



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Vírusmentesítési eljárások fejlesztése a szőlő
szaporítóanyag előállításban

Doktori (PhD) értekezés
tézisei

Turcsán Mihály

Budapest

2025

A doktori iskola megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola
tudományága: Növénytermesztés és kertészet

vezetője: Zámboriné Dr. Németh Éva
Tanszékvezető, egyetemi tanár, DSc
MATE
Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezetők: Dr. Oláh Róbert
tudományos tanácsadó, PhD
MATE
Szőlészeti és Borászati Intézet
Kecskeméti Kutatóállomás

Dr. Deák Tamás
egyetemi docens, PhD
MATE
Szőlészeti és Borászati Intézet
Szőlészeti Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető(k) jóváhagyása

1. BEVEZETÉS

A szőlőt számos patogén fertőzheti, köztük a viroidok, vírusok, fitoplazmák, baktériumok és gombák is. A felsorolt csoportokba tartozó patogének közül több látens formában is fertőzhet, amely fertőzött szaporítóanyag használata esetén elősegíti terjedésüket más ültetvényekre, ezért kritikus fontosságú a patogéntesztelt szaporítóanyag használata. Jelenleg nem létezik megfelelően kidolgozott módszer arra, hogy az ültetvényekben a szaporítóanyaggal terjedő kórokozók által okozott betegségek megjelenése után sikeresen tudjunk védekezni, így sok esetben a fertőzésekben érintett tőkék kondíciója csökken, és növényegészségügyi vagy gazdasági okok miatt gyakran kivágásra kerülnek. Ezek a patogének komoly gazdasági károkat okozhatnak, mivel a termés mennyiségét és minőségét is hátrányosan befolyásolhatják. A gazdasági károk minimalizálása érdekében a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Szőlészeti és Borászati Intézetének Kecskeméti Kutatóállomásának jogelődjében már a 60-as évektől folyt meghatározott vírusok kimutatása biotesztek alkalmazásával, majd ezt követte az adott vírusoktól mentesített kiindulási és prebázis állományok létrehozása, amelyben Lehoczky Jánosnak meghatározó szerepe volt. Ugyanitt napjainkban is magas minőségű szaporítóanyag előállítás, illetve patogéntesztelt kiindulási és prebázis állományok fenntartása zajlik izolált és szabadföldi körülmények között is. A zárlati károsítóktól mentes státusz elérése fontos kritérium, hiszen ezen kórokozók tünetét mutató fajták/klónok a Nemzeti Fajtajegyzékbe sem kerülhetnek be (87/2006. (XII.28.) FVM rendelet). A munka éppen ezért nagy jelentőséggel bír, ugyanis a hagyományos és molekuláris szelekció során kiválasztott, valamint keresztezéses módszerekkel előállított új fajták gyakran több vírussal és viroiddal is fertőzöttek lehetnek, ami komoly tünetek megjelenését is eredményezheti.

Az elmúlt évtizedekben a kutatók számos módszert dolgoztak ki a különböző kórokozók eltávolítására. A gombák és a fitoplazmák koncentrációjának csökkentésére az egyszerűen kivitelezhető melegvizes kezelés is alkalmas, míg a vírusok és viroidok eltávolítása csak bonyolultabb szövettenyésztési módszerekkel érhető el. Ilyenek a merisztéma tenyészetek, a szomatikus embriogenezis és az ezeket kiegészítő kemoterápia is. Ezek az eljárások más és más mechanizmus alapján hatnak, így eltérő hatékonysággal alkalmazhatók a különböző szőlővírusok és viroidok eltávolítására. A vírusmentesítési protokollok fejlesztésére folyamatos igény van, akár a felhasznált szövet típusok milyensége, akár a felhasznált antivirális szerek tekintetében. A vírusmentesítési folyamat hosszának csökkentése fontos tényező, ugyanis ezzel növelhető az adott időintervallum alatt előállítható egészséges növényegyedek száma is.

A merisztémák regenerációs ideje lényegesen hosszabb, mint a nagyobb hajtáscsúcsoké, így utóbbiak alkalmazásával idő spórolható, de ilyenkor különböző kiegészítő kezelések is szükségesek lehetnek. Ilyen a hőterápia, a krioterápia vagy az antivirális szerekkel végzett kemoterápia is. Az antivirális szereknek a növényekre nézve sokszor negatív hatásaik is vannak

(pl. klorózis, növekedésgátlás, pusztulás), amelyeket felhasználásuk közben figyelembe kell venni. A kezelt szövettípusnak, a kezelés hosszának és a vegyszer koncentrációjának megválasztása is nagy körültekintést igényel. A szomatikus embriogenezis vírusmentesítési hatása bizonyított, de a portok és ovárium alapú tenyészetek létesítése csak a virágzatok meglétekor kivitelezhető és ha nem járunk sikerrel, akkor más módszerek alkalmazására van szükség.

A különböző módon regenerált növényegyedek vírusmentességét ellenőrizni szükséges. Erre a célra az enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) és a polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction – PCR) alapú módszerek a legelterjedtebbek. Utóbbi esetében a növényegyedeinkből izolált nukleinsav meglétéről és minőségéről meg kell bizonyosodnunk. Ehhez megbízható referenciagént kell választanunk, amely előzetes kísérletek elvégzését teszi szükségessé.

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkám egyik fő célja volt a szövettenyésztési módszerek és a patogénmentesítésben felhasználható egyéb technológiai lehetőségek optimális kombinációjának kidolgozása. A merisztéma tenyésztés és a szomatikus embriogenezis a korábbi RT-PCR és ELISA vizsgálatok szerint hatékony vírusmentesítési módszerek, de utóbbi hatékonyságát munkám megkezdésekor még nem vizsgálták érzékenyebb technikák alkalmazásával, ezért a szomatikus embriogenezis vírus- és viroidmentesítésben való hatékonyságát terveztem vizsgálni a kis RNS-ek nagy áteresztőképességű szekvenálásának segítségével, ami így átfogóbb képet adhat a módszer jelentőségéről. Ezen kívül terveztem összehasonlítani a két módszer hatékonyságát is.
2. A 0,2 mm-nél kisebb szőlő hajtáscsúcs-merisztémákból csak 0,5-10%-ban regenerálódnak hajtások. Tapasztalataink alapján 2 mm-es *in vitro* hajtáscsúcsok regenerációs képessége ezzel szemben akár 100% is lehet, de vírusmentesítésre ez a méret önmagában nem alkalmas. Erre a problémára a szakirodalomban már publikált antivirális szerek (pl. ribavirin, zidovudin, 2-thiouracil) jó lehetőséget kínálhatnak, ugyanis alkalmazásukkal kikerülhető a bonyolult és sokszor körülményes merisztématenyészetek használata. Munkám következő célja volt tehát a ribavirin vírusmentesítési hatásának vizsgálata nagy számú növényen, valamint, hogy elsőként kísérleljem meg a 2-thiouracil és a zidovudin szőlő vírusmentesítésére való alkalmazását.
3. A vírusmentesítésen átesett növények tesztelése kulcsfontosságú, amire az RT-PCR alkalmas módszer. Ehhez megfelelő mennyiségű és minőségű nukleinsavból történő sikeres cDNS (copy DNS) szintézis szükséges, így lehetőség nyílik az RNS genommal rendelkező kórokozók kimutatására is. Ennek ellenőrzésére számos referenciagén primer van használatban, de ezek alkalmazása során nem egyértelmű a keletkezett PCR termék eredete. Erre a célra olyan egy vagy több intront tartalmazó génszakaszra specifikus háztartási gén primereket terveztem tesztelni, amik eltérő méretű fragmentumot amplifikálnak a genomi DNS-ről (gDNS) és a cDNS-ről, hiszen az mRNS-ekből az érési folyamat során az intronok kivágódnak, míg a gDNS-ről az intronokat is tartalmazó, hosszabb szakasz amplifikálódik.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Felhasznált növényanyagok

A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyésztéssel kapcsolatos kísérletek növényanyaga

Ennél a kísérletnél három *Vitis vinifera* szőlőfajtaival dolgoztam: Az ‘Ottonel muskotály’ H.7-3 és ‘Ottonel muskotály’ H.14-1 klónjaival, valamint ‘Trilla’ és ‘Szirén’ fajtákkal. Merisztéma tenyésztéshez az *in vitro* növények hajtáscsúcsát, szomatikus embriogenezishez a szabadföldi növények virágzatából izolált portokokat használtam fel.

Kemoterápiás kísérletekhez felhasznált növényanyag

Az antivirális szerekkel történő kemoterápia során három szőlő fajtahoz tartozó klónokkal dolgoztam, amelyek növényvonalait a vírusfertőzöttségük függvényében választottam ki: A ‘Furmint’ P51 klón A1 és ÜH2 vonalaival, a ‘Kadarka’ P131 klón A1 vonalával és ‘Sárfehér’ A1 vonalával. A kiválasztott genotípusok vírusfertőzöttségét a kísérlet kezdetén üvegházi kiindulási növények leveléből vett mintákon először kis RNS szekvenálással térképeztük fel, majd RT-PCR-rel is ellenőriztem. Ezt követően a kiindulási növények hajtásait felületi fertőtlenítést követően *in vitro* kultúrák létrehozására használtam fel. Az így nevelt *in vitro* növényeket mikroszaporítottam, majd a vírusfertőzöttségüket újra ellenőriztem RT-PCR-rel. A különböző antivirális szerekkel történő kezelést minden esetben a felsorolt klónok *in vitro* növényeinek 1-2 cm-es hajtásvégeit felhasználva végeztem el.

Referenciagénekkel kapcsolatos kísérletek növényanyaga

Ebben a kísérletben 24 (7 alany és 17 nemes) szőlőfajtaival dolgoztam: *V. berlandieri* × *V. riparia* ‘Teleki 5C’, *V. berlandieri* × *V. riparia* ‘Teleki-Fuhr S.O.4’, *V. berlandieri* × *V. riparia* ‘Teleki Kober-5BB’, (*V. berlandieri* × *V. riparia*) × *V. vinifera* ‘Georgikon 28’, *V. riparia* × *V. cinerea* ‘Börner’, *V. berlandieri* × *V. rupestris* ‘Ruggieri 140’, *V. berlandieri* × *V. rupestris* ‘Richter 110’, ‘Kövidinka’, ‘Sárfehér’, ‘Kunleány’, ‘Miklóstelep 7’, ‘Kadarka’, ‘Kék bakator’, ‘Juhfark’, ‘Neoplanta’, ‘Pintes’, ‘Zefír’, ‘Furmint’, ‘Esther’, ‘Ottonel muskotály’, ‘Olasz rizling’, ‘Vulcanus’, ‘Zervin’ és ‘Piros bakator’. A felsorolt fajták felhasznált szövetei a következők voltak:

- *in vitro* növények levele
- szabadföldi növények levele és levélnyele
- szabadföldi, nyugalmi állapotban lévő vesszők hánckaparéka

Az *in vitro* kultúrák létrehozása

A folyamatot a begyűjtött fajták fás vesszőinek melegvizes kezelésével kezdtem, amelynek során 51 °C-on 30 percig inkubáltam azokat. Ezt követően a vesszőket feldaraboltam és egyrügyes

dugványokat készítettem belőlük. Ezeket gyökeresedés céljából perlittel töltött műanyag poharakba dugványoztam és csapvízzel öntöztem őket. A rügyekből fejlődő zöld hajtások kb. 1 cm-es csúcsait leválasztottam és 70%-os etil-alkohol oldatban történő 30 másodperces öblítést követően 8 percig nátrium-hipoklorit tartalmú vizes oldatban (1% NaOCl és 0,1% Tween 20) áztattam, majd háromszor steril desztillált vízben lemostam azokat. Ezek után a hajtásokról szabad szemmel nagyjából 0,5 cm nagyságú hajtáscsúcsokat preparáltam és növényi növekedésszabályozók (metatopolin - mT vagy benziladenin - BA) segítségével szárnövekedést indukáltam fél mennyiségű makroelemet tartalmazó MS (fél-MS) táptalajon. A hajtásokat növekedésüket követően hormonmentes MS táptalajra helyeztem gyökeresedés céljából. Az *in vitro* növények fenntartása fényszobai körülmények között 25 °C-on történt folyamatos, havi rendszerességű mikroszaporítás kíséretében.

Kísérletek intront tartalmazó génszakaszra specifikus referenciagén primerekkel

A referenciagénekkel kapcsolatos kísérletekhez először a *18S rRNS*-re specifikus primer párral végeztem RT-PCR-t 24 szabadföldi szőlő levélmintán. Ehhez a levelekből izolált nukleinsavat és az abból szintetizált cDNS-eket is felhasználtam. Következő lépésben ugyanezt a *PEP* gén intront tartalmazó génszakaszára specifikus primer párral is elvégeztem, majd az eredményeket összehasonlítottam.

Ezután 4 további, intront tartalmazó referenciagénszakaszra specifikus primer párt (*aktin*, *EF1α*, *GAPDH*, *tubulin*) teszteltem ugyanezen 24 szőlőfajtán. Ezt követően a megbízhatóan működő primer párokat 12 szőlőfajta különböző szöveteiből származó mintákon (*in vitro* levél, szabadföldi levél és levélnyél, hánckaparak) is teszteltem.

Alkalmazott vírusmentesítési módszerek

Merisztéma kultúrák

A 0,1-0,5 mm-es mérettartományba eső merisztémákat Petri-csészében lévő 30 g/l szacharózt és 1 mg/l mT-t tartalmazó fél-MS táptalajra helyeztem. A Petri-csészéket alufóliába csomagoltam és a merisztémákat 3 napig sötétben tartottam. A növekvő, de még gyökérrel nem rendelkező hajtásokat ugyanolyan összetételű, de már csak 0,2 mg/l mT-t tartalmazó fél-MS táptalajra helyeztem át, hogy a gyökeresedés megindulhasson. Ezt követően a gyökeresedő, független növényvonalakat hormonmentes 10 g/l szacharózt tartalmazó fél-MS táptalajra helyeztem és szaporítottam.

Szomatikus embriogenezis

A szomatikus embriogenezis kivitelezése az Oláh et al. (2009) által leírt módon történt. A kísérletben részt vevő négy szabadföldi anyanövény virágzatait felületileg sterilizáltuk a korábban

már az *in vitro* kultúrák létrehozásánál leírt módon. A virágzatokat ezt követően felnyitottuk és a portokszállal kapcsolt portokokat szilárd, kalluszindukciós MST táptalajra helyeztük, amely 0,05 mg/l thidiazuront (TDZ), 1,1 mg/l 2,4-D-t, 20 g/l szacharózt és szilárdító ágensként 5 g/l agart tartalmazott. A portok kultúrákat ezek után 24 °C-on, sötétben inkubáltuk. Később az embriogén jelleget mutató kalluszokat átraktuk 1 g/l aktív szenet tartalmazó MSAc táptalajra, amely már csak 10 g/l szacharózt és 3 g/l gelritet tartalmazott. Végül a képződő embriókból regenerálódó független hajtásokat egyenként, ugyanezen MS táptalajra helyeztük és szaporítottuk.

Növényi kemoterápia

A különböző antivirális szereket az 1. táblázatban feltüntetett koncentrációban alkalmaztam a kiválasztott fajták/klónok hajtásainak kezelésére. A kezelt növényekről ezt követően 2 mm-es hajtáscsúcsokat választottam le és ezekből növényeket regeneráltam. Az így előállított növények leveléből izolált nukleinsavat felhasználva RT-PCR-rel teszteltem azokat a kiindulási anyagban korábban már kimutatott vírusokra/viroidokra.

1. táblázat: A kijelölt fajták/klónok antivirális szerekkel történő kezelése

Fajta/klón	Kezelés	Alkalmazott koncentráció
‘Sárfehér’ A1	Ribavirin	25 mg/l
	Zidovudin	10, 20, 30, 40, 80, 120 mg/l
	2-thiouracil	5, 10, 15, 20 mg/l
	GY + 2-thiouracil	10, 20 mg/l
‘Furmint’ P51 A1	Ribavirin	25 mg/l
	2-thiouracil	20 mg/l
	Ribavirin + Zidovudin	25 mg/l + 50 mg/l
‘Furmint’ P51 ÜH2	Ribavirin	25 mg/l
	Ribavirin + Zidovudin	25 mg/l + 50 mg/l
	GY + 2-thiouracil	20 mg/l
‘Kadarka’ P131 A1	Ribavirin	25 mg/l
	GY + Ribavirin	25 mg/l
	Zidovudin	50 mg/l
	GY + 2-thiouracil	10 mg/l

GY – a kezelésre kijelölt hajtások előgyökereztetése 0,8 mg/l IBA hormonnal fél-MS táptalajon

Nukleinsav-izolálás és cDNS szintézis

A tesztelni kívánt növényekből származó szövetekből 50 mg-t használtam fel nukleinsav izolálásra. A folyamat során a Xu et al. (2004) által leírt CTAB alapú módszert követtem. A tiszta nukleinsavat végül 100 µl steril desztillált vízben oldottam fel, majd felhasználásig -80 °C-on tároltam.

A cDNS szintézist a RevertAid First cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K1622) felhasználásával kiviteleztem és a mellékelt protokoll alapján dolgoztam.

Felhasznált vírusdiagnosztikai módszerek

RT-PCR

A PCR reakciót a DreamTaq DNA Polymerase Kit (Thermo Scientific, #EP0703) felhasználásával végeztem el. A reakcióelegyet a gyártó leírása alapján mértem össze. A vírusmentesítéssel kapcsolatos kísérletekhez már bizonyítottan vírusfertőzött növények cDNS-ét használtam pozitív kontrollnak, míg nullkontrollként steril desztillált vizet adtam a reakcióhoz. Ezután a mintákat a PCR készülékbe helyeztem, ahol a reakció az 2. táblázatban leírt ciklusokon ment végig.

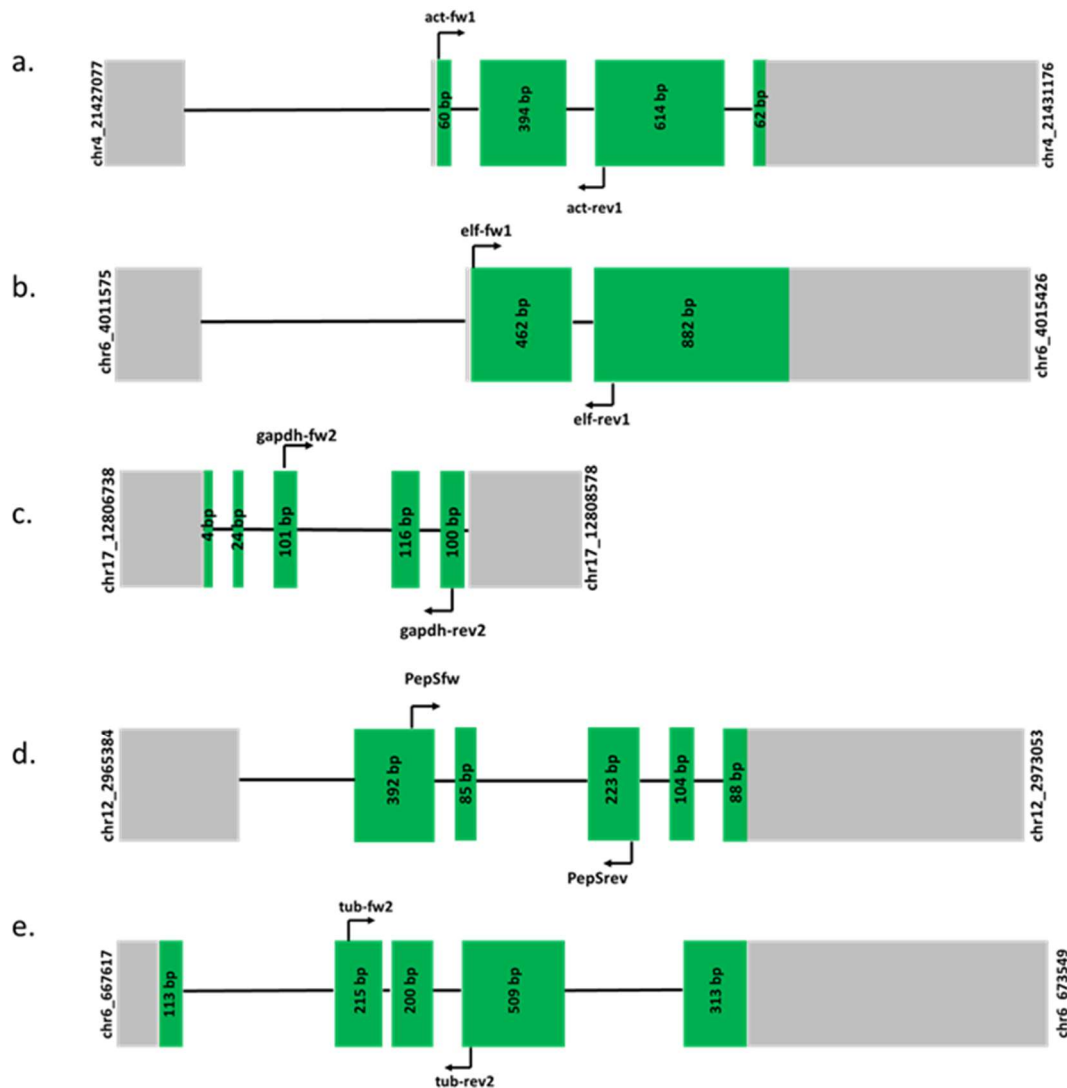
2. táblázat: Az RT-PCR programok lépései és időtartamuk

Folyamat	Hőmérséklet	Időtartam (perc)
Elődenaturáció	94 °C	3:00
Denaturáció	94 °C	0:30
Primer kötődés	50-60 °C	0:30
Lánchosszabbítás	72 °C	0:30-1:30
Végső lánchosszabbítás	72 °C	3:00

A patogének kimutatását megelőzően a nukleinsav minőségének és a cDNS szintézis sikerességének ellenőrzésére a kísérletek során több referenciagénre specifikus primer párt is használtam, amelyek felsorolása a 3. táblázatban található. Az *aktin*, *EF1α*, a *GAPDH*, *PEP* és a *tubulin* génekre olyan primereket használtunk, amelyek egy vagy két intront tartalmazó génszakaszra specifikusak (1. ábra)

3. táblázat: A kísérletek során felhasznált referenciagén primerek

Gén	Primer neve	Szekvencia (5'-3')	Referencia
18S rRNS	18S rRNA_Fw	CGCATCATTCAAATTTCTGC	Gambino & Gribaudo 2006
	18S rRNA_Rev	TTCAGCCTTGCGACCATACT	
aktin	act-fw1	GGCCGATACTGAAGATATCCAG	Jelen munka
	act-rev1	ACCAGAATCCAGCACAAATACC	
EF1α	elf-fw1	GGGTAAGGAGAAGGTTTCACATC	Jelen munka
	elf-rev1	TGCCTTGGAGTACTTTGGTG	
GAPDH	gapdh-fw2	GCAGTCAACGATCCATTCATC	Jelen munka
	gapdh-rev2	AGCCTTGTCTTGTCTCAGTG	
PEP	PepS2fw	GTCCTTACAGCACATCCTACTC	Jelen munka
	PepS2rev	CCCACCCATCCAAGAAGAAA	
tubulin	tub-fw2	CACGATGCTTTCAACACCTTC	Jelen munka
	tub-rev2	CTTCATTGTCCAAGAGCACAG	



1. ábra: Az intront tartalmazó referenciagénszakaszokra specifikus primerek elhelyezkedése az érintett *Vitis vinifera* kromoszómákon.

Az *aktin* génre specifikus (a.), az *EF1α* génre specifikus (b.), a *GAPDH* génre specifikus (c.), a *PEP* génre (d.) és a *tubulin* génre specifikus (e.) primer párok helye az érintett kromoszómákon. A zöld mezők a génen belüli exonokat, a fekete vonalak az intronokat jelölik. A szürke mezők a 5' upstream és a 3' downstream szekvenciák, amelyek az érintett szekvenciákon kívül esnek.

kis RNS-ek nagy áteresztőképességű szekvenálása

Ehhez a szekvenálási módszerhez először kis RNS könyvtárakat kellett készítenem. A négy üvegházi anyanövényről fiatalabb és idősebb leveleket, kacsokat és hajtáscsúcsokat szedtem le, majd nukleinsav kivonást végeztem a Gambino & Gribaudo (2008) által leírt módon.

A nukleinsav kivonást követően RNS mintakeverékeket (poolokat) hoztam létre, amelyek minden növény esetében a különböző szöveti eredetű minták keverékét tartalmazták egyforma koncentrációban. A mintákat ezután urea tartalmú (8%) poliakrilamid gélen futtattam, majd a kis RNS frakciókat kivágtam és tisztítottam. A kis RNS könyvtár készítést innentől az „Illumina TruSeq Small RNA Library Prep Reference Guide (# 15004197 v02)” leírása alapján végeztem el.

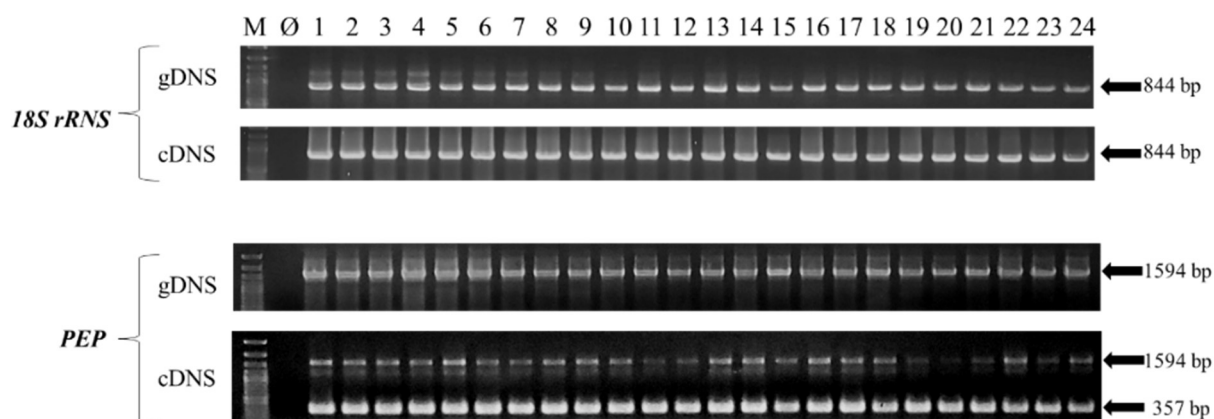
Végül kis RNS könyvtárakat szekvenálásra küldtük. A szekvenálást követően kapott FASTQ kiterjesztésű fájlokat a CLC Genomics Workbench (Qiagen) program segítségével értékeltük ki.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

A referenciagénekkel kapcsolatos kísérletek

Konvencionális és intront tartalmazó referenciagén-szakaszra specifikus primer párok

A széleskörűen használt *18S rRNS* primer párral és az intronokat tartalmazó *PEP* génszakaszra specifikus primer párral végzett RT-PCR-t követően elmondható, hogy utóbbi cDNS templát esetében egy rövidebb fragmentumot is amplifikál, mivel a cDNS szintézis templáját adó RNS érése során az intronok kivágódnak. A gDNS eredetű fragmentum ugyanakkor továbbra is jelen van a gélen, mivel a cDNS szintézishez használt mintában lévő maradék gDNS-ről továbbra is történhet átírás (2. ábra).



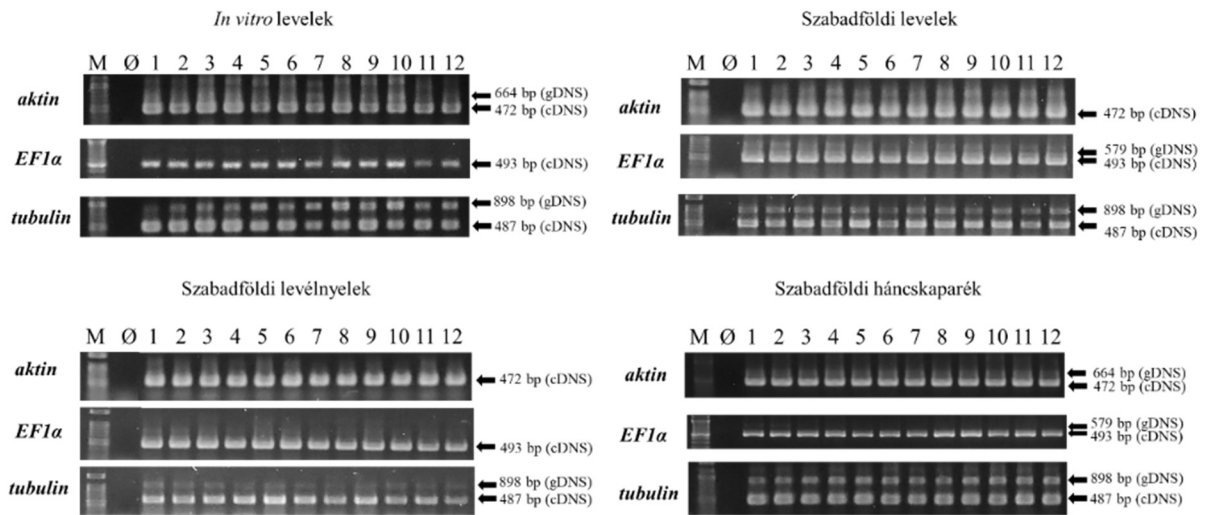
2. ábra: A *18S rRNS* és a *PEP* referenciagénekre specifikus primerekkel végzett RT-PCR reakció gélképe 24 szőlő levélminta genomi DNS-t és cDNS-t használva templátként

Mintasor: M: mólsúly marker, Ø: null kontroll, 1.-24.: 'Teleki 5C', 'Telefi-Fuhr S.O.4', 'Teleki-Kober 5BB', 'Georgikon 28', 'Börner', 'Ruggieri 140', 'Richter 110', 'Kövidinka', 'Sárfehér', 'Kunleány', 'Miklóstelep 7', 'Kadarka', 'Kék bakator', 'Juhfark', 'Neoplanta', 'Pintes', 'Zefir', 'Furmint', 'Esther', 'Ottonel muskotály', 'Olasz rizling', 'Vulcanus', 'Zervin', 'Piros bakator'

Intront tartalmazó génszakaszra specifikus referenciagén primerek tesztelése különböző eredetű szöveteken

A továbbiakban 4 újabb referenciagén primer pár (*aktin*, *EF1α*, *GAPDH*, *tubulin*) működését teszteltem a 24 szőlőfajta levelének nukleinsav kivonatát használva templátként. Azt figyeltem meg, hogy mindegyik amplifikálta a megfelelő gDNS eredetű fragmentumot, de mivel a *GAPDH* primer pár használatakor a várt gDNS eredetű fragmentum mellett megjelent egy rövidebb, aspecifikus fragmentum, így a további kísérletekből kizártam.

A három megbízhatóan működő primer pár (*aktin*, *EF1α*, *tubulin*) működését ezt követően 12 fajta *in vitro* levél, szabadföldi levél és levélnyel, valamint hancskaparék eredetű mintáin vizsgáltam.



3. ábra: A különböző szöveti eredetű mintákon végzett RT-PCR tesztek eredménye a random hexamer primerrel szintetizált cDNS-ekből

Mintasor: M: mólsúly marker, Ø: null kontroll, 1.-12.: 'Teleki 5C', 'Teleki-Fuhr S.O.4', 'Georgikon 28', 'Börner', 'Kövidinka', 'Sárfehér', 'Kadarka', 'Zefír', 'Furmint', 'Esther', 'Ottonel muskotály', 'Olasz rizling'

A 3. ábra alapján kijelenthető, hogy a tesztelt referenciagén primer párok mind a négy szövettípus esetében átírták a cDNS eredetű fragmentumokat, így alkalmasak a cDNS szintézis sikerességének igazolására. A gDNS eredetű fragmentumok tekintetében akadtak különbségek, mivel csak a tubulin primer pár tudta azt az összes mintából amplifikálni. Az EF1 α primer pár által esetenként átírt gDNS eredetű fragmentum nem volt jól elkülöníthető a cDNS eredetű fragmentumtól. Ennek oka az lehetett, hogy csak 1 rövid intront (86 bp) tartalmazó régióra specifikus. Megemlítendő ugyanakkor, hogy a gDNS eredetű fragmentum megjelenése nem esszenciális a cDNS szintézis sikerességének igazolásához, hiszen a rövidebb fragmentum hosszának ismerete elégséges információ annak beazonosításához.

A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyészetek hatékonyságának vizsgálata érzékeny diagnosztikai módszerrel

A kiválasztott anyanövények vírusdiagnosztikai vizsgálata

A kis RNS HTS és az azt követő RT-PCR tesztek alapján a kísérletre kijelölt szabadföldi anyanövények ('Ottonel muskotály' H.7-3, 'Ottonel muskotály' H.14-1, 'Szirén', 'Trilla') több vírussal és viroiddal is fertőzöttek voltak (GFkV, GPGV, GRSPaV, GRVfV, GSyV-1, GVT, GYSVd-1, HSVd).

A kijelölt fajták vírusmentesítése szomatikus embriogenezissel és merisztéma tenyésztéssel

A portokokból indított szomatikus embriogenezis mind a négy fajta/klón esetében sikeresnek bizonyult, míg a merisztéma tenyésztés a két 'Ottonel muskotály' klón esetében nem járt sikerrel. A regenerált növényvonalak tesztelését kis RNS HTS-sel és RT-PCR-rel is elvégeztem (5. táblázat)

5. táblázat: A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyészetek vírusmentesítési hatékonyságának összegzése

FAJTA_MÓDSZER	DIAGNOSZTIKAI MÓDSZER		VÍRUSOK										VIROIDOK					
			GFkV		GPGV		GRSPaV		GRVfV		GSyV-1		GVT		GYSVd-1		HSVd	
MO7_SE	RT-PCR	kis RNS HTS (pool)	-		n.t.		-		-		-		n.t.		+		-	
		pool	-		n.t.		-		-		-		n.t.		-		-	
		egyedek	7/7	100%	n.t.		7/7	100%	7/7	100%	7/7	100%	7/7	100%	6/7	86%	7/7	100%
MO14_SE	RT-PCR	kis RNS HTS (pool)	-		-		-		-		-		-		+		-	
		pool	-		-		-		-		-		-		+		-	
		egyedek	8/8	100%	8/8	100%	8/8	100%	8/8	100%	8/8	100%	8/8	100%	6/8	75%	8/8	100%
T_SE	RT-PCR	kis RNS HTS (pool)	n.t.		-		-		n.t.		-		-		+		+	
		pool	n.t.		-		-		n.t.		-		-		+		+	
		egyedek	n.t.		12/12	100%	12/12	100%	n.t.		12/12	100%	12/12	100%	1/12	8%	10/12	83%
T_ME	RT-PCR	kis RNS HTS (pool)	n.t.		-		+		n.t.		-		-		+		+	
		pool	n.t.		-		+		n.t.		-		-		+		+	
		egyedek	n.t.		3/5	60%	2/5	40%	n.t.		5/5	100%	4/5	80%	0/5	0%	0/5	0%
SZ_SE	RT-PCR	kis RNS HTS (pool)	n.t.		-		+		n.t.		-		-		+		+	
		pool	n.t.		-		+		n.t.		-		-		+		+	
		egyedek	n.t.		11/11	100%	5/11	45%	n.t.		11/11	100%	11/11	100%	9/11	82%	9/11	82%
SZ_ME	RT-PCR	kis RNS HTS (pool)	n.t.		+		+		n.t.		-		+		-		+	
		pool	n.t.		+		+		n.t.		-		+		-		+	
		egyedek	n.t.		2/4	50%	2/4	50%	n.t.		4/4	100%	2/4	50%	4/4	100%	2/4	50%

MO7_SE: Ottonel muskotály H.7-3 szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; MO14_SE: Ottonel muskotály H.14-1 szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; T_SE: Trilla szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; T_ME: Trilla merisztéma eredetű vonalak; SZ_SE: Szirén szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; SZ_ME: Szirén merisztéma eredetű vonalak; n.t.: nem tesztelt, mert az anyanövény nem volt fertőzött; az egyedek esetében a számok a mentes/összes tesztelt egyedet jelölik

A GFkV és GRVfV vírusok a regenerált szomatikus embriogenezis (SE) eredetű növényekből nem voltak kimutathatóak. A GSyV-1 eliminálása kiemelkedő hatékonyságú volt mindkét módszer alkalmazásával, ugyanis sem az SE, sem pedig a merisztéma (ME) eredetű növényekben sem voltak már jelen. Ezen felül mindkét módszer alkalmazásával sikeresen elimináltuk a GPGV, GRSPaV és GVT vírusokat, valamint a Trilla ME vonalak kivételével a GYSVd-1 és HSVd viroidokat is.

A két módszer hatékonyságában azonban voltak különbségek. A szomatikus embriogenezis rendszerint felülmúlta a merisztéma tenyészetek vírus- és viroidmentesítési hatékonyságát és vírusok esetében legtöbbször 100%-os hatékonyságúnak bizonyult. Ez alól egyedül a Szirén SE növények voltak kivételek, mivel esetükben a GRSPaV mentesítése mérsékeltebb, 45%-os sikerrel zárult.

Viroidok esetében a szomatikus embriogenezis ugyancsak hatékonyabb módszernek bizonyult, de hatékonysága nem mindig közelítette meg a vírusok esetében megfigyelt 100%-ot. A Trilla SE egyedek 92%-a például fertőzött maradt a GYSVd-1 viroiddal, amely kiemelkedően magas arány, viszont a ME eredetű egyedei között egyetlen GYSVd-1-mentes sem volt.

Kemoterápiás kísérletek

A kemoterápiás kísérletek növényanyagának vírus- és viroiddiagnosztikai elemzése

A kiindulási növények ('Furmint' P51 A1 és P51 ÜH2 klónjaival, valamint a 'Kadarka' P131 A1 és 'Sárfehér' A1) vírus- és viroid-fertőzöttségi profilját kis RNS HTS segítségével készítettem el, majd RT-PCR-rel validáltam. Kimutattam a GFkV, GFLV, GLRaV-1, GPGV, GRSPaV és GVA vírusokat, valamint a GYSVd-1 és HSVd viroidokat is.

A ribavirin kezelés hatásainak vizsgálata a kijelölt fajtákon

A kezelt hajtások túlélési aránya és a 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációja

A ribavirin kezelések (25 mg/l) során a kezelt hajtások túlélési aránya 28,8 és 49,3% között változott. A kezelt növényekről leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs aránya 36 és 85,2% között volt, de fajtánként eltérőnek bizonyult. A legkedvezőtlenebb arányok a 'Kadarka' P131 A1 klón esetében voltak megfigyelhetők, de a kezelésre kijelölt hajtások előzetes gyökereztetésével (0,8 mg/l IBA fél-MS táptalaj) sikeresen javítottunk az arányokon (6. táblázat).

6. táblázat: A ribavirinnel (25mg/l) kezelt Kadarka P131 A1 hajtások túlélési aránya és a 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs aránya

Kezelt hajtás típus	A kezelést túlélő hajtások aránya	A 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs aránya
 Gyökér nélküli hajtás	30/104 (28,8 %)	18/50 (36 %)
 Gyökeresedő hajtás	40/50 (80 %) + 51,2 %	61/89 (68,5 %) + 32,5 %

A ribavirin vírus-, és viroidmentesítési hatásának vizsgálata a kezelt fajtákon

A ribavirin vírusmentesítési hatásának vizsgálata céljából a kezelés után regenerált *in vitro* egyedeket RT-PCR-rel teszteltem (7. táblázat).

7. táblázat: Az egyes vírusoktól és viroidoktól mentes egyedek aránya ribavirin (25mg/l) kezelést követően

Vírus/Viroid	Fajta	Mentes/tesztelt egyed fajtánként		Mentes/tesztelt egyed összesen	
GFkV	Furmint P51 A1	36/46	(78,3 %)	36/46	(78,3 %)
GFLV	Furmint P51 ÜH2	0/41	(0 %)	0/41	(0 %)
GLRaV-1	Furmint P51 A1	2/46	(4,3 %)	5/122	(4,1 %)
	Kadarka P131 A1	3/76	(3,9 %)		
GPGV	Sárfehér A1	66/68	(97,1 %)	103/105	(98,1 %)
	Furmint P51 A1	37/37	(100 %)		
GRSPaV	Sárfehér A1	53/68	(77,9 %)	151/ 231	(65,4 %)
	Kadarka P131 A1	38/76	(50 %)		
	Furmint P51 ÜH2	28/41	(68,3 %)		
	Furmint P51 A1	32/46	(69,6 %)		
GVA	Furmint P51 A1	3/46	(6,5 %)	3/46	(6,5 %)
GYSVd-1	Furmint P51 A1	0/46	(0 %)	0/231	(0 %)
	Furmint P51 ÜH2	0/41	(0 %)		
	Kadarka P131 A1	0/76	(0 %)		
	Sárfehér A1	0/68	(0 %)		
HSVd	Furmint P51 A1	0/46	(0 %)	0/190	(0 %)
	Kadarka P131 A1	0/76	(0 %)		
	Sárfehér A1	0/68	(0 %)		

Azt találtam, hogy a GFkV, GRSPaV és GPGV eltávolítása sikeres volt és magas hatékonyságú (65-98%). A GLRaV-1 és a GVA esetében szintén regeneráltam vírusmentes növényeket minden fajta esetében, de kisebb arányban (4,1 és 6,5%). A GFLV fertőzést a 41 tesztelt növényből minden esetben kimutattam, így eltávolítása a kísérlet végeztével sikertelennek bizonyult. A GYSVd-1 és a HSVd viroidok tekintetében a nagy tesztelt egyedszám ellenére is minden növény fertőzött maradt a 25 mg/l-es ribavirin kezelést követően is.

A 'Kadarka' P131 A1 esetében, ahol gyökereztetés nélküli és előgyökereztetésen átesett hajtásokat is kezeltem, nem volt nagymértékű eltérés a GRSPaV-, és GLRaV-1-mentes növények arányában, de a vírusmentes egyedek száma az előgyökereztetés után kezelt hajtások esetében nagyobb volt (8. táblázat). Ez tovább erősíti azt a megfigyelést, miszerint a ribavirin kezelésre érzékenyebben reagáló fajták esetében a hajtások túlélése és a leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációja előgyökereztetéssel optimalizálható anélkül, hogy a ribavirin kezelés vírusmentesítési hatékonysága csökkenne.

8. táblázat: Az egyes vírusoktól/viroidoktól mentes Kadarka P131 A1 egyedek aránya ribavirin (25mg/l) kezelést követően

Vírus/Viroid	Kezelés típusa	Mentes/tesztelt egyed	
GRSPaV	R25	9/18	(50 %)
	GYR25	29/58	(50 %)
GLRaV-1	R25	1/18	(5,5 %)
	GYR25	2/58	(3,4 %)
GYSVd-1	R25	0/9	(0 %)
	GYR25	0/58	(0 %)
HSVd	R25	0/9	(0 %)
	GYR25	0/58	(0 %)

R25: 25 mg/l-es ribavirin kezelés; GYR25: 0,8 mg/l IBA hormonnal történő előgyökereztetés, majd 25 mg/l-es ribavirin kezelés

A kijelölt fajták zidovudinnal történő kemoterápiás kezelése

A zidovudint korábban nem alkalmazták szőlő vírusok eliminálására, így hatását 10, 20, 30, 40, 80 és 120 mg/l koncentrációkban teszteltem ‘Sárfehér’ A1 hajtásokon. Az összes kezelt hajtás túlélte a 3 hónapos kezelést a kontroll hajtásokhoz hasonlóan, ugyanakkor azt tapasztaltam, hogy a 3 hónapig tartó 120 mg/l-es zidovudin kezelés sem tudta eliminálni a GPGV és GRSPaV vírusokat. Ugyanezt az eredményt kaptam a GRSPaV és GLRaV-1 vírusokkal fertőzött ‘Kadarka’ P131 A1 hajtások 50 mg/l zidovudinnal történő kezelését követően is.

A kijelölt fajták ribavirinnel és zidovudinnal történő kombinált kezelése

Ehhez a kísérlethez olyan vírusokkal fertőzött fajtákat választottam, amelyeket korábban kizárólag ribavirin használatával nem, vagy csak nagyon ritkán tudtam eliminálni. Ennek érdekében a ‘Furmint’ P51 klón A1 és ÜH2 vonalait kezeltem 25 mg/l ribavirinnel és 50 mg/l zidovudinnal. Az RT-PCR tesztek alapján elmondható, hogy a ribavirin és a zidovudin kombinált használata nem vagy nem jelentős mértékben eredményezte a vírusmentes egyedek arányának növekedését a csak kizárólag ribavirinnel történő kezelésekhez képest. Regenerálni tudtam azonban GFLV-mentes ‘Furmint’ P51 ÜH2 és GYSVd-1-mentes ‘Furmint’ P51 A1 növényeket, amit korábban csak ribavirint alkalmazva nem tudtam elérni.

A kijelölt fajták 2-thiouracillal történő kemoterápiás kezelése

A Sárfehér' A1 2-TU-lal történő kezelése során azt figyeltem meg, hogy már az 5 mg/l-es koncentráció is rövid időn belül a kezelt hajtások pusztulását okozta. A 2-TU kezelésre kijelölt hajtások előgyökereztetése (0,8 mg/l IBA) ebben az esetben is jelentősen javította azok túlélési arányát (<75 %). A kezelt növényekről leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsokból felnevelt növények viszont kivétel nélkül fertőzöttek maradtak a GPGV és GRSPaV vírusokkal a 2 hónapig tartó 10 és 20 mg/l-es 2-TU kezelés után is. A 'Furmint' P51 ÜH2 és a 'Kadarka' P131 A1 növényeken végzett kísérletek során ugyancsak minden egyed fertőzött maradt a korábban kimutatott vírusokkal.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

A szomatikus embriogenezis a jelen kutatásban elvégzett kis RNS HTS vizsgálatok alapján is alkalmas vírus-, és viroidmentesítési módszer, amely jól kiegészíti a korábbi RT-PCR és ELISA alapú vizsgálatok eredményeit. A szomatikus embriogenezis hatékonysága rendszerint felülmúlta a merisztéma tenyésztékét és egyes esetekben olyan genotípusokon is sikeresen alkalmazható volt, ahol a merisztéma tenyésztés nem járt sikerrel (jelen esetben a ‘Ottonel muskotály’ H.7-3 és ‘Ottonel muskotály’ H.14-1 klónok). A ‘Trilla’ SE vonalak nagy arányú GYSVd-1 fertőzöttsége azonban arra enged következtetni, hogy az ezen viroidot tartalmazó kallusz sejtekből könnyebben fejlődhet embrió, mint a vírusokkal fertőzöttekből. Ezen megállapítás megerősítéséhez azonban további, más genotípusok viroidfertőzöttségét vizsgáló kutatások is szükségesek lehetnek. A szomatikus embriogenezis jelen kísérletben sikeresen kivitelezhető módszer volt mind a 4 genotípus esetében, ellentétben a merisztéma tenyésztetekkel, de ez nem jelenti azt, hogy kevésbé lenne genotípusfüggő módszer. A szomaklonális variabilitás okozta genetikai eltérések a kiindulási anyagokhoz képest valós és más mentesítési módszerekhez képest gyakoribb veszélyt jelenthetnek, így a regenerált egyedek legalább ampelográfiai szempontok alapján történő vizsgálata indokolt lehet a vírusmentesítési folyamatokat követően is, hogy az egyértelmű eltérést mutató egyedek szelekciója megtörténhessen.

A GRSPaV és GVT vírusok kimutatásának nehézsége a szabadföldi növényekben azt jelzi, hogy a kis RNS HTS alapú protokollok további finomításra szorulnak, annak ellenére, hogy ugyanezen vírusok kimutatása az üvegházi és *in vitro* növényekből nem ütközött hasonló problémákba. Az RT-PCR ugyanakkor az itt elvégzett vizsgálatok alapján alkalmas módszer, hogy az ilyen esetekben kiegészítse a kis RNS HTS alapú víruskimutatási eredményeket és egyben jelzi azt is, hogy a csak kizárólag kis RNS HTS alapú rutinszerű víruskimutatás ideje még nem érkezett el. Amellett azonban nem lehet elmenteni, hogy az új, eddig nem azonosított kórokozók kimutatásában kiemelkedő sikereket értek el alkalmazásával.

A ribavirinnel folytatott kezelések során a GFLV eliminálása sikertelen volt, amire magyarázatot adhat, hogy ez nem egy floémre korlátozott vírus. A kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsa ennek megfelelően nagyobb eséllyel maradhatott fertőzött. Ez azonban ellentmondásban van Aiter et al. (2020), valamint Weiland et al. (2003) publikációival, ahol is 75 és 94%-os hatékonysággal szabadultak meg a GFLV-től. A ‘Kadarka’ P131 klón esetében beiktatott előgyökereztető lépés jelentős mértékben javította a ribavirin kezelés alatt álló hajtások túlélési arányát, amit később a 2-thiouracil kezelések során is alkalmazni tudtunk. Ez új lehetőségeket nyithat az erős fitotoxicitást mutató potenciális antivirális szerek alkalmazásában. Ennek oka lehet, hogy az így előgyökereztetett hajtások, már gyökéren keresztül, lassabban tudták felvenni a ribavirint, mint a szárukon friss vágást viselő hajtások, így vegyszer negatív hatásai sem

olyan intenzitással érték azokat. Elképzelhető, hogy egyéb, védelmi funkciót is ellátó metabolitok (pl. szalicilsav, jazmonátok, antioxidánsok) is nagyobb mennyiségben halmozódtak fel ezen hajtásokban, de ennek kimutatására további, növényélettani vizsgálatok elvégzése lenne szükséges.

A 2-thiouracil és a zidovudin önmagukban nem voltak alkalmasak szőlő vírusok eliminálására több hónapos kezeléseket követően sem. Fontos megjegyezni azonban, hogy az alkalmazott kezelések vírustiterre gyakorolt hatását nem vizsgáltuk, így nem jelenthető ki általánosan, hogy az ne csökkent volna. Indokolt lenne tehát ezen szerek vírusmentesítési hatásának vizsgálata más diagnosztikai módszerek, pl. RT-qPCR alkalmazásával is. Erre utalhat az is, hogy a ribavirin és a zidovudin kombinált alkalmazása lehetővé tette egy GYSVd-1 és egy GFLV fertőzéstől mentes vonal regenerálását is, amit korábban egyetlen szer alkalmazásával nem tudtam elérni.

Az elvégzett kísérletek alapján alapvető tanulság, hogy mivel a különböző vírusmentesítési módszerek eltérő mechanizmusok alapján hatnak, így hatékonyságuk is eltérő az egyes fajták és vírusok tekintetében is. Javasolt lehet tehát több módszer párhuzamos alkalmazása, azok optimalizálása, illetve kombinálása annak érdekében, hogy a lehető legrövidebb idő alatt jussunk vírusmentes szaporítóanyaghoz.

A RNS gemommal rendelkező kórokozók kimutatását megelőző cDNS szintézis sikeressége kulcsfontosságú a nukleinsav alapú diagnosztikai módszereknél. Több nukleinsav kivonási protokoll esetében is előfordulhat azonban, hogy a minták maradék genomi DNS-t tartalmaznak, így a konvencionális referenciagén primerek fals-pozitív eredményt adhatnak az RT-PCR-t követően. Az intronokat tartalmazó génszakaszra specifikus primerek jó alternatívát kínálnak erre. Költséges RNS izoláló Kit-ek és DNáz kezelés nélkül is igazolják sikeres cDNS szintézist. Amennyiben azonban a gDNS és cDNS eredetű fragmentumok egyértelmű szeparálódását szeretnénk látni a gélelektroforézist követően, úgy a több és/vagy hosszabb intront tartalmazó génszakaszokra specifikus primer párok alkalmazása célszerű. A jövőben a doktori dolgozat keretén belül vizsgált háztartási géneken kívül a szintén széleskörűen célzott *UBQ*, a *PP2A* (*Protein Phosphatase 2A*) vagy akár a *CYP* (*Cyclophilin*) gének intront tartalmazó régióira tervezett primerek tesztelése hasonló körülmények között jó kutatási alapot nyújthat, de a már tesztelt primer párok kipróbálása stresszhatásnak kitett szőlőnövényből származó mintákon is jó kutatási irány lehet, mivel pl. a *tubulin* gén hő- és szárazságstressz alatt instabilabb eredményt adhat (Gu et al. 2011). Mindezek figyelembevételével az efféle, új primerek számának növelése hasznos eszköztárat biztosíthat a változatos körülmények között végzett diagnosztikai vizsgálatokhoz, legyen szó akár a vegetatív, akár a nyugalmi időszakban megszedett minták teszteléséről.

IRODALOMJEGYZÉK

- Aiter, N., Lehad, A., Haddad, B., Taibi, A., Meziani, S., Rabhi, M. L., ... & Chaouia, C. (2020). Sanitation of autochthonous grapevine varieties from Algeria by chemotherapy. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 55(1), 43-50.
- Gu, C., Chen, S., Liu, Z., Shan, H., Luo, H., Guan, Z., & Chen, F. (2011). Reference gene selection for quantitative real-time PCR in Chrysanthemum subjected to biotic and abiotic stress. *Molecular Biotechnology*, 49(2), 192-197.
- Oláh, R.; Zok, A.; Pedryc, A.; Howard, S.; Kovacs, L. (2009). Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Sci. Hortic.* 120, 134–137.
- Weiland, C. M., Cantos, M., Troncoso, A., and Perez-Camacho, F. (2003). Regeneration of Virus-Free Plants by In Vitro Chemotherapy of Gflv (Grapevine Fanleaf Virus) Infected Explants of Vitis vinifera L. Cv'Zalema'. In: *International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research* 652 (pp. 463-466).
- Xu, Q., Wen, X. & Deng, X. (2004): A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) for RFLP and PCR analyses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(3):301-302.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A szomatikus embriogenezis szőlő vírus-, és viroidmentesítési hatékonyságát elsőként vizsgáltuk meg kis RNS-ek nagyátersztőkéességű szekvenálásával. Az ‘Ottonel muskotály’ klónok, valamint a ‘Trilla’ és ‘Szirén’ fajták esetében is kiemelkedő vírusmentesítési hatékonysággal bírt, míg a viroidok eltávolításában kevésbé volt hatékony. Elsőként publikáltuk továbbá az eredményt, miszerint a szomatikus embriogenezis hatékony a GPGV, GSyV-1, GRVfV és a GVT vírusok eltávolítására is.
2. Az antivirális kezelések során azt találtuk, hogy a kezelni kívánt hajtások 0,8 mg/l IBA-val történő 1-2 hetes előgyökereztetésével lényegesen növelhető a ribavirin (és 2-thiouracil) kezelést túlélő hajtások száma, illetve a kezelést követően leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs aránya is. Mindemellett a ribavirin vírusmentesítési hatása továbbra is megmaradt.
3. Az általunk elsőként alkalmazott intron(oka)t tartalmazó génszakaszra specifikus *aktin*, *EF1 α* , *PEP* és *tubulin* primerek használatával sikeresen el tudtuk különíteni a genomi DNS-ről és a cDNS-ről amplifikált fragmentumokat 24 szőlőfajta (alany, nemes, fehér és kék fajták) levélmintájának esetében. Ezt követően az *aktin*, *EF1 α* és *tubulin* primer párokkal 12 szőlőfajta eltérő szöveteiből (levél, levéllyél, hánccskaparék) származó minták esetében is megtettük ugyanezt, amely eredmény ezen primerek megbízhatóságát mutatja és alkalmazásukkal egyértelműen igazolható a sikeres cDNS szintézis.

A DOLGOZATHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Lektorált, IF-es folyóiratban megjelent cikkek:

1. Oláh, R., Deák, T., **Turcsán, M.**, Szénási, M., Bordé, Á., & Szegedi, E. (2017). Use of an intron containing grapevine gene as internal control for validation of cDNA synthesis in virus detection by RT-PCR. *Eur J Plant Pathol.* 149(3), 765-770. (IF: 1,5)
2. Szegedi, E., Deák, T., **Turcsán, M.**, Szénási, M., Bordé, Á., & Oláh R. (2018). Evaluation of intron containing potential reference gene-specific primers to validate grapevine nucleic acid samples prepared for conventional PCR and RT-PCR. *Vitis* 57, 69–73. (IF: 1,36)
3. **Turcsán, M.**, Demian, E., Varga, T., Jaksa-Czotter, N., Szegedi, E., Oláh, R. & Varallyay, E. (2020) HTS-based monitoring of the efficiency of somatic embryogenesis and meristem cultures used for virus elimination in grapevine. *Plants* 9, 1782. (IF: 3,93)

Lektorált folyóiratban megjelent cikkek:

1. **Turcsán, M.**, Deák, T., Oláh, R., & Szegedi, E. (2019). Intron-containing housekeeping genes as useful tools in grapevine virus detection by PCR-based protocols. *Res J Plant Pathol* Vol.2 No.1: 03.
2. **Turcsán, M.**, Szegedi, E., Oláh, K., Oláh, R., Jahnke, G., Varga, Zs., Deák, T., & Sárdy, D. A. N. (2023) Referenciagénekre tervezett új primerek alkalmazhatósága rutinszerű szőlő vírusdiagnosztikai vizsgálatokhoz. *Kertgazdaság* 55, 4: 33-45.

Egyéb, a dolgozathoz nem szorosan kapcsolódó IF-es cikkek:

1. Oláh, R., **Turcsán, M.**, Oláh, K., Farkas, E., Deák, T., Jahnke, G., & Sárdy, D. A. N. (2022). Somatic embryogenesis: A tool for fast and reliable virus and viroid elimination for grapevine and other plant species. *Horticulturae*, 8(6), 508. (IF: 3,1)
2. Demian, E., Holczbauer, A., Galbacs, Z. N., Jaksa-Czotter, N., **Turcsán, M.**, Oláh, R., & Varallyay, E. (2021). Variable Populations of Grapevine Virus T Are Present in Vineyards of Hungary. *Viruses*, 13(6), 1119. (IF: 5,82)
3. Oláh, R., **Turcsán, M.**, Jaksa-Czotter, N., Oláh, K., Sárdy, D. A. N., Mavrič Pleško, I., & Varallyay, E. (2024). First report of grapevine leafroll-associated virus 4 infecting grapevine in Hungary. *Plant disease*, 108(7). (IF (2023): 4,4)

A teljes publikációs lista érhető itt:

<https://m2.mtmt.hu/gui2/?type=authors&mode=browse&sel=10074205&view=simpleList>