltüntetésével

Bortermő régió	Ültetvény				Minták							
	Könyvtár kód	Az ültetvény helyszíne	Fajta		Mintázott egyedek		RNS kivonáshoz használt különböző szervek száma					
					egyedek száma	egyedek sorszáma	Idősebb levél*	Fiatal levél*	Hajtáscsúcs	Virágzat	Kacs	
Balaton	1_BSZ	Balatonszárszó	1	Fercal	2	<b>1-2</b>	0	1	1	0	2	
			2	S.O.4	7	<b>3-9</b>	7	7	7	1	7	
	2_BB	Balatonboglár	1	5C	6	<b>1-6</b>	6	5	6	0	5	
			2	125AA	3	<b>7-9</b>	2	3	3	0	1	
Zala	3_FH	Figyháza	1	5C	6	<b>1-6</b>	2	5	5	0	2	
			2	Fercal	6	<b>7-12</b>	2	6	6	0	6	
	4_BH	Becsehely	1	Fercal	8	<b>1-8</b>	3	6	8	0	7	
			1	Ruggeri	2	<b>1-2</b>	0	2	2	0	1	
	5_ZE	Zalaegerszeg	2	Georgikon	2	<b>3-4</b>	0	2	2	0	0	
			3	125AA	3	<b>5-6, 16</b>	2	3	3	0	1	
			4	5BB	4	<b>7-8, 14-15</b>	0	4	4	0	2	
			5	Fercal	3	<b>9-11</b>	0	2	2	0	1	
			6	S.O.4	2	<b>12-13</b>	0	2	2	0	2	
			7	5C	2	<b>17-18</b>	0	2	2	0	1	
	6_ZG	Zalaszentgrót	1	5BB	5	<b>1-5</b>	0	5	5	0	4	
			2	Fercal	4	<b>6-9</b>	0	4	3	0	3	
	Balaton	7_NG	Nemesgulács	1	5BB	5	<b>1-5</b>	0	4	4	0	5
				2	Fercal	2	<b>6-7</b>	0	1	2	0	2
3				S.O.4	3	<b>8-10</b>	0	3	3	0	2	
8_MT		Mogyorósi-Hegy Tapolca	1	Fercal	10	<b>1-10</b>	0	10	9	0	7	
			2	Fercal tünetes	1	<b>11</b>	0	1	1	0	1	
9_MR		Mogyorósi Raposka	1	5C idős	5	<b>1-5</b>	0	5	5	0	4	
			2	Georgikon	1	<b>6</b>	0	1	1	0	1	
			3	Berlandieri	1	<b>7</b>	0	1	1	0	1	
			4	5C fiatal	4	<b>9-12</b>	0	3	4	0	3	
Villány	Villány	1	5BB	7	<b>1-7</b>	0	7	7	0	6		
		2	5C	4	<b>8-11</b>	0	3	4	0	4		
Pécs	11_P	Pécs		*fajtagyűjtemény		<b>34</b>	0	25	29	0	12	
	12_KSZ	Kővágószőlős	1	5C	8	<b>1-6, 15-16</b>	0	8	8	0	4	
			2	Fercal	1	<b>8</b>	0	1	1	0	1	
			3	S.O.4	2	<b>9-10</b>	0	2	2	0	1	
			4	125AA	2	<b>11-12</b>	0	2	2	0	1	
			5	Paulsen	2	<b>13-14</b>	0	2	2	0	2	
			6	Ruggeri	1	<b>17</b>	0	1	1	0	0	
7	Richter	1	<b>18</b>	0	1	1	0	1				
Szekszárd	13_SZ	Szekszárd	1	5BB	3	<b>1-3</b>	0	3	3	0	3	
			2	Fercal	9	<b>4-12</b>	0	8	9	0	9	
Eger	14_AD	Aldebrő	1,5	5C	14	<b>1-10, 15-18</b>	0	12	12	0	10	
			2	5BB	1	<b>11</b>	0	1	1	0	0	
			3	125AA	2	<b>12-13</b>	0	2	2	0	0	
			4	Fercal	1	<b>14</b>	0	1	0	0	1	
Tokaj	15_TC	Tarcal		*fajtagyűjtemény		<b>33</b>	0	31	33	1	20	
	16_TC2	Tarcal 2	1	5C	7	<b>1-7</b>	8	8	10	2	6	
			2	Ruggeri	1	<b>8</b>	0	1	1	0	1	
			3	Harselevelu	1	<b>9</b>	0	7	7	2	5	
	17_LB	Legyesbénye	1	Fercal	3	<b>1-3</b>	0	3	3	0	3	
			2	S.O.4	2	<b>4-6</b>	0	2	2	0	0	
			3	5BB	1	<b>7</b>	0	1	1	0	1	
			4	Börner	2	<b>8-9</b>	0	2	2	0	0	
5			5C	1	<b>10</b>	0	1	1	0	1		
6	Georgikon	2	<b>10-11</b>	0	2	2	0	2				
Mátra	18_AS	Abasár	1,4	5C	5	<b>1-4, 9</b>	0	5	5	0	5	
			2	S.O.4	2	<b>5-6</b>	0	2	1	0	2	
			3	Ruggeri	2	<b>7-8</b>	0	2	2	2	1	
Balaton	19_TB	Beled	1	5BB	8	<b>7</b>	7	11	14	0	0	

M3 Mintavételezett szőlő termő ültetvények alapadatai és a kis RNS könyvtárak elnevezése

Könyvtár név	Ültetvény			
	Bortermő régió	Ültetvény helye	Fajta	Ültetvény kora (év)
1_TK	Sopron	Sopron	Kékfrankos - Blaufränkisch, Lemberger	20
2_PH	Pannonhalma	Pannonhalma	Olasz rizling - Welschriesling	7
3_HT	Neszmély	Neszmély	Chardonnay	14
4_PP	Villány	Villány	Cabernet Sauvignon	16
5_CS	Balatonboglár	Balatonboglár	Csabagyöngye	n
6_MP	Szekszárd	Szekszárd	Merlot	6
7_FP	Kunság		Generosa	4
8_ET	Eger	Eger	Kadarka (vírustesztelt szaporítóanyag)	13
9_SZHT	Tokaj	Szegilong	Fumint	n
10_EH		Erdőbénye	Fumint, régi *	100
11_SZHU		Szegilong	Fumint, új	1
12_DF		Erdőbénye	Fumint, régi*	100
13_BV		Bodrogkisfalud	Régi magyar fajták, ami soha nem voltak vírustesztelve: 1:Purcsin, 2:Balafánt, 3:Sárga Ortliebi, 4:Kék Bakator, 5:Fehér Járdovány	6
14_MK1	Mád		Fumint T85●	törzsállomány, amelyet rendszeresen csak vizuálisan vizsgálnak vírusfertőzöttség szempontjából
15_MK3			Hárslevelű K3●	
16_MK4			Sárgamuskotály●	
17_MK5			Teleki-Kober 125●	
18_MK7			Teleki-Kober 5C●	
			* különböző ültetvények ● ugyanaz az ültetvény, különböző sorok	

## M4 A PCR tesztekhez használt primerek listája

Sorszám	Vírus	Primer neve	Primer szekvencia (5'-3')	Elhelyezkedés a referencia genomon	Amplifikált régió funkciója	Termék mérete (bp)	Referencia genom	Referenciák*
1	GFLV	GFLVfW	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT	5506-5527	RNS1-polyprotein	118	NC_003615	Gambino and Gribaudo, 2006
		GFLVRev	GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG	5623-5602				
2	ArMV	ArMVfW	TGACAACATGGTATGAAGCACA	6127-6148	RNS1-polyprotein	402	NC_006057	Gambino and Gribaudo, 2006
		ArMVRev	TATAGGGCCTTTTCATCAGCAAT	6528-6507				
3	GCMV	Nepo-B s	ATGTGYGCHACYACWGGHATGCA	3818-3840	köpenyfehérje	392	NC_003621	Digiaro et al., 2007
		Nepo-B a	TTCTCTDHAAGAAATGCCTAAGA	4209-4187				
4	GRVfV	GRGVfV-F/3501	CCTGCTGATCGCTGGAGACTCG	3501-3522	polyprotein	1414	NC_034205	Czotter et al., 2018
		GRGVfV-R/4914	CGAAGATTTCGCTGGTACTTCTT	4914-4893				
5	GLRaV1	GLRaV1-10372F	GCTCTATAAACGAACCAACGTC	10372-10394	HSP70	1033	NC_016509	Czotter et al., 2018
		GLRaV1-11404R	CATGTAACCTCAGAGAACATATCG	11404-11382				
6	GLRaV-2	GLRaV-2Fw	GGTGATAACCCGACGCTCTA	14614-14633	köpenyfehérje	543	NC_007448	Gambino and Gribaudo, 2006
		GLRaV-2Rev	CCTAGCTGACGCAGATTGCT	15156-15137				
7	GLRaV-3	GLRaV-3Fw	TACGTTAAGGACCGGACACAGG	13383-13404	köpenyfehérje	336	NC_004667	Gambino and Gribaudo, 2006
		GLRaV-3Rev	TGCGGCATTATCTTCATTG	13718-13699				
8	GVA	GVA6591F	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA	6591-6612	köpenyfehérje	272	NC_003604	Goszczynski and Jooste, 2003
		GVA6862R	TCCAACATACCTGTGGCTC	6862-6843				
9	GVB	GVB H28	GTGCTAAGAAGCTCTTCACAGC	6980-7001	putatív RNS kötő fehérje	460	NC_003602	Minafra and Hadidi, 1994
		GVB C410	ATCAGCAAACACGCTTGAACCG	7439-7418				
10	GFKV	GFKVfW	TGACCAGCCTGCTGTCTCTA	6453-6472	köpenyfehérje	179	NC_003347	Gambino and Gribaudo, 2006
		GFKVRev	TGGACAGGGAGGTGTAGGAG	6631-6612				
11	GFKV	GFK V1/F	GGTCCTCGGCCAGTGAAAAAGTA	5208-5231	replicase	352	NC_003347	Czotter et al., 2018
		GFK C1/R	GGCCAGGTTGTAGTCGGTGTGTC	5559-5536				
12	GSyV-1	SY5922F	CCAATGGGTGCGCACTTGTG	5922-5941	köpenyfehérje	374	NC_012484	Glasa et al., 2015
		SY6295R	ACTTCATGGTGGTGC CGGTG	6295-6276				
13	GSyV-1	GVQ-CPF	TCCCAGCTTCAGGGTGAATT	5689-5708	köpenyfehérje	721	NC_012484	Sabadzanovits et al., 2009
		GVQ-CPR	GCATTGCTGCGCATTGGAGG	6409-6390				
14	GRSPaV	RSPaVfW	GGGTGGGATGTAGTAACTTTTGA	4298-4320	replikáz	155	NC_001948	Gambino and Gribaudo, 2006
		RSPaVRev	GCAAGTGAAATGAAAGCATCACT	4452-4430				
15	GRSPaV	RSPaV-F/6904	AGAGGCACATTTTCATCAAGTCAA	6904-6926	köpenyfehérje	1542	NC_001948	Czotter et al., 2018
		RSPaV-R/8445	TCTGAGCATTKAACYTCAAAG	8445-8423				
16	GPGV	GPG-6609F	GAGATCAACAGTCAGGAGAG	6609-6628	köpenyfehérje	411	NC_015782	Glasa et al., 2014
		GPG-7020R	GACTTCTGGTGCCTTATCAC	7020-7001				
17	GPGV	GPGV 5557F	ACTTATCTGATGGCTCTGATG	5569-5589	RdRP-MP-CP-3'UTR	1653	KU312039	Czotter et al., 2018
		GPGV 7220R	GTTACGTGCTCCTATGAGAC	7221-7202				
18	GPGV	GPGV-10F	CAATTGATCCCGTGTAGTGC	21-40	5'UTR-RdRP	2005	KU312039	Demian et al., 2022
		GPGV-2015R	CAGGTTTCATYTTTGGATTCAAC	2025-2004				
19	GPGV	GPGV5578_F_KpnI	caggtaccATGGCTCTGATGAAGAGGAT	5578-5597	RdRP-MP-CP-3'UTR	1599	KU312039	Demian et al., 2022
		GPGV7177_R_XbaI	tctagaCTACATACTRAATGCACTCTCC	7178-7156				
20	GVT	GPG-526A2	GGATGGATGTATCTCCTGAG	517-536	csak szekvenáláshoz			Demian et al., 2021
		GVT_7630F	GTGTGGTCTCGTTAGGTGC	7630-7649	köpenyfehérje-3'UTR	905	NC_035203	
21	GVT	GVT_8534R	CGGCAAGAGTTCCTCAACTAGC	8534-8515				köpenyfehérje-3'UTR
		GVT-ORF5-F	ATGTAYTACTCYAARGTRATATGG	8132-8155				
22	HSVd	HSVd-F	CTGGGGAATTTCTCGAGTTGCC	1-21	genomiális RNS	302	NC_001351	Farkas et al., 1999
		HSVd-R	AGGGGCTCAAGAGAGGATCCG	302-282				
23	GYSVd-1	GYSVd-1-F	TCACCTCGGAAGGCCGCCCGG	31-51	genomiális RNS	363	NC_001920	Czotter et al., 2018
		GYSVd-1-R	GTGAAACCACAGGAACCACAGG	29-12				
24	AGVd	AGVd	TGGGCACCAACTAGAGGT	1-18	genomiális RNS	370	NC_003553	Guo et al., 2006
		AGVd	GGGCTCAAACAGGGAG	370-353				

# M5 Alanyültetvényekről és alany fajtagyűjteményekről származó kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzésének eredménye

Könyvtár kód	Analízis			Vizsgálatköteles vírusok							Viroidok			Nem vizsgálatköteles vírusok		
	Bioinformatika	GFLV	ArMV	GFLV1	GLRaV2	GLRaV3	GVA	GVb	HSVd	GYSVd-1	AGVd	GRSPav	G5V-1 (SK30)	GPGV	GDeV	
1_BSZ	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 490/173	480/187	242	1096	884	851	333	383	130	62	17	710	270	2922	430/227
		Redundáns 1072/216	1144/322	354	2425	3106	2811	719	573	219	71	34	5225	682	7 385	629/364
	lefedettség	%	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	100	84	41,36	63,73	32,88	95,11	n/a
2_BB	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	3	6	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 314/117	322/119	204	670	597	575	237	278	700	425	6	400	619	850	317/145
		Redundáns 570/151	541/188	296	1651	1711	1812	413	389	420/70	757	7	3074	1217	1 735	424/225
	lefedettség	%	42/11	40/14	22	122	127	134	31	29	3110	559	1	227	90	128
3_FH	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 371/154	392/133	311	932	816	708	260	324	491	52	15	746	388	1031	398/194
		Redundáns 584/195	799/195	435	2249	3915	3051	581	557	106/16	62	20	2155	1007	1 786	547/278
	lefedettség	%	39/13	53/13	29	150	260	203	39	37	706	4	1	143	67	119
4_BH	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 347/136	317/167	193	846	684	656	274	328	195	115	10	674	179	2922	397/177
		Redundáns 529/176	680/262	307	2368	2390	3407	566	482	440	162	14	4419	503	7 385	551/253
	lefedettség	%	31/10	40/16	18	140	141	202	33	29	26	10	1	261	30	437
5_ZE	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 468/184	482/206	360	1138	1116	826	346	438	548	61	26	781	563	1410	450/239
		Redundáns 865/232	1194/455	463	2857	4373	3411	745	721	13299	71	34	2109	1059	2 616	659/355
	lefedettség	%	55/15	77/29	30	183	280	219	48	46	853	5	2	135	68	168
6_ZG	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 585/267	572/238	478	1444	1521	1065	433	555	713	241	24	1151	1062	1367	569/303
		Redundáns 1074/378	2142/348	696	4073	5508	4322	857	1071	26363	878	29	2618	2028	2 743	931/470
	lefedettség	%	50/18	100/16	32	189	256	201	40	50	1226	41	1	122	94	128
7_NG	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 337/148	364/132	220	789	649	575	265	328	170	79	15	466	326	573	344/173
		Redundáns 689/173	628/211	313	1624	1903	1901	497	419	354	116	19	973	628	931	477/249
	lefedettség	%	54/14	49/16	24	127	149	149	39	33	28	9	1	76	49	73
8_MT	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 610/279	624/241	385	1384	1311	1026	460	573	150	60	22	990	426	1633	583/299
		Redundáns 951/389	1396/359	570	3753	4492	4049	904	933	263	86	30	4049	1040	2 827	929/429
	lefedettség	%	48/20	70/18	29	189	226	203	45	47	13	4	2	203	52	142
9_MR	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	7	3	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 615/265	606/250	470	1584	1439	1107	430	534	870	704	22	971	818	1347	642/333
		Redundáns 1162/359	1355/401	621	4269	5526	3797	769	878	37359	15895	25	3751	2181	2 980	992/526
	lefedettség	%	63/19	73/22	34	231	299	205	42	47	2019	859	1	203	118	161
10_V	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 650/232	674/261	1318	1562	1337	1173	439	555	814	446	22	1024	1662	1978	684/366
		Redundáns 1423/313	1282/448	2408	3961	5052	4528	907	976	51017	6370	31	6051	4346	3 978	1192/565
	lefedettség	%	61/13	55/19	103	169	216	194	39	42	2180	272	1	259	186	170
11_P	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	10	5	5	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 4726/2436	1591/1221	1558	1573	3594	2786	603	586	933	1086	522	1153	1229	3110	3887/1055
		Redundáns 32506/15262	9711/8599	2438	3925	9036	6736	1251	921	43140	33714	4446	4271	2432	6 654	24145/8119
	lefedettség	%	144/770	480/434	123	198	456	340	63	47	2179	3703	225	216	123	336
12_KSZ	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	2	11	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 654/271	676/274	806	1647	1709	1791	439	554	822	1042	38	1261	1096	1798	602/353
		Redundáns 1358/381	1840/407	1172	5077	8795	6407	838	995	27020	16024	50	3142	2121	3 538	985/594
	lefedettség	%	47/20	98/22	62	270	468	341	45	53	1437	853	3	167	113	188
13_SZ	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 650/282	661/253	477	1635	1476	1133	465	590	154	81	25	1257	538	2385	650/380
		Redundáns 1222/383	1362/449	699	4566	5599	4773	886	990	258	89	33	7780	1231	4 785	1033/600
	lefedettség	%	46/15	52/17	26	173	212	181	34	38	10	3	1	295	47	181
14_AD	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	8	12	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 508/235	554/196	388	1243	1145	972	386	451	854	898	23	810	910	1227	510/270
		Redundáns 862/287	1064/304	540	3164	3756	3497	705	736	45827	15328	27	5191	1629	2 663	777/409
	lefedettség	%	45/15	55/16	28	165	196	182	37	38	2387	798	1	270	85	139
15_TC	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	9	7	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 489/224	494/179	629	1173	1030	849	398	471	773	429	30	1766	974	3882	471/248
		Redundáns 979/265	850/239	921	2564	3951	2490	715	693	39279	5829	50	4997	1982	10 495	698/374
	lefedettség	%	53/14	46/13	50	140	216	136	39	38	2146	319	3	273	108	573
16_TC2	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	8	3	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 750/389	863/349	1830	1982	1694	1484	584	717	973	457	39	1254	1296	3876	837/468
		Redundáns 1550/544	2252/587	3411	5167	5852	5060	1108	1278	64248	6625	44	8336	3496	10 035	1458/832
	lefedettség	%	66/23	95/25	145	219	248	214	47	54	2722	281	2	353	148	425
17_LB	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	4	5	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 859/373	865/320	614	2137	1854	1572	623	729	436	800	39	1281	601	4032	865/489
		Redundáns 1947/580	2529/536	966	6143	7499	7193	1237	1303	9799	22185	88	6117	1732	9 879	1598/912
	lefedettség	%	83/25	107/23	41	260	318	305	52	55	415	940	4	259	73	419
18_AS	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 702/333	739/299	563	1739	1656	1353	517	654	832	502	28	1187	602	1907	760/410
		Redundáns 1690/486	3284/524	860	5340	7203	6021	964	1248	36467	6489	48	5000	1458	4 688	1284/660
	lefedettség	%	85/25	166/26	43	270	364	304	49	63	1842	328	2	253	74	237
19_TB	CLC kontigok	0	0	0	0	0	0	0	6	4	0	0	0	0	0	
	Vírus találat	Nem redundáns 320/141	323/106	282	872	838	694	256	319	616	625	18	2657	331	1329	324/198
		Redundáns 595/208	623/149	369	2208	2408	2852	423	793	9826	6925	51	4596	752	2 500	509/255
	lefedettség	%	39/14	41/10	24	146	360	188	28	52	648	457	3	303	50	165</



M7 A termő szőlőültetvény-felmérés kis RNS HTS eredményeinek bioinformatikai elemzése a GVT jelenlétének vizsgálatára

Könyvtár kód	Bioinformatikai elemzés	GVT_ref	GVT_cons	RT-PCR	Könyvtár kód	Bioinformatikai elemzés	GVT_ref	GVT_cons	RT-PCR		
1_TK	vírus specifikus kontigok száma	0	0	10/10	11_SZHU	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/5		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR	1929 136			2767 195	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR		452 40	456 40
	genom lefedettség	%	64			70	genom lefedettség	%		31	20
2_PH	vírus specifikus kontigok száma	0	0	9/10	12_DF	vírus specifikus kontigok száma	0	1	8/8		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR	952 87			1002 92	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR		1155 132	1266 144
	genom lefedettség	%	40			30	genom lefedettség	%		41	44
3_HT	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/10	13_BV	vírus specifikus kontigok száma	1	1	5/5		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR	604 54			592 52	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR		600 67	739 83
	genom lefedettség	%	30			20	genom lefedettség	%		39	40
4_PP	vírus specifikus kontigok száma	0	0	7/10	14_MK1	vírus specifikus kontigok száma	0	0	2		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR	585 57			575 56	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR		977 112	1033 118
	genom lefedettség	%	31			22	genom lefedettség	%		43	41
5_CS	vírus specifikus kontigok száma	0	0	1	15_MK3	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR	607 68			635 71	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR		559 57	661 67
	genom lefedettség	%	43			32	genom lefedettség	%		24	28
6_MP	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/10	16_MK4	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR	554 63			490 56	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR		340 37	287 31
	genom lefedettség	%	41			27	genom lefedettség	%		31	17
7_FP	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/10	17_MK5	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR	340 42			313 38	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR		306 28	370 34
	genom lefedettség	%	25			15	genom lefedettség	%		16	10
8_ET	vírus specifikus kontigok száma	0	0	10/10	18_MK7	vírus specifikus kontigok száma	1	1	1		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR	885 93			1063 112	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR		607 69	831 94
	genom lefedettség	%	58			52	genom lefedettség	%		44	40
9_SZHT	vírus specifikus kontigok száma	1	1	4(5)/5	10_EH	vírus specifikus kontigok száma	0	0	4(5)/5		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR	2233 216			2361 228	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns RPMR		1122 102	1348 123
	genom lefedettség	%	54			53	genom lefedettség	%		46	46

Megjegyzés: az RPMR a vírusspecifikus redundáns olvasatok száma / egymillió szekvenált olvasat angol rövidítése. A GVT\_ref oszlop a GVT referencia-genomjára illesztett olvasatok alapján kapott eredményeket tartalmazza, míg a GVT\_cons oszlop a 27 teljes hosszúságú GVT genomszekvencia alapján szerkesztett konszenzus szekvenciára illesztett olvasatokból származó eredményeket mutatja. A szürke háttérrel jelölt cellák a pozitív GVT-találást mutató mintákat jelzik, míg az RT-PCR oszlopban a pozitív reakciók száma látható.

M8 A szőlő alanyültetvény felmérés kis RNS HTS eredményeinek bioinformatikai elemzése a GVT jelenlétének vizsgálatára.

Könyvtár kód	Bioinformatikai elemzés	GVT_ref	GVT_cons	RT-PCR	Könyvtár kód	Bioinformatikai elemzés	GVT_ref	GVT_cons	RT-PCR		
1_BSZ	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/2	11_P	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0(3)/34		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns	1801			1830	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns		1979	3254
		RPMR	92			94		RPMR		100	164
	genom lefedettség	%	59,5			45	genom lefedettség	%		76	52,5
2_BB	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/3	12_KSZ	vírus specifikus kontigok száma	0	0	1/7		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns	1128			1227	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns		1676	2423
		RPMR	83			91		RPMR		89	129
	genom lefedettség	%	50			35	genom lefedettség	%		75	51
3_FH	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/2	13_SZ	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/2		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns	1063			1075	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns		2282	2385
		RPMR	71			71,5		RPMR		86	90
	genom lefedettség	%	58			39	genom lefedettség	%		75,5	53
4_BH	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/1	14_AD	vírus specifikus kontigok száma	0	1*	0/5		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns	1349			1274	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns		1711	1805
		RPMR	80			75		RPMR		89	94
	genom lefedettség	%	60			38	genom lefedettség	%		68,5	49
5_ZE	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/7	15_TC	vírus specifikus kontigok száma	0	0	10/33		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns	1166			1821	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns		2176	3812
		RPMR	74			116		RPMR		119	208
	genom lefedettség	%	67			49	genom lefedettség	%		65	45
6_ZG	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/2	16_TC2	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/2		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns	1440			1527	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns		2585	3933
		RPMR	67			71		RPMR		110	167
	genom lefedettség	%	71,5			48	genom lefedettség	%		77	59
7_NG	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/3	17_LB	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/6		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns	973			1006	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns		2470	2680
		RPMR	76			78		RPMR		105	114
	genom lefedettség	%	51,5			34	genom lefedettség	%		80	60
8_MT	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/1	18_AS	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/4		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns	1905			1843	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns		2255	4300
		RPMR	96			92		RPMR		114	217
	genom lefedettség	%	70,5			49	genom lefedettség	%		77	56
9_MR	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/4	19_TB	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/8		
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns	1604			1680	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns		850	899
		RPMR	87			91		RPMR		56	59
	genom lefedettség	%	71,5			45	genom lefedettség	%		62	43
10_V	vírus specifikus kontigok száma	0	0	0/2	*Vitis vinifera találat						
	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns	1909		1971	vírus specifikus read-ek száma	Redundáns	850	899		
		RPMR	81		84		RPMR	56	59		
	genom lefedettség	%	72		51	genom lefedettség	%	62	43		

Magyarázat: az RPMR a vírusspecifikus redundáns olvasatok száma / egymillió szekvenált olvasat angol rövidítése. A GVT\_ref oszlop a GVT referencia-genomjára illesztett olvasatok alapján kapott eredményeket tartalmazza, míg a GVT\_cons oszlop a 27 teljes hosszúságú GVT genomszekvencia alapján szerkesztett konszenzus szekvenciára illesztett olvasatokból származó eredményeket mutatja. A szürke háttérrel jelölt cellák a pozitív GVT-találatot mutató mintákat jelzik, míg az RT-PCR oszlopban a pozitív reakciók száma látható.

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel és hálával tartozom témavezetőmnek, Várallyay Évának, a doktori munka teljes időszaka alatt nyújtott szakmai iránymutatásért, türelemért és támogatásért. Segítsége, bizalma és elhivatottsága nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.

Köszönöm a volt Diagnosztika csoport munkatársainak, Jaksa-Czotter Nikolettának, Nagyné Galbács Zsuzsannának, Pesti Rékának és Baráth Dánielnek a közös munkát, a szakmai együttműködést és azt a támogató, jó hangulatú légkört, amelyben a mindennapi munka zajlott.

Köszönöm a volt Növényi Fejlődésbiológia csoport munkatársainak is a közös munkát, valamint a szakmai támogatást és segítséget, amely hozzájárult a kutatás előrehaladásához.

Hálás vagyok a Biológiai Tudományi Doktori Iskola és a Habilitációs Központ munkatársainak a háttérmunkáért, az adminisztratív támogatásért és a mindenkori segítőkészségért.

Köszönöm jelenlegi munkatársaimnak a megértést, a türelmet és a támogatást, amelyet a doktori munka befejezése során kaptam.

Külön köszönet illeti Salamon Pált (Pali bácsit) a szakmai és baráti támogatásért, az emberi odafordulásért és a biztatásért.

Végül, de nem utolsósorban, köszönöm a családomnak a türelmet, a kitartást és a folyamatos biztatást, amely végigkísérte ezt az utat, és amely nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre

## Hallgatók, doktoranduszok nyilatkozata mesterséges intelligencia (MI) alkalmazásáról

### 1. Általános adatok

Hallgató neve:	Demián Emese
Neptun-kódja:	AAATPK
Képzési szint (a megfelelőt jelölje X-szel):	<input type="checkbox"/> BSc/BA <input type="checkbox"/> MSc/MA <input checked="" type="checkbox"/> Doktori (PhD) <input type="checkbox"/> Egyéb: .....
Tantárgy neve/kódja*:	
A munka címe:	Szőlőültetvények virológiai vizsgálata kis RNS alapú nagy áteresztőképességű szekvenálással, valamint a Grapevine Pinot gris vírus új gazdanövényeinek azonosítása Magyarországon

\* doktori értekezés esetén nem kitöltendő

### 2. Nyilatkozat az MI használatáról

Alulírott, etikai felelősségem teljes tudatában az alábbi nyilatkozatot teszem:

(Kérjük, válasszon egyet az alábbi lehetőségek közül!)

A) Nem alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Amennyiben ezt jelölte, a további táblázatok kitöltése nem szükséges.)

B) Alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Kérjük, töltsse ki a vonatkozó táblázatokat!)

### 3. A mesterséges intelligencia használatának részletezése

I. TÁBLÁZAT: Asszisztensi vagy kisebb mértékű felhasználás (pl. fordítás, nyelvi korrekció, ötletelés stb.)

(Ezen felhasználások esetében a konkrét promptok és válaszok csatolása nem szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve és verziója	Érintett rész (ha nem a szöveg egészére vonatkozik)
fordítás, nyelvi és stilisztikai támogatás, ötletelés	ChatGPT (OpenAI, GPT-4 alapú modell)	A disszertáció szövegének egyes részei

II. TÁBLÁZAT: Jelentős tartalmi hozzájárulás (pl. egy teljes ábra vagy egy hosszabb szövegrész generálása)

(Ezekben az esetekben a felhasznált kulcsfontosságú promptok és az MI által adott nyers válaszok dokumentálása és a munka **mellékletében való csatolása szükséges.**)

A felhasználás célja	Alkalmazott eszköz verziója, elérhetősége	MI-neve,	Az érintett fejezet / ábra / táblázat pontos sorszáma	A prompt-naplót tartalmazó melléklet bejegyzésének sorszáma

### 3/A. Oktató által előírt kiegészítő szabályok (ha vannak)

Amennyiben az adott tantárgy oktatója vagy témavezetője az MI-eszközök használatára vonatkozóan külön szabályokat vagy elvárásokat határozott meg, kérjük, az alábbi mezőben foglalja össze ezeket:

*Pl. az MI használatának tilalma bizonyos feladattípusokra; csak konkrét eszköz használata engedélyezett; eltérő hivatkozási elvárások; dokumentációs forma stb.*

Oktató vagy témavezető által előírt szabályok:

.....  
.....  
.....  
.....


### 4. Minden hallgatóra vonatkozó nyilatkozat:

Kijelentem, hogy az MI által esetlegesen generált tartalmakat minden esetben kritikailag felülvizsgáltam, szerkesztettem és a munkába illesztettem. A leadott munka minden eleméért, annak eredetiségéért és tudományos helytállóságáért teljes körű felelősséget vállalok. Tudomásul veszem, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem a benyújtott munkát mesterséges intelligencia detektorral ellenőrizheti, és eljárást kezdeményezhet, amennyiben a nyilatkozatom valótlan vagy hiányos.

Kelt: Gödöllő, 2026. ....február..... hó ...08. ... nap

.....  


Hallgató aláírása

.....  


Konzulens/Témavezető aláírása