

Akadémiai doktori értekezés

Várallyay Éva

**Növényeket fertőző vírusok
gazdanövényre gyakorolt hatásának vizsgálata,
diagnosztikája és felhasználása a molekuláris biológiában**

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

Gödöllő, 2020

1 Tartalom

2	Bevezetés.....	4
3	Irodalmi áttekintés	5
3.1	<i>A növényi virológia (rövid) története</i>	5
3.2	<i>HTS.....</i>	7
3.3	<i>Növényeket fertőző vírusok és viroidok</i>	7
3.4	<i>A növény védekezési reakciója a vírusfertőzésekkel szemben – RNS interferencia</i>	8
3.5	<i>A vírusfertőzés hatása a növényi gazda génexpressziójára.....</i>	10
3.6	<i>A vírusok, mint vektorok felhasználása a biotechnológiában, funkcionális genomikában</i>	11
3.7	<i>A növényi vírusdiagnosztikai fontossága a fászfű, vegetatívan szaporított növények esetében.....</i>	13
3.8	<i>A növényi vírusok kimutatására alkalmas diagnosztikai módszerek.....</i>	14
3.9	<i>A kutatásaimban szereplő vírusok</i>	15
3.9.1	<i>Lágyszárú kétszikűeket fertőző vírusok</i>	15
3.9.2	<i>Lágyszárú egyszikűeket fertőző vírusok</i>	17
3.9.3	<i>Szőlőt fertőző vírusok.....</i>	18
3.9.4	<i>Csonthéjas gyümölcsfákat fertőző vírusok.....</i>	21
4	Célkitűzések.....	23
5	Anyagok és módszerek	24
5.1	<i>Növényanyag.....</i>	24
5.1.1	<i>Lágyszárú kísérleti növények.....</i>	24
5.1.2	<i>Fászfű növények</i>	24
5.2	<i>Nukleinsav tisztítás</i>	24
5.3	<i>cDNS készítése</i>	24
5.4	<i>Klónozásra, vagy hagyományos Sanger szekvenálásra alkalmas DNS darab előállítása</i>	25
5.5	<i>DNS szakaszok vektorba építése (klónozás)</i>	25
5.5.1	<i>Ligátum transzformálása E. coliba.....</i>	26
5.5.2	<i>Fertőzés rekombináns vírusokkal.....</i>	26
5.5.3	<i>Vírusfertőzés és tranziens GFP vagy VSR expresszió Agrobacterium tumefaciens segítségével, agroinfiltrációval.....</i>	26
5.6	<i>Vírus és gazdanövény gének expressziójának vizsgálata</i>	26
5.6.1	<i>Northern blot analízis.....</i>	26
5.6.2	<i>Vírus RNS és gazdanövény mRNS-ek kimutatása RT-PCR-rel</i>	27
5.6.3	<i>kvantitatív RT-PCR</i>	27
5.6.4	<i>Növényi gazda génexpressziójának vizsgálata microarray módszerrel</i>	28
5.6.5	<i>Növényi gazda génexpressziójának vizsgálata RNS szekvenálással</i>	28
5.7	<i>Fászfű növények vírusdiagnosztikája sRNS HTS-el.....</i>	28
5.7.1	<i>Növényi anyag és RNS tisztítás</i>	28
5.7.2	<i>Szekvenálható sRNS könyvtár készítés</i>	29
5.7.3	<i>Szekvenálás</i>	29
5.7.4	<i>A HTS eredményének, a szekvenált olvasatok (readek) bioinformatikai elemzése</i>	29
6	Eredmények és értékelésük	31
6.1	<i>Az gazdanövény ARGONAUTE 1 szintjének változása vírusfertőzés során</i>	31
6.1.1	<i>A vírusfertőzés során indukálódó AGO1 szint csökkenés hosszú ideig jelen van a gazdában és ez a hiány zavart okozhat a miRNS által történő génszabályozásban</i>	31
6.1.2	<i>Az AGO1 miR168 általi regulációja általánosan előfordul a vírusfertőzések során.....</i>	32
6.1.3	<i>A vírusfertőzés során a MIR168 gén expressziójának indukciója következik be.....</i>	33
6.1.4	<i>Különböző vírusok nem rokon, VSR fehérjéi egyaránt indukálják a miR168 expressziót, és ezen keresztül szabályozzák az AGO 1 fehérje szintjét</i>	35
6.1.5	<i>A p19-3M nem képes siRNS-eket kötni, de indukálja a miR168 expresszióját.....</i>	36

6.1.6	A p19 közvetített AGO1 szabályozás hatással van a vírusfertőzés tüneteinek súlyosságára és ezt a defektív interferáló RNS-ek sem tudják befolyásolni	39
6.2	<i>A gazdanövény génexpressziójának változása akut és perzisztens vírusfertőzés során</i>	40
6.2.1	A gazdanövény transzkriptómja akut fertőzés során jelentősen megváltozik	41
6.2.2	A fotoszintézishez kötődő transzkriptumok expressziójának csökkenése és a stresszgének aktiválódása az akut fertőzéshez köthető	43
6.2.3	A háztartási-, stressz- és néhány speciális anyagcsere-gén expressziója megváltozik akut fertőzés során, míg perzisztens fertőzéskor változatlan marad	44
6.2.4	A fotoszintézisben résztvevő, sejtfa átalakító és a hormonális válaszadásban fontos transzkriptumok expressziója jelentősen megváltozik akut fertőzés során	47
6.2.5	Fiziológiai változások vírusfertőzött <i>N. benthamiana</i> és <i>S. lycopersicum</i> növényekben	49
6.2.6	Olyan szabályozásban fontos gének is hasonlóan változtak az azonos típusú vírusfertőzésekben, melyek a sejtmagban fejtik ki hatásukat	51
6.2.7	A sejtmagban működő RNSi folyamatok lehetséges szerepe az akut fertőzés során bekövetkező „shut-off”-ban	52
6.2.8	Az akut fertőzést jellemző háztartási gén expresszió gátlás nem a nekrosis következménye	53
6.2.9	A különböző fertőzési stratégiájú vírusfertőzések során bekövetkező génexpressziós és fiziológiai változások vizsgálatának összefoglalása	54
6.3	<i>VIGS vektor fejlesztése, használata a genomikai, növénykórtani kutatásokban</i>	55
6.3.1	VIGS vektor fejlesztése egy pillangósvirágúakat fertőző tobamovírusból	55
6.3.2	Lisztharmat-rezisztencia kialakítása búzán	59
6.3.3	VIGS vektorok használatakor nem célzott változások is történhetnek a gazdanövény génexpressziójában	63
6.4	<i>Az sRNS HTS, mint vírusdiagnosztikai módszer fejlesztése és használata</i>	71
6.4.1	Az sRNS HTS, mint vírusdiagnosztikai módszer optimalizálása fásszárú növények fertőzöttségének vizsgálatára	71
6.4.2	sRNS HTS-sel határoztuk meg több termő szőlőültetvény viromját	71
6.4.3	Szőlő alanyültetvények virológiai felmérése sRNS HTS-sel	91
6.4.4	Kajszi törzsültetvények vizsgálata sRNS-ek újgenerációs szekvenálásával	99
6.4.5	A Szőlő vonalas mintázottság vírus szekvenciájának meghatározása HTS-sel	104
7	Új tudományos eredmények	110
8	Következtetések, javaslatok	111
9	Összefoglalás	116
10	Köszönetnyilvánítás	117
11	Irodalomjegyzék	118
12	Várallyay Éva közleményeinek jegyzéke.	130
12.1	<i>Az értekezés alapját képező közlemények.</i>	130
12.2	<i>Az értekezéshez kapcsolódó további közlemények.</i>	131
12.3	<i>A PhD megszerzése óta megjelent, az értekezésben nem tárgyalt impakt faktoros közlemények.</i> ..	132
13	Függelék	134
13.1	<i>Táblázatok</i>	134
13.2	<i>Rövidítések jegyzéke</i>	136
13.3	<i>Az értekezéshez kapcsolódó publikációk első oldalainak másolata.</i>	138

2 Bevezetés

A vírusok és viroidok a legegyszerűbb saját örökítőanyaggal rendelkező „élőlények” a földön. Életük teljes mértékben a gazdaszervezetre utalt. Alapvető életműködésükhöz minimálisan a genomjuk sokszorozását végző replikázt, a nukleinsavat burkoló köpenyfehérjét és a gazdanövényben való elterjedést segítő mozgási fehérjét kódolják. Az állati vírusokhoz hasonlóan, a növényi vírusok sem képesek minden növényt fertőzni, általában speciális gazdakörrel rendelkeznek. A vírus növényben való sokszorozódása és elterjedése (a fertőzés) kisebb nagyobb mértékben megváltoztatja a növény anyagcsere-folyamatait, ennek eredménye a fertőzés során megjelenő tünetek megjelenése. A gazdaságilag fontos növényeinken megjelenő tünetek, amik akár a gyökeret vagy hajtást, akár a virágot vagy termést változtatják meg, okozzák közvetlenül a vírusfertőzés eredetű gazdasági károkat. Ugyan a vírusfertőzési folyamatokat, az előforduló természetes és mesterséges rezisztenciák mechanizmusát kiterjedten kutatják, a vírusfertőzés tüneteinek hátterében álló folyamatok molekuláris mechanizmusa még nem teljesen ismert.

A vírusfertőzés során a növény nem passzívan szenved el a fertőzést, a vírus replikációja, illetve a növényi RNS-függő RNS polimerázok (RNA dependent RNA polymerase - RdRp) működése során keletkező vírus eredetű kétszálú (double stranded – ds) RNS intermedierek bekapcsolják a növény RNS alapú védekező rendszerét, az RNS interferenciát (RNA interference - RNSi). Ezen RNS alapú szabályozó mechanizmus jelenlétének felfedezése a 2000-es évek elején, éppen a víruskutatásoknak volt köszönhető. Azt, hogy az RNSi szabályozó molekulái 21-24nt hosszú kisRNS-ek (small RNA – sRNS), transzgenikus növények mellett, először vírusfertőzött növényekben mutatták ki. Az RNSi folyamatok vizsgálata során derült fény ugyancsak arra, hogy ennek a rendszernek az egyik lefontosabb funkciója a fertőző vírusok elleni védekezés és hogy a vírusok ezeket az eliminációjukra irányuló folyamatokat blokkolni képesek a genomjukban kódolt virális RNSi gátló fehérjék (viral silencing repressor - VSR) segítségével. A VSR-ek felfedezése és jellemzése komoly segítséget nyújtott a kutatóknak az RNSi folyamatokban résztvevő fehérjék feltérképezésében.

Az antivirális RNSi folyamatok vizsgálata során fény derült az RNSi, mint alapú endogén szabályozás létére is, így arra, hogy a genomban nem kódoló információként jelen levő hosszabb, rövidebb RNS-sé átíródó szakaszok védelmet nyújtanak a parazita transzpozonok aktivitása ellen, hogy részt vesznek a genom működését meghatározó metilációs mintázat kialakításában, és hogy az élőlények endogén folyamatait is szabályozzák. Az RNS alapú szabályozás meglete pedig új eszközöket adott a genomban kódolt információk meghatározására és a biotechnológia számára is.

Az RNS alapú szabályozás felfedezése mellett az elmúlt 20 év legnagyobb molekuláris biológiát érintő forradalma a szekvenálási technikák fejlődésében zajlott. Az új, nagy-áteresztő képességű (high-throughput sequencing - HTS) szekvenálási technikáknak köszönhetően új dimenziók nyílnak a genomokban kódolt és az adott élet helyzetekben (biotikus és abiotikus stresszek során) kifejeződő információ meghatározására. Mivel a földön élő élőlények genetikai kódja univerzális, a szekvenálási technikák a vírusok kimutatásának diagnosztikai módszereit is alapvetően megváltoztatták. A szekvenálás alapú metagenomikai módszereknek

köszönhetően nap, mint nap új vírusokat írnak le, ami nemcsak a vírus rendszer- és nevezéktant állítja folyamatos kihívás elé, hanem újra és újra felveti a kérdést, hogy a vírusfertőzés valóban minden esetben kedvezőtlen hatású-e a gazdaszervezetre nézve?

A vegetatívan szaporított növények esetében a vírusdiagnosztika meghatározó, hiszen ennek érzékenységétől függ az, hogy a szaporítandó növényben jelenlevő összes virális kórokozóról tudomást szerzünk-e. Amennyiben nem, a szaporítás során nemcsak a fajtát, hanem a kórokozót is szaporítani fogjuk, ami alapvetően meghatározza a hosszú évekre, vagy akár évtizedekre tervezett szőlő-, vagy gyümölcsfaültetvény egészségügyi állapotát. Az új, szekvenáláson alapuló diagnosztikai módszerek e kihívásokra is választ jelenthetnek.

3 Irodalmi áttekintés

Az irodalmi áttekintés fejezetben virológiai kutatásokat az értekezés megértéséhez szükséges mélységben, a teljesség igénye nélkül, tárgyalom. Az egyes témák előzményeit részletesebben a konkrét kutatás eredményeinek bevezetésében ismertetem. Ebben a fejezetben a növényi vírusokról, az RNS-i-ről és a molekuláris vírusdiagnosztika fejlődéséről összegyűjtött információkat foglalom össze. Mivel az értekezésben összegyűjtött eredményeim 20 év kutatása során születtek, korai munkáim esetén az eredmények bemutatása után bemutatom azt is, hogy elért eredményeim óta milyen jelentős változások, eredmények születtek az adott szakterületen.

3.1 A növényi virológia (rövid) története

A növényi virológia története igen sok tanulsággal szolgál a ma virológusai számára. Az 1800-as években dél-Amerikában monokultúrában kezdték el termesztetni a dohányt, hiszen ebből igen értékes szivart tudtak előállítani. Mivel évről évre ugyanott termesztették, a talaj tápanyagtartalma csökkent, a dohány pedig fogékonyabb lett a betegségekre. Az 1800-as évek elején egy mozaikos betegség ütötte fel a fejét, a beteg dohány keserűbb volt (vírustünetek okozta gazdasági kár). Az *Nicotiana. tabacum* fogékonyabb volt, míg a *N. glutinosa* ellenállóbb volt a betegséggel szemben (rezisztencia). A fertőzés kolumbiai dohánylevelekkel került Európába, Németországba. 1857-ben Hollandiában a dohány növények megbetegedését okozó járvány pusztított, melyet nem gomba, vagy baktérium okozott (kereskedelem globalizációja, kontroll nélküli import). 1886-ban itt végezte el Adolph Mayer klasszikus kísérletét: fertőzött növény kivonatát egészségesbe dörzsölve a kórokozó átvihető volt, de a 80 fokos hőkezelés megölte (Mayer ebből azt következtette, hogy baktériummal állunk szemben). 1892 már a Krím-félszigeten is járvány pusztított (a globalizáció nem ismer határokat). Ekkor Dmitrij Ivanovszkij egy olyan szűrőn préselte át egy fertőzött növény nedvét, mely a baktériumokat nem engedi át, a kórokozó mégis átjutott. A tanulság szerint a kórokozó egy kisebb baktérium, vagy toxin. A holland porcelángyártás fejlődése technikailag lehetővé tette baktériumokat egyáltalán nem áteresztő szűrők elkészítését (technikai fejlődés segíti az alapkutatót). Mivel a kórokozó Martinus Beijerinck kísérleteiben ezen is átjutott, 1898-ban bebizonyosodott, hogy biztosan nem baktérium. Ekkor nyerte el a „Contagium vivum fluidum = vírus” nevet. Az 1900-as évek elejére az USA-ban a betegség mindenütt elterjedt, ahol a dohány jelen volt (epidemiológia). Ezt a fontos, alapkutatót érintő felfedezést egy gazdaságilag fontos haszonnövényt érintő

betegség inicializálta! Az 1950-60-as évekig a virológia fő kérdése az volt, hogy vajon mi is a vírus? Ennek tanulmányozásához tiszta vírus tenyészetek hoztak létre, azt vizsgálták, hogy vajon vannak-e törzsek és mutánsok, változik-e a vírus, amikor más gazdát fertőz, mi határozza meg a gazdaspecifitást? (ezt máig vizsgáljuk molekuláris biológiai módszerekkel). A virionok tisztításához ismét egy technikai fejlődésre volt szükség, 1927-ben fejlesztettek olyan ultracentrifugát, ami 50000 g-val tudott működni. 1929 Helen Purdy Beale ily módon tisztított dohánymozaik vírusát (tobacco mosaic virus – TMV) injektált nyúlba, ami specifikus antiszérum termeléséhez vezetett, amivel specifikusan ki tudta mutatni, hogy a TMV nincs jelen az egészséges növényben. Ez a kísérlet elvileg megteremtette az ELISA alapú vírusdiagnosztika lehetőségét, ami azonban csak az 1970-es években valósult meg. Szintén 1929-ben Harold McKinney megállapította, hogy ha gyenge variánssal fertőzi a növényt, az ellenálló lesz a súlyos tüneteket okozóval szemben. Ezen alapult később, az 1990-es években a köpenyfehérjét expresszáló transzgénikus növények vírusrezisztenciájának elmélete, mely megfigyelés végül a 2000-es években, az RNSi mechanizmusának megismerésével nyert magyarázatot. Ezek után talán nem meglepő, hogy Rosalind Franklin röntgendiffrakciós munkáiban is vizsgálta a TMV-t és helyesen állapította meg (ugyan akkor még nem tudta bizonyítani), hogy egy fehérjeburokba csomagolt egyszálú RNS-sel van dolgunk. A rekombináns dezoxiribonukleinsav (DNS) technika térhódításával a virológia új korszaka következett be, mivel ezzel a technikával nemcsak tiszta tenyészeteket (rekombináns vírusokat és fertőzőképes transzkriptumokat) lehetett előállítani, hanem vizsgálható lett a vírusgenom egyes részeinek funkciója (*in vitro* mutagenézis, reasszortánsok, stb). Az 1977-ben kidolgozott Sanger szekvenálás lehetővé tette a vírusok örökítőanyagának nukleinsav sorrendjének meghatározását. Így kiderült, hogy a növényeket fertőző vírusok örökítőanyaga, alakja, mérete igen változó, de jobban konzervált, mint az állati sejteket fertőző vírusoké. Mivel a növényi sejtek között a sejtfaon, a kis átmérőjű plazmodezmákon kell átjutni, korlátozott a méretük. Vírusnál kisebb patogének jelenlétére is fény derült, leírták a szatellit RNS-eket, melyek replikációjához egy vírus is kell, míg a viroidok, ugyan parazitálják a gazdát, de replikációjukhoz más virális patogén nem szükséges. Jól jellemzett modell növényeken a gazda – vírus interakciók is vizsgálhatóak voltak. Az első modell növény az *Arabidopsis thaliana* genomja 2000-ben lett ismert, de ez a növény viszonylag kevés vírussal fertőzhető. A virológusok kedvenc modellnövénye, az N gén hiánya miatt igen fogékony *N. benthamiana* genomja máig igen rosszul annotált. Ennek ellenére e modellen mára ipari szintre fejlődött a virális vektorokról történő fehérje expresszió: vírus indukált géncsendesítésen alapuló (virus induced gene silencing based – VIGS) vektorok segítik a gének funkcionális analízisét és tranziens génexpressziós rendszer támogatja az alapkutatásokat. A 2000-es években David Baulcombe laboratóriumában a növényvirológiai kutatásoknak kulcs szerepe volt az RNSi mechanizmusának megértésében, amikor burgonya X vírus (potato virus X - PVX) fertőzött dohány növényben kimutatták a víruseredetű sRNS-eket (Hamilton & Baulcombe, 1999). A VSR-ek jellemzése pedig igen nagy mértékben járult hozzá az RNSi folyamatainak megértéséhez. Ebben elvülhetetlen érdeme van Burgyán Józsefnek, és a Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (Cymbidium ringspot virus – CymRSV) p19 VSR-én végzett kísérleteknek (Vargason *et al.*, 2003). A polimeráz láncreakció felfedezése nemcsak a molekuláris biológiai kutatásokat gyorsította fel, hanem egy új diagnosztikai lehetőséget

teremtett meg. A szerológiai módszerek mellett, máig ezen alapulnak a hatóság által használt diagnosztikai módszerek. Ezt a helyzetet változtatta meg a HTS platformok megjelenése.

3.2 HTS

A jelenleg széles körben elterjedt Illumina szekvenálási platformok kémiaja a hagyományos Sanger szekvenálás óta nem sokat változott. A detektálási módszerek technikai fejlesztése viszont igen, és ez ma már lehetővé teszi egyszerre több száz millió szekvenálási folyamat egyidejű regisztrálását. Az ilyen szekvenálás technikailag csak DNS templárról lehetséges. A detektálás szintézis alapú, és a DNS polimerázok működéséhez a templáton kívül a templáttal komplementer szekvenciájú indítószekenciák is szükségesek, ezért a különböző vizsgálandó nukleinsavakat (DNS, RNS, sRNS) szekvenálhatóvá kell tenni. Ennek során a nukleinsavakat darabolják, adaptereket ligálnak hozzájuk és ha RNS templátot használtak arról reverz transzkripcióval komplementer DNS-t (cDNS) kell készíteni, ami a továbbiakban már alkalmas a szekvenálásra. A szekvenálás új platformjai már teljesen új alapokon, szintézis nélkül képesek a nukleinsav sorrend meghatározásra. Így lehetővé vált az adott mintában, vagy akár egy sejten, jelenlevő összes DNS és így az adott mintában jelenlevő összes élőlény (metagenom) meghatározása. A vizsgált anyag RNS-einek meghatározása a génexpresszióról és az RNS örökítőanyaggal rendelkező vírusokról, viroidok jelenlétéről ad felvilágosítást, így új korszak nyílt a virológiában és a vírusdiagnosztikában is (Massart *et al* 2014, 2018). E módszerekkel olyan vírusokat is kimutathatunk, melyeket eddig egyáltalán nem ismertünk. Ahhoz azonban, hogy ezek a technikák a mindennapi vírusdiagnosztika részévé váljanak nemcsak a szekvenálás árának csökkenése, hanem az így eredményül kapott információ tömeg analízisét lehetővé tevő bioinformatikai módszerek fejlődése is szükséges.

3.3 Növényeket fertőző vírusok és viroidok

A vírusok obligát intracelluláris paraziták, szaporodásuk a gazdasejt működésétől függ, mivel hiányzik belőlük a fehérjeszintézis és az energiatermelés apparátusa. A sejtés lényekkel ellentétben, melyek növekedés után osztódnak, a vírusok sokszorozódása a gazdasejt által elkészített szerkezeti elemeik összeszerelésével történik. A vírusok örökítő anyaga lehet RNS vagy DNS, egyszálú vagy kétszálú, melyet védő funkciójú fehérje burok (kapszid) vesz körül. A legelterjedtebb pozitív szálú RNS vírusok a növényi sejtekbe jutva mRNS-ként funkcionálnak, és közvetlenül bekapcsolódnak a fehérjeszintézisbe. A fehérjeszintézis során keletkező víruseredetű RdRp, vagy más néven replikáz, a gazdafehérjével komplexet alkotva felismeri a pozitív RNS szál 3' végének speciális promóter elemét, és a pozitív szál templátként használva elkezd a komplementer (negatív) szálak készítését. Az elkészült komplementer szálak szolgálnak templátul a nagy mennyiségű pozitív szál szintéziséhez. Ezek egy része becsomagolódik a vírus által kódolt köpenyfehérjébe. Az újonnan szintetizálódott vírusok (nem feltétlenül virionként) először a szomszédos sejtekbe jutnak át sejtről-sejtre való mozgással, majd a növény szállítónyalábjain keresztül távolabbi szervekbe. A növényi vírusok másik gazdanövényre általában vektorok által jutnak át, de terjedhetnek pollennel, maggal és mechanikai sebzéseken keresztül. A terjedés speciális módja az emberi tevékenységeken keresztül, oltással, sebzéssel, vegetatív szaporítással történő trejedés. Az eukarióta sejt fehérjeszintetizáló rendszere monocisztronos. Amennyiben a transzláció során stop kodon kerül leolvasásra, a transzlációs komplex felbomlik. A vírus RNS-en kódolt fehérjék száma ennél

több, a vírusoknak minimálisan a genomjuk sokszorozására képes replikázt, a kapszid alkotóelemeit kódoló köpenyfehérjét (coat protein - CP) és a gazdanövényben való mozgáshoz, a plazmodezmákon való átjutáshoz szükséges segítő fehérjét: a mozgási fehérjét (movement protein - MP) kell kódolniuk. Ahhoz, hogy a monocisztronos gazdában ezek a fehérjék is transzlálódni tudjanak igen sokféle megoldás lehetséges: szubgenomikus RNS-ek, osztott genom, eltérő polaritás, poliprotein termelése és hasítása proteázsal, melyekre a növényeket fertőző vírusok között mindegyikre találunk példát.

A kísérleteimben felhasznált, illetve leírt fontosabb vírusokat és azok kutatásaim és eredményeim szempontjából legfontosabb tulajdonságait a 3.9 fejezetben ismerettem. A vírusnevek helyesírásakor magyar nevet akkor használtam, ha ez konszenzuson alapulva elfogadott. Ellenkező esetben a vírus első előfordulásakor az angol nevet használtam.

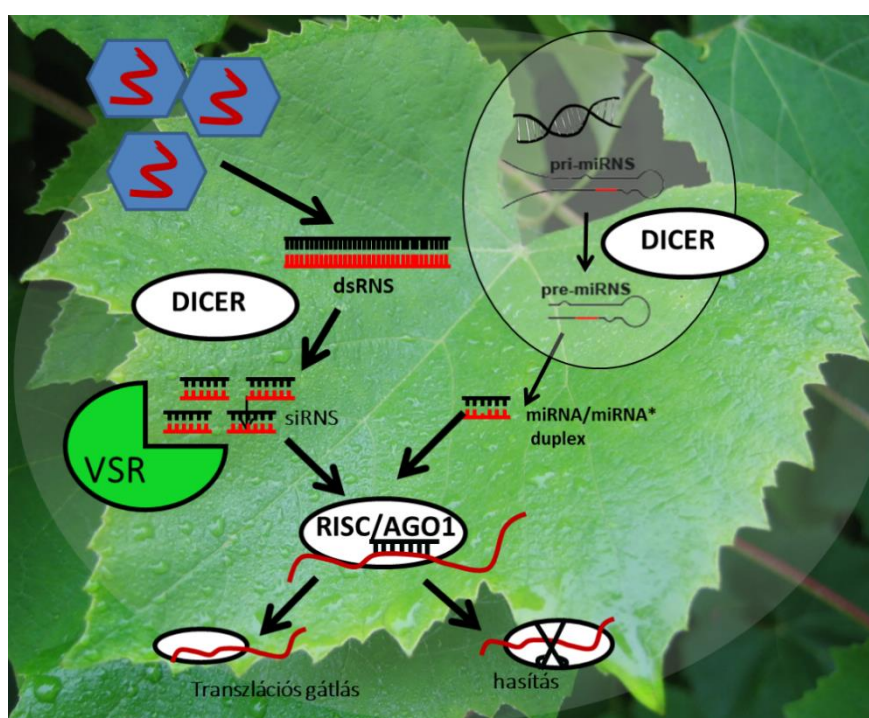
A viroidok a legkisebb növényeket fertőző genetikai ágensek. Genomjuk kisméretű (250-450nt) cirkuláris, fehérjét nem kódoló, egyszálú RNS. A viroidok két családja a Pospiviroidae (ide tartozik a szőlőn szinte mindig megtalálható komló törpülés viroid (hop stunt viroid – HSVd) és a szőlő sárga foltosság viroid (grapevine yellow speckle viroid – GYSVd) 1,2 és az Avsuntoviroidae család: ide tartozik az őszibarack látens mozaik viroid (peach latent viroid - PLMVd) alapvetően különböznek egymástól. Előbbiek asszimmetrikus rolling-circle mechanizmussal sokszorozódnak a sejtmagban, míg utóbbiak replikációja a plasztiszban, szimmetrikus rolling-circle mechanizmussal történik, melyet a viroid erős másodlagos szerkezete miatt kialakuló hammerhead ribozim katalizál (Flores *et al.*, 2006). Ilyen másodlagos szerkezet csupán a nukleinsav szekvencia alapján bioinformatikai módszerekkel is előre jelezhető (Wu *et al.*, 2012). Zhang és munkatársai ilyen bioinformatikai módszerekkel azonosítottak több lehetséges viroidot sRNS HTS eredményeikelemzésekor (Zhang *et al.*, 2014). A viroidok, a vírusokhoz hasonlóan, indukálják a gazdanövény védekező rendszerét, jelenlétük együtt jár a szekvenciájukkal megegyező sRNS-ek felhalmozódásával (Navarro *et al.*, 2009).

3.4 A növény védekezési reakciója a vírusfertőzésekkel szemben – RNS interferencia

Vírusfertőzés során aktiválódik a gazdanövény hatékony, szekvenciaspecifikus, RNS alapú védekezési rendszere, az RNSi (Ding, 2007, Herr & Baulcombe, 2004). A folyamat lényege, hogy a növényeket fertőző vírusok (bármilyen genommal rendelkeznek is) és viroidok replikációja során dsRNS keletkezik (Huang *et al.*, 2016). A dsRNS-eket a növény egy ribonukleáz (ribonuclease - RN-áz) aktivitással rendelkező enzime, a DICER, felismeri és rövid, kis interferáló (small interfering – si) RNS-ekké darabolja. A keletkező siRNS-ek egyik szála beépül az RNS indukált géncsendesítési komplexbe (RNA induced silencing complex – RISC). Az így „töltött” RISC a növényi sejtet pásztázva megtalál minden olyan RNS-t, ami szekvencia komplementaritást mutat a beépült sRNS-sel. Mivel ebben az esetben az sRNS a vírusról keletkezett, a RISC minden virális RNS-t megtalál, és blokkolja kifejeződését, általában úgy, hogy elhasítja az RNS-t, vagy gátolja transzlációs kifejeződését (1. ábra).

Mivel a vírusfertőzött növényben mindig jelen vannak a vírus szekvenciájával megegyező siRNS-ek, ezek szekvenciájának meghatározása diagnosztikai módszerként is felhasználható (Pooggin, 2018). A rendszer igen specifikus és nagyon hatékony: ha nem gátolná semmi az aktivitását, a vírusok szaporodását és terjedését a növények kontroll alatt tarthatnák. Sajnos

azonban a vírusok képesek ezt a folyamatot különböző pontokon gátolni. Túlélésük érdekében az evolúció során különböző VSR-eket evolvtak. A VSR-ek az antivirális RNSi folyamatát különböző pontokon képesek gátolni (Burgyan & Havelde, 2011, Csorba *et al.*, 2015). Az egyik legismertebb VSR, a CymRSV p19 fehérjéje, dimerként tudja kötni a 21nt hosszú siRNS-eket. Mivel megköti a siRNS-eket, azok nem tudnak beépülni a RISC-be, ennélkül pedig a komplex nem tudja felismerni a vírus RNS-eket, azok szabadon terjedhetnek. A VSR nélküli mutáns vírus fertőzésekor a növény fel tudja venni a harcot a fertőzéssel, a növény kigyógyul a fertőzésből. A másik ilyen igen sok szempontból jellemzett VSR az uborkamozzaik vírus (cucumber mosaic virus – CMV) 2b fehérjéje, ami nemcsak egy, hanem több ponton is gátolja a folyamatot (Nemes *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2006). A különböző víruscsaládokba tartozó vírusok a VSR-ek egész sorát képesek kifejezni, sokszor az eredeti vírusfunkciókkal (replikáz, köpenyfehérje) egyidejűleg (Csorba *et al.*, 2015).



1. ábra A vírusfertőzéskor indukálódó antivirális RNSi és az endogén miRNS útvonal sematikus áttekintése.

A növényi sejtekben különböző DICER enzimek vannak jelen, melyek egyes specifikus RNSi útvonalakra specializálódtak (Brodersen & Voinnet, 2006). Az RNS darabolását a dsRNS végéhez kötődve végzik. A keletkező siRNS duplex mérete attól függ, hogy a keletkezését katalizáló DICER-ben (dicer like - DCL) az RNáz domének távolsága mekkora az RNS 3' véget kötő doménjéhez viszonyítva. A növényi gazdák közül az *A. thaliana* DCL-ei a legjobban jellemzettek (négyet különböztetünk meg): a DCL1 és a DCL4 21, a DCL2 22nt, a DCL3 24nt méretű darabot vág a templátjából (Vaucheret, 2006). A többi növényben is ezen DCL-ekhez való hasonlóság alapján írták le és annotálták a különböző DCL enzimeket. A DCL-ek nemcsak különböző méretű sRNS duplexet generálnak, hanem a különböző RNSi folyamatokban vesznek részt. A DCL1 az endogén mikro RNS (micro – miRNS) alapú szabályzásban, a DCL2 és DCL4 az antivirális RNAi-ben, míg a DCL3 az RNSi alapú metilációs szabályozási folyamatokban vesz részt (Vaucheret, 2006).

A RISC végrehajtó komplex legfontosabb molekulája az ARGONAUTE (AGO) fehérje (Mallory & Vaucheret, 2010), melyből szintén több, *A. thaliana*-ban 10, található, és szintén specializálódtak a különböző RNSi útvonalakra.

Az RNSi ifolyamatok nemcsak az invazív nukleinsavakkal szemben nyújtanak védelmet, hanem alapvetően fontosak a növények endogén szabályozási folyamataiban is (Yu *et al.*, 2017). Ebben az esetben a miRNS duplexek (ez esetben miRNS:miRNS* duplex), a genomban kódolt, RNS-sé átíródó és erős másodlagos szerkezettel rendelkező miRNS prkurzorokról keletkeznek elsősorban a DCL1 aktivitásának eredményeképpen (1. ábra). A duplexből az érett miRNS épül be a RISC fő fehérjéjébe, jellemzően az az AGO1-be, és szekvencia komplementaritás alapján regulálja az endogén célmolekulákat. A miRNS* száll eliminálódik. Az miRNS alapú szabályozás az evolúció során folyamatosan fejlődött (Cui *et al.*, 2017) és a génexpresszió szabályozásában a transzkripciós faktorokkal azonos nagyságrendben vesz részt, alapvető fontosságú a fejlődésbiológiai jelenségekben és a stressz válaszokban (Yu *et al.*, 2017). Nagyon sok esetben a transzkripciós faktorok maguk is miRNS szabályozás által reguláltak. A HTS platformok egyre több és több ilyen reguláló miRNS-ről adnak számot, adatbázisuk, a miRBase (<http://www.mirbase.org/>) folyamatosan bővül. A vírusfertőzött növény sRNS-einek szekvenálása során tehát nemcsak a virális siRNS-ekről szerezhetünk tudomást, hanem azt is felderíthetjük, hogy a vírusfertőzés mely miRNS-ek kifejeződésére – és így milyen célmolekulák expressziójára van hatással (Weiberg *et al.*, 2014).

3.5 A vírusfertőzés hatása a növényi gazda génexpressziójára

A vírusfertőzött növények génexpressziós változásait vizsgáló kutatások általában a fertőzés korai szakaszát vizsgálják, azt a pontot, amikor a vírus belép a gazdasejtbe. E korai ponton a gazda vírusellenes mechanizmusai aktiválódnak és a vírusfertőzés sorsa is eldőlt. Ha a növény nem gazdája a vírusnak, a vírus nem tud replikálódni. Ha a növény gazdája a vírusnak, a fertőzött sejtben replikálódni tud, de a hatékony vírusellenes rezisztencia folyamatoknak köszönhetően a fertőzés továbbra is a fertőzött sejtre korlátozódik és a vírus mozgása gátolt (Calil & Fontes, 2017, Paudel & Sanfaçon, 2018). Ha a növényi gazda fogékony a vírus fertőzésére, a vírus átjut ezen az akadályon és a fertőzés következő szakaszába lép, amikor végül nemcsak sejtről sejtre, hanem nagyobb távolságokra is eljut és kolonizálja az egész növényt. E folyamatok során más védekező folyamatok is, mint az RNSi, aktiválódnak (Baulcombe, 2004). A vírusok ugyanakkor ezeket a folyamatokat is képesek gátolni a genomjukban kódolt VSR-ek segítségével, és így nagyobb koncentrációban képesek felhalmozódni a növényekben (Csorba *et al.*, 2007). Az RNSi alapú molekuláris mechanizmusok és a betegségek kialakításában betöltött szerepükről részletes információink vannak (Wang *et al.*, 2012), ugyanakkor a fertőzés későbbi szakaszában bekövetkezett génexpressziós változások még nem teljes mértékben jellemzettek. Mára, egyre több az ismert genommal rendelkező gazdanövény és a génexpressziós változások jellemzésére nagy-átersztő képességű, a genom egészének expressziós változásának leírására alkalmas, módszerek (microarray és mRNS szekvenálás) állnak rendelkezésre. Így egyre több és több leírás látott napvilágot, melyekben egy adott gazdában, adott vírus fertőzésére bekövetkező, a vírusfertőzés során kialakult tünetek hátterében álló molekuláris folyamatokat jellemezték (Catoni *et al.*, 2009, Allie & Rey, 2013, Yang *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2014, Choi *et al.*, 2015,

Fan *et al.*, 2015, Kaur *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2016, Gómez-Aix *et al.*, 2016, Sun *et al.*, 2016, Conti *et al.*, 2017).

A vírusfertőzés során a vírus megváltoztatja a gazdanövény anyagcseréjét, egyrészt, hogy replikálja saját genomját, másrészt, hogy sejtről sejtre tudjon vándorolni a növényben. Az adott vírus fertőzésére a fogékony gazda lehet érzékeny vagy toleráns. Érzékeny gazdában a fertőzés általában akut: a vírus igen nagy mennyiségben halmozódik fel és fontos háztartási gének gátlását (shut-off) okozhatja (Aranda & Maule, 1998). Ennek eredményeként súlyos betegség tünetek jelennek meg, ami akár rövid időben belül a gazdanövény pusztulását is okozhatja. Toleráns gazdában ezzel szemben a fertőzés perzisztenssé válik: annak ellenére, hogy ugyan a vírus itt is nagy mennyiségben halmozódik fel, nincsenek látható vagy súlyos betegség tünetek, és a növény túléli a fertőzést.

Korábbi kísérleteinkben azt figyeltük meg, hogy néhány vírus-gazda kapcsolatban a fontos háztartási gének expressziójának csökkenése akár hosszabb ideig is jelen van, az úgynevezett shut-off jelenség hetekig fennállhat (Havelda *et al.*, 2008). *In vitro* run on transzkripciók kísérleteink azt is megmutatták, hogy a shut-off a sejtmagban, transzkripció szinten fejeződik ki (Havelda *et al.*, 2008). Leírtuk, hogy a CymRSV és a keresztesvirágúakat fertőző dohánymozzaik vírus (crucifer infecting tobamovirus - crTMV) súlyos tüneteket okoz *N. benthamiana* növényen, ami a gazda pusztulását okozza. A PVX intenzív klorózist okoz *Solanum lycopersicum* gazdán, de sosem történik nekrozis és a növény túléli a fertőzést. Ezek a fertőzések igen gyors lefolyásúak, miközben a például a ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz/oxigenáz (Rubisco) és a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (Gapdh) mRNS-einek expressziója jelentős mértékben csökken, ami az akut fertőzése jellemző génexpressziós változás. Ezzel ellentétben a tarlórépa gödrösödés vírussal (turnip crinkle virus - TCV) fertőzött *N. benthamiana* és a TMV U1 törzsével fertőzött *S. lycopersicum* csupán enyhe tüneteket és gyenge klorózist mutat és sem a Rubisco, sem a Gapdh szintje nem csökken, ami a perzisztens fertőzéseket jellemzi (Havelda *et al.*, 2008).

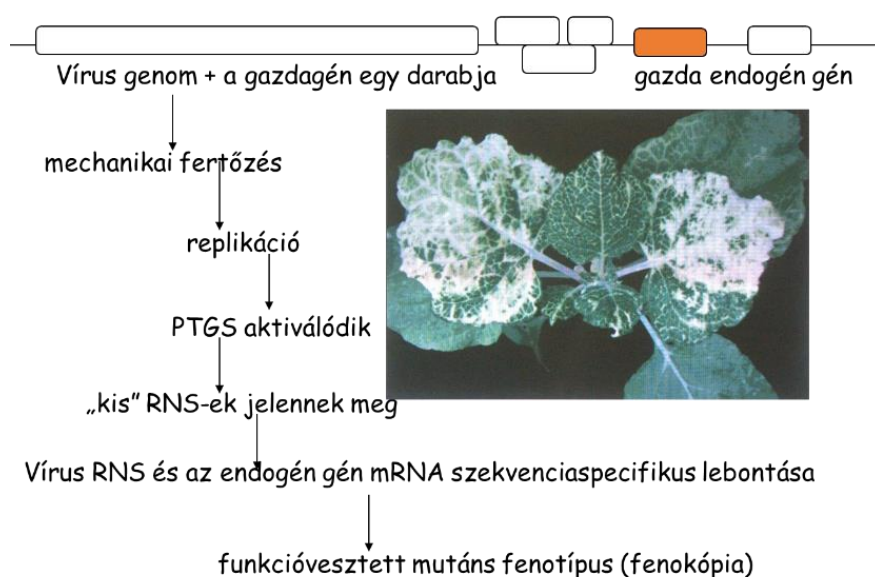
3.6 A vírusok, mint vektorok felhasználása a biotechnológiában, funkcionális genomikában

A vírusok biotechnológiai felhasználása mára egy új iparágat alapozott meg. Ennek lényege az, hogy mivel a növényi vírusok igen nagymértékben képesek idegen géneket kifejezni rekombináns „gyárként” használhatóak fehérje termelésre. Legtöbbször a köpenyfehérje felületén expresszáltatják a termelni kívánt antigént, fehérjét, ami nemcsak nagy mennyiségben történik, hanem a bakteriálisan termelt fehérjékkel szemben, megfelelő módon tartalmazza a működésben igen fontos poszttranszlációs módosításokat is (Peyret & Lomonosoff, 2015).

A vírusok azonban replikációjuk során indukálják a növényi gazda védekező folyamatait is. Ezt a jelenséget használják fel a funkcionális genomikában, amikor a növényi gének funkciójának megállapításához hívják a vírusokat segítségül. A vírus indukált RNSi (virus induced gene silencing - VIGS) során a gazda endogén génjét, vagy annak egy darabját építik rekombináns vírusokba (Baulcombe, 1999). Így a VIGS vektorral való fertőzés során a gazda siRNS alapú RNSi folyamatai nemcsak a vírus, hanem az endogén gén ellen is indukálódnak (Baulcombe, 1999). A fertőzött növényben így nemcsak a fertőző vírus mRNS-e, hanem a beépített génnel homológiát mutató endogén gén mRNS-e is lebomlik. A VIGS vektorral

fertőzött növényen a gén hiányára jellemző fenotípus jelenik meg, így ez a módszer jól használható gének funkciójának megállapítására (2. ábra).

A VIGS, más gének funkciójának megállapítására alkalmas módszerrel összehasonlítva, számos előnnyel rendelkezik. Gyors, mert a gazdanövény stabil transzformálása nem szükséges. Olyan gének funkciója is vizsgálható, melyek letálisak, mert a kísérletek során már kifejezett növényeket fertőzünk. Ilyenkor a letális gén funkciójára a növények pusztulásából tudunk következtetni. A VIGS rendszerek kidolgozásában a legnagyobb kihívás a megfelelő, vektorkészítésre alkalmas vírus megtalálása. Egy VIGS vektor készítésre alkalmas vírusnak hatékonyan kell fertőznie a gazdanövényt, de úgy, hogy minél kisebb mértékben okozzon tüneteket, mivel ezek megzavarnák a kísérletek kiértékelését.



2.ábra A vírus indukált RNSi mechanizmusa.

VIGS vektort igen sokféle növényre fejlesztettek. A legismertebb tobamovírus, a TMV volt az egyik legelső vírus, melyből vírusvektort alakítottak ki (Dawson *et al.*, 1989). A CP szubgenomikus RNS-ének promóterének megduplázásával készült vektor replikálódott és a klónozott gén nagy mennyiségben expresszáldott. Gyakran történt meg azonban, hogy a duplikált promóter a vírus replikációja során kirekombinálódott (Dawson *et al.*, 1989). Ennek elkerülésére az újabb tobamovírus vektorokban a promóter duplikációjához egy rokon vírus promóterének hasonló régióját használták (Donson *et al.*, 1991, Shivprasad *et al.*, 1999), és ezek a vektorok hatékonyan tudták csendesíteni az endogén fitoen desaturáz (phytoen desaturase - PDS-t) gént *N. benthamiana*-ban (Kumagai *et al.*, 1995).

A legelterjedtebb, a funkcionális genomikában legtöbbször használt vektorok a *N. benthamiana*-t és a *S. lycopersicum*-ot fertőzik. Köztük is a legelterjedtebb a dohány zörgőlevelűség vírus (tobacco rattle virus -, TRV) alapú VIGS vektor (Ratcliff *et al.*, 2001). Ennek vitathatatlan előnye, hogy ugyan két genommal rendelkezik, a fejlesztés végterméke egy a két genomot külön-külön kódoló bináris vektor. Ezek közül csupán az egyiket kell rekombinációs technikákkal változtatni (ebbe kell klónozni annak a génnek egy darabját, melyet vizsgálni szeretnénk), míg a másik, a replikált kódoló, plazmidként fenntartható. A két bináris vektort külön-külön *Agrobacterium tumefaciens*-be transzformálva a felnőtt baktérium szuszpenziókat

összekeverve lehet a gazdanövény levelébe infiltrálni. A vírus a tranziens expressziót követően szisztemizálódik, így a vizsgált gén hiánya az egész növényen megfigyelhető. A TRV további előnye, hogy igen enyhe tüneteket okoz és a merisztémába is képes bejutni. Mivel a TRV az *A. thaliana*-t is képes fertőzni eredetileg e növény VIGS vektorának fejlesztették. Mivel azonban a fertőzések ismételtetősége a TRV - *Arabidopsis* rendszerben nem volt tökéletes végül ezen a gazdán való felhasználása nem terjedt el.

3.7 A növényi vírusdiagnosztikai fontossága a fásszárú, vegetatívan szaporított növények esetében

Fásszárú növényeink ültetvényeit hosszú távra, évtizedekre tervezzük. Az ültetvények eközben folyamatos fertőzésveszélynek vannak kitéve, igen sokféle kórokozó képes őket megbetegíteni. A baktériumok és a gombák fertőzése legtöbbször gyorsan megjelenő, látványos tüneteket okoz, de ellenük, azonosításuk után megfelelő növényvédelemmel általában hatékonyan védekezhetünk. A növényt vírusok is megbetegíthetik, egyszerre akár több is, de a fertőzés sokszor évekig rejtve marad. Szélsőséges időjárás, vagy más kórokozókval való fertőzés viszont legyengítheti a növény immunrendszerét és ekkor kialakulhatnak a vírushatásra jellemző tünetek, ami termésveszteséget, a növény leromlását és akár pusztulását jelentheti, így igen komoly gazdasági károkat okoznak a mezőgazdaságban szerte a világon.

A fásszárú növényeket, szőlőt, gyümölcsfákat igen sok vírus és viroid képes megfertőzni. Ezen kórokozók örökítő anyagának mérete igen tág határok között mozog. A legnagyobb vírusok genomja akár 20 ezer nukleotid is lehet, míg a legkisebb viroid csupán 150 nukleotid hosszú. A fertőzés során ezek a kórokozók szaporodásuk érdekében megváltoztatják a gazdanövény anyagcsere-folyamatait, ennek eredménye lesz a növényeken megjelenő tünet együttes. A vírushatások elleni védekezés a terjesztő vektorok elleni növényvédelemre és az egészséges, vírusmentes szaporítóanyag használatára korlátozódik. A szőlőt, gyümölcsfákat a fajtatulajdonságok fenntartása miatt vegetatívan szaporítjuk. Így, ha az anyató vírussal fertőzött, nemcsak a fajtát, hanem a vírust is terjesztjük (3. ábra).



3. ábra A vírusok terjedés a vegetatívan szaporított növények esetében. Vegetatívan szaporított növényeink esetében fokozottan kell ügyelnünk arra, hogy a szaporítóanyag forrásául szolgáló anyafa vírusmentes legyen. Ellenkező esetben a kedvező fajtatulajdonságok mellett az anyanövényben jelenlevő vírusokat is terjesztjük.

Mivel egyre nő a vegetatívan szaporított növények száma és az intenzív szaporítóanyag kereskedelem is globalizálódik, tovább nő a vírusos megbetegedések terjedésének veszélye. A megelőzés kulcsa a vírusmentes szaporítóanyag használata. A kérdés csupán az, hogy honnan tudjuk, hogy a szaporítóanyag valóban vírusmentes-e?

3.8 A növényi vírusok kimutatására alkalmas diagnosztikai módszerek

A hagyományos vírusdiagnosztika során a tesztelendő anyatőről, vagy fertőzésre utaló tüneteket mutató tőkékől nyert mintákban vizsgáljuk, hogy egy kérdéses kórokozó vajon jelen van-e a növényben. A molekuláris vizsgálatokat legtöbbször ELISA tesztekkel végzik, amihez szükség van egy olyan ellenanyagra, ami a vírus valamelyik (legtöbbször köpeny) fehérjét felismeri. Az ELISA-nál érzékenyebb kimutatást lehetővé tevő polimeráz láncreakción (polymerase chain reaction - PCR-en) alapuló technikákhoz pedig ismernünk kell a vírus örökítőanyagának nukleotid sorrendjét (legalább egy rövidebb szakaszon), hogy ezekre specifikus indítószekvenciákat tervezhessünk. A két módszer tehát közös abban, hogy csak olyan kórokozó kimutatására alkalmas, melyet ismerünk és feltételezzük jelenlétét az adott növényen. A hatóság éppen ezért az anyatöveket egy másik módszerrel, bioteszttel is teszteli, mely elvileg alkalmas a növényben jelenlevő összes vírus kimutatására. Ehhez a tesztelendő tőkéről lágyszárú és fásszárú indikátornövényekre oltanak, majd figyelik a tünetek kialakulását, ami fásszárúak esetében évekig is eltart.

E hagyományos vírusdiagnosztikai módszerekhez képest teljesen új megközelítési módot jelent a HTS, mely alkalmas új vírusok azonosítására is (Al Rwahnih *et al.*, 2009). A kapott adatok alapján arra is lehetőség nyílt, hogy egy ültetvényben vagy szaporítóanyagban jelenlevő összes vírus és viroid (virom) szekvenciáját megállapítsuk (Coetzee *et al.*, 2010). A különböző kiindulási anyagok (DNS, RNS, dsRNS, sRNS, vírus associated nucleic acid – VANA) HTS-én alapuló vírusdiagnosztika, számos új szőlővírus azonosításához vezetett (Martelli, 2014).

A dsRNS, sRNS tisztítás és VANA izolálások sok munkát és nagy hozzáértést igényelnek, így bár a HTS egyre olcsóbb, az ezen alapuló diagnosztikai még mindig viszonylag drága eljárás. Míg a DNS, RNS, dsRNS és VANA HTS-nél magát a vírus örökítőanyagát mutatjuk ki, az sRNS HTS esetében a vírus RNS helyett, a vírus ellen, a növény védekező rendszere által termelt sRNS-ek szekvenciáját határozzuk meg.

Ahogy azt már a 3.3 fejezetben bemutattam, a vírusfertőzés során a növény RNSi alapú védekezőrendszere olyan specifikus reakciókat indít, melynek eredményeképpen a növény a fertőző vírust lebontja. A lebontás specifikását a vírus szekvenciájával megegyező szekvenciájú 21-24 nukleotid hosszúságú siRNS-ek adják. Vírussal vagy viroiddal fertőzött növényben tehát jelen vannak a kórokozó szekvenciájával megegyező sRNS-ek, melyek nukleinsav sorrendje HTS-sel meghatározható (Navarro *et al.*, 2009, Pantaleo *et al.*, 2010), így a jelen lévő vírusok bioinformatikai elemzésekkel azonosíthatóak, még akkor is, ha eddig teljesen ismeretlenek voltak (Wu *et al.*, 2012, Giampetruzzi *et al.*, 2012). Mivel az sRNS-ek nukleinsav sorrendje megegyezik a mintánkban található vírus variáns nukleinsav sorrendjével, feltérképezhetőek azok a pozíciók is, ahol variánsuk szekvencia eltérést mutat a referenciagenomhoz képest. Ez az információ pedig segíthet minket abban, hogy a mintáinkban jelenlevő variánsokra specifikusabb, ezért kimutatásuknál megbízhatóbban használható primereket tervezzünk a rutin tesztek számára.

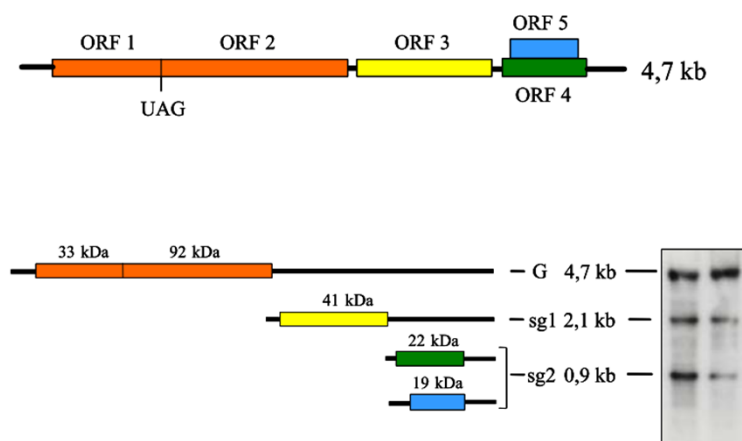
3.9 A kutatásaimban szereplő vírusok

Kutatásaim alanyai vírusok. Munkám során igen sok, a diagnosztikai felmérések miatt pedig egyre több, vírus került a látókörmbe. Mivel munkám célja nem egy-egy vírus részletes jellemzése volt, ebben a fejezetben csak néhány olyan vírusról foglaltam össze a legfontosabb tudnivalókat, melyek ismerete a kutatások megértéséhez segítséget nyújt.

3.9.1 Lágyszárú kétszikűeket fertőző vírusok

3.9.1.1 Tombusvírusok

Az RNSi kutatásink során leggyakrabban használt vírusok, a CymRSV és a szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus (carnation Italian ringspot virus – CIRV), tombusvírusok. A tombusvírusok pozitív szálú, osztatlan genomi RNS-e kb. 4700 bázis hosszú, öt nyitott leolvasási keretet (open reading frame – ORF) kódol. Az ORF4-gyel kereteltolódással kódolt ORF5-nek szerepe van a nekrotikus tünetek kialakulásában (Dalmay *et al.*, 1993), de funkciója nagyon sokáig talány volt. Az RNSi kutatások során derült ki, hogy ez a 19kDa fehérje a vírus VSR-e (Voinnet *et al.*, 1999) (4.ábra).

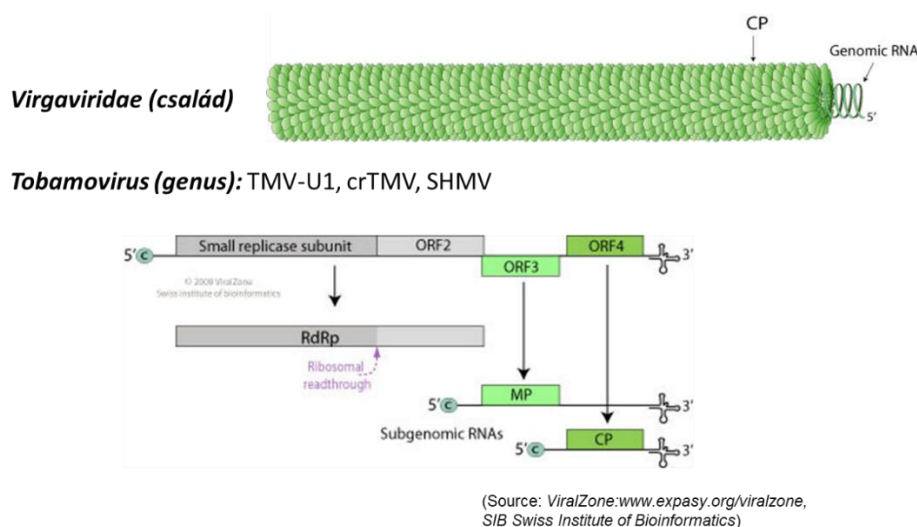


4. ábra Egy tipikus tombusvírus, a CymRSV genomszerveződése. (Havelda Zoltán doktori értekezése alapján)

Szintén tombusvírus, a TCV, genomszerveződés kissé eltér a tipikus tombusvírusoktól. A legnagyobb különbség az, hogy az RNSit gátló funkciót esetében a p38-as köpenyfehérje tölti be (Thomas *et al.*, 2003).

3.9.1.2 Tobamovírusok

A tobamovírusok nemzetség névadója, a virológia legjobban tanulmányozott vírusa, a TMV. A tobamovírusok genomja kb 6400-6500nt hosszú, négy ORF-et kódol, 5' végén CAP védi az exonukleázoktól míg a 3' vége tRNS-hez hasonló, erős másodlagos szerkezettel rendelkezik. Az ORF1 és ORF2 kódolja a replikázt. A hosszabb forma kifejeződése egy read-through stop kódoknak köszönhető. A replikáz egyben a vírus VRS fehérjéje is (Csorba *et al.*, 2007). A mozgási fehérje (ORF3) és a köpenyfehérje (ORF4) szubgenomikus RNS-ekről íródnak át (5. ábra).

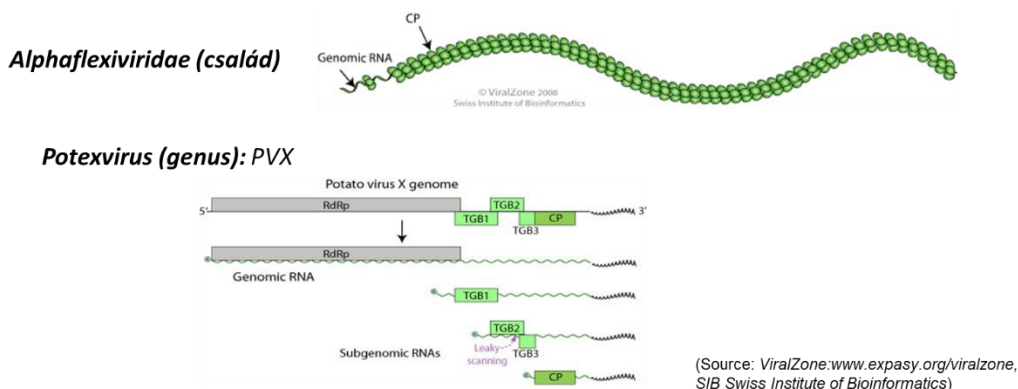


5. ábra A Tobamovirusok genomszerveződése.

A TMV-ből elsőként építettek idegen gént kifejezni képes vektort. Ma már egész biotechnológiai ipar épül a TMV-ben expresszált fehérjék termelésére (Magnicon technológia) (Peyret & Lomonossoff, 2015). A TMV egy speciális variánsa (crTMV) képes a keresztesvirágúakat is, így az *Arabidopsis*-t is fertőzni. A sunnhemp mosaic virus (SHMV) pozitív, egyszálú tobamovírus, genomja 6483nt hosszú. Az SHMV egy különleges tobamovírus, mivel minden ORF-je átfed. Egy fehérjét kódoló szakasz egyben egy szubgenomikus promóter része is, így nagyon nehéz klónozó helyet is tartalmazó vektort építeni belőle (Shivprasad *et al.*, 1999). Bár régóta ismert, hogy az SHMV pillangósokat is képes fertőzni, gazdakörét részletesen nem jellemezték.

3.9.1.3 Potexvírusok

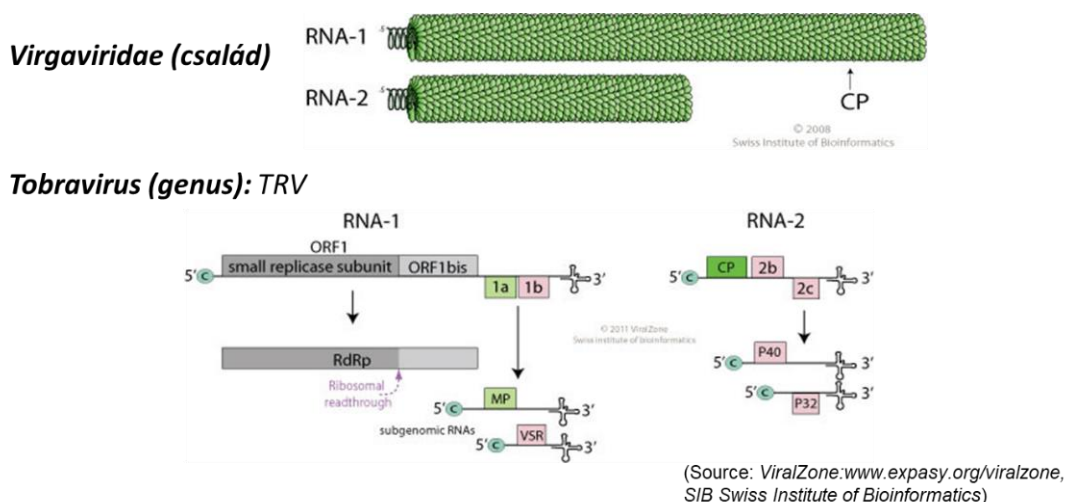
A Flexyviridae család Potexvirus nemzetségének névadó tagja a PVX. Genomja pozitív egyszálú, 5835 nukleotidból álló RNS. A teljes hosszúságú genomi RNS-ről a replikáz és három kisebb fehérje (triple gene block) transzlálódik, melyek a vírus sejtről-sejtre való terjedésében játszanak szerepet. A köpenyfehérje egy szubgenomikus RNS-ről transzlálódik. A PVX-en alapuló VIGS vektort Ruiz és munkatársai dolgozták ki 1998-ban a PDS gén funkciójának vizsgálatára *N. benthamiana*- (Ruiz *et al.*, 1998) (6.ábra).



6. ábra A Potexvírusok genomszerveződése.

3.9.1.4 Tobravírusok

A TRV a tobnavírus nemzetség legismertebb képviselője. A TRV pozitív szálú RNS genomja kétsztrátú. Az RNS1 6791nt, az RNS2 1905nt hosszú. Az RNS1 kódolja a genomi RNS-ről keletkező replikázt és a mozgási fehérjét. Az RNS2 a 25kDa-os köpenyfehérje és a szubgenomikus RNS-ről keletkező két, nem strukturális fehérje kifejeződéséért felelős (7. ábra).



7. ábra A TRV genomszerveződése.

Az RNS1 képes replikálódni és szisztemikusan terjedni az RNS2 nélkül. A TRV alapú VIGS vektor a legelterjedtebb VIGS vektor. Fertőzi az *Arabidopsis*-t is és a vírus az osztódó szövetekbe is képes bejutni, így a generatív szervekben, hajtáscsúcsban expresszálandó gének funkciója is vizsgálható használatával. A vektort Ratcliff és munkatársai (2001) fejlesztették ki (Ratcliff *et al.*, 2001). A genom két RNS-ét nagy expressziót biztosító (CaMV 35S) promóter mögé és a nopalinnal szintáz terminátor elé, bináris (baktérium és növényi gazdában is működő) vektorba klónozták, a nem strukturális géneket helyettesítették egy multiklónozó hellyel, ami lehetővé tette a vizsgálni kívánt gén egy szakaszának a beépítését. A T-DNS kazettákat *Agrobacterium*ban kifejezve, agroinfiltrálásra alkalmas rendszert állítottak elő, ami lényegesen megkönnyítette a növények fertőzését.

3.9.2 Lágyszárú egyszikűeket fertőző vírusok

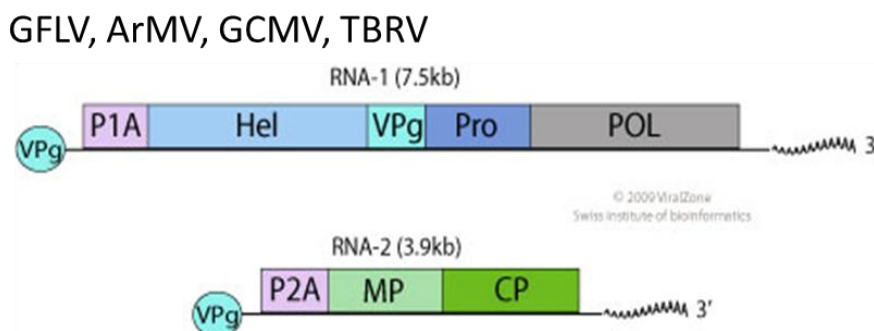
A hordeovírus nemzetség tagja az árpa csíkos mozaik vírus (barley stripe mosaic virus - BSMV). A BSMV pozitív szálú RNS-el rendelkezik. A genomja háromsztrátú (α , β , γ), genomja 7 fehérjét kódol. A BSMV cDNS klónjainak hozzáférhetősége, a mechanikai úton való átvihetősége és a széles gazdanövény köre alkalmassá tette VIGS vektor fejlesztésére az egyszikűekben (Holzberg *et al.*, 2002), amihez a vírus γ RNS-ébe építettek egy klónozó kazettát.

3.9.3 Szőlőt fertőző vírusok

A szőlőt igen sok, akár 80 vírus és hét viroid képes fertőzni (Martelli, 2014). Pontos számukat elég nehéz meghatározni, hiszen a korszerű szekvenálási technikáknak köszönhetően egyre több szőlőt fertőző vírust írnak le. A vírusok nagy része a szőlőn megjelenő tünetek alapján négy fő betegség komplexhez köthető: (1) szőlő fertőző vírusos leromlás, (2) levélsodródás tünetcsoport, (3) faszöveti barázdáltság és a (4) látens foltosság tünetcsoport. A szőlőt fertőzni képes vírusok legnagyobb része pozitív, egyszálú RNS genommal rendelkezik. A szőlővírusok kutatása területén Lehoczky János és munkatársai kezdtek vizsgálatokat a 60-as években, hazánkban. Ezek a kutatások főként a kórokozók jellemzésére, életmódjuk megismerésére, kimutatásukra, valamint a fertőzött tőkék kiszűrésére szolgáló rendszer kidolgozásra irányultak. Ezen munkának köszönhetően Magyarországon kötelezővé váltak a szőlő virológiai ellenőrzések a szaporítóanyag előállítás során. Az ellenőrzések a 87/2006. (XII.28.) FVM rendelet előírásainak megfelelően történnek. Az alábbiakban csak a legfontosabb szőlőt fertőző vírusok az értekezés szempontjából fontos tulajdonságait, jellemzőit, és magyar vonatkozásait tárgyalom.

3.9.3.1 Szőlőt fertőző nepovírusok

A nepovírusok genomja két, pozitív egyszálú RNS-t (RNS1, RNS2) tartalmaz, vektoraik nematódák, erről kapták a nevüket (8. ábra).



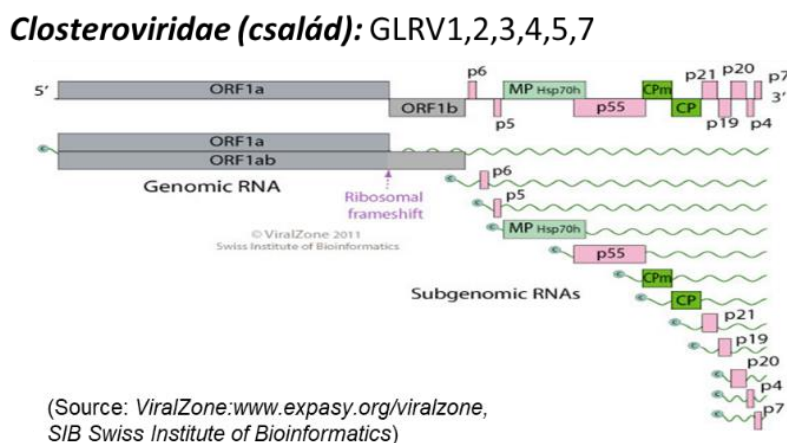
(Source: ViralZone: www.expasy.org/viralzone,
SIB Swiss Institute of Bioinformatics)

8. ábra A Nepovírusok genomszerveződése.

Mivel nagyon közeli rokonságba tartoznak, ha egy tőke több rokon vírussal fertőzött könnyen alakul ki rekombináció közöttük (Vigne *et al.*, 2008). A legfontosabb képviselőik: a szőlő fertőző leromlás (grapevine fanleaf virus – GFLV) (Martelli, 1965, Martelli & Lehoczky, 1968) és az Arabisz mozaik vírus (Arabis mosaic virus – ArMV). A szintén ide tartozó szőlő króm mozaik vírust (grapevine chrome mosaic virus, - GCMV) – eredetileg Hungarian chrome mosaic virus – a világon elsőként a Balaton-felvidéken detektálták (Martelli, 1965). A paradicsom fekete gyűrűs vírus fertőzése esetén gátolt a tőkék fejlődése, a leveleken klorotikus tünetek jelenhetnek meg (Lehoczky, 1986).

3.9.3.2 Levélsordódás vírusok

A szőlőféléket érintő betegségek közül a szőlő-levélsordódás betegség (grapevine leafroll disease - GLD) világszerte okoz gazdaságilag is igen jelentős kárt (Naidu *et al.*, 2014). A levélsordódás vírusok tagjai a szőlő levélsordódás asszociált vírusok (grapevine leafroll associated virus – GLRaV), a *Closteroviridae* családon belül az *Ampelovirus* (GLRaV-1, -3, -4), a *Closterovirus* (GLRaV-2), és a *Velarivirus* (GLRaV-7) nemzetségbe sorolhatóak. Igen hosszú (akár 18kB hosszú) pozitív egyszálú RNS genomjuk van, replikázuk a legmegbízhatóbb hibajavító mechanizmussal rendelkező RdRp (9. ábra).



9. ábra A Closterovírusok genomszerveződése.

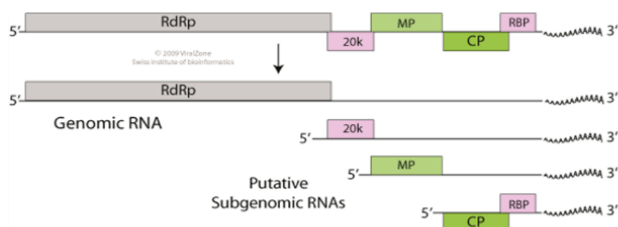
A virális fehérjéken kívül egy, vagy két, növényi génnel rokonságot mutató hősokk fehérjét is kódolnak. Hazánkban a GLRaV-1 és -3 vírusok terjedtek el (Cseh *et al.*, 2013), és okoznak károkat, így jelenlétüket a szaporítóanyagban kötelező vizsgálni.

3.9.3.3 Vitivírusok

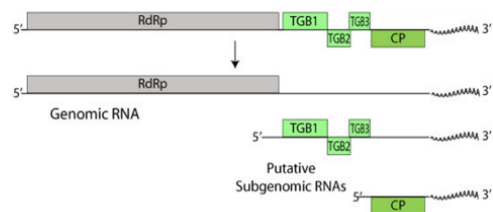
A vitivírusok pozitív egyszálú RNS genommal rendelkeznek, ami általánosan 5 ORF-et kódol. A nemzetség legrégebben leírt tagjai: a szőlő vírus (grapevine virus – GV) GVA, GVB és a GVD vírusok a faszöveti barázdáltság és a parakérgűség tünet együttes kialakításában fontosak (10. ábra).

***Betaflexiviridae* (család), *Vitivirus* (genus)**

GVA, GVB, GVD, GVE, GVF, GVT



***Foveavirus* (család) GRSPaV**



10. ábra A Vitivírusok és a GRSPaV genomszerveződése.

Az utóbbi időben, molekuláris technikáknak köszönhetően, számos új vitivírust azonosítottak: GVE (Al Rwahnih *et al.*, 2012), GVF (Nakaune *et al.*, 2008), GVI, GVG (Blouin

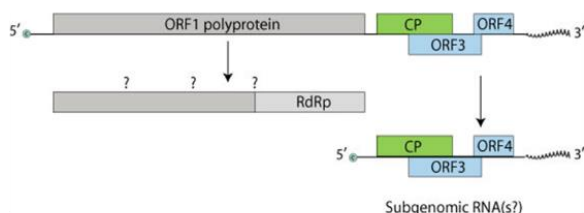
et al., 2018) és GVT (Jo *et al.*, 2017), de nem tudjuk pontosan, hogy vajon ezek a vírusok milyen mértékben járulnak hozzá a betegség komplex kialakulásához. Szintén ebbe a csoportba tartozik a legelterjedtebb és nagyon változatos genommal rendelkező szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus (grapevine rupestris stem pitting associated virus - GRSPaV), aminek előfordulását az oltással átvihető faszöveti barázdáltság betegséggel hozták összefüggésbe.

3.9.3.4 Tymovírusok

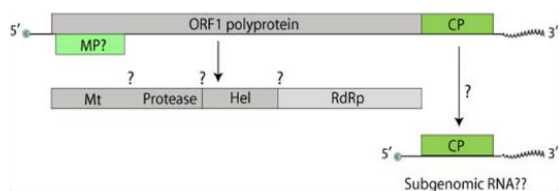
A tymovírusok legismertebb és legelterjedtebb képviselője a szőlő foltosodás vírus (grapevine fleck virus - GFkV), melyet hazánkban (Lehoczky, 1981) írt le először. A nemzetség többi tagját sokkal később azonosították: a grapevine redglobe virus (GRGV), a grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV), a grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV), melyek a GFkV vírussal közeli rokonságban állnak, és együttesen alkotják a „fleck-komplexet” (Martelli, 2014) (11. ábra).

Tymoviridae (család):

Maculavirus (genus) GFkV



Marafivirus (genus) GRGV, GRVfV, GaMaV, GSYV1



(Source: ViralZone: www.expasy.org/viralzone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics)

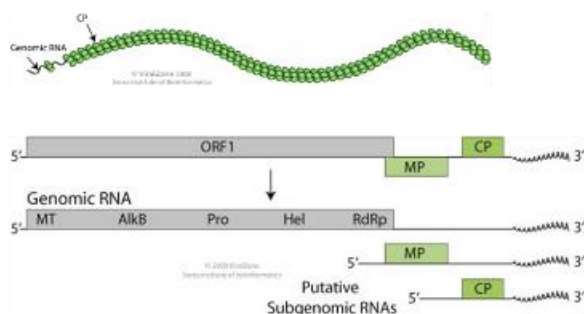
11. ábra A Tymovírusok genomszerveződése.

Ugyancsak ebbe a nemzetségbe tartozik a Szőlő Syrah vírus1 (Grapevine Syrah virus-1, GSYV-1), melyet 2009-ben dsRNS-ek nagy-áteresztőképességű szekvenálásával és hagyományos módszerekkel egy időben azonosítottak (Al Rwahnih *et al.*, 2009), (Sabanadzovic *et al.*, 2009) és azóta számos európai országból jelentették előfordulását.

3.9.3.5 Szőlő Pinot gris vírus

A szőlő Pinot gris vírus (grapevine Pinot gris virus - GPGV) 2012-ben sRNS-ek HTS-sel azonosították Olaszországban (Giampetruzzi *et al.*, 2012). A GPGV fertőzést a jellegzetes levélfoltosodást és deformációt okozó GLMD (Grapevine Leaf Mottling and Deformation) betegséggel hozták összefüggésbe, mely betegséget már korábban, 2003-ban szintén Olaszországban figyeltek meg. A GPGV genomja pozitív egyszálú RNS, ami három ORF-et kódol (12. ábra).

A GPGV genetikai sokféleségét és a tünetek kialakulásával való kapcsolatát folyamatosan vizsgálják. Az eredmények szerint a tünetmentes szőlő mintából származó izolátum MP-t kódoló szakasza 6 nukleotiddal hosszabb, mint a tünetet okozó variánsé (Saldarelli *et al.*, 2015), és ez a nukleotid polimorfizmus játszhat szerepet a tünetek kialakulásában.

Betaflexiviridae (család), Trichovirus (genus)

(Source: ViralZone: www.expasy.org/viralzone,
SIB Swiss Institute of Bioinformatics)



A GPGV virulens törzsének tipikus tünetei/
Csókakő / 2017

12. ábra A GPGV genomszerveződése és egy jellemző GPGV tünetet mutató Pinot gris tőke képe.

A vírust és/vagy az általa okozott betegséget a világ számos országában megtalálták, rendkívül széles körben elterjedt. A vírus, szőlőn kívül, természetes módon képes megfertőzni lágyszárú növényeket is, eddig *Silene latifolia subsp. Alba* és *Chenopodium album L* (Gualandri *et al.*, 2017) növényekben írták le jelenlétét, ami a vírus bonyolultabb epidemiológiájára utalhat.

3.9.3.6 Szőlő vonalas mintázottság vírus

A szőlő vonalas mintázottság vírust (grapevine line pattern vírus - GLPV), magyarországi szőlőről írták le (Lehoczky, 1987). Az *Ilarvirus* nemzettség feltételezett tagja. Nevét a leveleken megjelenő világos, juharfalevélre emlékeztető mintázata és szétszórtn látható pontok, foltok alapján kapta. A kórokozó szekvenciája nem ismert, ez is lehet annak az oka, hogy bár minden szőlő virológiai könyvben szerepel, hazánkon kívül sehol máshol nem írták le előfordulását.

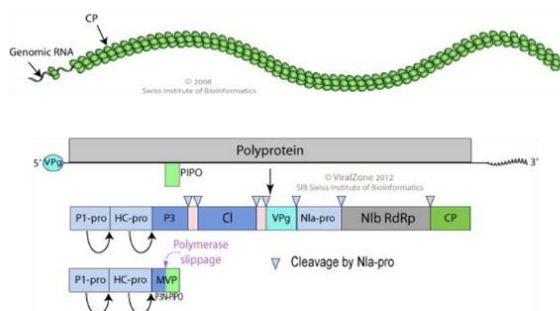
3.9.4 Csonthéjas gyümölcsfákat fertőző vírusok

A csonthéjas gyümölcsfák (őszibarack, nektarin, kajsz, szilva, cseresznye, meggy és mandula) szaporítása a mandula kivételével, melyet magról szaporítanak, vegetatíván történik. A csonthéjasokat a vegetatív szaporítás során nemcsak azért szemzik, mert a vesszőik nehezen gyökereznek, hanem azért is, mert az alanyok számos előnyös tulajdonsággal (növekedési erély, tápanyaggazdálkodás, ellenállóság) járulhatnak hozzá a fa és az ültetvények értékéhez. A vegetatív szaporítás miatt a gyümölcsfákban is számos vírus akkumulálódhat (akár szimultán – egyidejűleg is). Jelenlétük, lehet látens, tünetmentes, de akár súlyos tüneteket is okozhat, ami termésvesztéshez, vagy akár ültetvénypusztuláshoz vezethet, így jelentős gazdasági kárt okoz. A csonthéjasokról leírt vírusok száma jelenleg 44, de a HTS térhódításával ez a szám folyamatosan nő (Umer *et al.*, 2019, Maliogka *et al.*, 2018). A csonthéjasok talán legrettegettebb vírusa a sharka betegséget okozó szilvahimlő vírus (plum pox virus – PPV)(Garcia *et al.*, 2014). A PPV terjedését megelőzendő a potenciális sharka-gazda fajok

anyafáit izolátorháló alatt kell nevelni, a törzsültetvényeket rendszeresen ellenőrizni kell a vírus jelenlétére, hogy a terjedését megelőzzük. A PPV különböző gazdákon egymástól szekvenciálisan kijelentősen eltérő izolátumok formájában lehet jelen (eddig 9 fő izolátumát jellemezték), de a természetes rekombinánsai tovább bonyolítja ezt a képet (Szathmáry *et al.*, 2009). A Potyvírusok közé tartozó PPV-n kívül Prunus fajokon az Ilarvírusokhoz tartozó Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (Prunus necrotic ringspot virus -PNRSV) és a szilva törpülés vírus (prune dwarf virus – PDV) vírusok tartoznak az elsődlegesen vizsgálandó kórokozók közé (13. ábra).

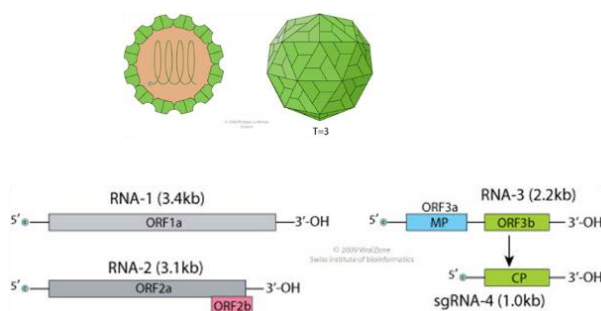
Potyviridae (család):

Potyvirus (genus): PPV



Bromoviridae (család):

Ilarvirus (genus): PNRSV PDV



(Source: ViralZone: www.expasy.org/viralzone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics)

13. ábra A Prunus fajokon vizsgálatköteles PPV, PNRSV és PDV genomszerveződése.

A PNRSV és PDV kontrollja azért is igen fontos, mert ez a vírus, az oltással, szemzéssel történő terjedésén kívül, maggal és pollennel is terjed. A HTS használata a csonthéjasokat fertőző vírusok kutatásában az INRA-Bourdeaux úttörő munkájával kezdődött, amikor a Sirofugen törpeség betegség okát keresték, és az ezért felelős cseresznye aprógyümölcsűség vírus (little cherry virus – LChV) 1-et HTS-sel azonosították (Candresse *et al.*, 2013). Azóta folyamatosan írnak le újabb és újabb csonthéjasokat fertőző vírusokat. Az új vírusok leírásán kívül a HTS használatával a látens jelenlevő vírusok jelenléte megbízhatóbban deríthető fel (számtalan publikáció foglalkozik az eddig leírt vírusok új földrajzi elterjedésének reportjáról) és az eddigi tudás alapján gazdaként nem feltételezett fajokról is leírásra kerülnek eddig nem leírt vírusok (Maliogka *et al.*, 2018). E dolgozatban leírt munkánk során fontos cseresznye A vírus (cherry virus A - CVA) és LChV1-ről a legfőbb tudnivalók az eredmények részben a kutatás bevezetésében találhatóak (6.4.4.)

4 Célkitűzések

Doktori értekezésemben azon munkáimat foglaltam össze, melyekben a növényeket fertőző vírusok gazdanövényre gyakorolt hatásának molekuláris mechanizmusát vizsgáltam, célzott fertőzésekben használható rekombináns vírus vektort (VIGS) vektort építettem és használtam, valamint egy új, sRNS HTS-en alapuló diagnosztikai módszert adaptáltam és használtam szőlő és gyümölcsfák vírusfertőzöttségének jellemzésére. Konkrét céljaim a következők voltak:

A vírusok gazdanövényre gyakorolt hatásának tanulmányozásakor:

- 1/ Megvizsgálni azt, hogy vajon a különböző vírusok nem rokon VSR-ek egyaránt képesek-e a miR168 indukcióján keresztül transzlációsán gátolni a gazda Argonaute 1 aktivitását?
- 2/ Bizonyítani, hogy a CymRSV p19 mir168 indukáló képessége független a szupresszor s RNS kötő képességétől, de azzal párhuzamosan képes a gazda vírusfertőzésre indukálódó RNSi folyamatait gátolni.
- 3/ Jellemezni az akut és perzisztens vírusfertőzési folyamatok során bekövetkező génexpressziós és fiziológiai változásokat, melyeknek szerepe lehet a fertőzésre jellemző tünetek kialakulásában.

VIGS vektorokkal kapcsolatos kísérleteimben:

- 4/ A pillangósvirágúak génexpressziós változásainak tanulmányozására alkalmas VIGS vektor készítése.
- 5/ VIGS használatával megvizsgálni azt, hogy a lisztharmat rezisztencia gén o (powdery mildew resistance o- Mlo) gén csendesítése búza növényen a növények lisztharmat-ellenállóságát eredményezi-e?
- 6/ *N. benthamiana*, *S. lycopersicum*, *Capsicum annuum* és *Triticum aestivum* növényeken vizsgálni azt, hogy az elterjedt VIGS vektorok valóban csak a célzott gének szintjét változtatják-e meg?

Az sRNS HTS használatával kapcsolatban:

- 7/ Adaptálni, az sRNS HTS-t és a hozzá kapcsolódó bioinformatikai eljárásokat, mint vírusdiagnosztikai módszert.
- 8/ sRNS HTS-sel felmérni hazánk termő- és alany- szőlőültetvényeinek vírusfertőzöttségét.
- 9/ Csonthéjas gyümölcsfa törzsültetvények vírusfertőzöttségét vizsgálni sRNS HTS-sel.
- 10/ Szekvencia információt gyűjteni a hazánkban leírt, szőlő vonalas mintázottság vírusról HTS-sel.

5 Anyagok és módszerek

Az anyag-módszer fejezetben csupán dióhéjban foglaltam össze az összes olyan molekuláris biológiai technikát, melyeket a kísérleteimben használtam. A részletes protokollok szakcikkeinkben, illetve hallgatóim dolgozataiban hozzáférhetőek (utóbbiak a honlapunkon publikusak: <https://abc.naik.hu/vegzett-hallgatok>) Mivel a dolgozatban szereplő kutatásaim mintegy 20 év termékei – mialatt a molekuláris biológiai módszerek igen sokat fejlődtek, egy módszernél akár több protokoll is található.

5.1 Növényanyag

5.1.1 Lágyszárú kísérleti növények

Kísérleteinkhez üvegházi körülmények között nevelt *N. benthamiana*, *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *C. annuum*, *Medicago truncatula* és *T. aestivum* növényeket használtunk.

A növényeket tisztított virionokkal, rekombináns vírusokról, vagy vírusokból épített VIGS vektorokról szintetizált *in vitro* transzkriptummal fertőztük meg. A fertőzéskor inokuláló puffert kevertünk össze a transzkriptummal, és azt mechanikailag, fertőző spatulával vittük a növények levelére. A vírusfertőzött növények mellett azonos korú növényeket, transzkriptumot nem tartalmazó inokuláló pufferrel kezeltük, mimikálva a fertőzéssel járó fizikai stresszeket (mock fertőzés). A vírusfertőzés során bekövetkező változások vizsgálatánál ezeket a növények negatív kontrollként szerepeltek.

5.1.2 Fásszárú növények

A virológiai felmérésekhez *in vitro* szaporított, izolátor házakban, törzs és termő ültetvényeken fenntartott szőlő és gyümölcsfák (szilva, kajszi, őszibarack) leveleit gyűjtöttük be. A leveleket mintagyűjtés után -70°C-on mélyfagyasztóban tároltuk.

5.2 Nukleinsav tisztítás

Kísérleteinkhez a mintázott növényekből nukleinsavakat kellett tisztítanunk. A lágyszárú növényekből teljes nukleinsav kivonatot készítettünk fenol-kloroformos extrakció sorozattal White és Kaper módszerét alapul véve (White & Kaper, 1989). Fásszárú növényekből RNS kivonatot Gambino optimalizált protokollja alapján (Giorgio *et al.*, 2008, Gambino, 2008, Czotter *et al.*, 2018) készítettünk. *E coli* baktériumokból, klónozást követően alkalikus módszerrel (Sambrook, 1983), vagy a kereskedelemben forgalmazott kit-eket felhasználva tisztítottunk plazmid DNS-t.

A tisztított nukleinsavak minőségét 1,2%-os agaróz gélben és TBE (90 mM Tris, 90 mM bórsav és 3mM EDTA) pufferben elektroforézissel történő elválasztást követően, etídium-bromidot tartalmazó gélben UV fényben láthatóvá téve vizuálisan ellenőriztük. A kivonatok össznukleinsav, RNS, vagy DNS koncentrációját NanoDrop® készülékkel határoztuk meg.

5.3 cDNS készítése

Az RNS vírusok darabjainak, illetve a gazdanövény endogén génjeinek klónozásához a szekvencia specifikus DNS amplifikáció előtt cDNS-t kellett szintetizálnunk. Az RNS templárról történő reverz transzkripciót a Thermo Scientific „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit” -jével készítettük, kit használati leírása alapján. Az endogén növényi gének

klónozásához a cDNS-t hígítás nélkül a vírusdiagnosztikai vizsgálatokban 10-szeres hígítás után használtuk.

5.4 Klónozásra, vagy hagyományos Sanger szekvenálásra alkalmas DNS darab előállítása

A klónozendó DNS előállítása vagy egy adott plazmidból történő hasítással, vagy szekvencia specifikus primerek segítségével PCR reakcióban történt.

A PCR reakciókat különböző gyártók által forgalmazott DNS polimerázok (Taq, Pfu, Phire, Phusion, Q5) segítségével végeztük, ABI, később Eppendorf, vagy Biometra készüléket használva. Az endogén génekre, adott vírusokra specifikus indítószekvenciákat vagy magunk terveztük vagy az irodalomban közölt primereket rendeltük meg és használtuk a sokszorozáshoz. A reakció körülményeit, amik mind a polimeráz típusától, az amplifálandó szakasz hosszától és a használt primerek szekvenciától függően változtak, legtöbbször gradiens hőmérséklet beállítását lehetővé tevő készülékben az annealási hőmérséklet optimalizálását követően terveztük meg.

A hasítási, illetve a PCR terméket a ligálási reakció előtt tisztítani kell. Ehhez a restrikciós hasítási, vagy a PCR reakcióelegy egészét EtBr-ot tartalmazó 1,2%-os, kisebb méretű termékek esetében 2%-os, agaróz gélen választottuk el. A tisztítandó terméket a gélből kivágtuk és a forgalomban levő oszlopos elválasztással működő kit-tekkel (GE – GFX, Thermo Scientific - GeneJet) a kit leírása alapján tisztítottuk.

5.5 DNS szakaszok vektorba építése (klónozás)

Kísérleteim során kezdetben pUC18, pBluescript (pKS) típusú vektorokba klónoztuk a növényi endogén gének, vagy vírusok darabjait. Ezeknél a klónozásoknál először restrikciós endonukleázokkal kellett a plazmidot emésztetni, majd a létrejött ragadós, vagy tompa végeket a véletlen ligálást elkerülendő defoszforilálni. Ahhoz, hogy a klónozendó DNS darabot ligálni tudjuk, azt vagy a vektor ragadós helyeinek megfelelő restrikciós endonukleázzal kellett emésztelnünk, vagy a PCR-rel történő amplifikálás során foszforilált primereket kellett használnunk. A molekuláris biológiai eszközök fejlődésével a PCR reakciókkal kompatibilisebb rendszerek álltak rendelkezésre, így a későbbiekben a klónozásaink során a Promega pGEMT Easy vektorrendszerét használtuk. Ebben a rendszerben a Taq polimerázok működési sajátóságaként a reakció végtermékén jelenlevő túlnyúló adenin ligálódik a kitben található T túlnyúló végeket tartalmazó nyitott vektorral. Mind a pUC, pKS és pGEMT vektorok klónozó helye a β -galaktozidáz génben található, a klónozás sikeressége kék-fehér szelekcióval ellenőrizhető. Jelenlegi kutatásainkban a Thermo Scientific pJET rendszerét használjuk, ahol a klónozó hely egy letális génben található, így a transzformálást követően csak az olyan baktériumkolóniák képesek telepet formálni, melyekben a ligálás sikeres volt, és a ligált DNS darab jelenléte miatt ez a gén nem expresszál. A pGEMT és a pJET vektorok esetén a gyártó által forgalmazott kit-eket vettük meg és a klónozást az általuk ajánlott protokollok alapján végeztük. A vektorrendszerek egy robosztus aktivitással működő ligáz enzimet is tartalmaztak, a ligálást a megadott protokoll alapján végeztük.

5.5.1 Ligátum transzformálása *E. coli*-ba

A ligálási keverék felét 100 µl kompetens sejtbe (*E. coli* DH5α törzs) transzformáltuk (Sambrook, 1983).

5.5.2 Fertőzés rekombináns vírusokkal

A vektorba klónozott teljes vírusokról vagy VIGS vektorokról *in vitro* transzkripcióval készítettünk transzkriptumot. Ehhez, hogy biztosítsuk, hogy az RNS polimeráz csak a vírust írja át, a plazmidot egy restrikciós hasítással a vírus szekvenciájának végén el kellett hasítanunk (linearizálnunk kellett). A restrikciós emésztést követően a reakcióelegyből proteináz K kezeléssel elemésztettük a fehérjéket, melyek törmelékét fenol-kloroform-os extrakcióval távolítottuk el. A linearizált plazmid DNS-t glikogént (Fermentas) jelenlétében 6M ammónium-acetáttal csaptuk ki. A keletkezett csapadékot egyszer 70%-os etanollal mostuk. Ezután szárítottuk és steril desztillált vízben oldottuk vissza.

A tisztított linearizált plazmidról (a vektorban jelenlevő T7, T3, vagy SP6 DNS függő RNS polimeráz promótert felhasználva) DNS függő RNS polimerázzal szintetizáltunk transzkriptumot. *In vitro* transzkripció során a megfelelő polimerázt, szükség esetén Cap analógot (Thermo Fisher Scientific) és a linearizált plazmidot használtunk fel. Az átírt RNS minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az *in vitro* transzkriptummal mechanikailag inokuláltuk a tesztnövényeket.

5.5.3 Vírusfertőzés és tranziens GFP vagy VSR expresszió *Agrobacterium tumefaciens* segítségével, agroinfiltrációval

A TRV VIGS vektort, illetve a zöld fluoreszcens fehérjét (green fluorescent protein – GFP) és a klónozott virális VRS fehérjét tartalmazó pBIN61 vektorokat *A. tumefaciens* sejtekbe transzformáltuk. A tranziens expresszióhoz használt *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) egy éjszakán keresztül nőtt folyadéktenyészetének optikai denzitását OD₆₀₀=1-re állítottuk be, majd szobahőmérsékleten történő 2 órás inkubáció után a szuszpenziókat TRV1:TRV2 = 1:1 arányban kevertük össze. Az agroinfiltráció során az agrobaktérium szuszpenziót *N. benthamiana* levelek fonákján keresztül, fecskendővel juttattuk be a növények leveleibe. Kontrollként a növények leveleit csak TRV1-et tartalmazó tenyészzel infiltráltuk.

5.6 Vírus és gazdanövény gének expressziójának vizsgálata

5.6.1 Northern blot analízis

5.6.1.1 Vírus RNS és gazdanövény mRNS-ek kimutatása Northern blottal

A vírus RNS-ek jelenlétét Northern blot analízissel mutattuk ki. A teljes nukleinsav kivonatokat 1,2% agaróz gélen választottuk el. Ahhoz, hogy az endogén gének expressziós szintjét ki tudjuk mutatni a fentihez képest egy érzékenyebb rendszerre volt szükségünk. A totál nukleinsav kivonatokat 1,2%-os agaróz formaldehidet és formamidot tartalmazó denaturáló gélben választottuk el. Gélelektroforézis után a gélből az RNS-t kapilláris blottolón Hybond-NX nylon membránra blottoltuk egy éjszakán keresztül 20xSSC puffer rendszerben (3 M NaCl, 0,3 M Na-citrát, pH=7.2), majd kétszer kereszt kötöttük UV fény alatt, hogy az RNS-t rögzítsük a membránra. A membránból az inkubálás hőmérsékletén eltávolítottuk az SSC-t, majd a hibridizálás hőmérsékletén 65°C-on, majd előmelegített Church pufferrel (0,5 M NaPi, 7% SDS, 1 mM EDTA pH 8,0, 1% BSA, 0,02 mg/ml ssDNS) 1 órán keresztül prehibridizáltuk.

A klónozott vírus és endogén gének darabjairól a Thermo Scientific Decalabel DNA labelling kit segítségével készítettünk radioaktívan [α -³²P]-dCTP izotóppal jelölt DNS próbát.

Az elkészült próbát 15 ml Church pufferbe mértük, a prehibridizált membránt a radioaktív próbát tartalmazó Church pufferben hibridizáltuk egy éjszakán keresztül.

Ezt követően a membránt csökkenő sókoncentráció mellett mostuk, hogy az aspecifikusan kötött próbát eltávolítsuk. A membránra röntgenfilmet tettünk és a jel erősségtől függően pár óráig vagy akár több napig exponáltuk, majd előhívtuk.

5.6.1.2 sRNS-ek kimutatása Northern blottal

A miRNS-ek Northern blottal való kimutatását korábbi kísérleteinkben optimalizáltuk (Varallyay *et al.*, 2007, Varallyay *et al.*, 2008). A teljes nukleinsav kivonatokban levő sRNS-ek kimutatásához a mintáinkat 12%-os denaturáló poliakrilamid gélen (8 M urea) választottuk el. Az elválasztott RNS-eket elektroforézis és az urea kimosása után Hybond-NX nylon membránra blottoltuk kapilláris módszerrel 20x SSC puffer rendszerben, majd UV fénnel keresztkötöttük az RNS-t. A membránt egy speciális „kisRNS” pufferben 50°C-on hibridizáltuk. Próbaként 1-10 pmol LNA (locked nucleic acid) oligonukleotidokat használtunk, melyeket T4 polinukleotid kinázzal [α -³²P] -dATP-vel végjelöltünk. siRNS-ek kimutatása esetén az adott vírus egy darabját pKS vektorba klónoztuk és erről radioaktív UTP jelenlétében készítettünk reverz transzkripcióval RNS-t. Az így készült radioaktív RNS próbával az akrilamid gélen elválasztott RNS-eket blottolás után 37°C-on, „kisRNS” pufferben hibridizáltuk. Ezt követően a membránt 2x SSC, 0,1% SDS oldatban mostuk kétszer 10 percig a hibridizálás hőmérsékletén. A radioaktív jelet röntgenfilm segítségével tettük láthatóvá.

5.6.2 Vírus RNS és gazdanövény mRNS-ek kimutatása RT-PCR-rel

5.6.2.1 cDNS szintézise reverz transzkripcióval

A reverz transzkripciót a Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kitjével készítettük a kit használati leírása alapján. Az endogén mRNS-ekklónozásakor oligo dT primerrel, míg a vírusdiagnosztika során random hexamer primerrel indítottuk a reakciót.

5.6.2.2 Endogén génszakaszok amplifikálása PCR reakcióval

A cDNS-eket templátként és specifikus primereket indítószekvenciaként használva DNS polimerázzal sokszoroztuk egyes növényei gének vagy az adott vírusok szakaszait – szekvenálási, klónozási vagy vírusdiagnosztikai célból. Az endogén gének klónozásakor Thermo Scientific hibajavító funkcióval rendelkező polimerázait: Phusion, Deep Taq, Long Taq vagy NEB Q5 használtuk a gyártó által javasolt denaturálási, annealási és extenziós paramétereket használva. A vírusdiagnosztikai felhasználáskor ugyancsak a Thermo Scientific igencsak robusztus, de hibajavító funkcióval nem rendelkező Phire enzimét használtuk. A PCR reakciók pontos körülményei és a primerek szekvenciája publikációinkban szabadon hozzáférhető.

5.6.3 kvantitatív RT-PCR

Vírusfertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényekből készített cDNS-ről a vizsgált gének expressziójának vizsgálatára 3 biológiai és 3 technikai ismétlésben kvantitatív real-time PCR-t (qRT-PCR) végeztünk. Mindkét gazda esetén az ubiquitin mRNS-t használtuk belső referenciaként. A qRT-PCR-hez használt RNS kivonatokat először DNáz (ThermoFisher Scientific) kezelésnek vetettük alá, majd RNazol-lal (Sigma-Aldrich) tovább tisztítottuk. 3 µg RNS-ről reverz transzkriptázzal és random oligonukleotidokkal cDNS-t szintetizáltunk (RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit, Thermo Scientific). Az elkészült cDNS-ről specifikus primerek felhasználásával qRT-PCR-t végeztünk az Applied Biosystems® SYBER Green Master Mix-et használva. A kvantitatív reverz transzkripciót követő PCR (quantitative real time RT-PCR - qRT-PCR) eredményeit Rotor Gene 6 (Qiagen) szoftverrel értékeltük ki. A

kontroll és a vírusfertőzött minták összehasonlításával, valamint az ubiquitin (belső kontroll) használatával relatív génexpressziós különbségeket, delta-delta Ct-t számoltunk. A relatív normalizált génexpressziós különbségeket R statisztikai program segítségével készített bajusz diagramon ábrázoltuk. A bajusz diagram vízszintes tengelyén az egyes vírusfertőzéseket, függőleges tengelyén az adott gén relatív normalizált expresszióját tüntettük fel. A különböző vírusfertőzések esetén gének expresszióját minden esetben a kontrollhoz viszonyítottuk, melynek relatív normalizált expressziója 1.

5.6.4 Növényi gazda génexpressziójának vizsgálata microarray módszerrel

Vírusfertőzött *N. benthamiana* növények génexpressziós változásait microarray hibridizációval vizsgáltuk. Ehhez a fertőzött növények totálnukleinsav kivonataiból keveréket készítettünk (10 minta/fertőzés 3 biológiai ismételtsben), amit tovább tisztítottunk Triagent (Sigma) segítségével és DNázssal kezeltünk (Thermo Scientific). A tiszta DNS mentes RNS kivonat koncentrációját NanoDrop®-pal, minőségét Agilent scanner, FE SW 9.5.-en határoztuk meg. A megfelelő minőségű minták microarray (Agilent Tobacco Gene Expression Microarray 4x44K array) hibridizációját és a kezdeti bioinformatikai elemzéseket szolgáltatásként rendeltük meg. A nyers adatokat depozitáltuk: NCBI-GEO: GSE113774/ GPL21056. A normalizált expressziós értékeket minden próbára (3 biológiai ismételts, 3 vírus és egy mock fertőzés esetében) meghatároztuk és szintén hozzáférhetővé tettük az NCBI-GEO-n. A statisztikailag szignifikánsan eltérő expressziót mutató géneknek azokat tekintettük, melyek legalább kétszeres változást mutattak és p értékük <0.05 volt. A szignifikáns változásokat mutató próbákat összefoglaló táblázat szabadon hozzáférhető (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216618>)

5.6.5 Növényi gazda génexpressziójának vizsgálata RNS szekvenálással

A génexpressziós változások pontosabb nyomon követésének céljából mRNS-t szekvenáltattunk. A vírusfertőzött *S. lycopersicum* növényekből fenol-kloroformos módszer segítségével totál RNS kivonatot készítettünk, ezeket poololtuk, majd a mintákat RNazol-lal tisztítottuk. A tisztított RNS-eket az UD-GenoMed Kft.-vel Illumina HiScanSQ platformon szekvenáltattuk. Három biológiai ismételtsből származó minták RNS szekvenálását végeztettük el. Technikai ismételtsként 3. biológiai ismételtsét kétszer szekvenálták. A nyers adatokat depozitáltuk: NCBI-GEO: GSE113774/GPL24943A. normalizált expressziós értékeket minden génre meghatároztuk és szintén hozzáférhetővé tettük az NCBI-GEO-n. A statisztikailag szignifikánsan eltérő expressziót mutató géneknek azokat tekintettük, melyek legalább kétszeres változást mutattak és p értékük <0.05 volt. A szignifikáns változásokat mutató próbákat összefoglaló táblázat szabadon hozzáférhető (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216618>)

5.7 Fásszárú növények vírusdiagnosztikája sRNS HTS-el

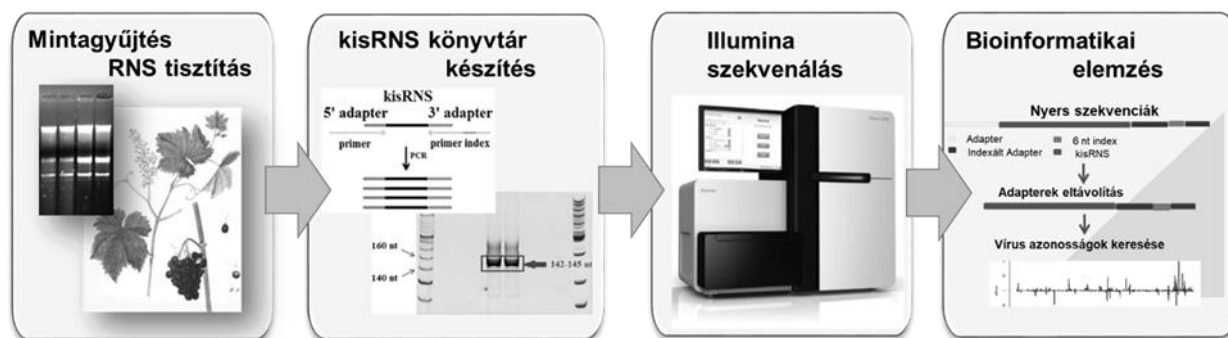
5.7.1 Növényi anyag és RNS tisztítás

A vírusdiagnosztikai vizsgálatokhoz szőlő és gyümölcsfa mintákat gyűjtöttünk. Mivel a vírus koncentráció szezonálisan és akár egy növényen belül is változhat gyümölcsfák esetében a fa 4, különböző égtájba mutató ágáról is szedtünk levélmintát, melyekből úgy készítettük az RNS tisztítást, hogy az mind a négy levelet reprezentálja. nagyon fontos a megfelelő időpont kiválasztása.

Az RNS izolálását a jelenlevő poliszacharidok és polifenolok eliminálása érdekében Gambino, CTAB alapú módszerének optimalizált változatával végezzük friss, vagy -70 °C-on tárolt mintákból (Gambino, 2008).

5.7.2 Szekvenálható sRNS könyvtár készítés

A szekvenáló könyvtár készítéséhez az RNS kivonatból poliakrilamid gélen való elválasztás segítségével kitisztítottuk az sRNS frakciót. Ehhez ismert szekvenciájú adaptereket ligálunk, majd cDNS-t írunk át, amit néhány ciklusban PCR reakcióban amplifikálunk. Az így elkészített „sRNS könyvtár” méret alapján újból gélből tisztítottuk (14. ábra). Kísérleteinkben az Illumina „TruSeq Small RNA Library Prep” kitjét használjuk. A módszer részletes leírását magyarul Czotter Nikoletta doktori dolgozata (<http://konyvtar.uni-pannon.hu/en/node/381>), angolul a Czotter és mtsai (Czotter *et al.*, 2018) könyvfejezet tartalmazza.



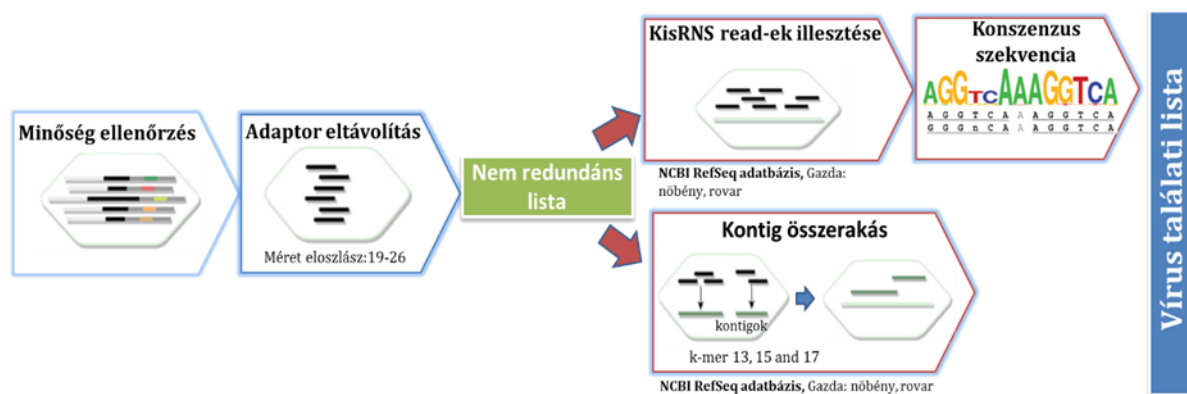
14. ábra Az sRNS HTS folyamatának sematikus ábrája.

5.7.3 Szekvenálás

Az elkészített könyvtárakat Illumina platformon az UD-Genomednél szekvenáltattuk 50bp-os leolvasással. A szekvenálás kiválasztásánál figyelembe vettük, hogy a read-ek száma (szekvenálás mélysége) összefügg a szekvenáló berendezéssel és azzal is, hogy hány mintát szekvenáltattunk együtt. Mivel fasszárúakban a virális siRNS-ek száma általában igen alacsony, ezért tapasztalatunk szerint 10-12 millió leolvasás minimálisan szükséges a megfelelő érzékenységu vírusdiagnosztikához. Egy töke különböző szerveiből izolált RNS-ek, majd egy ültetvény több egyedéből származó RNS keverék készítése nemcsak a költségeket csökkenti, hanem az esetleg nem egyenletes víruseloszlásból adódó probléma elkerülését is szolgálja.

5.7.4 A HTS eredményének, a szekvenált olvasatok (readek) bioinformatikai elemzése

A bioinformatikai elemzéseket szekvencia elemző programcsomagokkal végezhetjük. Munkánk kezdetén ingyenes programokat és scripteket használtunk (alább ezeket a lépések találhatóak részletesebben), később pedig a CLC Genomics Workbench és a Geneious programcsomagokat. Az elemzések első lépésében minőségellenőrzés után eltávolítottuk a ligálással az sRNS-ekhez illesztett szekvenciákat. Ezt követően a vírus azonosításhoz két bioinformatikai stratégiát alkalmaztunk egymással párhuzamosan (15. ábra).



15. ábra HTS eredmények feldolgozásának bioinformatikai munkafolyamata (Czotter Nikolett PhD dolgozata alapján)

A nem redundáns sRNS szekvenciákat direkt módon az NCBI RefSeq adatbázis vírus referencia szekvenciáihoz (növény és gerinctelen gazda) illesztettük fel. Az illesztéshez a BWA aln programot használtuk (Li & Durbin, 2009).

Az sRNS szekvenciákat *de novo* összeszereltük, hosszabb „kontig” szekvenciákba, 13-as, 15-ös és 17-es kmer érték beállítása mellett, a Velvet Software segítségével (Zerbino & Birney, 2008) és a kapott kontig szekvenciákat az NCBI RefSeq adatbázis növény vírus referencia szekvenciáihoz illesztettük MegaBLAST programmal (Morgulis *et al.*, 2008).

A bioinformatikai elemzések eredménye egy víruslista, melynek eredményei molekuláris biológiai módszerekkel (pl. RT-PCR) igazolhatóak.

A bioinformatikai elemzések során nyert tapasztalataink alapján 2017-ben megvásároltuk a Qiagen CLC Genomic workbench software-t és későbbi munkáink során már ezt a programot használtuk. Az elemzés alapvetően azonban követte korábbi stratégiánkat: az sRNS readekből hosszabb kontigokat építettünk (a program, 'de novo assembly' parancsával), melyeket az NCBI növényi vírus referenciagenomjaihoz illesztettünk. Pozitív találat esetén a readeket (redundáns és nem redundáns readeket is) az adott vírus referenciagenomjára illesztettük ('Map to reference' paranccsal), és az illeszkedő readekből egy normalizált (read/million read) adatot és a vírus lefedettségi %-át számoltuk ki. E három paraméter figyelembevételével állapítottuk meg az adott ültetvény vírusfertőzöttségét.

6 Eredmények és értékelésük

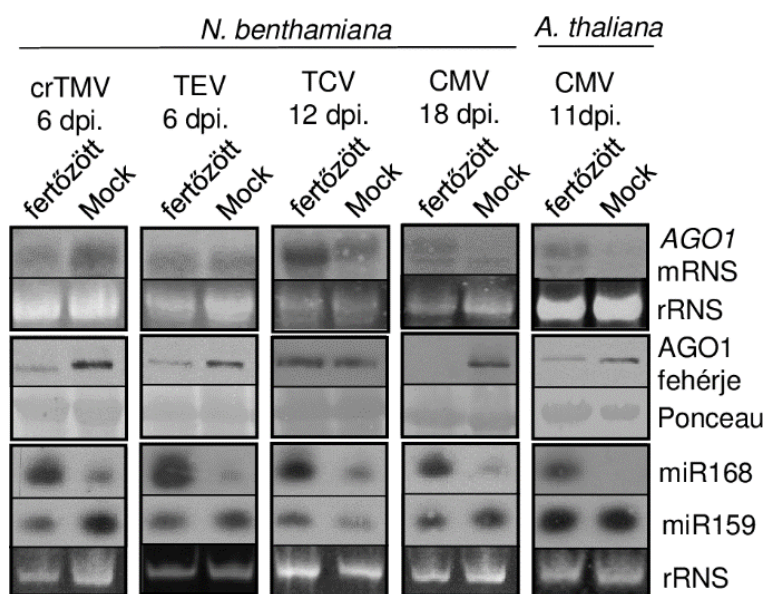
6.1 Az gazdanövény ARGONAUTE 1 szintjének változása vírusfertőzés során

Az RNSi nemcsak egy konzervatív génexpressziós szabályozó mechanizmus, hanem a növények antivirális védekező rendszerének is az alapja (Ding, 2010, Ding, 2007, Mlotshwa *et al.*, 2005). A rendszer központi szabályozó molekulái a 21-24nt hosszú sRNS-ek és az AGO fehérjék. A szabályozó sRNS-ek az AGO fehérjéhez kötődve adják az ribonukleáz aktivitással rendelkező molekula aktivitásának szekvencia specifitását. Az sRNS-sel „töltött” AGO minden olyan mRNS működését gátolja, ami a beépült sRNS-sel komplementer szekvenciájú: vagy elhasítják az mRNS-t, vagy gátolják annak transzlációját (Mallory & Vaucheret, 2010). A növényekben fajoként eltérő számú, az *A. thaliana*-ban 10, különböző szekvenciával és funkcióval rendelkező AGO található. Az AGO1 mind az antivirális védekezésben, mind a miRNS alapú génszabályozásban központi szerepet játszik (Mallory & Vaucheret, 2010). A növényi sejtekben tehát igen fontos a megfelelő mennyiségű AGO1 jelenléte, ami ezért precízen szabályozott. Az AGO1 sejten belüli szintjét, az AGO1 gén promóter aktivitása mellett, alapvetően egy miRNS: a miR168, szabályozza (Vaucheret *et al.*, 2004). Mennyiségének kialakításában szerepe van még (i) az AGO1 eredetű siRNS-eknek (Mallory & Vaucheret, 2009), (ii) a miR168 AGO1 által történő poszt-transzkripcionális stabilizálásának, és (iii) az AGO1 és a miR168 ko-regulált expressziójának (Vaucheret *et al.*, 2006). Kísérleteink során más kutatókhoz hasonlóan, mi is azt találtuk, hogy vírusfertőzött növényekben a miR168 szintje jelentősen megnő (Csorba *et al.*, 2007), (Havelda *et al.*, 2008, Várallyay *et al.*, 2010). Azt is kimutattuk, hogy az AGO1 mRNS indukció a vírusfertőzés során a gazdanövény védekező folyamatainak, míg az indukált miR168 szint a vírusok válaszlépésének az eredménye (Várallyay *et al.*, 2010). A CymRSV – *N. benthamiana* rendszert tanulmányozva tranziens génexpressziós kísérletekben kimutattuk, hogy a miR168 indukciója a vírus VSR fehérjéhez, a p19-hez köthető. A p19 hiányos mutáns vírus fertőzésekor a miR168 indukció elmaradt, míg a p19 tranziens expressziója önmagában is megemelte a növény miR168 szintjét (Várallyay *et al.*, 2010). E munkát folytatva azt a kérdést vizsgáltuk, hogy a miR168 - AGO1 szabályozás hozzájárulhat-e a vírusfertőzésre jellemző tünetek kialakulásához? Vajon a különböző vírusok által kódolt szekvenciálisan és funkcionálisan különböző VSR-ek hasonlóan viselkednek-e a miR168 indukció szempontjából?

6.1.1 A vírusfertőzés során indukálódó AGO1 szint csökkenés hosszú ideig jelen van a gazdában és ez a hiány zavart okozhat a miRNS által történő génszabályozásban

A CymRSV fertőzött *N. benthamiana*-hoz hasonlóan a crTMV fertőzött *A. thaliana*-ban is megnő a miR168 szintje (Várallyay *et al.*, 2010). A crTMV VSR-e, a p122, a CymRSV p19-éhez hasonlóan sRNS-eket köt, és mivel így azok nem tudnak beépülni az AGO1-be, a növény védekező folyamatai gátlódnak (Csorba *et al.*, 2007). crTMV fertőzött *A. thaliana*-ban a vírus nem okoz nekrozist, a növény hosszú ideig túlél, így megvizsgálhattuk, hogy vajon a miR168 indukció és a csökkent AGO1 szint csak a fertőzés kezdeti lépése, vagy esetleg hosszú ideig fennállhat a növényben? A fertőzött növények szisztémikus leveleinek kivonataiból készült

benthamiana kapcsolatban a miR168 indukció az AGO1 mRNS transzlációs kontrollja miatt az AGO1 fehérje szintjének csökkenését okozza (Varallyay *et al.*, 2010). Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy ez a szabályozás mennyire általánosan fordul elő *N. benthamiana* és *A. thaliana* növényeket fertőztünk különböző vírussaládokba tartozó vírusokkal: crTMV - Tobamovírussal, TEV (tobacco etch virus) – Potyvírussal, TCV - Carmovírussal és CMV Fny Cucumovírussal. A fertőzés korai szakaszában (amikor a szisztémikus tünetek megjelentek) vizsgáltuk az AGO1 és a miR168 szintjét. A vizsgált időpontban a miR168 szint minden növényben megemelkedett a mock fertőzéshez képest (16. ábra).



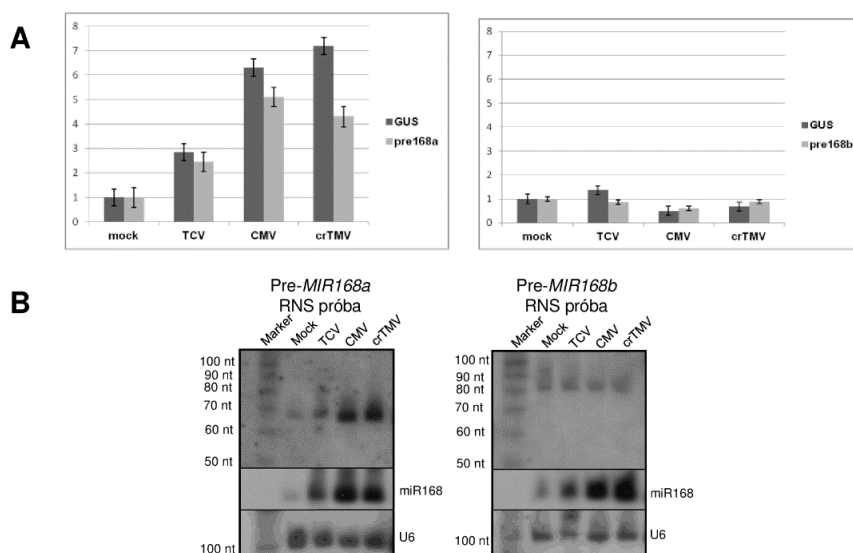
16. ábra Az AGO1 mRNS, AGO1 fehérje és a miR168 szint vizsgálata vírusfertőzött növényekben.

Az AGO1 mRNS indukciója TCV és CMV fertőzéskor egyértelműen látszott, de TEV fertőzéskor ezt nem tudtuk kimutatni. Érdekes módon a crTMV fertőzött *N. benthamianaban* az AGO1 mRNS szintje lecsökkent, ami éppen ellenkező trendet mutat, mint amit crTMV fertőzéskor *A. thalianaban* tapasztaltunk. Az AGO1 fehérje szintje a TEV és a CMV fertőzött növényekben lecsökkent. Annak ellenére, hogy a TCV fertőzés *A. thalianaban* az AGO1 szint csökkenését okozta (Varallyay *et al.*, 2010), *N. benthamianaban* ezt nem tudtuk megfigyelni. Azt láttuk, hogy a TCV kevésbé hatékonyan tudja az AGO1 szintet szabályozni ebben a gazdanövényben. Ez a jelenség hasonló ahhoz, amit CymRSV fertőzött *N. benthamianaban* tapasztaltunk: az AGO1 szint a nem fertőzött növényhez hasonló szinten marad (Varallyay *et al.*, 2010). A miR168 közvetített kontroll itt is működik, hiszen ez a fehérjeszint, egy indukált mRNS szinthez viszonyítva csökkenést mutat, ami jelzi a transzlációs kontroll meglétét. Eredményeink azt mutatják, hogy ugyan a miR168 közvetített AGO1 kontroll általánosan jelen van vírusfertőzött növényekben, a szabályozás hatékonysága a vírus – gazdanövény kapcsolattól függően változik.

6.1.3 A vírusfertőzés során a *MIR168* gén expressziójának indukciója következik be

Ezt követő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a vírusfertőzés során megnövekedett miR168 szint hogyan alakul ki? Tudni szeretnénk volna, hogy a miR168 csupán a VSR-ek sRNS-

t stabilizáló funkciója miatt nő meg, vagy maga a miR168 génexpressziója az, ami ilyenkor indukálódik? Olyan transzgenikus *A. thaliana* növényeket fertőztünk TCV, CMV és crTMV vírusokkal, melyek az *Arabidopsis* miR168a, illetve miR168b gének promótereiről termelik a β -glukoronidáz (GUS) riporter fehérjét (Vaucheret, 2009). Azt már korábban kimutattuk, hogy a miR168 indukció és az AGO1 miR168 általi szabályozása ezekben a növényekben is működik (Várallyay *et al.*, 2010). Jelen kísérleteinkben qRT-PCR-rel vizsgáltuk a vírusfertőzés során változó *MIR168a* és *b* prekursor szinteket ezekben a növényekben és azt találtuk, hogy a GUS expressziója csak a *pMIR168a:GUS* növényekben nő meg, a *pMIR168b:GUS* növényekben a prekursor szintje nem változik (17. ábra/A). Ezekben a kísérletekben nemcsak a GUS, hanem az endogén *MIR168a* és *b* promóterek expressziójának szintjét is vizsgálni tudtuk (a prekursorra tervezett specifikus primerek qRT-PCR amplifikációjával). Ezek az eredmények megerősítették a GUS expresszió során találatokat, hogy vírusfertőzés során csak a *MIR168a* indukciója valósul meg a *MIR168b* gén expressziója nem indukálódik (17. ábra/A).



17. ábra A miR168a és miR168b expressziójának vizsgálata A/ real-time RT-PCR-rel és B/Northern blottal.

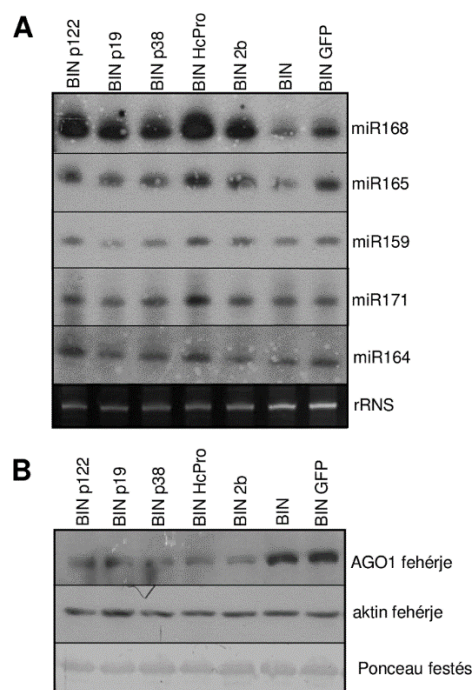
Tovább vizsgálva sRNS Northern hibridizációval a miR168 prekursor érése során keletkező intermedierek meglétét és koncentrációját vírusfertőzött *A. thaliana* növényekben kimutattuk, hogy csak a *MIR168a* gén érése során nőtt meg ennek az intermedierek a szintje, a *MIR168b*-ről kifejeződő prekursor érése során keletkező kb. 80bp hosszú intermedierek koncentrációja nem változott (17. ábra/B). Ezek a kísérleteink azt is kimutatták, hogy a TCV-val való fertőzéskor a *MIR168a* specifikus intermedierek a szintje alacsonyabb, mint CMV és crTMV fertőzéskor, ami alátámasztotta az előzőekben kimutatottakat, hogy a miR168 indukció a TCV fertőzés során kisebb mértékű, mint a másik két vírus esetén. Összességében elmondhatjuk, hogy a TCV, CMV és crTMV fertőzés indukálja a *MIR168a* prekursor expresszióját *A. thaliana* növényekben.

6.1.4 Különböző vírusok nem rokon, VSR fehérjéi egyaránt indukálják a miR168 expressziót, és ezen keresztül szabályozzák az AGO 1 fehérje szintjét

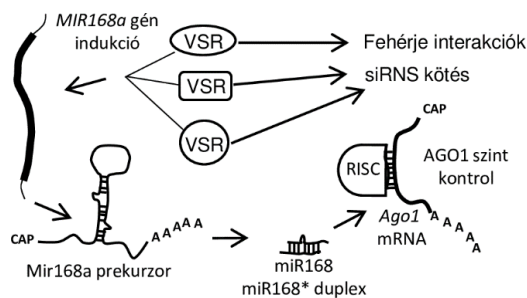
Előző kísérleteinkben, a CymRSV – *N. benthamiana* rendszert tanulmányozva, kimutattuk, hogy önmagában a p19, a CymRSV VSR-je, képes a miR168 szintjét indukálni. Számos transzgenikus kísérletben kimutatták, hogy különböző vírusok VSR-jét expresszálva sok miRNS expressziója megváltozik (Chapman *et al.*, 2004), (Mallory *et al.*, 2002, Mlotshwa *et al.*, 2005, Zhang & Ghabrial, 2006). A VSR-ek tehát befolyásolhatják az endogén miRNS-ek expresszióját, így jogosan vizsgálhattuk azt a kérdést, hogy vajon a különböző VSR-ek hogyan befolyásolják a gazdanövény miR168 szintjét. A VSR-ek funkciójának tanulmányozása transzgenikus növényekben is lehetséges, de ebben a rendszerben a VSR fehérje állandóan jelen van a rendszerben, így a vírusfertőzés korai és késői szakaszában betöltött funkciója nem különíthető egymástól.

Mi a VSR-ek-nek a vírusfertőzés korai szakaszában betöltött funkcióját akartuk megvizsgálni, amihez *A. tumefaciens*-ben kifejezett VSR-ek infiltrálásával indukált tranziens rendszert használtunk. Ezzel a rendszerrel rövid idő alatt nagymennyiségű fehérje expresszálódik, ami mimikálhatja a vírusfertőzés korai szakaszát. Kísérleteinkben különböző VSR-eket: a crTMV p122-öt (Csorba *et al.*, 2007), a TCV p38-át (Merai *et al.*, 2005), a TEV HcPro-ját (Lozsa *et al.*, 2008), a CMV 2b-jét (Zhang *et al.*, 2006) használtunk. Azt találtuk, hogy a különböző VSR-ek expressziója minden esetben indukálta a miR168 szintjét a GFP-t expresszáló, vagy üres vektort tartalmazó *Agrobacterium*-mal való infiltráláshoz képest (18. ábra/A).

Több más miRNS mennyiségének a változását vizsgálva azt is megállapítottuk, hogy azok mennyisége a tranziens expresszió során alig vagy nem változott, mutatva a rendszer specifikitását. Az is kimutattuk, hogy a legkisebb miR168 indukciót a TCV p38-ával értük el, ami összhangban van előző eredményeinkkel (18. ábra/A). A miR168 biológiai hatására vonatkozóan megvizsgáltuk, hogy ezekben a tranziens expressziókban is tudjuk-e detektálni az AGO1 szint csökkenését. Western blot kísérleteink azt mutatták, hogy a különböző VSR-ek tranziens expressziója minden esetben az AGO1 fehérje szint csökkenésével járt együtt (18. ábra/B). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a vírusok VSR-ei által indukált, a miR168 indukció által közvetített AGO1 kontroll egy általánosan jelen levő, a növényi gazda RNSi alapú védekezését hatékonyan csökkentő mechanizmus, ami az antivirális RISC aktivitását csökkenti (19. ábra).



18. ábra Az A/ miR168 és az B/ AGO1 fehérje szintjének vizsgálata különböző VSR-ek tranziens expressziója során



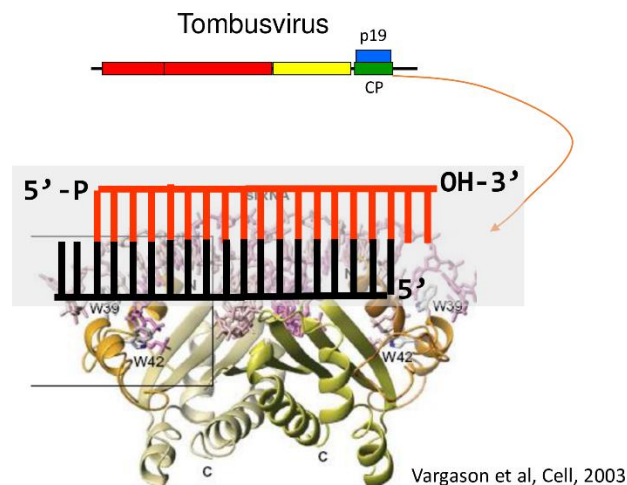
19. ábra a miR168 által történő AGO1 szabályozás modellje.

E modell szerint a VSR-ek különböző RNSi gátló funkciójukon kívül (siRNA kötés, AGO1 aktivitás gátlás, stb) indukálni képesek a *MIR168a* gén expresszióját és ezen keresztül kontrollálni az AGO1 szintjét a vírusfertőzött növényekben (19. ábra).

6.1.5 A p19-3M nem képes siRNA-s-et kötni, de indukálja a miR168 expresszióját

Előző kísérleteinkben igazoltuk, hogy különböző vírusok eltérő funkciójú és térszerkezetű VSR-jei hatékonyan indukálják vírusfertőzés során a gazdanövény *MIR168a* génjét, és a megnőtt miR168 szint transzlációs kontrollon keresztül csökkenti az RNSi alapú védekező rendszer központi molekulájának, az AGO1 fehérjének, a szintjét. A CMV 2b és a TCV P38 fehérjék esetében leírták, hogy ezek a fehérjék képesek speciális fehérje-fehérje kapcsolatot kialakítani (Zhang *et al.*, 2006, Azevedo *et al.*, 2010).

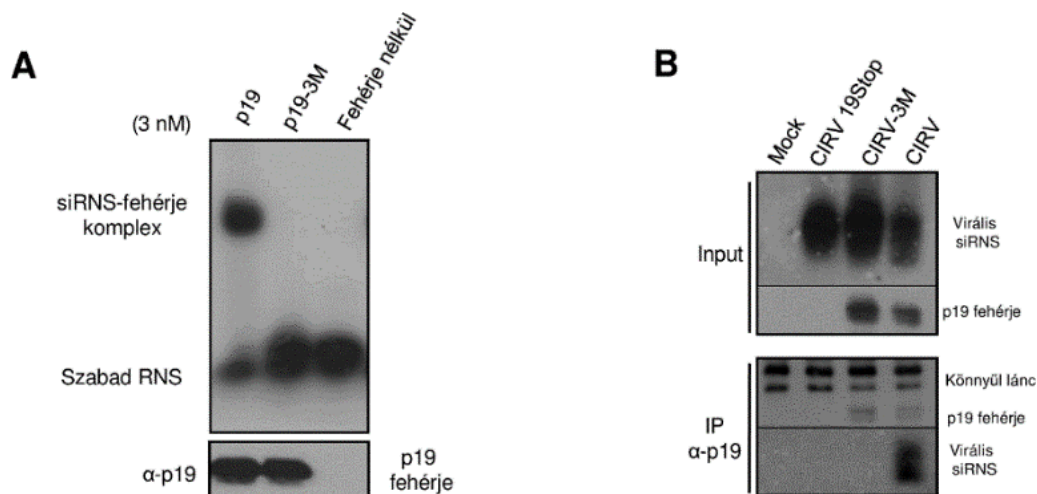
A vizsgált VSR-ek mindegyike rendelkezik azonban több-kevesebb siRNA kötés képességgel (Silhavy *et al.*, 2002). Emiatt elképzelhetőnek tartottuk, hogy a VSR-ek siRNA kötés képességének szerepe lehet valahogy a miR168 indukcióban. A tombusvírusok p19 VSR-jének térszerkezete alapján egyértelmű, hogy ez a VSR méret specifikusan köti a 21nt hosszú siRNA duplexeket (Vargason *et al.*, 2003) (20. ábra).



20. ábra A CIRV p19 VSRfehérje térszerkezete, sematikusan rávetítve a 21nt hosszúságú kétszálú siRNA-s-t.

A térszerkezetből az is kiderült, hogy a kötésben két triptofán oldalláncnak (Trp39- és Trp42-nek) van kulcsszerepe. Ahhoz, hogy elrontsuk a p19 siRNA kötés képességét ezt a két aminosavat cseréltük glicinre irányított mutagenézissel. Ezeket a mutációkat nemcsak a transziens rendszerben történő vizsgálatokhoz használt bináris vektorba klónozott p19 fehérjébe vezettük be, hanem a CIRV fertőző képes teljes klónjába is. Mivel a vírus genomjában a p19-et expresszáló ORF5 a p22 mozgási fehérjével átfedésben kódolódik, e mutációk a p22 53. aminosavát is megváltoztatták (szerint argininre cserélték). Ahhoz, hogy az így kialakított mutációk ne okozzanak változást, a p22-ben még egy mutációt (E41V) iktattunk be, ami a p22-ben visszaállította az eredeti aminosavat (szerint). Az így elkészült mutáns p19-3M-et heterológ

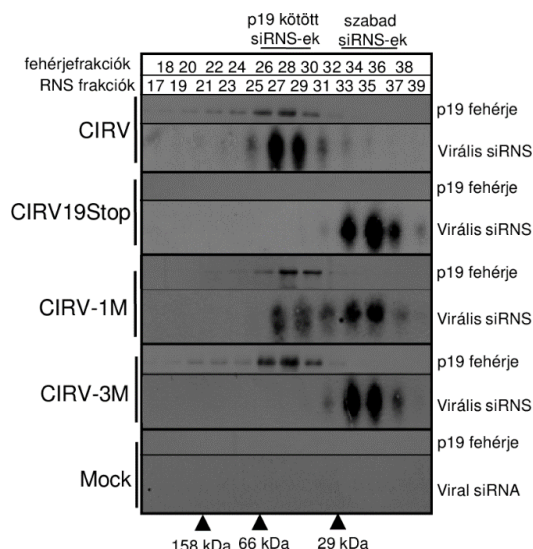
rendszerben expresszáva, szintetikus RNS duplexek használatával, gél-retardációs kísérletekben vizsgáltuk, hogy vajon elvesztette-e sRNS kötő képességét (21. ábra/A).



21. ábra A/ *In vitro* (band shift) és B/ *in vivo* (p19 immunprecipitációs) kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a p19-3M nem köti az sRNS-eket.

In vitro kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy míg a vad típusú VSR igen hatékonyan kötötte a radioaktívan jelölt siRNS-eket, a p19-3M elvesztette sRNS kötő képességét (21. ábra/A). Ezek után szerettük volna *in vivo* is bizonyítani, hogy a p19-3M vírusfertőzés során sem képes a virális siRNS-ek kötésére. Ehhez rekombináns, p19-3M-et kódoló CIRV *in vitro* RNS transzkriptummal fertőzött *N. benthamiana* növényekben p19 ellenanyagot felhasználva immunoprecipitációt követően vizsgáltuk, hogy a mutáns VSR tudott-e virális siRNS-eket kötni. Az eredmények azt mutatták, hogy nem (21. ábra/B).

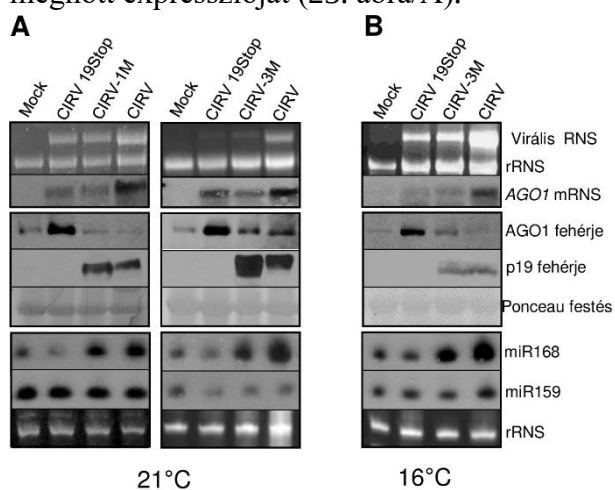
Ezt a kérdést tovább vizsgáltuk úgy, hogy a vírusfertőzött növények nyers kivonatait Superdex-200-as gél-szűrő oszlopon frakcionáltuk. A méret szerint elválasztott frakciók fehérje tartalmát Western blottal, RNS tartalmát pedig Northern blottal vizsgáltuk. A kísérleteket vad típusú (CIRV), p19-et nem expresszáló (CIRV19STOP), CIRV-3M és mock fertőzött növények kivonataival is elvégeztük. A kapott eredmények összehasonlítása azt mutatta, hogy míg vad típusú vírusfertőzéskor a virális siRNS-ek a p19-et tartalmazó frakciókban voltak jelen, a p19-3M-et expresszáló vírusfertőzés során, a CIRV19STOP mutánsához hasonlóan, a virális siRNS-ek a szabad frakciókban voltak kimutathatóak, annak ellenére, hogy a mutáns p19 igen nagy mennyiségben expresszált (22. ábra).



22. ábra Vírusfertőzött növények kivonatának elválasztása gélzúréssel és a frakciók p19 és a virális siRNS tartalmának vizsgálata.

Bizonyítottuk tehát, hogy a rekombináns CIRV-3M vírus stabilan expresszálja a mutáns szupresszort, ami viszont *in vivo* sem képes siRNS-eket kötni. Természetesen a végső kérdésünk a mutáns szupresszor előállítás után az volt, hogy vajon az sRNS kötő képességét elvesztett szupresszor indukálni fogja-e a miR168-at?

A CymRSV fertőzések során kapott eredményeinkhez hasonlóan azt találtuk, hogy a CIRV fertőzés során az AGO1 mRNS expressziója megnő. Ugyanez történt CIRV19STOP, 1M és 3M mutáns vírusokkal való fertőzés során is. A különbség az volt, hogy a miR168 expresszió csak akkor volt megfigyelhető, ha a p19 expresszálódott, (CIRV 1M, 3M és CIRV fertőzések esetén), ekkor viszont az AGO1 fehérje szintjének növekedése nem követte az AGO1 mRNS megnőtt expresszióját (23. ábra/A).



23. ábra Az AGO1 mRNS, fehérje és a miR168 mennyiségének vizsgálata vad típusú és mutáns (1M, 3M és 19STOP) vírusokkal fertőzött növényekben A/ 21 és B/ 16°C-on.

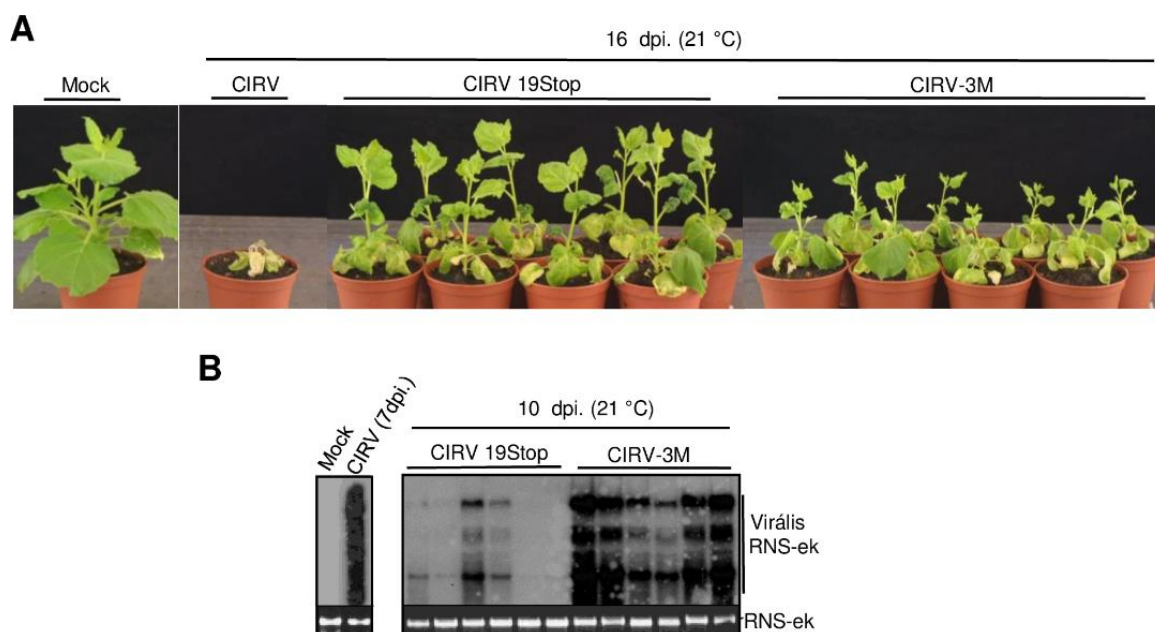
Az eredmények szerint ezen a hőmérsékleten valóban megnőtt a mutáns vírusok expressziója, és míg a vad típusú szupresszor expressziójakor az AGO1 fehérjeszint csökkent, a mutáns szupresszort tartalmazó vírusfertőzésnél ez nem történt meg (23. ábra/B.) Az sRNS

Mivel a mutáns vírus esetén a miR168 által regulált AGO1 szint változás ugyan megmarad, de a VSR mutációja miatt a növény RNSi alapú védekező folyamatai nagyon hatékonyan működnek a vírus ellen, a vírus koncentráció, így a mutáns p19 expressziója is, sokkal kisebb volt, mint vad vírussal való fertőzés esetén. A siRNS RNSi *N. benthamianában* alacsony hőmérsékleten nem működik hatékonyan (Szittyá *et al.*, 2003). Ahhoz, hogy a vad típusú vírusfertőzés során expresszált VSR-hez hasonló mértékű p19 expressziót érjünk el, a kísérleteinket megismételtük, úgy, hogy a növényeket 16 fokon neveltük.

kötésre nem képes p19-3M továbbra is képes volt a miR168 indukcióra és az AGO1 fehérjeszint szabályozására, tehát a miR168 indukció és az sRNS kötés a VSR két egymástól független tulajdonsága.

6.1.6 A p19 közvetített AGO1 szabályozás hatással van a vírusfertőzés tüneteinek súlyosságára és ezt a defektív interferáló RNS-ek sem tudják befolyásolni

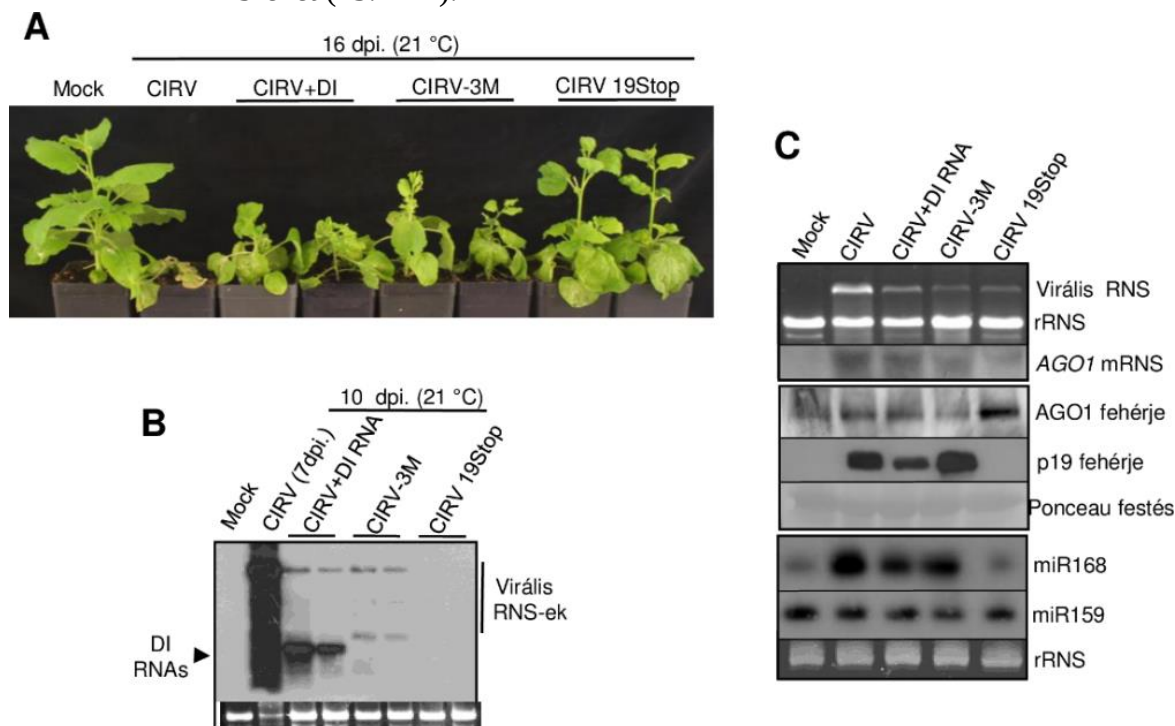
Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk meg, hogy a p19 által indukált miR168 mediált AGO1 kontroll milyen mértékben járul hozzá a vírusfertőzés során kialakult tünetek súlyosságához. A tombusvírusok fertőzése során a vírus extrém magas koncentrációban képes felhalmozódni és 8-10 nap alatt nekrozist kialakítani, ami a növény pusztulásához vezet (Vargason *et al.*, 2003), (Burgan *et al.*, 2000). A p19 VSR hiányos vírus fertőzésekor ezzel ellentétben a növény kigyógyul a fertőzésből, miközben a jelenlevő vírus mennyisége nagyon lecsökken (Szittyá *et al.*, 2002). CIRV-3M vírussal fertőzve *N. benthamiana* növényeket azt tapasztaltuk, hogy a megjelenő tünetek átmenetet képeztek a vad típusú vírus fertőzését követően kialakuló nekrosis és a CIRV19STOP fertőzés során kialakuló kigyógyulás között (24. ábra/A). Ez az átmeneti tünet összhangban volt a kimutatható vírus mennyiségével, amint Northern blot vizsgálataink is mutatták (24. ábra/B). Ez az eredmény azt sugallja, hogy ugyan a p19-3M nem tudja megakadályozni a szabad virális siRNS-ek megjelenését, a miR168 közvetített AGO1 koncentráció gátlásával kisebb mértékben ugyan, de képes a növény RNSi folyamatait gátolni.



24. ábra Vad típusú és mutáns (3M és 19STOP) vírusokkal fertőzött növényeken **A**/mutatkozó tünetek, és **B**/ a növényekben jelenlevő vírusok mennyiségének vizsgálata.

A tombusvírusok passzálása során a vírus genomjának delécijával defektív interferáló (defecting interfering - DI) RNS-ek képződnek, melyek feldúsulása szintén a növény kigyógyulásához vezet (Havelda *et al.*, 2005). Ezen folyamatok során az történik, hogy a DI RNS-ek hatékony replikációjuknak köszönhetően igen nagy mennyiségben halmozódnak fel,

róluk olyan sok virális siRNS keletkezik, hogy telítik a jelenlevő p19-ek sRNS kötő kapacitását (Havelda *et al.*, 2005). Amikor DI RNS-t is tartalmazó CIRV-vel fertőztünk *N. benthamiana* növényeket azt tapasztaltuk, hogy a DI RNS-ek jelenlétében is megnő a miR168 szint, de mivel a DI RNS-ekről tömegesen keletkező siRNS-ek telítik a p19 sRNS kötő kapacitását, hasonló tünetek keletkeznek, mint a CIRV-3M esetében, amikor a mutáns p19 nem tudja megkötni a szabad virális siRNS-eket (25. ábra).



25. ábra A A/ fertőzés tüneteinek, B/ a vírusedényiségnek és C/ az AGO1 mRNS, AGO1 fehérje és a miR168 mennyiségének vizsgálata DI-t tartalmazó, illetve nem tartalmazó vad típusú és 3M mutáns vírusokkal való fertőzés során.

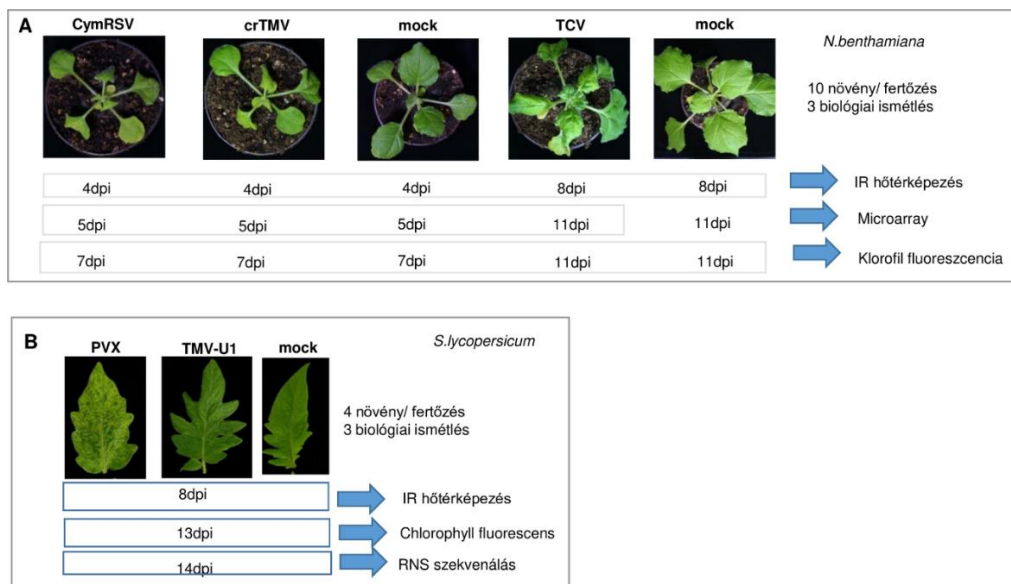
A DI RNS mediált sRNS telítés tehát nem zavarta a p19 miR168 indukáló képességét, tovább erősítve azt a feltételezésünket, hogy az sRNS kötés és a miR168 indukció a VSR két egymástól független tulajdonsága.

6.2 A gazdanövény génexpressziójának változása akut és perzisztens vírusherőztés során

A nagy-áteresztőképességű génexpressziós változások jellemzésére alkalmas vizsgálati módszerek lehetővé tették, hogy az akut és a perzisztens fertőzések során bekövetkező génexpressziós változásokat nagyobb mélységben, genom szinten vizsgáljuk. Kísérleteinkben microarray és RNS szekvenálási eljárásokat használva vizsgáltuk a fertőzés során bekövetkező génexpressziós változásokat és az eredmények egy részét független módszerekkel (Northern blot és kvantitatív RT-PCR) igazoltuk vissza. Különböző bioinformatikai módszerek használatával megállapítottuk az akut és perzisztens fertőzéseket kísérő génexpressziós változásokra jellemző általánosságokat és különbségeket, illetve azt, hogy milyen fiziológiai változások jellemzik a különböző fertőzéseket.

A vírus fertőzések során megjelenő tünetek és a fertőzési életciklusok alapján kiválasztva, a gazdanövényeken akut és perzisztens fertőzéseket okozó, egyszálú RNS vírusokkal fertőztük

a gazdanövényeket. *N. benthamiana* növényeket CymRSV (tombusvirus, akut), crTMV (tobamovirus, akut) és TCV (tombusvirus, perzisztens), míg *S. lycopersicum* növényeket PVX (potexvirus, akut) és TMV-U1 (tobamovirus, perzisztens) vírusokkal. A mintaszedés idejét úgy választottuk meg, hogy kellően korai legyen ahhoz, hogy a vírus már szisztemizálódjon de még csak enyhe tüneteket, klorózis, törpülést, okozzon. A kísérletek és a mintavételek idejét az 26. ábrán foglaltam össze.



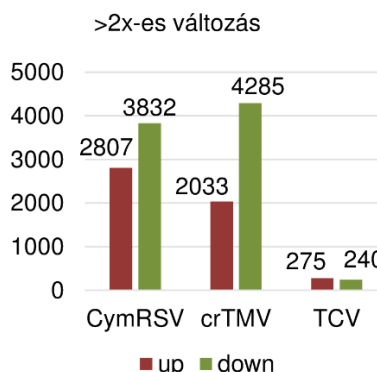
26. ábra A vírusfertőzött A/ *N. benthamiana* és B/ *S. lycopersicum* génexpressziós és fiziológiai vizsgálatának áttekintése a mintavételi időpontot megjelölésével.

6.2.1 A gazdanövény transzkriptómja akut fertőzés során jelentősen megváltozik

A vírusfertőzés során lejátszódó transzkripció változásokat CymRSV-, crTMV-, TCV- (és mock) fertőzött *N. benthamiana* növényben microarray hibridizációval vizsgáltuk.

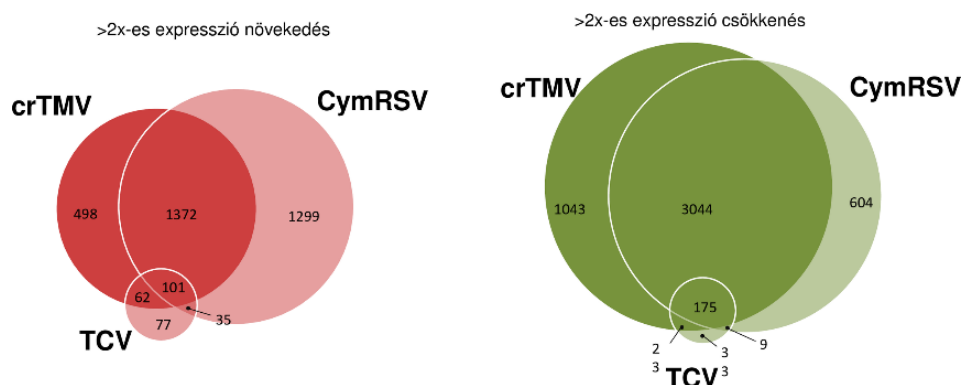
Az eltérően expresszáló gének azonosításához minden olyan a chipen előforduló próbát összegyűjtöttünk, melyek legalább 2x-es változást (és 0,5-nél kisebb p értéket) mutattak a vírusfertőzött növények bármelyikében.

A CymRSV- és a crTMV-fertőzött növényekben a különböző expressziót mutató próbák (differentially expressed probes - DEPs) száma (6639 és 6318) volt, míg a TCV-fertőzött mintákban a DEP-ek száma ennél jelenősen, kb. egy nagyságrenddel kisebb (515 DEPs) volt (27. ábra).



27. ábra *N. benthamiana* növényben vírusfertőzés során eltérően expresszáló DEP-ek eloszlása

Ezek közül 2807, 2033 és 275 próba expressziója csökkent, míg 3832, 4285 és 240 expressziója nőtt (28. ábra). Az indukálódott (1473) és a csökkent expressziójú (3219) próbák többsége a CymRSV- és a crTMV-fertőzés során megegyezett, ami hasonló regulációt sugall.

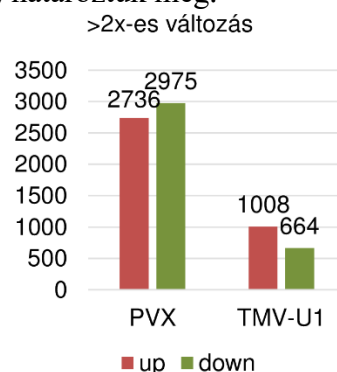


28. ábra A különböző vírusok fertőzése során a *N. benthamiana* növényben eltérően és hasonlóan expresszálódó DEP-ek eloszlásának ábrázolása Venn-diagrammon.

A PVX és a TMV-U1 fertőzött *S. lycopersicum*-ban bekövetkezett génexpressziós változások azonosítását RNS-szekvenálással (RNS-seq) határoztuk meg.

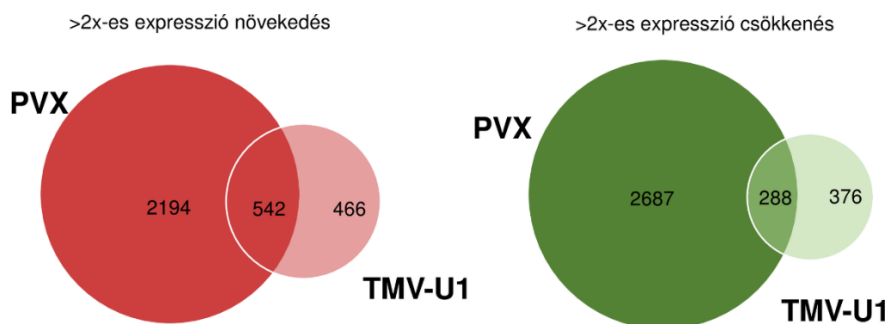
A különbözően expresszáló gének (differentially expressed gene - DEG)-nek azokat tekintettük, amik a vírusfertőzés során legalább kétszeres változást (és $p < 0.05$) mutattak.

PVX fertőzés során 5711, míg TMV-U1 fertőzés során jóval kevesebb, 1672 DEG-et azonosítottunk, melyek közül 2736 és 1008 DEG indukálódott, míg 2975 és 664 DEG expressziója csökkent (29. ábra).



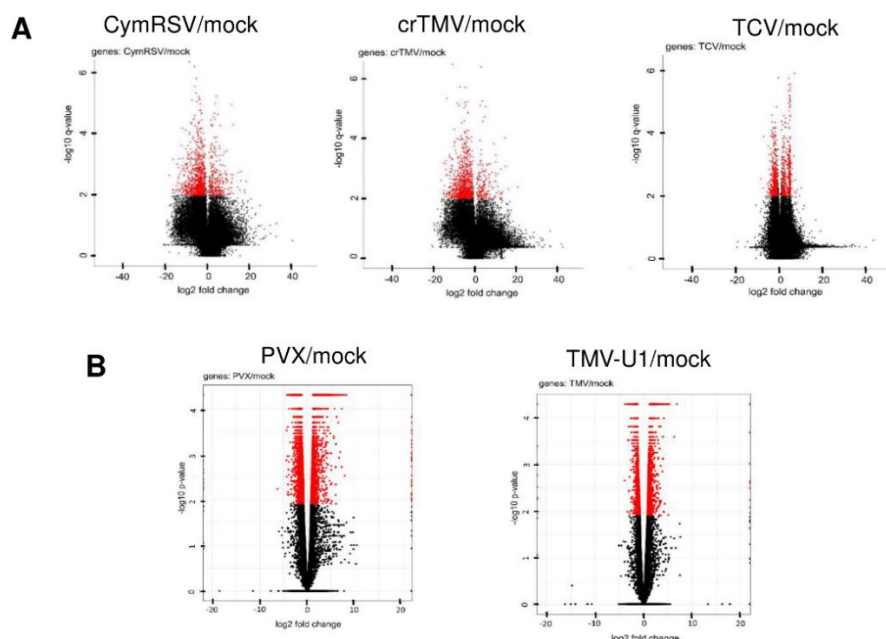
29. ábra *L. esculentum* növényben vírusfertőzés során eltérően expresszálódó DEP-ek eloszlása.

A DEG-ek csak kis száma egyezett meg a PVX és a TMV-U1 fertőzött növényekben (542 és 288) és a változások nagy része a PVX fertőzés során következett be (30. ábra).



30. ábra A különböző vírusok fertőzése során *L. esculentum* növényben eltérően expresszálódó DEP-ek számának eloszlásának ábrázolása Venn-diagrammon.

A vulkán-diagrammok azt mutatják, hogy *N. benthamiana*-ban sokkal több az expressziós csökkenést mutató gén száma, mint *S. lycopersicum*-ban, ahol a fel és le-regulálódott gén száma kb megegyezett. (31. ábra).

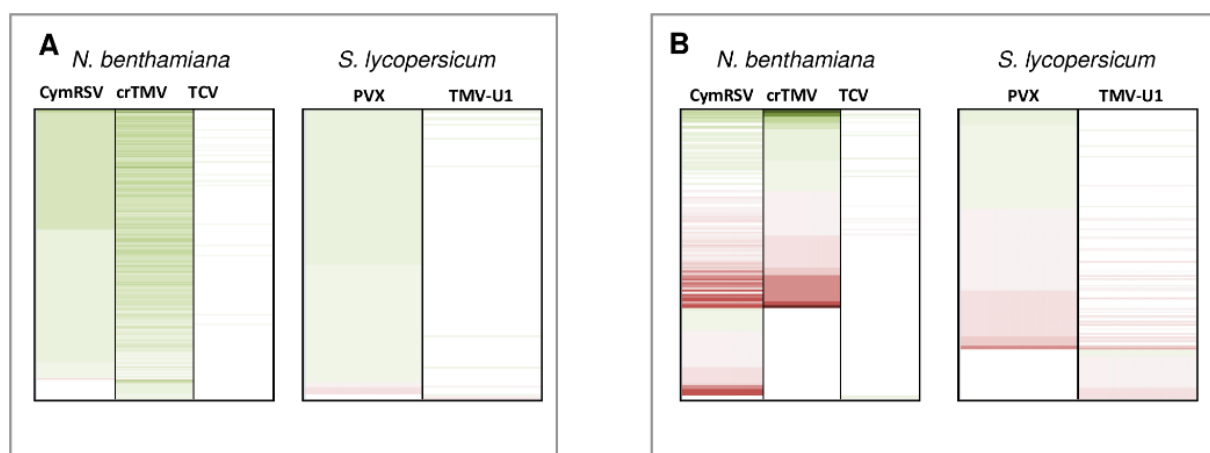


31. ábra A A/ *N. benthamiana* és B/ *L. esculentum* gazdanövényben bekövetkező génexpressziós változások ábrázolása vulkán-diagrammon. A szignifikánsan különbözően expresszálódó géneket piros szín mutatja.

Ez lehet annak a következménye, hogy a *N. benthamiana* chipen jelenlévő próbák nem a genom egészét képviselik, egyes gének reprezentáltsága nagyobb lehet. Ez az egyenlőtlenség tükröződhet a DEG-ek számában, ami nem feltétlenül mutatja a változások valós arányát. Ezen eredményeink is azt mutatják, hogy akut fertőzés esetén a gazda transzkriptomja jelentősen változik, míg perzisztens vírus fertőzése a gazda génexpresszióját sokkal kisebb mértékben változtatja meg. Az akut és perzisztens fertőzések által indukált változások mértéke a két gazdában hasonló képet mutatott.

6.2.2 A fotoszintézishez kötődő traszkriptumok expressziójának csökkenése és a stresszgének aktiválódása az akut fertőzéshez köthető

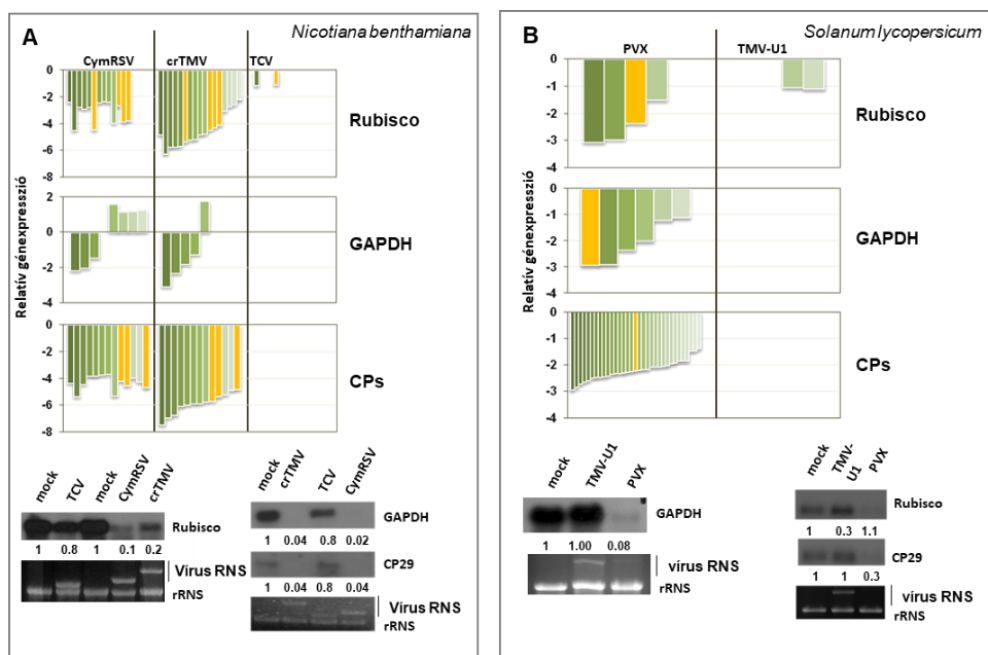
Ahhoz, hogy kideríthessük az akut és a perzisztens fertőzések során bekövetkező génexpressziós változások háttérében húzódó molekuláris folyamatokat, megvizsgáltuk a DEG-ek funkciójának megoszlását (annotációjukat a Bin kódjuk alapján végeztük el). A legnagyobb változást mutató gének (az összes vírusfertőzést figyelembe véve), a fehérje anyagcserében, RNS szabályozásban, szignál útvonalakban és a transzportban játszanak szerepet, és megegyeztek az akut és a perzisztens fertőzések során mindkét gazdában. A különböző expressziót mutató gének vizsgálatakor azt találtuk, hogy a fotoszintézisben szerepet játszó traszkriptumok gátlása, és a stresszgének indukciója szinte kizárólag az akut (CymRSV, crTMV és PVX) fertőzések során valósul meg és expressziójuk a perzisztens (TCV és TMV-U1) fertőzések során változatlan marad (32. ábra).



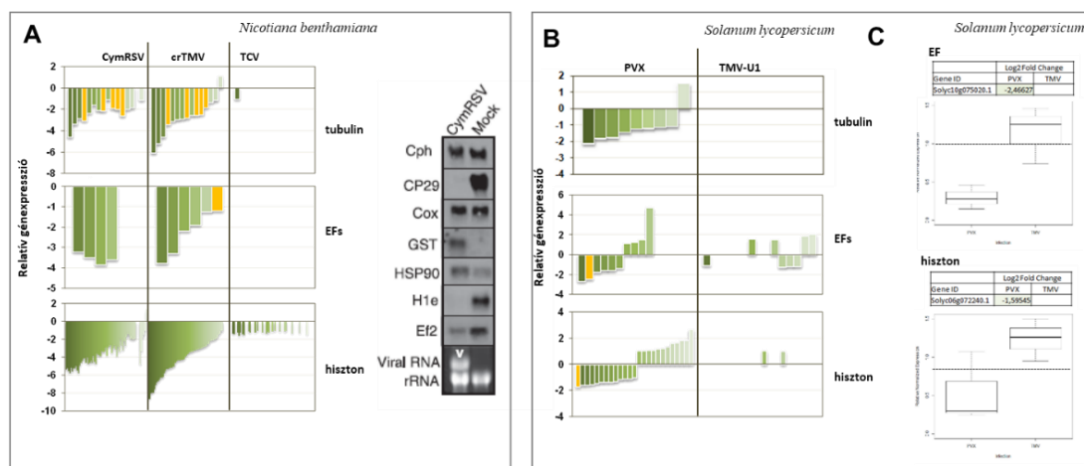
32. ábra A A/fotoszintézisben és a B/ stresszválaszban fontos gének expressziós változásainak ábrázolása a vírusfertőzések során heat-map ábrázolással. 1-1 csík egy-egy DEP-et, illetve DEG-et jelez. Piros az expressziós növekedést, míg a zöld az expressziós csökkenést. A színek intenzitása arányos a változás mértékével.

6.2.3 A háztartási-, stressz- és néhány speciális anyagcsere-gén expressziója megváltozik akut fertőzés során, míg perzisztens fertőzéskor változatlan marad

Korábbi kísérleteink során kimutattuk, hogy a CymRSV-fertőzött *N. benthamiana* szisztémikus leveleiben a Gapdh, tubulin, Rubisco, klorofil a/b kötő fehérje (CPs) 29 (CP29) és a hiszton 1 (H1E) transzkriptumok szintje erőteljesen lecsökken. Az elongációs faktor (EF) 2 mRNS-ének szintje kicsit csökkent, míg a glutation S-transzferázt (glutathion S-transferase - GST) és a hősokk fehérjét (heat shock protein - HSP) 90 kódoló (HSP90) transzkriptumok szintje megnőtt (Havelda *et al.*, 2008). Megvizsgáltuk ezen gének expressziójának szintjét a microarray és az RNS-seq adatainkban. A microarray chip több Rubisco-, Gapdh- és CPs-specifikus próbát tartalmazott. Ezek expressziója csak az akut fertőzések (CymRSV és crTMV) során változott a perzisztens TCV fertőzéskor változatlan maradt, amit Northern blot analízissel is visszaigazoltunk (33. ábra/A). A vírusfertőzött *S. lycopersicum* RNS-seq eredményei és ezek Northern-blottal való visszaigazolása is azt mutatták, hogy ezen gének expressziójának szintje csak a PVX fertőzés során csökkent drasztikusan, TMV-U1 fertőzés során alig, vagy egyáltalán nem változott (33. ábra/B). A tubulin, EF-ek és hisztonok expressziója is főleg az akut (CymRSV, crTMV és PVX), fertőzések során csökkent míg perzisztens fertőzéskor (TCV és TMV-U1) expressziójuk nem változott (34. A és B).

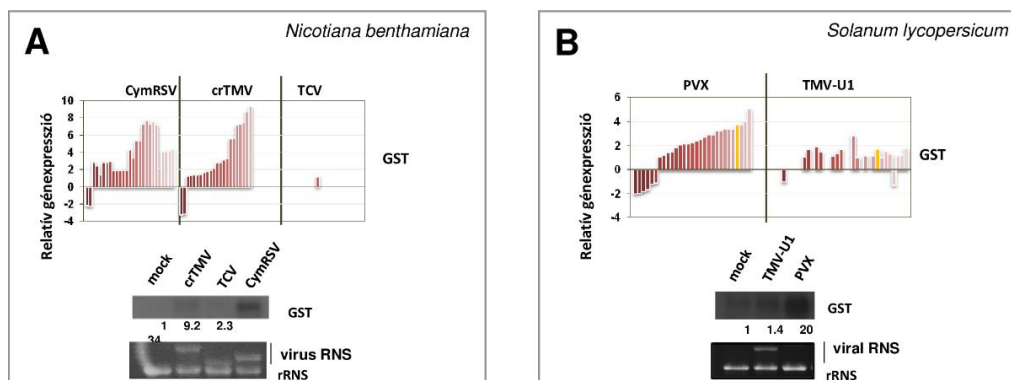


33. ábra A Rubisco, a Gapdh és a különböző klorofill kötő fehérjék (CPs expressziójának vizsgálata vírusfertőzött A/ *N. benthamiana* és B/ *S. lycopersicum* növényekben. A felső panel oszlopdiagramjai a microarray analízis (*N. benthamiana*) vagy az RNS-seq (*S. lycopersicum*) során az adott gént reprezentáló DEP-ek, vagy DEG-ek-re kapott expressziót log2-szeres változását mutatják. Az alsó panel az adott endogen génre specifikus radioaktív próbával végzett Northern hibridizációt mutatja. A jelek alatt a változások mértékét a mock fertőzött növényben detektált expresszióhoz viszonyítva adtam meg (mintafelviteli kontrollként az EtBr festett gélek rRNS-eket tartalmazó régióit adtam meg). Sárga színnel azokat a DEP-eket, vagy DEG-eket jelöltem, melyek expresszióját Northern blottal vizsgáltuk. (A vizsgált *N. benthamiana* Gapdh-ra specifikus próbát nem találtunk a microarray chipen.)



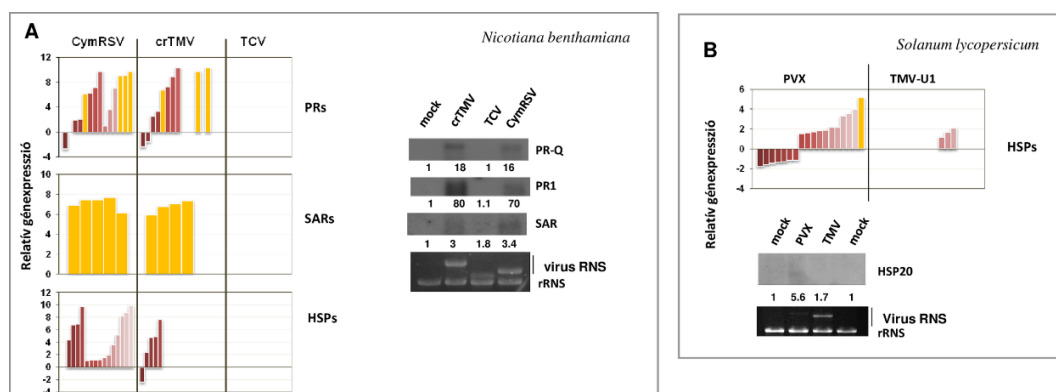
34. ábra A tubulin, az elongációs faktorok és a hisztonok expressziójának vizsgálata vírusfertőzött A/ *N. benthamiana* és B/ *S. lycopersicum* növényekben. Az oszlopdiagrammok a microarray analízis (*N. benthamiana*) vagy az RNS-seq (*S. lycopersicum*) során az adott gént reprezentáló DEP-ek, vagy DEG-ek-re kapott expressziót log2-szeres változását mutatják. Az A jobb oldali panelen a CymRSV fertőzött *N. benthamiana* esetén ezen gének expressziójának Northern blottal való vizsgálatát mutatom be (Havelda *et al.*, 2008). A B panel jobb oldalán egy paradicsom EF és hiszton expressziójának qRT-PCR-rel kapott eredményét mutatom be bajusz diagrammon. Sárga színnel azokat a DEP-eket, vagy DEG-eket jelöltem, melyek expresszióját Northern blottal vizsgáltuk.

A GST, patogén-kapcsolt (pathogen related, PR), a szisztémikus rezisztencia (systemic acquired resistance, SAR) és a HSPk tipikus stresszgének. A GST specifikus próbák és a GST gén szintje is indukálódott akut fertőzés során és nem változott perzisztens fertőzéskor (35. ábra/A és B).



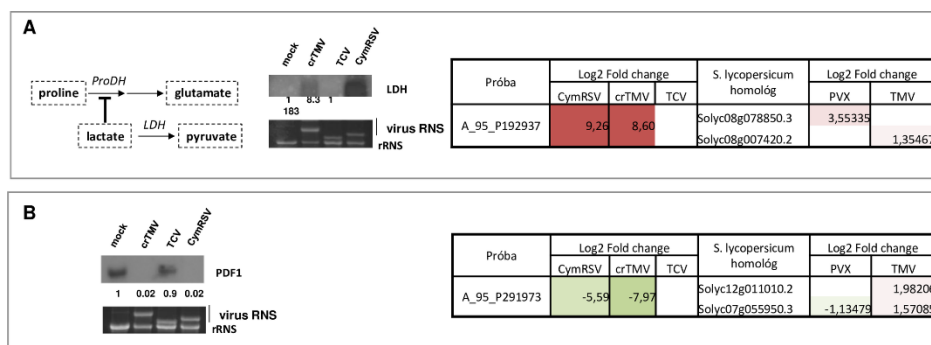
35. ábra A GST expressziójának vizsgálata vírusfertőzött A/ *N. benthamiana* és B/ *S. lycopersicum* növényekben. A felső panel oszlopdiagramjai a microarray analízis (*N. benthamiana*) vagy az RNS-seq (*S. lycopersicum*) során az adott gént reprezentáló DEP-ek, vagy DEG-ek-re kapott expressziót log2-szeres változását mutatják. Az alsó panel az adott endogén génre specifikus radioaktív próbával végzett Northern hibridizációt mutatja. A jelek alatt a változások mértékét a mock fertőzött növényben detektált expresszióhoz viszonyítva adtam meg (mintafelviteli kontrollként az EtBr festett gél rRNS-eket tartalmazó régióit adtam meg). Sárga színnel azokat a DEP-eket, vagy DEG-eket jelöltem, melyek expresszióját Northern blottal vizsgáltuk. (A vizsgált *N. benthamiana* GST-re specifikus próbát nem találtunk a microarray chipen.)

Megvizsgáltuk a PR, SAR és HSP gének expresszióját is és azt találtuk, hogy ezek is csak az akut (CymRSV, crTMV és PVX) fertőzések során indukálódtak és expressziós szintjük a perzisztens fertőzések (TCV vagy TMV-U1) során változatlan maradt (36. ábra/A és B).



36. ábra A PR, a SAR és a HSP gének expressziójának vizsgálata vírusfertőzött A/ *N. benthamiana* és B/ *S. lycopersicum* növényekben. Az oszlopdiagrammok a microarray analízis (*N. benthamiana*) vagy az RNS-seq (*S. lycopersicum*) során az adott gént reprezentáló DEP-ek, vagy DEG-ek-re kapott expressziót log2-szeres változását mutatják. A Northern blottok paneljei az adott endogén génre specifikus radioaktív próbával végzett Northern hibridizációt mutatják. A jelek alatt a változások mértékét a mock fertőzött növényben detektált expresszióhoz viszonyítva adtam meg (mintafelviteli kontrollként az EtBr festett gél rRNS-eket tartalmazó régióit adtam meg). Sárga színnel azokat a DEP-eket, vagy DEG-eket jelöltem, melyek expresszióját Northern blottal vizsgáltuk.

A protodermal faktor 1 (PDF1) és a laktát-dehidrogenáz (LDH) egyaránt az akut fertőzés során legjobban változó próbák között voltak jelen, míg szintjük nem változott a TCV fertőzött *N. benthamiana*-ban (37. ábra/A, B).



37. ábra Az A/ LDH és a B/ PDF1 expressziójának vizsgálata vírusfertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényekben. A Northern blottok paneljei az adott endogen génre specifikus radioaktív próbával végzett Northern hibridizációt mutatja. A jelek alatt a változások mértékét a mock fertőzött növényben detektált expresszióhoz viszonyítva adtam meg (mintafelviteli kontrollként az EtBr festett gél rRNS-eket tartalmazó régióit adtam meg). A jobb oldali táblázatok az adott génre specifikus DEP és DEG-ek vírusfertőzés során megváltozott expresszióját mutatják.

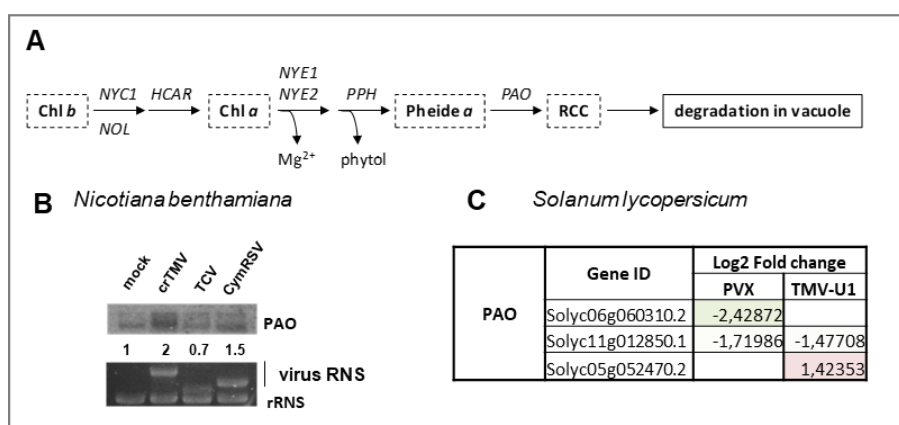
Az LDH a prolin metabolizmusban vesz részt (Peter *et al.*, 2014). Stressz hatására a prolin dehidrogenáz aktiválódik (ProDH) és így a prolin gyorsan lebomlik (Soledad *et al.*, 2017). A laktát az LDH szubsztrátja, de egyben a ProDH kompetitív inhibitora, így az LDH expressziójának indukciója közvetetten megnöveli a ProDH aktivitását, és lehetővé teszi a gyors stressz válasz kialakulását. A PDF1 egy feltételezeten extracelluláris prolin-gazdag fehérjét kódol, ami kizárólag a növényi szervek fejlődése során kialakuló protodermában és a merisztéma L1 sejtjeiben expresszálódik. Ennek szintje is csak az akut fertőzés során nőtt, míg TCV fertőzéskor változatlan maradt (37. ábra/B). *S. lycopersicum*-ban a PDF1 és az LDH expressziójának változása hasonló trendet mutatott, a PDF1 szint jelentősen megnőtt a PVX, és csak kicsit változott TMV-U1 fertőzéskor, míg az LDH expressziója csak PVX fertőzéskor csökkent, TMV-U1 fertőzéskor a szintje enyhén emelkedett (37. ábra/A és B).

A fent leírt génexpressziós mintázatok azt mutatják, hogy akut fertőzéskor a transzkriptom specifikus változást mutat, mindkét gazdában igen hasonlóan, és ez a drasztikus változás perzisztens fertőzéskor nem következik be.

6.2.4 A fotoszintézisben résztvevő, sejtfal átalakító és a hormonális válaszadásban fontos transzkriptumok expressziója jelentősen megváltozik akut fertőzés során

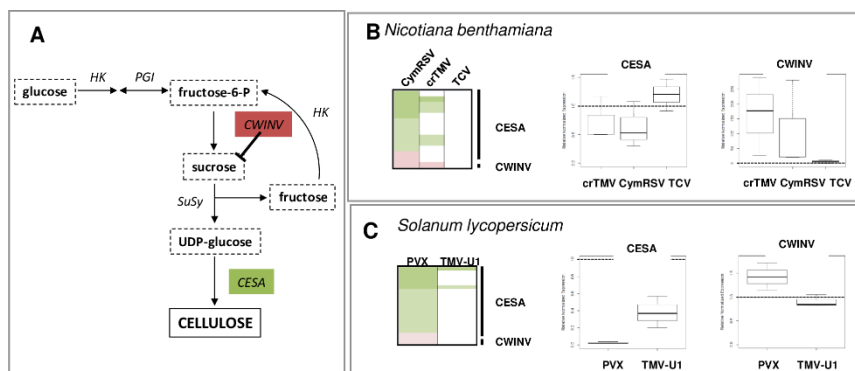
A virológia egyik igen kutatott alapkérdése a vírusfertőzés során kialakuló tünetek kialakulásának hátterében álló folyamatok molekuláris mechanizmusa, ennek ellenére nagy része máig ismeretlen. A vírusfertőzött növényen megjelenő tünetek a molekuláris és fiziológiai változások összességét tükrözik (Rojas *et al.*, 2014, Paudel & Sanfaçon, 2018). A különböző növényi vírusok által okozott általános tünetek a klorózis, sárgulás, a levél méretének csökkenése és torzulása vagy öregedése. Ezek a változások sokszor egybeesnek a gazda fotoszintetikus aktivitásának vagy kloroplasztisz szerkezetének megváltozásával (Dardick,

2007, Satoh *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2014, Ahmed *et al.*, 2017, Huang *et al.*, 2017, Seo *et al.*, 2018). A klorózist és a sárgulást okozhatja a klorofill lebomlása, ami a levél öregedésének egy korai jele. A klorofill lebomlásának egyik kulcs regulátora a pheoforbida oxigenáz, a PAO, ami a pheoforbida porfirin gyűrűjének hasítását katalizálja. A reakció során egy vörös klorofill intermedier (red Chl catabolite intermediate (RCC)) keletkezik, ami később a vakuólumban bomlik le (38. ábra/A). Biotikus stresszek során a PAO szintje megnő (Xiao *et al.*, 2015, Zhu *et al.*, 2017). Sajnos a microarray chipen nem találtunk PAO specifikus próbát, de Northern blottal megvizsgálva kimutattuk, hogy indukálódik a szintje akut (CymRSV és crTMV) fertőzéskor (38. ábra/B). Ezzel ellentétben az RNS-seq eredményeink *S. lycopersicum*-on azt mutatták, hogy három különböző PAO-szerű gén szintje enyhén csökken PVX és alig változik TMV-U1 fertőzéskor (38. ábra/C).



38. ábra A A/ PAO szerepe az anyagcsere-folyamatokban és B/ génexpressziójának változása vírusfertőzött/ *N. benthamiana* és C/ *S. lycopersicum* növényekben. A Northern blott panelje a PAO-ra specifikus radioaktív próbával végzett Northern hibridizációt mutatja. A jelek alatt a változások mértékét a mock fertőzött növényben detektált expresszióhoz viszonyítva adtam meg (mintafelviteli kontrollként az EtBr festett gél rRNS-eket tartalmazó régióit adtam meg). A C panel táblázata a PAO-ra specifikus *S. lycopersicum* DEG-ek vírusfertőzés során megváltozott expresszióját mutatják.

Akut fertőzéskor a klorózis és a sárgulás mellett mindkét gazda enyhe törpülése is megfigyelhető volt. Ha a sejtfal szintézis megváltozik, a levelek mérete csökkenhet, alakjuk torzulhat és a teljes növény mérete is csökkenhet. Ezt lehet megfigyelni a sejtfal szintáz (cell wall synthase - CESA) mutáns, vagy CESA-géncsendesített növényekben (Burton *et al.*, 2000). Ezzel ellentétben, a sejtfal invertáz (cell wall invertase - CWINV), ami a szaharózt fruktózzá alakítja, általában indukálódik korai védekezési reakciókban (Essmann *et al.*, 2008)(39. ábra/A). Paradicsom sárga levélsordódás vírus fertőzött paradicsomban, különösen, ha paradicsom klorózis vírussal együtt fertőzték, a törpülés közvetlenül kapcsolható volt a CESA8 expresszió csökkenésével és a CWINV2 expresszió indukciójával (Seo *et al.*, 2018). A vírusfertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* vizsgálata során mi is hasonló trendet figyeltünk meg (39. ábra/B és C), t.i. a CESA8 típusú szintázok szintje le-, míg az invertázok szintje fel-regulálódott.



39. ábra A A/ CESA és a CWINV szerepe az anyagszere-folyamatokban és génexpressziójának változása vírushatózott B/ *N. benthamiana* és C/ *S. lycopersicum* növényekben. A B és C panel heatmap-je az adott enzimre jellemző DEP-ek (B) és DEG-ek (C) expressziós változását mutatja. A panelek jobb oldalán az adott gén expressziójának qRT-PCR-rel való vizsgálata során kapott eredményt mutatom be bajusz diagrammon.

Eredményeink szerint a PAO, CESA és CWINV expressziós szint korrelált a fertőzés típusával, akut fertőzés során mindkét gazdában sokkal kifejezettebb volt. Ezek a változások pedig hozzájárulhatnak a fertőzés során kialakuló törpülési tünetekhez.

Az akut fertőzés során sokszor megjelenő különböző fejlődési rendellenességeket a megváltozott hormon anyagszere is okozhatja (napjainkban összefoglalva: (Paudel & Sanfaçon, 2018)). A növény növekedését, fejlődését és megnyúlási folyamatait reguláló auxinek, citokininek, gibberellin sav és brassinoszteroidok szintjének változása a vírushatózás során nem egyértelmű (összefoglalva: (Mazen & Na-Sheng, 2015)). Ugyan a microarray chip és a paradicsom genom nem megfelelő annotálása nem tette lehetővé, hogy e folyamatokban résztvevő DEP-eket és DEG-eket teljesen feltérképezzük, az egyértelmű, hogy akut fertőzéskor az ezen útvonalakban résztvevő gének expressziója mindkét gazdában megváltozott, míg perzisztens fertőzésnél alig mutattak változást. A többi növényi hormon: etilén, abszcizinsav, jázmonsav vagy szalicilsav által szabályozott transzkripciós faktorok eltérően regulálhatják a szenescenciában résztvevő géneket (senescence-associated genes (SAGs)), ami végül a klorofill lebomlásához és a levél öregedéséhez vezet (Robatzek & Somssich, 2002, Woo *et al.*, 2013). A hormon bioszintézis és reguláció teljes, vagy kombinált megváltozása vezethet végül a levél öregedéséhez. Az akut fertőzések során bekövetkező változások a hormon anyagszere-útvonalak minden szintjén kifejezettebbek voltak, ami magyarázhatja azt, hogy miért alakulnak ki súlyosabb tünetek e fertőzések során.

6.2.5 Fiziológiai változások vírushatózott *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényekben

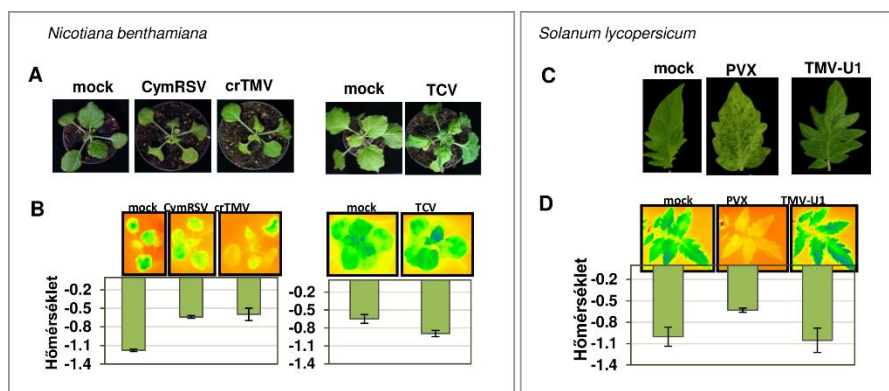
Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy vajon az akut fertőzés során bekövetkező molekuláris változások valóban fiziológiai változásokat idéznek-e elő, megvizsgáltuk a gazda fotoszintetikus aktivitásának változását. Ehhez a vírushatózott növények klorofill fluoreszcencia, levélhőmérséklet fotoszintetikus aktivitás és performance index paramétereit jellemeztük, fiziológiai mérések segítségével.

Hőkamerás vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy a beteg és az egészséges növények párolgás során bekövetkező hővesztesége eltér. Az egészséges növények a beteg

növényeknél több vizet párologtatnak, aminek lehet az az oka, hogy sztóma regulációjuk hatékonyabban működik, vagy akár az is, hogy a patogén a sztóma záródását idézi elő.

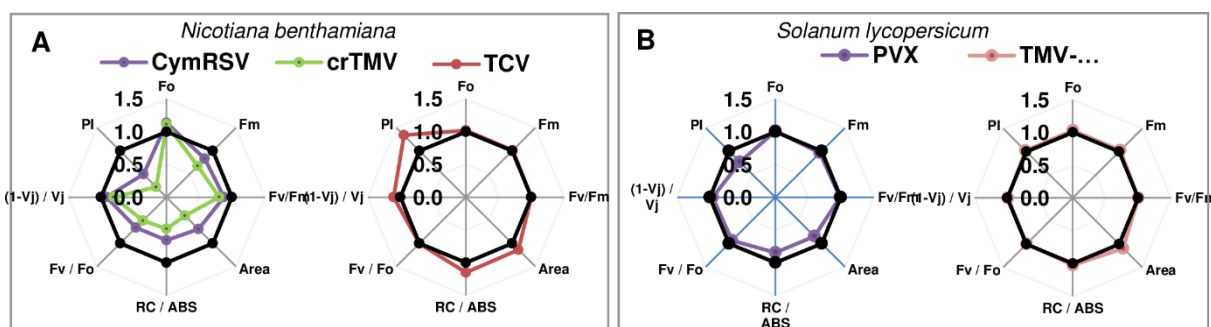
Hőkamerás vizsgálatokkal a fertőzött növények és a növényt körülvevő levegő hőmérsékletét hasonlítottuk össze (40. ábra).

A mock fertőzött növények transpirációs rátája a perzisztens vírusokkal fertőzött növényekhez hasonlított jobban. Akut fertőzéskor a levélhőmérséklet szignifikánsan magasabb volt, majdnem elérte a levelet körülvevő levegő hőmérsékletét, ami azt sugallja, hogy az akut fertőzést okozó vírusok a gazda légcseréjét gátolják.



40. ábra A kísérleteinkben használt vírusfertőzött növények képe látható fényben (A és C) és hőkamerás felvétellel (B és D). A B és D paneleken az adott levél hőmérsékletét a környezethez viszonyítva is bemutatom oszlopdiagrammokon.

Klorofill fluoreszcencia mérésekkel is jellemeztük a vírusfertőzött növényeket és azt tapasztaltuk, hogy a II fotorendszer donor és akceptor oldalának elektrontranszferét jellemző paraméterek az akut fertőzések során jelentősen változtak, míg a perzisztens vírusok esetében ezek az értékek a kontrollal megegyeztek, vagy akár, a TCV esetében, kicsit meg is emelkedtek (41. ábra).

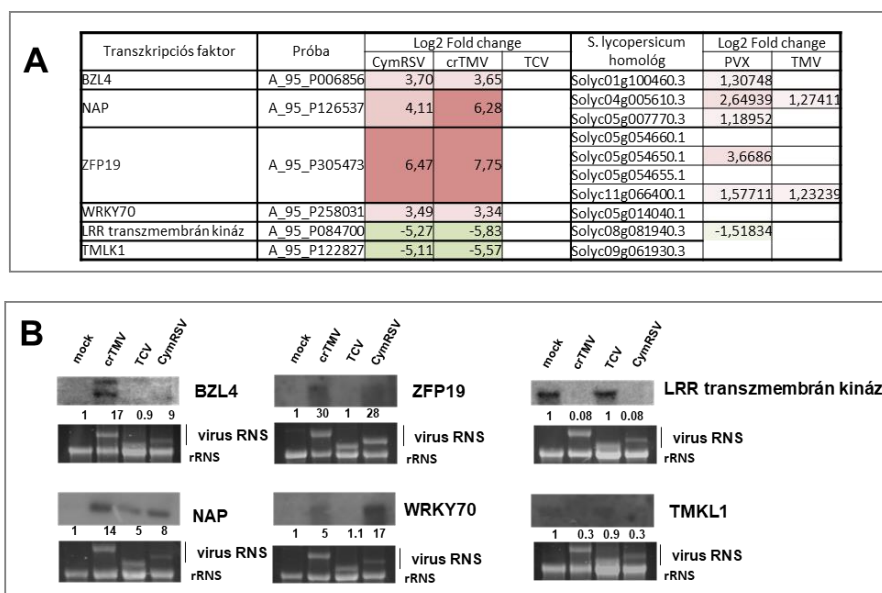


41. ábra A klorofill fluoreszcenciát jellemző paraméterek változása vírusfertőzött A/ *N. benthamiana* és B/ *S. lycopersicum* növényekben pókhálódigrammon bemutatva.

A mért fiziológiai paraméterek igen hasonlóan változtak, mint a molekuláris változások, perzisztens fertőzéskor enyhe, míg akut fertőzéskor jelentős változások voltak megfigyelhetők, már a fertőzés korai stádiumában.

6.2.6 Olyan szabályozásban fontos gének is hasonlóan változtak az azonos típusú vírusfertőzésekben, melyek a sejtmagban fejtik ki hatásukat

A hasonló stratégiájú vírusokkal fertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényekben bekövetkező molekuláris és fiziológiai változások is igen hasonlóak voltak, ami egy általános szabályozó folyamat jelenlétére utal. *In vitro* transzkripciók kísérletekkel kimutattuk, hogy a shut-off a sejtmagban, transzkripció szinten történik, ott, ahol a transzkripció faktorok is szabályozzák célgénjeiket (Havelda *et al.*, 2008). Microarray kísérleteink során számos ilyen szabályozó fehérjeként annotált DEP-et azonosítottunk. Ezek közül ugyan többet megvizsgáltunk részletesebben, de végül csak hatnak az expressziós mintázatát tudtuk Northern blottal is igazolni (42. ábra). A bázikus leucin zipzár (BZL)-4, NAP-szerű (nucleoszóma összeszerelő fehérje), a zink-ujj (ZF) P11 és egy WRKY70 transzkripció faktor aktivitása jelentősen nőtt, míg egy leucin gazdag (LRR) transzmembrán kináz és egy transzmembrán kinázszerű (TMKL)-1 fehérje expressziója csökkent akut fertőzések során. A BZL-4 a BZIP transzkripció faktor család tagja, és a biotikus stresszek során betöltött szerepe nem ismert. Tudjuk viszont azt, hogy túltermelve a dohány növekedése csökken, az internóduszok megrövidülnek, kisebbek lesznek a virágok és kevesebb a pollen termelődik (Tim *et al.*, 2010). Ha az egyik lehetséges *Antirrhinum majus* ortológját túltermeltették, akkor csökkent a klorofill a/b kötő fehérjék transzkripciója (Strathmann *et al.*, 2001). Ezzel összhangban a megnőtt BZL-4 expressziót mutató növények: a CymRSV, crTMV-fertőzött dohány és a PVX-fertőzött paradicsom növekedése mérséklődött, és ezzel párhuzamosan a CAB fehérjéket kódoló génjeik expressziója nagyon lecsökkent, azt mutatva, hogy ez a BZL transzkripció faktor biotikus stresszekben is szerepet játszhat.



42. ábra Különböző, vírusfertőzés során markáns változást mutató transzkripció faktorok expressziójának vizsgálata vírusfertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényekben. Az A/ táblázatok az adott génre specifikus DEP és DEG-ek vírusfertőzés során megváltozott expresszióját mutatják. A Northern blottok paneljei B/ az adott endogén génre specifikus radioaktív próbával végzett Northern hibridizációt mutatják. A jelek alatt a változások mértékét a mock fertőzött növényben detektált expresszióhoz viszonyítva adtam meg (mintafelviteli kontrollként az EtBr festett gél rRNS-eket tartalmazó régióit adtam meg).

A NAC-szerű transzkripciós faktorokat széles körben tanulmányozták: tudjuk, hogy fontos szerepük van az öregedési folyamatokban, és hogy az etilén érzéketlen (ethylene insensitive; EIN)-2 útvonalon keresztül szabályozódnak (Kim *et al.*, 2014). A NAP-szerű próba a microarray chip-en egy AtNAP (ANAC019-like) transzkripciós faktorként volt annotálva, ami a virág primórdiumban termelődik, és az APETALA 3 (AP3) és a PISTILLATA (PI) transzkripciós faktorok is szabályozzák az expresszióját (Sablowski & Meyerowitz, 1998). Az AtNAP túltermelése korai öregedést okozott (Guo & Gan, 2006), ahogy szintjének megemelkedése is a korai öregedéssel párosult (Vogelmann *et al.*, 2012). Mind a *N. benthamiana* és a *S. lycopersicum* homológjának az expressziója megnőtt akut fertőzéskor, azt mutatva, hogy a korai öregedési folyamatok elkezdődtek.

Ismert, hogy a ZF transzkripciós faktoroknak a stressz folyamatokban, így a bioikus stresszben is fontos szerepük van. Az AtZAT11 (At2g37430) expressziója *A. thalianában* biotikus stressz során a flagellin22 elicitor peptid hatására megnőtt (Zipfel *et al.*, 2004), míg nyárfában a ZF11 homológjának, a PtiZFP1-nak az expressziója szalicilsav (SA) és jázmonát (JA) kezeléskor és rozsdagomba fertőzéskor nőtt meg (Hamel *et al.*, 2011). Kísérleteinkben a P305473, ami egy ZF11 homológként volt annotálva, expressziója nőtt meg mindkét gazdában akut fertőzéskor, jelezve, hogy ennek a regulációs útvonalnak is szerepe lehet a súlyosabb tünetek kialakulásában.

A WRKY transzkripciós faktorokról tudjuk, hogy szerepet játszanak a növény védekező folyamataiban. Maga a WRKY70 SA hatására indukálódik, míg a JA gátolja az expresszióját. Kölcsönhat a „Nem-expresszál patogén-regulált fehérjé1” (Nonexpressor of pathogenesis-regulated protein 1; NPR1) génnel, és azt gondolják, hogy biotikus stresszek során gátolja a védekezéshez kötődő JA választ (Jing *et al.*, 2006). A legújabb eredmények szerint a brassinosteroid-regulált növekedésben is szerepet játszik (Chen *et al.*, 2017). A WRKY70 szintje akut fertőzések során megnőtt, ami azt mutatja, hogy nemcsak bakteriális és gomba, hanem vírus fertőzéskor is fontos a szerepe.

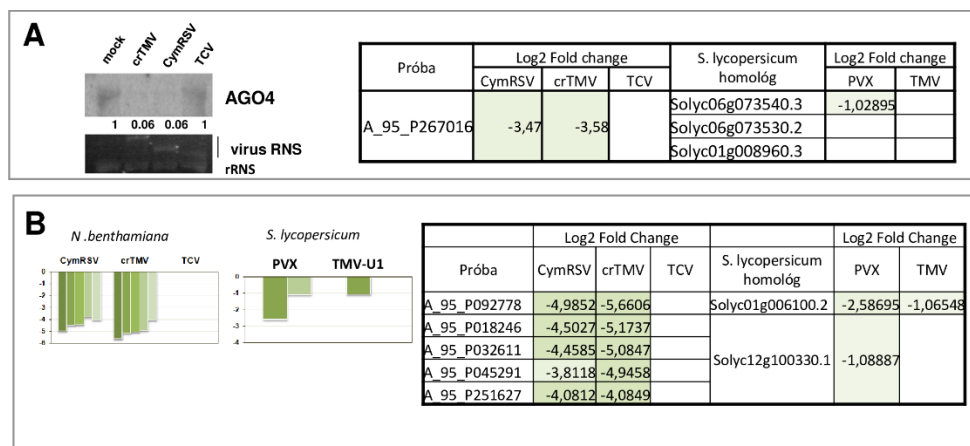
Az LRR transzmembrán kináz egy feltételezetten inaktív kinázként volt annotálva, de *Arabidopsis* homológja (At4g23740) aktiválódott (foszforilálódott) a bakteriális és gomba fertőzést mimelő flagellin és xylanáz kezelés hatására (Benschop *et al.*, 2007). Ennek a kináznak az expressziója akut fertőzéskor csökkent, azt sugallva, hogy mégis csak aktív és, hogy a vírusfertőzés korai szignalizációjában vehet részt.

Egy másik kinázt, a TMKL1-t is azonosítottuk microarray kísérleteinkben, mint aminek csak akut fertőzéskor csökken az expressziója, és ezt Northern blottal igazoltuk is *N. benthamianában*. Ez egy olyan *Arabidopsis* transzmembrán kináz homológ, aminek igen szokatlan a kináz doménje, de funkciója nem ismert (Valon *et al.*, 1993). Paradicsom homológjának nem változott a szintje, még PVX fertőzéskor sem, így a vírusfertőzés során betöltött szerepét nem tudtuk bizonyítani.

6.2.7 A sejtmagban működő RNSi folyamatok lehetséges szerepe az akut fertőzés során bekövetkező „shut-off”-ban

A transzkripciós faktorok a sejtmagban fejtik ki hatásukat, de az RNSi folyamatok által miRNS-eken és siRNS-eken keresztül sokszor ők maguk is regulálódnak (összefoglalva (Zvereva & Pooggin, 2012, Seo *et al.*, 2013, Paudel & Sanfaçon, 2018).

A transzkripcionális RNSi (transcriptional gene silencing - TGS) során a 24nt hosszú sRNS-ek az ARGONAUTE 4 fehérjébe (AGO4) épülnek be és így vesznek részt a metilációs és hisztonmódosítás alapú szabályozásban. Azt már régebben leírták, hogy patogén fertőzéskor a TGS is megváltozik (Downen *et al.*, 2012). Mi is azt találtuk, hogy az AGO4 expressziója megváltozott, akut fertőzésnél csökkent, csakúgy, mint több metiltranszferázé (43. ábra).



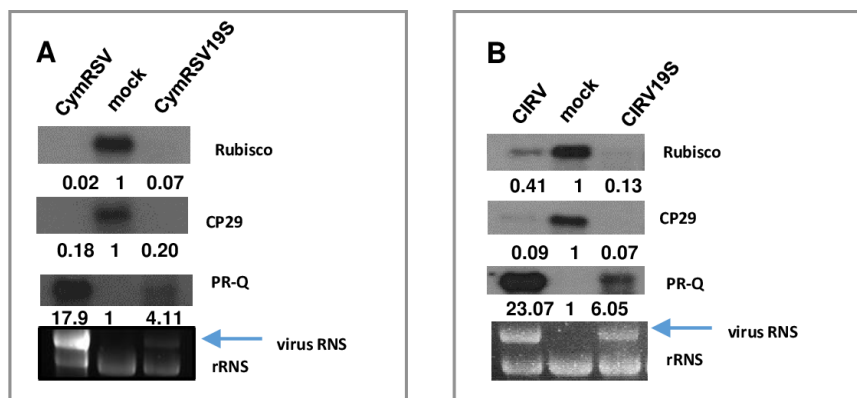
43. ábra A sejmagban működő szabályozó enzimek A/ AGO4 és B/ metiltranszferázok expressziójának vizsgálata vírusfertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényekben. A táblázatok az adott génre specifikus DEP és DEG-ek vírusfertőzés során megváltozott expresszióját mutatják. A Northern blot az adott endogén génre specifikus radioaktív próbával végzett Northern hibridizációt mutatja. A jelek alatt a változások mértékét a mock fertőzött növényben detektált expresszióhoz viszonyítva adtam meg (mintafelviteli kontrollként az EtBr festett gél rRNS-eket tartalmazó régióit adtam meg). Az oszlopdiagrammok a microarray analízis (*N. benthamiana*) vagy az RNS-seq (*S. lycopersicum*) során a metiltranszferázokat reprezentáló DEP-ek, vagy DEG-ek-re kapott expressziót log2-szeres változását mutatják.

6.2.8 Az akut fertőzést jellemző háztartási gén expresszió gátlás nem a nekrosis következménye

Ahogy azt bemutattuk, akut fertőzés során a gazdanövény génexpressziós rendszere igen nagy változást mutat. Nem volt azonban világos, hogy vajon ezek a változások a későbbi nekrosis okai vagy következményei.

A tombusvirusok, mint a CymRSV és a CIRV, a *N. benthamianát* szisztemikusan fertőzik, és ez a fertőzés végül a gazdanövény pusztulását idézi elő. Ezek a vírusok egy igen hatékony VSR-t kódolnak, a p19-et. A p19 az antivirális RNSi során keletkező siRNS-eket duplex formában köti (Vargason *et al.*, 2003), így meggátolja azok beépülését az RNSi végrehajtó komplexébe, gátolva az RNS alapú védekező folyamatokat. VSR hiányos rekombináns vírusokkal (CymRSV19S és CIRV19S) fertőzve a növényeket az antivirális védekezés jól működik, és a növények kigyógyulnak a fertőzésből (Várallyay *et al.*, 2014). A kigyógyulás folyamatának végén egy majdnem egészséges fenotípus jelenik meg, és a hatékony fertőzésnek köszönhetően a vírus csak kis mennyiségben van jelen. Az RNSi hatékonysága alacsony hőmérsékleten csökken (Szittya *et al.*, 2003), így alacsony hőmérsékleten a VSR mutáns vírusok is nagyobb mennyiségben tudnak felhalmozódni. Azt is kimutatták, hogy a CymRSV19Stop és a CIRV19Stop vírusok még alacsony hőmérsékleten sem okoznak nekrozist (Havelda *et al.*, 2005). Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy a gazdagének

expressziójának gátlása vajon a korai nekrosis következménye-e, alacsony hőmérsékleten (15°C-on) CymRSV19Stop és CIRV19Stopfertőzött növények génexpresszióját vizsgáltuk. Ehhez frissen fejlődő (12dpi) szisztemikus levelek kivonataiban vizsgáltuk két háztartási gén (Rubisco és CP29) és egy stresszgén (PR-Q) expresszióját Northern blottal (44. ábra).



44. ábra Vad típusú és p19 deficiens mutáns A/ CymRSV, B/ CIRV, vírussal fertőzött *N. benthamiana* növényekben bekövetkező génexpressziós változások vizsgálata Northern blottal. A jelek alatt a változások mértékét a mock fertőzött növényben detektált expresszióhoz viszonyítva adtam meg (mintafelviteli kontrollként az EtBr festett gél rRNS-eket tartalmazó régióit adtam meg).

A Rubisco és a CP29 szintje, csakúgy, mint a CymRSV19S fertőzéskor a Gapdh és tubulin expressziója, csökkent mindkét VSR deficiens vírus fertőzése esetén (Havelda *et al.*, 2008), míg a PR-Q szintje emelkedett, függetlenül a VSR jelenlététől. Ezen eredményeink azt mutatják, hogy a háztartási gének „shut-off”-ja nem a nekrosis következménye és független a VSR jelenlététől is.

6.2.9 A különböző fertőzési stratégiájú vírusszertőzések során bekövetkező génexpressziós és fiziológiai változások vizsgálatának összefoglalása

Munkánk során két gazdanövényben, eltérő stratégiájú vírusszertőzések során, vizsgáltuk genom-szinten a génexpressziós és fiziológiai változásokat. Az akut lefolyású vírusszertőzések különböző vírusok (Tombus, Tobamo és Potex) esetén, mindkét gazdanövényben hasonló változásokat eredményeztek, ami arra utal, hogy egy általános szabályozási folyamat áll a változások hátterében. A fertőzés során a vírusok a gazda eszköztárákat használják replikációjukhoz. E folyamatok során a gazda membránrendszerét, RNS-transzport folyamatait, transzkripciós és translációs eszköztárat is lefoglalják. Logikus következtetés lenne, hogy a gazda enzimatikus folyamatainak hiánya közvetlenül vagy közvetve felel az intenzív lefolyású fertőzés során bekövetkező génexpressziós és fiziológiai változásokért. A latens módon, folyamatosan jelenlevő vírusok igen nagy mértékben halmozódnak fel, így a gazda transzkripciós és translációs rendszerének kihasználása mégsem lehet az akut fertőzés során bekövetkező nagymértékű génexpressziós változások elsődleges oka. Azt is bizonyítottuk, hogy a háztartási gének „shut-off”-ja nem a nekrosis következménye és független a jelenlevő VSR-től is. Korábban azt feltételezték, hogy a vírusszertőzés során megjelenő tünetek kialakításában a VSR-eknek jelentős szerepe van, mert interferálnak a gazda RNS alapú szabályozó mechanizmusaival (Mallory *et al.*, 2002, Dunoyer *et al.*, 2004). Ezt a lehetőséget később a p19 esetében kizárták (Kontra *et al.*, 2016), mert annak ellenére, hogy a p19 igen

hatékonyan köti a siRNS-eket, vírusfertőzés során nem volt képes az endogén sRNS-ek kötésére. Így azt gondoljuk, hogy a jelentős transzkriptom és fiziológiai változások ugyan befolyásolják a miRNS regulált fejlődési folyamatok szabályozását, a megfigyelt anyagcsereváltozások elsősorban mégsem ezen változások miatt következnek be. Mivel akut fertőzés során a TGS kulcsregulátora, az AGO4 expressziója is megváltozott, lehetséges, hogy a nagymértékű génexpressziós változások kialakításában a TGS-alapú szabályozásnak kulcsszerepe van. Ennek eldöntéséhez azonban a TGS mediátorainak, a 24nt hosszú endogén sRNS-eknek és ezek metilációs folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára van szükség. Ezt a komplex mintázatot pedig tovább bonyolíthatja az AGO1-nek (amire specifikus próba nem volt a microarray chipen, és génexpressziós változását nem detektáltuk) transzlációs regulációja.

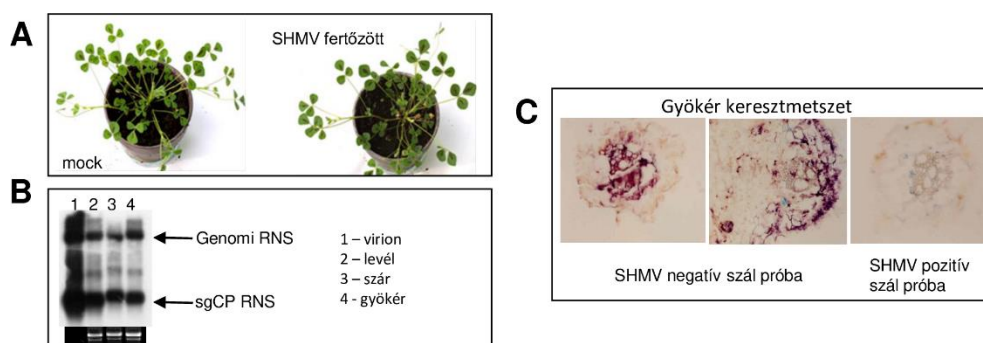
6.3 VIGS vektor fejlesztése, használata a genomikai, növénykórtani kutatásokban

6.3.1 VIGS vektor fejlesztése egy pillangósvirágúakat fertőző tobamovírusból

A *Medicago truncatula* a pillangósvirágúak modell növénye (Cook, 1999). Kis diploid genomja, önterményülése és gyors életciklusa miatt erre kiválóan alkalmas. Genomja az első szekvenált genomok között szerepelt. Noha széles körben felhasználják a genetikai kutatásokban, főként a szimbiotikus nitrogénkötést célzó kísérletekben, mint vírusgazdát nem említik a szakirodalomban. A VIGS első felhasználása óta számos növényből, köztük pillangósokat fertőző vírusokból is készült VIGS vektor: a pea early brown virus (PEBV) a *Pisum sativum* (Constantin *et al.*, 2004); a bean pod mottle virus (BPMV) pedig a *Glycine max* (Zhang & Ghabrial, 2006) gazdanövény funkcionális vizsgálatára lett kifejlesztve. Noha igen hasznos lett volna olyan VIGS vektor fejlesztése, ami a pillangós modellt, a *M. truncatulát* fertőzi, ilyet a közleményünk megjelenéséig nem írtak le. Gronlund és munkatársai (Gronlund *et al.*, 2008) megpróbálták a PEBV vektort a *M. truncatulán* használni. 21 ökotípust fertőztek, és azt találták, hogy csak négyet tudtak szisztémásan fertőzni, de a szekvenált genomú Jemalong A17-et nem. Mi az SHMV-t, egy tobamovírust felhasználva készítettünk egy, a *Medicago truncatulát* fertőző VIGS vektort.

6.3.1.1 Az SHMV szisztémikusan fertőzi a *M. truncatulát*, de nem okoz rajta tüneteket

SHMV izolátummal (Salamon Pál gyűjteményéből) *M. truncatulát* (Jemalong A17) fertőztünk. 6 nappal a fertőzés után a szisztémikus levelekben ki tudtuk mutatni a vírus jelenlétét. Annak ellenére, hogy a vírus nagy mennyiségben akkumulálódott a levelekben, gyökérben és szárban még 40 nap után sem tudtunk tüneteket megfigyelni (45. ábra/A és B). A fertőzött növények nemcsak tovább nőttek, virágoztak, hanem a mock fertőzött növényekhez hasonlóan *Shinorhizobium meliloti*-val inokulálva gümőztek is. A vírust még a gümőkben is ki tudtuk mutatni *in situ* hibridizációval, vírus-specifikus DIG jelölt próbát használva (45. ábra/C).



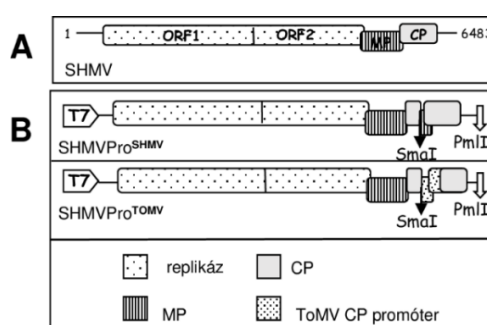
45. ábra Az SHMV fertőzött *M. truncatula* vizsgálata. A/ SHMV fertőzött és mock inokulált *M. truncatula*, B/ Az SHMV detektálása Northern blottal és C/ *in situ* hibridizációval a fertőzött növény különböző szerveiben, az. SHMV pozitív szál negatív kontrollként szolgált.

6.3.1.2 Fertőzőképes SHMV klón készítése

Az SHMV szekvenciáját hagyományos Sanger szekvenálással határozták meg (Silver *et al.*, 1996). Ezt a szekvenciát alapul véve primereket terveztünk, és a birtokunkban levő SHMV izolátumról cDNS szintézist követően 3 darabban amplifikáltuk a vírust. A három vírusdarabot restriktációs endonukleázokkal történő hasításokat felhasználva ligáltuk és építettük pUC18 vektorba úgy, hogy az 5' végéhez egy T7 RNS polimeráz promóter szekvenciát, a 3' végéhez pedig egy linearizálásra alkalmas PmlI restriktációs hasítóhelyet építettünk. A rekombináns plazmidot PmlI endonukleázzal linearizáltuk, és ezt a tisztított linearizált plazmidot használtuk templátként CAP analóggal történő *in vitro* transzkripcióhoz. Fertőzést követően a vírust *N. benthamiana* és *M. truncatula* szisztémikus leveleiben is ki tudtuk mutatni már a fertőzést követő 7. napon.

6.3.1.3 SHMV alapú VIGS vektor készítése

Az SHMV-vel rokon vírus, a TMV, már régóta alapul szolgált VIGS vektorok építésére. Ezeknél a próbálkozásoknál elég sok buktató merült fel, így az SHMV vektorok építésénél mi már építeni tudtunk a TMV vektorok építésénél nyert és publikált tapasztalatokra. Ezeket figyelembe véve két vektort építettünk: az SHMVProSHMV vektorban egyszerűen megdupláztuk a CP szubgenomikus RNS promóterét és a vektorba az első promóter után közvetlenül egy SmaI klónozó helyet építettünk (46. ábra) Az SHMVProTOMV vektorban a második CP szubgenomikus RNS promótert egy heterológ, egy másik tobamovírusból, a paradicsom mozaik vírusból (tomato mosaic virus – ToMV) származó CP szubgenomikus RNS promóterre cseréltük ki (46. ábra).

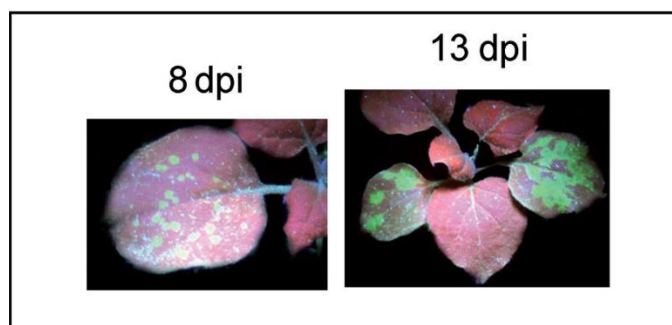


46. ábra Az A/ SHMV és a B/ belőle épített VIGS vektorok genomszerveződésének sematikus képe.

Ennek az volt a célja, hogy csökkentsük a vírus replikációja során a duplikált promóter rekombinációval való elvesztésének lehetőségét (Shivprasad *et al.*, 1999). Először az így elkészített „üres” vektorokról készítettünk *in vitro* transzkripcióval CAP-es transzkriptumot, amivel *N. benthamiana* és *M. truncatula* növényeket fertőztünk, hogy teszteljük a vektorok biológiai aktivitását. Az SHMVProSHMV a vad típusú vírushoz hasonlóan viselkedett, míg az SHMVProTOMV lassabban terjedt el a tesztnövényekben.

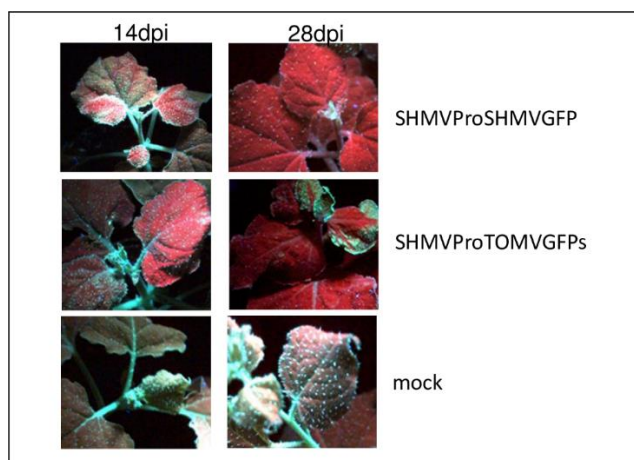
6.3.1.4 Az SHMV VIGS vektor képes idegen gént csendesíteni *N. benthamiana* gazdanövényben

Ahhoz, hogy könnyen detektálni tudjuk a vektorunk alkalmasságát mind idegen gének expressziójára, mind csendesítésére, a két vektor klónozó helyére GFP riportergént építettünk. Az SHMVProSHMVGFPs, SHMVProTOMVGFPs vektorok a riportergént sense orientációban tartalmazták, így róluk funkcionális GFP transzkriptum keletkezett, arról pedig aktív GFP fehérje transzlálódhatott. Vad *N. benthamiana*-t fertőzve az SHMVProTOMVGFPs esetén tudtunk, míg az SHMVProSHMVGFPs esetén nem tudtunk GFP-t detektálni (47. ábra).



47. ábra Az SHMVProTOMVGFP-vel fertőzött *N. benthamiana* képe UV fényben.

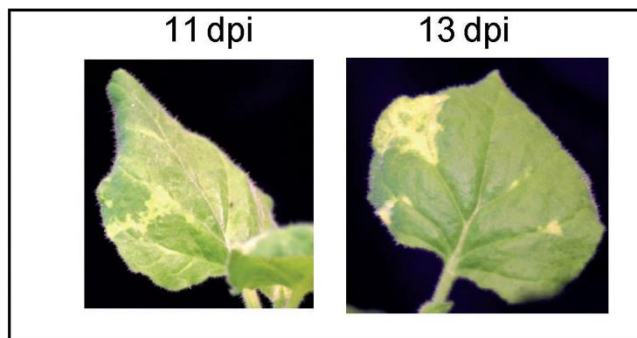
Ugyanezekkel a vektorokkal GFP transzgenikus *N. benthamiana* növényeket fertőzve 14 nappal a fertőzés után hatékony RNSi-t figyeltünk meg (48. ábra) szisztémikusan is, és ez a hatás akár 1 hónapig megmaradt. A frissen fejlődő levelek mindig a csendesített fenotípust (UV fényben piros levél) mutatták.



48. ábra SHMVProSHMVGFP, SHMVProTOMVGFP és mock inoklukált GFP transzgenikus *N. benthamiana* növények képe UV fényben.

6.3.1.5 SHMV VIGS vektorok képesek endogén géneket csendesíteni *N. benthamiana* és *M. truncatula* növényben is

Ahhoz, hogy a transzgénekén kívül endogén gének csendesítését is tesztelni tudjuk, a *N. benthamiana* endogén génjének a PDS 80bp-os darabját építettük a vektorokba: SHMVProSHMVPDSas, SHMVProTOMVPDSas. A fitoen deszaturáz hiányára jellemző kifehéredő fenotípust a fejlődő levelek 11-13 nappal a fertőzés után mutatták, de a kifehéredés csak a levelek egy-egy szegmensén jelent meg, soha nem terjedt ki az egész levélre (49. ábra)

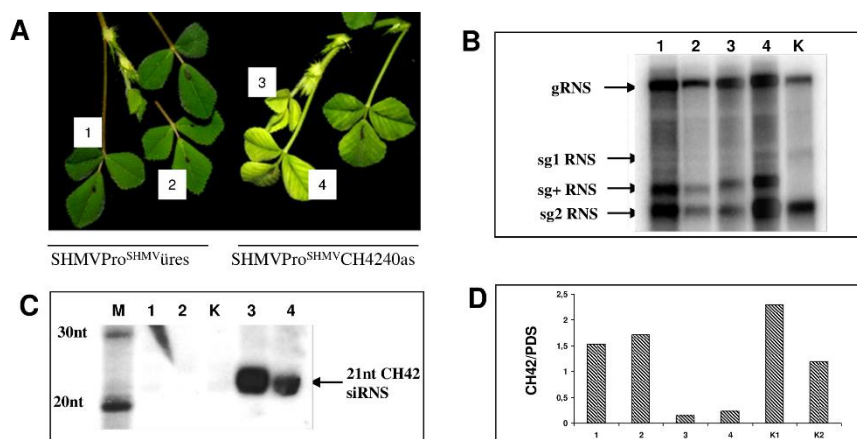


49. ábra SHMVSHMVProSHMVPDSas vektorral fertőzött *N. benthamiana* szisztémikus leveleinek képe a fertőzést követően.

A *M. truncatula*-n történő VIGS tesztekhez a növény chalcone szintáz (CH42) génjének 200 és 100bp-os darajait klónoztuk a vektorokba (Turnage *et al.*, 2002). Először *N. benthamiana* növényeken teszteltük, hogy vajon a klónozott gén darabjait tartalmazó vírusvektorok képesek-e replikálódni és szisztemizálódni. A CH42 darabokat hordozó SHMVProSHMV és az SHMVProTOMV vektor is jól replikálódott, függetlenül a klónozott DNS méretétől, noha az SHMVProTOMV fertőzési sebessége jelentősen csökkent (a szisztémikus levelekben a másik vektorhoz képest 10 nappal később jelent meg). Ezen eredményeink azt mutatták, hogy a rekombináns vektoraink biológiailag is aktívak. Ezek után a vektorokkal *M. truncatula* növényeket fertőztünk, de sajnos ebben a gazdában az endogén CH42 darabokat hordozó vektorok nem tudtak terjedni. Mivel az üres vektorok ebben a gazdában is jól replikálódtak, azt gondoltuk, hogy esetleg a klónozott gén nagyságának lehet meghatározó szerepe abban, hogy a vektor megtartja-e biológiai aktivitását. Mivel az SHMV esetében a vad vírusban a replikáz, a mozgási és a köpenyfehérje átfedéssel kódolódnak ez a lehetőség valószínűnek tűnt. Ahhoz, hogy ezt a hipotézist teszteljük, a hatékonyabb vektorba, az SHMVProSHMV-be, a CH42 csupán 40bp hosszúságú darabját építettük. Elvileg már egy 21nt hosszú, az endogén génnel megegyező szekvenciájú DNS-t illetve a vektor klónozó helyére is indukálódhat az RNSi. A fertőzést követően a kontroll SHMVProSHMV és a SHMVProSHMVCH4240as fertőzött növények szisztémikus leveleiből tisztított RNS-eket vizsgáltuk a vírus és a CH42 darab meglétére Northern hibridizációval (50. ábra/B).

Mindkét vektor jól replikálódott és szisztemizálódott, de csak az SHMVProSHMVCH4240as-val fertőzött növények 10%-a mutatott a gén hiányára jellemző sárguló fenotípust (50. ábra/A). Ezekben a levelekben viszont sRNS Northern blottal (antisense CH42 specifikus RNS próbát használva) ki tudtuk mutatni CH42 specifikus sRNS-eket, ami azt mutatta, hogy az RNSi az endogén génnel szemben indukálódott (50. ábra/C). Az eredményt

tovább erősíti az a tény, hogy a CH42 mRNS szintjének drasztikus csökkenését szemikvantitatív PCR reakcióban is ki tudtuk mutatni (50. ábra/D).



50. ábra Üres és CH42-t tartalmazó VIGS vektorokkal fertőzött *M. truncatula* vizsgálata. A/ a fertőzésre jellemző tünetek, B/ a vírus akkumulációja az A ábrán jelölt növényi részek RNS-eiből készített kivonatokban, C/ a CH42 specifikus sRNS-ek jelenlétének vizsgálata ugyanezen RNS-ekben Northern blottal D/ és a CH42 specifikus mRNS expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel.

6.3.1.6 Az SHMV VIGS vektor felhasználásának korlátai

Annak ellenére, hogy az SHMV igen bonyolult szerkezetű vírus, kódoló szakaszai egymással átfednek, sikerült belőle egy fertőzőképes, klónozó hellyel rendelkező VIGS vektort készítenünk. A heterológ promotert tartalmazó SHMVProTOMV replikálódott, de a vad típusú vírussal összehasonlítva lassabban. Elképzelhető, hogy a köpenyfehérje ilyen módon való megváltoztatása okozta a vírus mozgásának lassulását. A két vektor különböző hatékonysággal expresszálta a GFP-t, az SHMVProTOMV jól, míg az SHMVProSHMV rosszul. Ennek oka lehet, hogy a két vektor különbözőképpen tolerálta azt, hogy mekkora darabot építhetünk a klónozó helyére. Az SHMVProSHMV ebből a szempontból sokkal érzékenyebb volt. Transzgenikus *N. benthamiana* növényekben mindkét vektor hatékonyan csendesítette a GFP transzgént. A CH42 100 és 200nt hosszú darabjait a VIGS vektorok klónozó helyébe építve a vektorok nem tudtak szisztemizálódni. Ezen eredményeink azt sugallják, hogy a vírus mozgása a *M. truncatula*-ban sokkal érzékenyebb a beépített addicionális szekvenciákra, mint a *N. benthamiana*-ban.

6.3.2 Lisztharmat-rezisztencia kialakítása búzán

A búzalisztharmat a világ búzatermesztő övezeteiben évről évre megjelenő, akár 40%-os termés kiesést is okozó betegség. Okozója egy obligát parazita gomba (*Blumeira graminis* f. sp. *tritici*). A köztermesztésben álló búzafajták többsége lisztharmat-fogékony. A fellelhető néhány rezisztens fajta ellenállóságának genetikai háttere nem ismert. A lisztharmat genetikailag változatos kórokozó, a nagygénes rezisztenciával rendelkező, adott rasszra ellenálló fajták rezisztenciáját gyorsan képes áttörni.

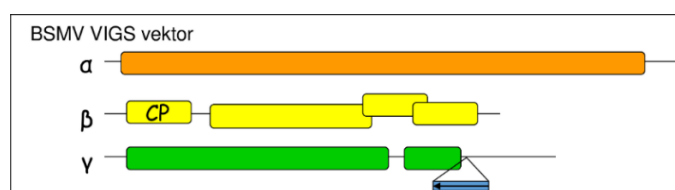
Az árpában ismertek széleskörű lisztharmat-ellenálló fajták, melyekben az ellenállóság egy gén mutációja miatt következik be (Buschges *et al.*, 1997). Amennyiben az árpában az *Mlo* gén mutáns (= *mlo* árpa), nem termelődik MLO fehérje és az árpa lisztharmat-ellenálló lesz. Az Európában köztermesztésben álló árpafajták több mint fele tartalmazza ezt a mutációt. A búza

esetén ilyen széles spektrumú rezisztencia nem ismert, az árpa *Mlo* ortológjait azonban megtalálták a búzában. Az MLO egy transzmembrán fehérje, nem fertőzött szövetekben represszálja a növény védekező reakcióit (Panstruga, 2005), szerepet játszik a sejt pusztulásban, a biotikus és az abiotikus stresszek elleni védekezésben (Piffanelli *et al.*, 2002). Ha nincs jelen funkcióképes MLO, a növény védekező reakciói hamarabb beindulnak, és a lisztharmat spórák epidermális sejtekbe jutása gátlódik, nemcsak egyszikűekben, hanem kétszikűekben is (Bai *et al.*, 2008, Consonni *et al.*, 2006). A hexaploid búzában hét *Mlo* cDNS-t írtak le (Konishi *et al.*, 2010). Három (TaMlo-1A, 1B és 1D) a három ősi genomon helyezkedik el és igen nagy homológiát mutat az árpa *Mlo*-val (Devoto *et al.*, 2003, Elliott *et al.*, 2002). Az MLO mutáns árpát – egy modellkísérletben egy sejt szinten – a búza TaMlo1B-val transzformálva a mutáns gén funkciója komplementálható volt, az árpa újból lisztharmat-fogékony lett (Schweizer *et al.*, 2000). Ezzel bizonyították, hogy a búzában talált *Mlo* az árpa *Mlo* funkcionális ortológja.

Munkánk során célunk az volt, hogy a búza MLO-t RNSi-vel inaktíváljuk és vizsgáljuk azt, hogy e gén hiányában kialakul-e a széles spektrumú lisztharmat-rezisztencia. Mivel a búza nehezen transzformálható, első lépésben mi VIGS-szel akartuk ellenőrizni, hogy munkahipotézisünk igaz-e: az *Mlo* gén csendesítésével kialakítható-e lisztharmat-rezisztencia búzában?

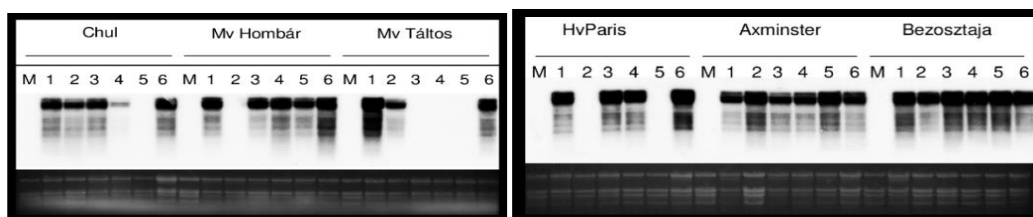
6.3.2.1 A BSMV VIGS rendszer adaptálása magyar búzafajtákra

A BSMV VIGS vector rendszert Holzberg és munkatársai fejlesztették ki (Holzberg *et al.*, 2002) (51. ábra).



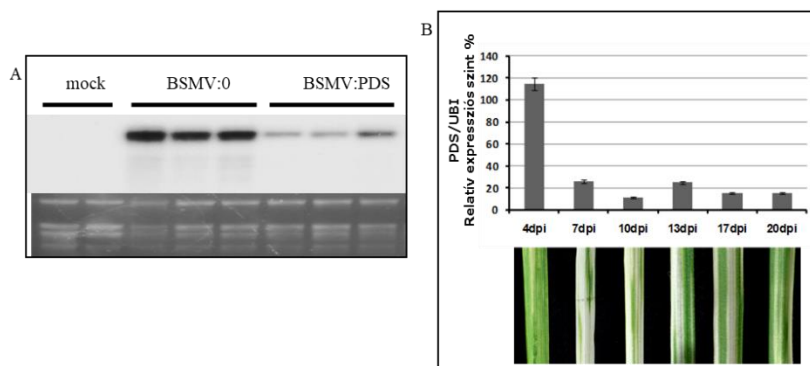
51. ábra A BSMV alapú VIGS vektor sematikus ábrázolása

Lacomme és munkatársai e rendszert használva tanulmányozták a lisztharmat rezisztenciát árpa növényeken (Hein *et al.*, 2005). Mivel a magyar búzafajták vírus érzékenysége eltér, először öt fajtát (Bezostaja, Chul, Mv Hombár, Mv Táltos és Axminster) fertőztünk a klónozó helyén üres BSMV-vel. A BSMV háromszaltatú RNS genomjának mindegyikéről *in vitro* transzkriptumot készítettünk és ezek keverékét inokuláló pufferrel elkeverve 10 napos növények második levelét fertőztük. 15 nappal a fertőzés után RNS-t tisztítottunk a növények szisztémikus leveléből és Northern blottal vizsgáltuk a vírus jelenlétét (52. ábra).



52. ábra Különböző búzafajták BSMV fogékonyságának vizsgálata Northern blot hibridizációval, vírus specifikus próbát használva.

A BSMV fertőzésre legjobban fogékony fajtát, a Bezosztaját ezután olyan VIGS vektorral fertőztük, mely a klónozó helyén PDS-t tartalmazott, hogy vizualizáljuk, illetve a riporter génen teszteljük az RNSi hatékonyságát. A BSMV γ klónozó helyén levő PDS-t tartalmazó vírus rosszabbul replikálódott, kisebb mértékben halmozódott fel a növényben (53. ábra/A).

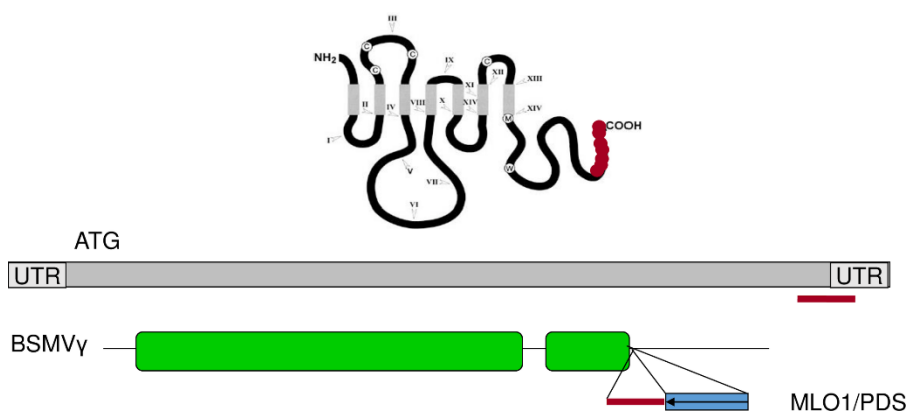


53. ábra A BSMV VIGS jelenlétének vizsgálata vírusfertőzött növényekben. A/ BSMV jelenlétének vizsgálata vírus specifikus Northern blottal, B/ a PDS expressziójának vizsgálata qRT-PCR-rel.

Mivel a növényen a PDS hiányára jellemző fenotípus megjelent és a PDS mRNS szintje drasztikusan csökkent, megbizonyosodtunk arról, hogy ez a csökkent jelenlét is elegendő volt a PDS hatékony csendesítéséhez (53. ábra/B).

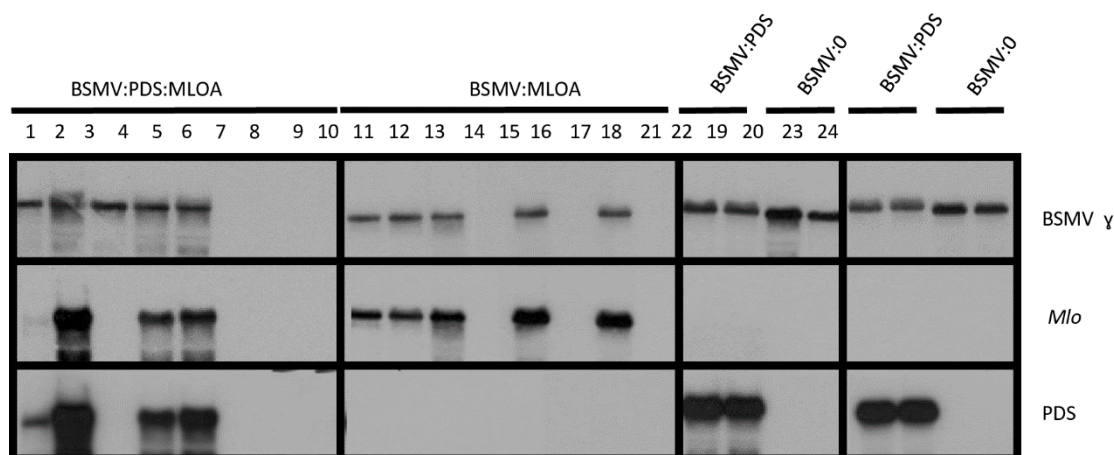
6.3.2.2 Búza fertőzése Mlo darabot tartalmazó BSMV vektorral

A különböző rokonsági csoportokba (clusterekbe) tartozó *Mlo* gének között igen kevés az azonosság. Mi a búza *Mlo* olyan régióját klónoztuk a VIGS vektorunkba, ami az árpa homológgal igen nagyfokú homológiát mutatott, de nagyon különbözött a búzában, nem e rokonsági körbe tartozó *Mlo*-tól. Holzberg és munkatársai nem találtak összefüggést a klónozott endogén gén mérete (1215-185bp között vizsgálták) és az RNSi hatékonysága között. Scofield és kollégái viszont azt találták, hogy a 120bp-nál kisebb méretű géndarab már nem eredményezett hatékony RNSi-t. Mivel a mi előkísérleteink szerint a beépített gén jelenléte miatt a vírus fertőzési hatékonysága csökkent, mi olyan 120bp-os búza *Mlo* darabot klónoztunk a VIGS vektorba, ami az *Mlo* 3' végét, a 3' nem traszlálódó (untranslated – UTR) egy részét is tartalmazta. Két különböző BSMV γ -t állítottunk elő (54. ábra).



54. ábra Az MLO és az RNSi során használt BSM VIGS vektor sematikus képe.

Az egyikben az MLO-t PDS-t tartalmazó, míg a másikban PDS-t nem tartalmazó vektorban használtuk. Beosztja búzákat fertőzve, 15 nappal a fertőzés után RNS kivonatok készítve vizsgáltuk a vírus, a PDS és az MLO jelenlétét Northern hibridizációval (55. ábra).



55. ábra A BSMV VIGS kísérletek hatékonyságának vizsgálata Northern hibridizációval, különböző radioaktív próbákat használva.

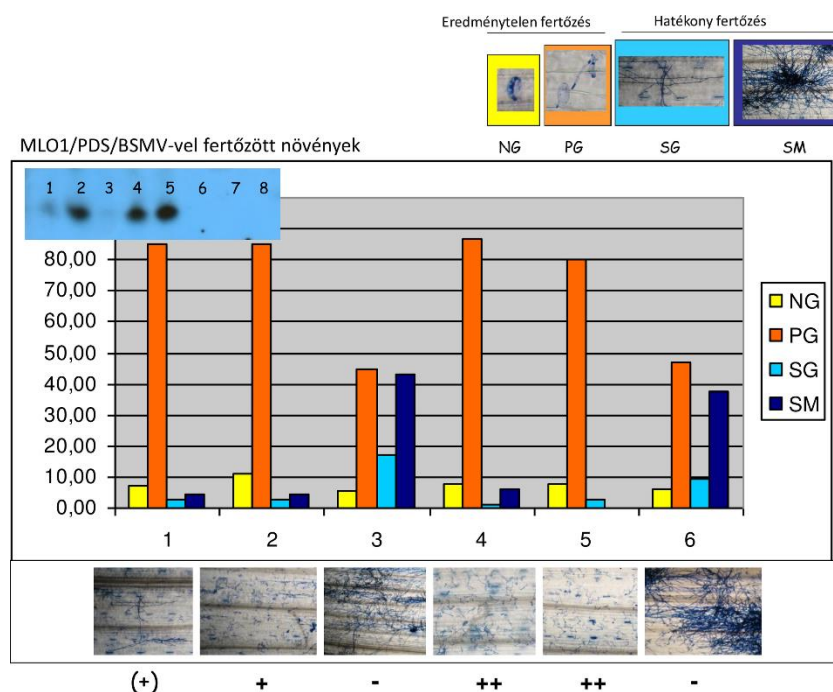
Az üres és a csak PDS-t tartalmazó BSMV vektorok 100%-os hatékonysággal fertőzték a búzát, míg a BSMV: MLOA esetén ez 75% (8 növényből 6), a BSMV: PDS: MLOA esetében ez csak 62,5% (8 növényből 5 fertőződött). Míg a BSMV:MLOA esetén a vektorok megőrizték az *Mlo* darabot, a BSMV: PDS: MLOA fertőzéskor 2 esetben az *Mlo* kirekombinálódott a vektorból. Ezek a megfigyeléseink összecsengenek azzal, hogy a klónozott génszakasz méretének növekedése a vírus replikációjának lassulását, és a klónozott darab elveszését okozhatja. Az RNSi hatékonyságának ellenőrzésére Northern hibridizációval vizsgáltuk a növényekben jelenlevő MLO specifikus RNS-ek jelenlétét, mennyiségét. Azt találtuk, hogy azokban a növényekben, melyekben a vírus megtartotta az *Mlo* darabot, minden esetben keletkezett *Mlo* specifikus sRNS (55. ábra)

6.3.2.3 Az *Mlo* sRNS-t tartalmazó búzák lisztharmatfertőzés ellenállóak lettek

Ahhoz, hogy a lisztharmatfertőzés lefolyását könnyen vizsgálhassuk búza növényen, egy egyszerű fertőzési és festési eljárást dolgoztunk ki: Várallyay Éva*, Vida Gyula, Giczey Gábor, Veisz Ottó, Burgyán József és Havelda Zoltán (2010): Egyszerű festési eljárás egyszikűek lisztharmatfertőzésének megállapítására és alkalmazása búzafajták jellemzésére *Növényvédelem* 46 (5), 233-239. Kevert törzseket tartottunk fenn lisztharmat fogékony búzán, és ezeket felhasználva befűjásos módszerrel búzaleveleket fertőztünk. A levelek klorofill tartalmát ecetsavas etanollal kioldva a sósavval fixált leveleket Trypán kézzel festettük, majd mikroszkóp alatt vizsgáltuk a spórák különböző fejlődési állapotainak megjelenését. Az ellenálló növényekben a spórák csak a kezdeti csírázásig jutnak el, tovább nem fejlődnek. A spórákat fejlettségi szintjük alapján négy csoportba soroltuk és ezen csoportok megoszlását vizsgáltuk. Az eredmények százalékos megoszlását oszlopdiagramon ábrázoltuk (56. ábra felső panel).

A VIGS vektorral fertőzött növények leveleit lisztharmattal megfertőzve azt tapasztaltuk, hogy azokon a leveleken, melyekben megjelent az *Mlo* specifikus sRNS, a lisztharmat spórák megrekedtek az elsődleges csírázás stádiumában, sem másodlagos micéliumot, sem

spóratartókat nem fejlesztettek (56. ábra). A kontrol – Mlo RNS-t nem tartalmazó – vírusokkal fertőzött búzalevelek lisztharmatfertőzésével összehasonlítva megállapítottuk, hogy az Mlo géncsökkentett búzák ellenállóbbak lettek a lisztharmatfertőzéssel szemben.



56. ábra Az Mlo tartalmú VIGS vektorral fertőzött búzanövények RNS kivonatainak sRNS Northern blot hibridizációs képe és lisztharmat fertőzési tesztje.

Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy az *MLO* 3' végét célzó RNSis búzásban hatékonyan működött, és a növények rezisztenciáját eredményezte.

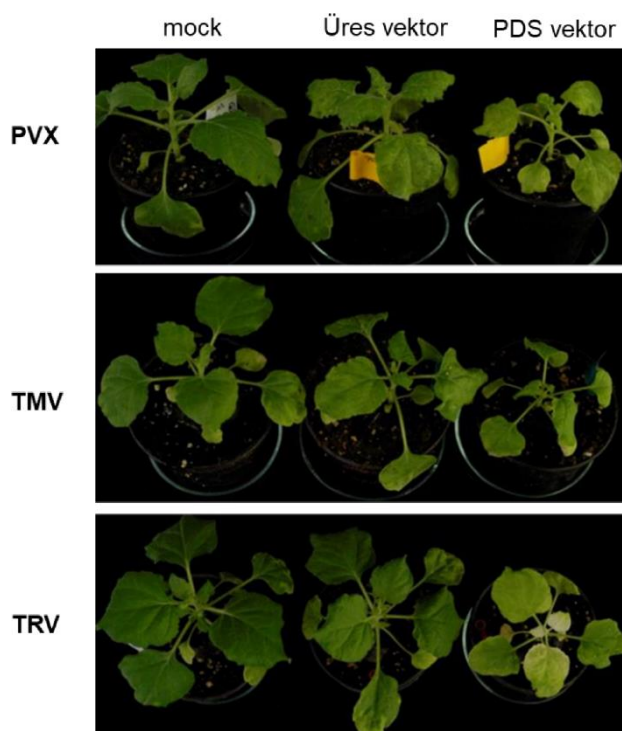
6.3.3 VIGS vektorok használatakor nem célzott változások is történhetnek a gazdanövény génexpressziójában

A VIGS, mint genetikai eszköz, széles körben elterjedt. Használatával számos gén funkcióját derítették fel, elsősorban *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényeken (Lange *et al.*, 2013, Ramegowda *et al.*, 2014). Amint azt már az előzőekben bemutattam, a VIGS hatékonyságának tesztelésére a gazda endogén PDS-ének egy darabját építik a vektorba és a VIGS sikerességére abból következtetnek, hogy az újonnan fejlődő levelek kifehérednek. Mint azt előző munkáinkban megállapítottuk a VIGS vektorok, mint vírusok, a beépített gazdagén darabok miatt sokszor sérülnek, mozgásuk és szisztemizálódásuk lassul. Ezek a problémák sokszor a beépített géndarab nagyságával állnak arányban. Míg egy viszonylag kis géndarab beépítését a rekombináns vírus elviseli, addig egy nagyobb darab a vírus alapfunkcióinak hibáját okozhatja. A vírusvektorral fertőzött növényben kialakuló génexpressziós változásokat bonyolítja, hogy a vírusfertőzés során nemcsak az RNSi folyamatok indukálódnak. A vírus a vírus-gazdanövény kapcsolattól függően kisebb mértékben, de akár alapvetően is megváltoztathatja a gazdanövény génexpresszióját. Bizonyos esetben alapvetően fontos háztartási gének, mint pl. a Rubisco, Gapdh mRNS-ének mennyisége igen nagy-mértékben lecsökken (Aranda & Maule, 1998, Havelda & Maule, 2000)(5.2. fejezet). A „shut-off” jelenségét vírusfertőzött növények szisztemikus leveleiben vizsgálva azt találtuk, hogy *N.*

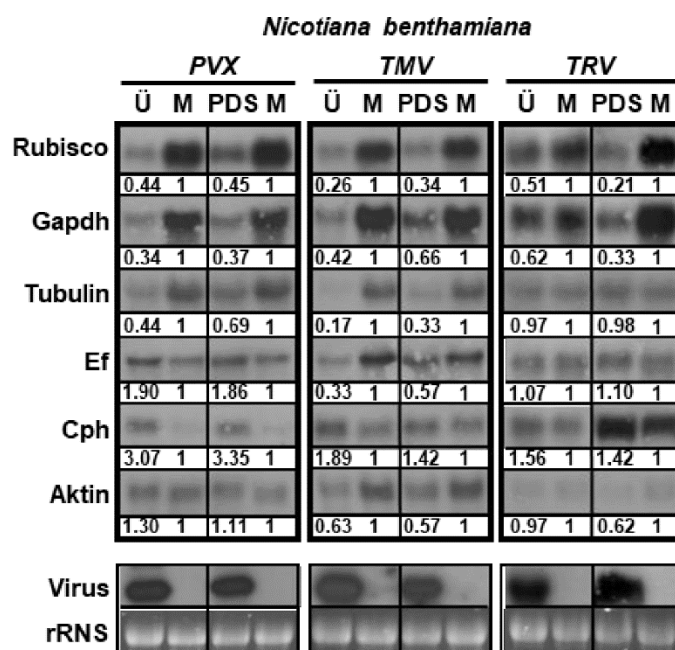
benthamiana leveleiben PVX és TMV fertőzéskor is, míg *S. lycopersicum* leveleiben csak a PVX fertőzésekor alakul ki „shut-off” (Havelda *et al.*, 2008). Mind a PVX-et, mind a TMV-t széles körben használják VIGS kísérletekben vektorként. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk meg, hogy vajon a leggyakrabban használt VIGS vektorok milyen hatással vannak a gazdanövény néhány háztartási génjének expressziójára. Ez azért is különösen fontos kérdés, mert a VIGS használatakor a kiválasztott gének mRNS szintjének változását általában qRT-PCR-rel vizsgálják, és ezekben a tesztekben referencia génként sokszor a Gapdh, tubulin, vagy akár a Rubisco szerepel. A kérdés megválaszolására *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényeken a PVX, TMV és TRV VIGS vektorok, *C. annuum* növényen a TMV és TRV VIGS vektorok és *T. aestivum* növényen a BSMV VIGS vektor hatását vizsgáltuk. A vektorok klónozó helyére PDS darabot építettünk (PDS), vagy üresen hagytuk (Ü). A fertőzés szisztemizálódása után a szisztemikus levelekből RNS-t tisztítottunk és Northern blottal vizsgáltuk néhány háztartási gén: a Rubisco, a Gapdh, a tubulin, egy elongációs faktor, egy ciklofillin és az aktin génexpressziós mintázatát a VIGS vektorral fertőzött (Ü és PDS), valamint mock (M) növényekben.

6.3.3.1 VIGS kísérletek *N. benthamiana* gazdanövényen

Vírusfertőzött *N. benthamiana* növényekben azt tapasztaltuk, hogy PVX és TMV-VIGS vektorral fertőzött növények esetében a Rubisco, Gapdh és a tubulin génexpressziós szintje nagymértékben lecsökkent a mock növényekhez képest (57-58. ábra).



57. ábra PVX, TMV és TRV (Üres, PDS) VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növények képe, a fertőzést követő 7. (PVX és TMV-VIGS vektor) és 10. napon (TRV-VIGS vektor).



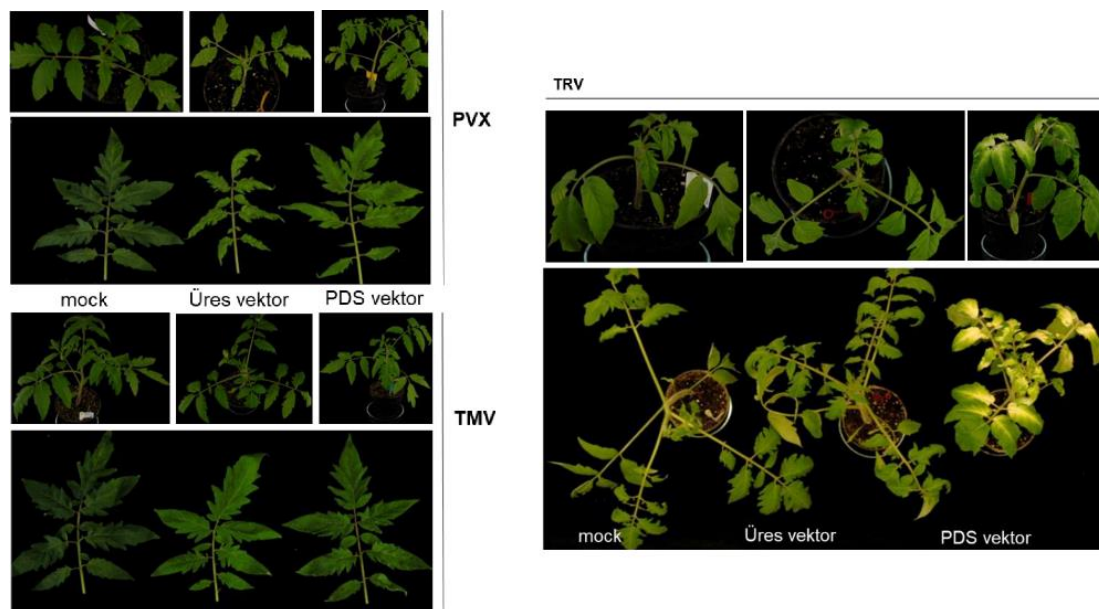
58. ábra Endogén gének (Rubisco, Gapdh, tubulin, Ef, Cph és aktin) expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel. Üres (Ü) és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokkal (TMV, PVX, TRV) szisztémikusan fertőzött *N. benthamiana* levelekben. A növényi mintákat PVX és TMV vektorral való fertőzést követő 7. napon, míg a TRV vektorral való fertőzést követő 10. napon vettük. Minden esetben mock (M) inokulált mintákat használtunk kontrollként. A minták egyenlő nukleinsav koncentrációját az etidium-bromiddal festett agaróz gél mutatja.

Ezzel ellentétben az Ef génexpressziós szintje a PVX-VIGS vektorral fertőzött növényeknél enyhén megemelkedett, míg a TMV-VIGS fertőzött növényeknél enyhén csökkent. PVX, TMV, TRV-VIGS vektorral való fertőzés során a ciklofillin (Cph) génexpressziós szintje megemelkedett a mock növényekhez képest. TMV-VIGS vektorral fertőzött növényeknél, az aktin génexpressziós szintje kis mértékben lecsökkent, míg a PVX-szel fertőzött növények esetében változatlan maradt a mock növényekhez képest. TRV-Üres VIGS vektorral fertőzött növények esetében az általunk vizsgált mRNS szintekben nem tapasztaltunk drasztikus változást, azt sugallva, hogy a TRV ideális VIGS vektor a dohány esetében. Ezzel ellentétben, amikor TRV-PDS VIGS vektorral fertőztük meg a dohány növényeket azt tapasztaltuk, hogy a Rubisco, Gapdh és az aktin mRNS szintje is nagymértékben lecsökkent a mock növényekhez képest. A tubulin és az Ef mRNS szintje nem változott, hasonlóan TRV-Üres fertőzéshez. A Rubisco, Gapdh, Ef, aktin, tubulin gyakran szerepel kontrollként VIGS kísérletekben, annak ellenére, hogy eredményeink azt mutatják, hogy expressziós szintjük sok esetben megváltozik a vírusfertőzés során. Vírusfertőzött *N. benthamiana* növényekben Liu és mtsai. 14 referencia gén expressziós szintjét vizsgálta különböző szoftver csomagokkal (Liu *et al.*, 2012). Eredményeik azt mutatták, hogy a leginstabilabb a Gapdh expressziója volt, ezt követi a tubulin és az aktin. Kísérleteink során mi is azt tapasztaltuk, hogy PVX- és TMV-VIGS vektorral fertőzött *N. benthamiana* növényekben a Gapdh és a tubulin génexpressziós szintje drasztikusan lecsökkent a mock növényekhez képest. PVX-VIGS vektorral fertőzött növényekben az aktin génexpressziós szintje nem változott, de TMV-VIGS vektorral fertőzött növényekben lecsökkent, így PVX-VIGS kísérleteknél a dohány esetében az aktin megfelelő referencia értéként alkalmazható qRT-

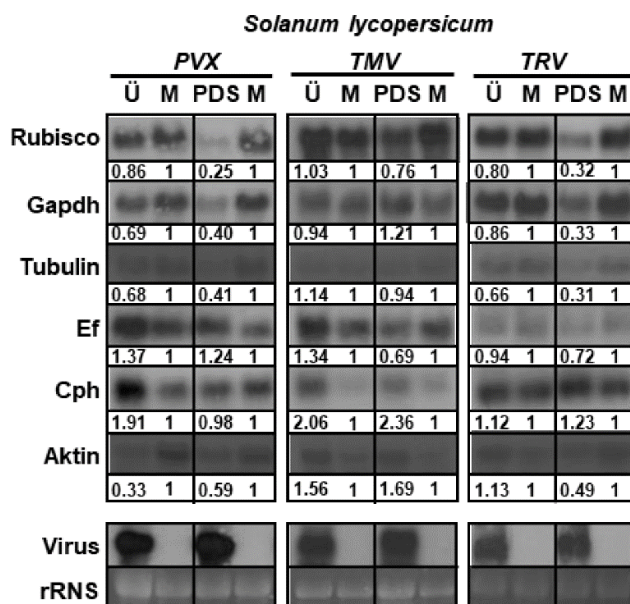
PCR-hez. A referencia helyes megválasztását bonyolítja, hogy a kiválasztott gén expressziója szövet és szerv szinten és a kísérleti körülményektől függően is eltérhet (Guenin *et al.*, 2009). Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a qRT-PCR során használt referencia gén expressziós szintje növény-vírus kapcsolatoktól függően is változhat. Vizsgálataink alapján a dohány esetében az általunk vizsgált VIGS vektorok közül, a TRV-VIGS vektor alkalmazása a legoptimálisabb. Rotenberg és mtsai. azt találták, hogy TRV-VIGS vektorral fertőzött *N. benthamiana* növényben legjobb referencia gén az Ef, melynek expressziós szintje nem változik (Rotenberg *et al.*, 2006). Kísérleteink igazolták, hogy TRV-VIGS vektorral fertőzött *N. benthamiana* növényekben az Ef génexpressziós szintje és a tubulin génexpressziós szintje is változatlan maradt, ezért TRV-VIGS esetében mindkettő alkalmazható referenciaként a qRT-PCR adatok kiértékelésekor. Ezzel ellentétben Liu és mtsai szerint a vírusfertőzött növények génexpressziós vizsgálata során az Ef referencia génként való használata nem optimális választás (Liu *et al.*, 2012). Ezzel összhangban mi is azt tapasztaltuk, hogy PVX-VIGS vektorral fertőzött *N. benthamiana* növényekben az Ef génexpressziós szintje megemelkedik, míg TMV-VIGS vektorral fertőzött növényekben nagymértékben lecsökken a mock növényekhez képest. Eredményeink tehát alátámasztják az előbbi megfigyelést, hogy az Ef gén referencia értéként való megválasztása nem minden esetben megfelelő.

6.3.3.2 *S. lycopersicum* gazdanövényen a TMV optimális VIGS vektorként működik

A vírusvektorok fertőzése során *S. lycopersicum* növényekben a PVX-Üres VIGS vektorral való fertőzés során a Rubisco, Gapdh és a tubulin génexpressziójának csupán enyhe csökkenést tapasztaltunk, míg a PDS gén egy darabját tartalmazó VIGS vektorral való fertőzéskor mindhárom gén mRNS szintje nagymértékben lecsökkent a mock növényekhez képest (59-60. ábra).



59. ábra PVX, TMV és TRV (Üres, PDS) VIGS vektorral fertőzött *Solanum lycopersicum* növények képe a fertőzést követő 14. napon (PVX és TMV-VIGS vektor) és 24. napon (TRV-VIGS vektor).



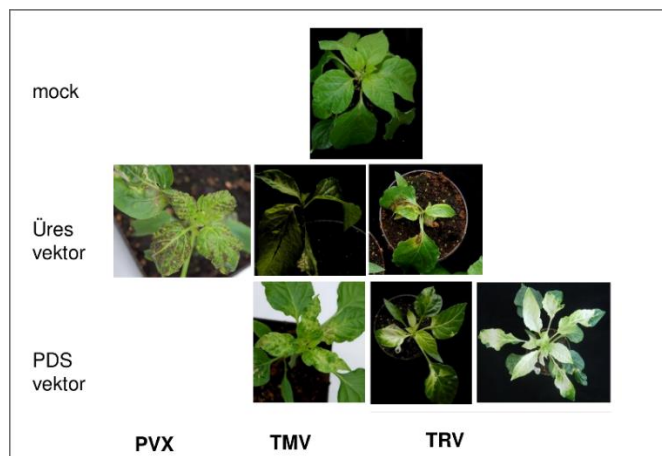
60. ábra Endogén gének (Rubisco, Gapdh, tubulin, Ef, Cph és aktin) expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel Üres (Ü) és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokkal (TMV, PVX, TRV) szisztémikusan fertőzött *Solanum lycopersicum* levelekben. A növényi mintákat PVX és TMV vektorral való fertőzést követő 14. napon, míg a TRV vektorral való fertőzést követő 24. napon vettük. Minden esetben mock (M) inokulált mintákat használtunk kontrollként. A minták egyenlő nukleinsav (rRNS) koncentrációját az etídium-bromiddal festett agaróz gél mutatja.

Sem a TMV-Üres, sem a TRV-Üres VIGS vektorral fertőzött növényeknél nem tapasztaltunk drasztikus változást az általunk vizsgált endogén gének expressziós szintjét tekintve a mock növényekhez viszonyítva. Ezzel szemben PVX-PDS, TRV-PDS vektorral fertőzött növényeknél az általunk vizsgált gének expressziós szintje a Cph kivételével drasztikusan lecsökkent. A dohánynál tapasztaltakhoz hasonlóan a paradicsomnál is megfigyeltük, hogy a VIGS vektorba beépített idegen szekvencia jelenléte befolyásolhatja a „shut-off” kialakulását. VIGS vektor használatakor a paradicsomnál az aktin és az Ef a leggyakrabban használt referencia gének. Vírusfertőzött paradicsom levelekben a Gapdh-nek és az aktinnak a legstabilabb a génexpressziós szintje (Mascia *et al.*, 2010). Kísérleteink során mi azt tapasztaltuk, hogy TMV-VIGS vektorral fertőzött paradicsomban a Rubisco, a Gapdh és a tubulin expressziós szintje sem változott. Ezzel ellentétben PVX-VIGS vektorral és TRV-PDS VIGS vektorral történő fertőzés során a Rubisco, a Gapdh és az aktin génexpressziós szintje is nagymértékben lecsökkent. Az Ef génexpressziós szintjét CMV fertőzött paradicsom növényekben vizsgálva Mascia és mtsai (Mascia *et al.*, 2010) azt tapasztalták, hogy szintje megemelkedett, és referencia értéként alkalmazva ez eredmények félreértelmezéséhez vezetett. Kísérleteink során PVX VIGS vektorral fertőzött paradicsomban mi is hasonló figyeltünk meg, az Ef génexpressziós szintje megemelkedett, tehát az Ef ebben az esetben sem a megfelelő referencia gén. Eredményeink alapján paradicsomnál legcélszerűbb a TMV-VIGS vektor alkalmazása, mivel nem okoz drasztikus génexpressziós változást a növényekben.

6.3.3.3 *C. annuum* gazdanövényen nem találtunk optimális VIGS vektort

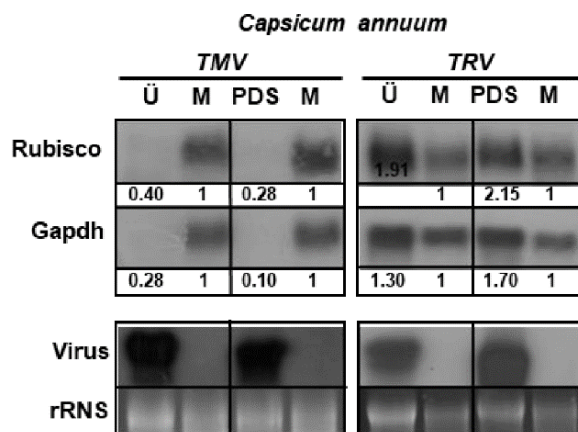
A paprika genom publikussá válása óta az addig nehezen vizsgált paprika génfunkció analízisek is megkezdődtek, általában a TRV vektort használva (Zhang *et al.*, 2015). A PVX a

paprikán nagyon súlyos tüneteket, sokszor nekrozist is okoz, így VIGS vektorként való alkalmazása ennél a növénynél fel sem merülhet (61. ábra).



61. ábra PVX, TMV és TRV (Üres, PDS) VIGS vektorral fertőzött *Capsicum annuum* növények képe PVX és TMV vektorok esetén a fertőzést követő 20. napon, míg TRV vektorral való fertőzést követően a 44. napon.

Kísérleteinkben TMV és TRV Üres és PDS tartalmú VIGS vektorokkal fertőztünk Fehérözön fajtájú paprikát. Az üres és a PDS tartalmú vektorok is hasonló változásokat okoztak (62. ábra).



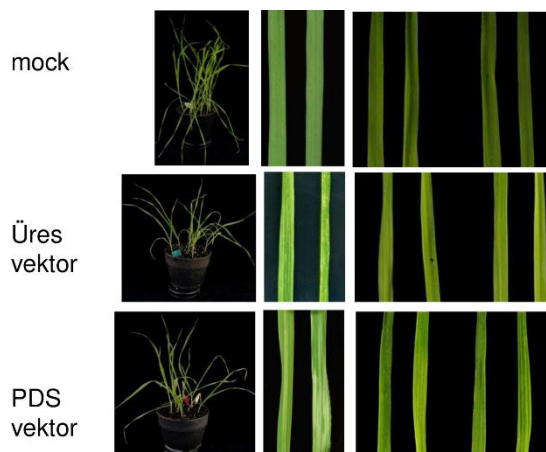
62. ábra Endogén gének (Rubisco, Gapdh) expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel Üres (Ü) és PDS-t tartalmazó TMV és TRV VIGS vektorral szisztemikusan fertőzött *Capsicum annuum* levelekben. A növényi mintákat a PVX és TMV vektorok esetén a fertőzést követő 20. napon, míg TRV vektorral való fertőzést követően a 44. napon vettük. Kontrollként mock (M) inokulált mintákat használtunk. A minták egyenlő nukleinsav(rRNS) koncentrációját az etídium-bromiddal festett agaróz gél mutatja.

A TMV vektorok fertőzésekor mind a Rubisco, mind a Gapdh szintje nagyon nagymértékben lecsökkent. Sajnos, bár klónoztuk a paprika elongációs faktorát és az aktint, ezekkel a próbákkal a Northern hibridizációs kísérleteink nem sikerültek. Érdekes módon, a többi növényen tapasztaltakhoz képest a TRV VIGS vektor fertőzése mind a Rubisco, mind a Gapdh expressziójának jelentős emelkedését eredményezte. Ennek okának vizsgálatához

további kísérletek lesznek majd szükségesek, azonban eredményeink alapján a paprika esetében sem a TMV sem a TRV használatát nem javasolnánk VIGS kísérletekhez.

6.3.3.4 A BSMV VIGS használata *T. aestivum* gazdanövényen

Ahogy azt az előző fejezetben ismertettem, búzát célzó kísérleteinkben – a szinte kizárólagosan hozzáférhető – BSMV vektort használtuk. Jelen kísérleteinkhez szintén ezzel a vektorral fertőztünk búza növényeket (63. ábra).



63. ábra BSMV (Üres, PDS) VIGS vektorral fertőzött *Triticum aestivum* növény képe a fertőzést követő 20. napon. BSMV-PDS VIGS vektorral való fertőzést követően a levél klorotikus tünetei jól láthatóak.

BSMV-Üres és BSMV-PDS VIGS vektorral fertőzött búzánál azt tapasztaltuk, hogy a Gapdh, Rubisco és az aktin, a leggyakrabban használt referenciagének, expressziós szintje drasztikus mértékben lecsökkent a mock növényekhez képest (64. ábra).

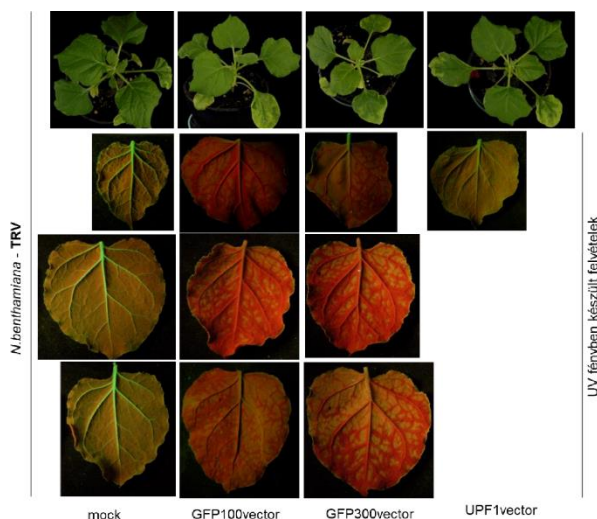
		<i>Triticum aestivum</i>			
		BSMV			
		Ü	M	PDS	M
Rubisco					
		0.44	1	0.62	1
Gapdh					
		0.69	1	0.70	1
Aktin					
		0.21	1	0.59	1
Virus					
rRNS					

64. ábra Endogén gének (Rubisco, Gapdh, aktin) expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel Üres (Ü) és PDS-t tartalmazó BSMV-VIGS vektorral szisztemikusan fertőzött *Triticum aestivum* levelekben. A növényi mintákat a fertőzést követő 20. napon vettük. Kontrollként mock (M) inokulált mintákat használtunk. A minták egyenlő nukleinsav (rRNS) koncentrációját az etídium-bromiddal festett agaróz gél mutatja.

A BSMV búzán nemcsak génexpressziós változást, hanem szembeűnő tüneteket, sárgulást, levélszáradást is okoz. Ezért a BSMV-VIGS vektor használatakor különösen körültekintőnek kell lenni az eredmények kiértékelésekor, mivel maga a VIGS vektor is nagymértékben képes befolyásolni a gazdanövény génexpressziós rendszerét. Elgondolkodtató, hogy a búzában BSMV-VIGS esetén, mely referencia gén legalkalmasabb az eredmények kiértékelésére. Jarosova és Kundu vizsgálataik alapján azt ajánlják, hogy egy másik vírusvektorral, BYDV vírussal, fertőzött búzában négy referenciagén (Gapdh, 18SRNS, tubulin és EIF4A) kombinációját használjuk a qRT-PCR adatok kiértékelésekor (Jarosova & Kundu, 2010).

6.3.3.5 A VIGS vektorba épített idegen szekvenciák hatása befolyásolhatja a TRV VIGS kísérletek eredményét

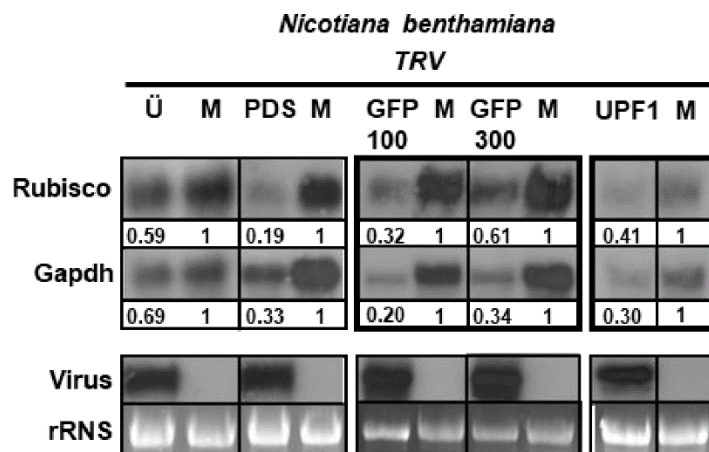
TRV-VIGS vektorral fertőzött dohányon és paradicsomnál, az Üres és a PDS-t tartalmazó vektorok fertőzésekor a Rubisco és Gapdh gének expresszióját különböző mértékben változott. Felmerült bennünk az a kérdés, hogy vajon mi lehet ennek az oka? Lehet, hogy a VIGS vektorba épített idegen szekvencia jelenléte befolyásolja azt, hogy az adott vektor mennyire változtatja meg a gazdanövény génexpresszióját, de az is előfordulhat, hogy a PDS csendesítése során lecsökkenő klorofill tartalom az, ami a Rubisco és Gapdh génexpressziós változását eredményezi. A kérdés megválaszolására TRV-VIGS vektorba a GFP gén különböző méretű (100bp és 300bp) darabjait klónoztuk, majd GFP-t expresszáló transzgénikus dohány növényeket fertőztünk meg TRV-GFP100 és TRV-GFP300 VIGS vektorokkal. Az infiltrálást követő 12. napon UV alatt ellenőriztük a vírusfertőzés sikerességét. A sikeres expresszió a GFP csendesítését okozza, így az UV fényben a levelek erei újra a vad típusra jellemző piros színben fluoreszkálnak, ahogy ezt tapasztaltuk is (65. ábra).



65. ábra TRV-GFP100, TRV-GFP300 és UPF1-et tartalmazó VIGS vektorokkal fertőzött GFP-t expresszáló transzgénikus dohány növények szisztemikus leveleinek UV alatti fényképe a fertőzést követő 12. napon. A dohánylevél erei a GFP hatékony csendesítésekor kipirosodnak.

Northern blottal vizsgálva a Rubisco és a Gapdh génexpressziós szintjét azt tapasztaltuk, hogy mind a TRV-GFP100, mind a TRV-GFP300 VIGS vektorral való fertőzéskor a Rubisco

és a Gapdh mRNS szintje lecsökkent, hasonlóan a TRV-PDS fertőzésekhez, tehát a Rubisco és a Gapdh gének expressziós változása mögött nem a klorofill szint csökkenése áll (66. ábra).



66. ábra Rubisco és Gapdh expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel TRV-GFP100 és TRV-GFP300, TRV-Upf1-gyel fertőzött GFP-dohány szisztémikus levélben. A növényi mintákat a fertőzést követő 12. napon vettük. Kontrollként mock (M) inokulált mintákat használtunk. A minták egyenlő nukleinsav (rRNS) koncentrációját az etídium-bromiddal festett agaróz gél mutatja.

Ennek tudatában megvizsgáltuk azt is, hogy a VIGS vektorba épített DNS szekvenciának a mérete hatással van-e a két háztartási gén expressziójára. TRV-Upf1 (582bp) VIGS vektorral fertőztünk dohány növényeket, és ezt követően Northern blottal ellenőriztük a Rubisco és Gapdh expressziós szintjét. A TRV-GFP (100bp, 300bp) és TRV-PDS fertőzésekhez hasonlóan, ebben az esetben is nagymértékben csökkent mind a Rubisco, mind a Gapdh expressziója. Mivel a gének expressziója 100-200-582bp-os eltérő szekvencia tartalmú DNS szakaszok beépítésekor is hasonló mértékben változott, azt gondoljuk, hogy a klónozó helyen levő DNS jelenléte és nem a mérete vagy szekvencia specificitása az, ami ezt a hatást előidézi. A jelenség mechanizmusának mélyebb megértése további kísérleteket igényel.

6.4 Az sRNS HTS, mint vírusdiagnosztikai módszer fejlesztése és használata

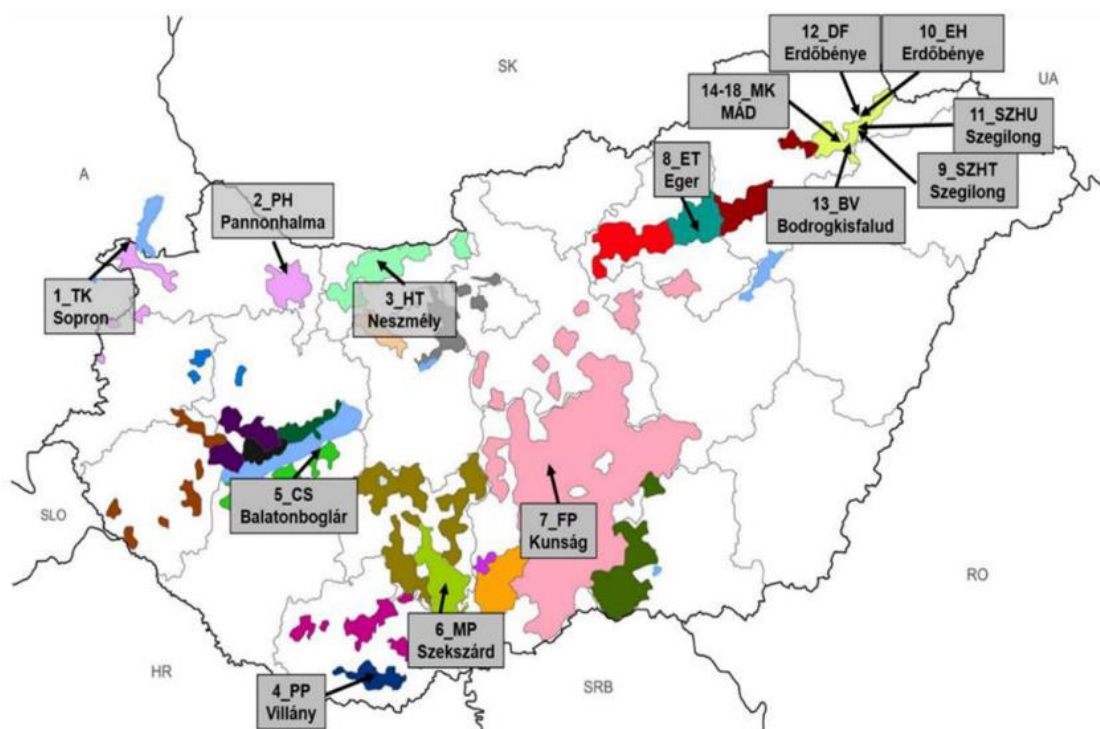
6.4.1 Az sRNS HTS, mint vírusdiagnosztikai módszer optimalizálása fásszárú növények fertőzöttségének vizsgálatára

Az sRNS HTS munkafolyamat áttekintése az anyag és módszer fejezetben található (5.7), részletesebben pedig a Viral Metagenomics című Protocols in Molecular Biology című könyvben (Czotter *et al.*, 2018) került leírásra.

6.4.2 sRNS HTS-sel határoztuk meg több termő szőlőültetvény viromját

A virológiai vizsgálatokhoz 9 borvidék összesen 14 különböző korú és fajta-összetételű termőültetvényéről (18 különböző fajta) leveleket tartalmazó hajtás mintát gyűjtöttünk 2014 májusában: Sopron (Soproni borvidék), Pannonhalma (Pannonhalmi borvidék), Neszmély (Neszmélyi borvidék), Szekszárd (Szekszárdi borvidék), Kecskemét (Kunsági borvidék), Mád, Erdőbénye, Szegilong, Bodrogkisfalud (Tokaji borvidék), Eger (Egri borvidék), Villány

(Villányi borvidék). 2014-ben néhány esetben a begyűjtött hajtattott vesszőkről gyűjtöttük be a szükséges növényanyagot: Balatonboglár (Balatonboglári borvidék), Erdőbénye (Tokaji borvidék) (67. ábra).



67. ábra Hazánk termő szőlőültetvényeinek vírusdiagnosztikai felmérése során mintázott ültetvények mintavételi helyei az sRNS könyvtár azonosítókkal

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

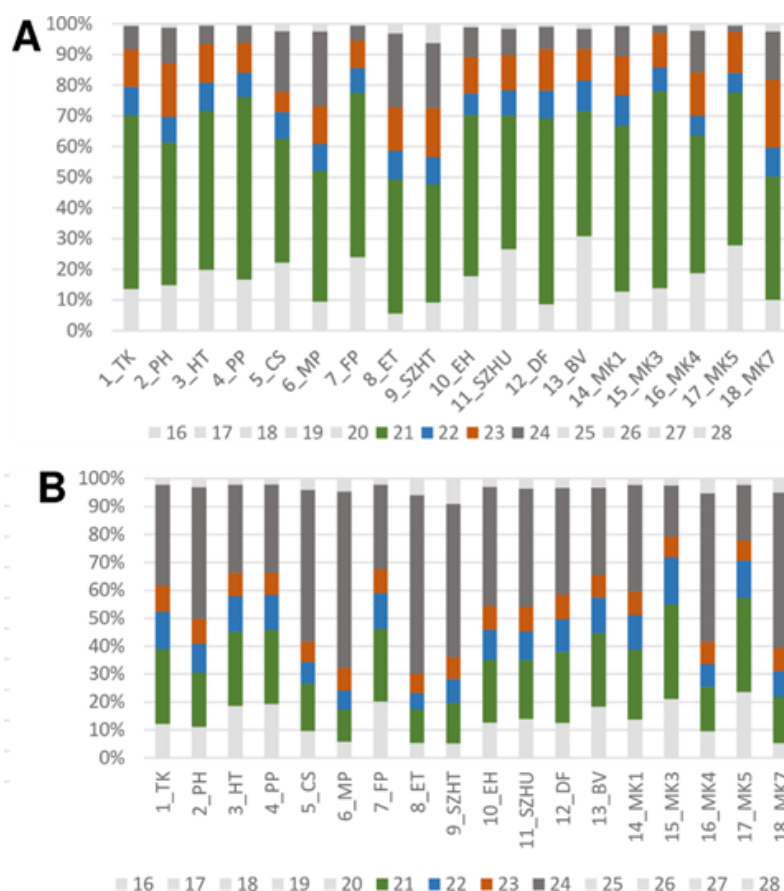
6.4.2.1 A szekvenálás és minőségének meghatározása

A szekvenálást követően az egyedi index szekvenciák alapján szétválogatott könyvtárak szekvenálásának minőségét minden esetben FASTQC programmal végeztük. A könyvtárak szekvenálásának minősége megfelelő volt, így folytathattuk elemzésüket. A nyers szekvenálási adatok alapján a szekvenált könyvtárak 8-14 millió read-et, átlagosan 10 millió read-et tartalmaztak. Ez a tendencia a szekvenciák trimmelése után sem változott meg (átlag 9.366.732 millió read), nem volt jelentős a szekvencia veszteség. A trimmelés során a szekvenáláshoz szükséges univerzális indító és adapter szekvenciákat távolítottuk el a leolvasások végéről. Az alapelemzési lépéseket követően megszüntettük a redundanciát adatainkban, vagyis meghatároztuk a nem-redundáns read számot (560.000-1.6 millió/könyvtár), anélkül, hogy a

szőlő specifikus sRNS-eket eltávolítottuk volna adatainkból. Elemzésünk következő lépésében, az sRNS read-ek vírus referencia genomokra való illesztésével meghatároztuk a virális eredetű sRNS-ek számát. A virális siRNS szekvenciák illeszkedése a redundáns read-ek esetében a kapott leolvasások 2,3-11,7%-a, míg a nem-redundáns read-ek esetében 3,3-13%-a volt.

6.4.2.2 A víruseredetű siRNS-ek méreteloszlása

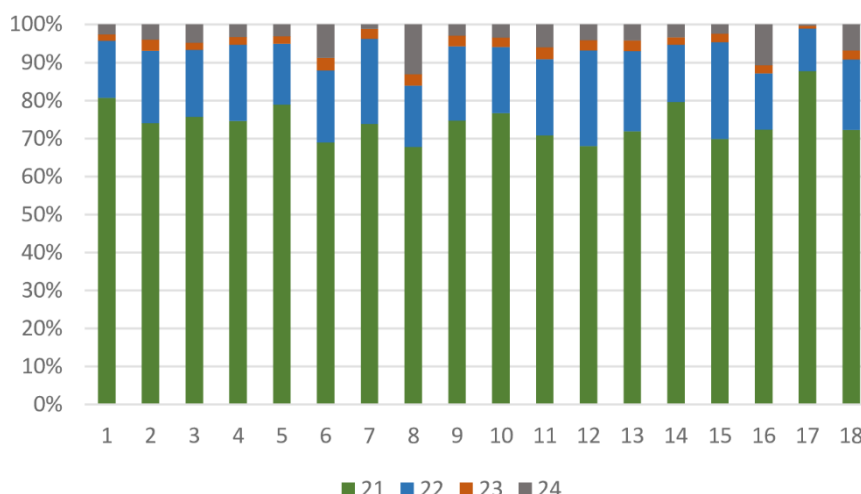
Az sRNS-ek a különböző növényi DCL enzimek hasításának eredményeként keletkeznek. *A. thalianában* a DCL fehérjecsald négy tagja (DCL1, -2, -3 és -4) ismert, melyek részt vesznek az endogén folyamatok szabályozásában és az antivirális RNSi-banegyaránt (Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009). A DCL4 felelős a 21nt hosszúságú sRNS-ek kialakulásáért, a DCL2 22nt hosszúságú, a DCL3 24nt hosszúságú sRNS-eket vág a dupla szálú RNS-ből (dsRNS), míg a DCL1 szintén 21nt hosszúságú sRNS-eket hasít, elsősorban miRNS-eket. A négy *Arabidopsis* DCL enzim homológjait a *Vitis vinifera* genomban is azonosították (Vv-DCL) (Zhao *et al.*, 2015). Kutatásukban kimutatták, hogy Vv-DCL1 egyetlen RNáz III domént tartalmaz, a Vv-DCL2 és Vv-DCL3-ből hiányzik a dsRB domén, továbbá a Vv-DCL4 nem tartalmaz PAZ domént. Ennek ellenére, valószínűleg teljesen funkcióképesek, mivel mintáinkban valamennyi méretű sRNS (21nt, 22nt, 23nt, 24nt) megtalálható volt (68. ábra).



68. ábra Az sRNS HTS eredményeképpen kapott sRNS-ek méreteloszlása A/ a minőségileg megfelelő összes read, B/ a nem redundáns read-ek esetében.

Megvizsgáltuk a redundáns sRNS szekvenciáink méreteloszlását, ez alapján a többségük a 21-24nt közötti mérettartományba tartozik (68. ábra/A), ami azt is igazolta, hogy maga a

könyvtár készítés sikeres volt. Az sRNS read-ek legnagyobb része 21nt hosszúságú mérettartományba esett, mely tartalmazta a miRNS szekvenciákat is, egybehangzóan korábbi vizsgálatokkal (Pantaleo *et al.*, 2010). A nem redundáns read-ek esetében a 24nt hosszú sRNS-ek túlsúlya érvényesült (68. ábra/B), valószínűleg a TGS következményeként. Az antivirális RNSi során a DCL4 és DCL2 hasítja a víruseredetű dsRNS-eket sRNS-ekre. A méreteloszlás vizsgálatot a vírus és viroid specifikus sRNS-ekre szűkítve, azt tapasztaltuk, hogy mintáinkban a 21-22nt hosszú sRNS-ek voltak a dominánsak, ami alapján feltételezhető, hogy szőlőben is a DCL2 és DCL4 enzimek játszhatják a kulcsszerepet a víruseredetű sRNS biogenezisben (69. ábra).



69. ábra Az sRNS HTS eredményeképpen kapott sRNS-ek méreteloszlása a vírus és viroid eredetű reak-ek esetében.

6.4.2.3 Az ültetvények vírusdiagnosztikája sRNS HTS-sel

Az sRNS HTS eredményének bioinformatikai értékelése során a vírusdiagnosztikát a 4.7.5 fejezetben részletezett módszerrel végeztük. A két eltérő stratégiai elemzéssel a szőlőt fertőző vírusok jelenlétét vizsgáltuk. Az adatok elemzését követően egy olyan küszöbértékeket határoztunk meg, melyek nagy valószínűséggel megmutatták az adott vírus jelenlétét:

- Legalább egy vírus-specifikus kontig összeépítése, bármelyik kmer érték (kmer13, 15, 17) alkalmazásával.
- Az adott vírus genomjának lefedettsége (%-ban) magasabb, mint 40% a vírusok, illetve több, mint 80% a viroidok esetében.

Az eredmények és elemzésük alapján elmondható, hogy a vizsgált ültetvények mentesek voltak GFLV, ArMV és GLRaV-2 vírusfertőzéstől, míg sok esetben akár 13 különböző vírus, viroid egyidejű jelenlétét tapasztaltuk ugyanazon ültetvény esetében.

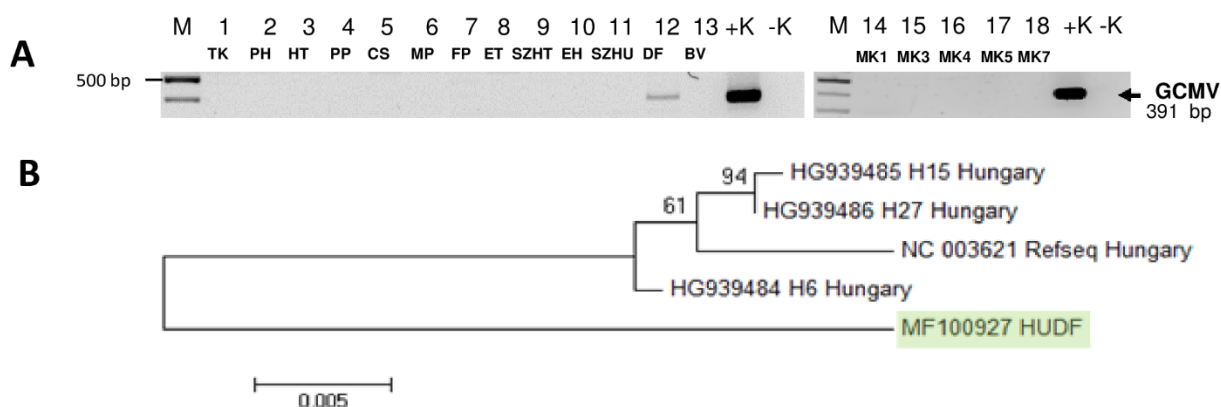
Az sRNS szekvenálási eredményeket RT-PCR reakcióval vizsgáltuk és igazoltuk vissza. cDNS-t szintetizáltunk az RNS ültetvény keverékekből, majd publikált vírus diagnosztikai primereket, illetve sok esetben saját, a meghatározott sRNS szekvenciák alapján tervezett primereket, valamint pozitív és negatív kontrollt használtunk a PCR vizsgálatokhoz. A kapott PCR termékeket 1.2%-os agaróz gélen választottuk el, termékeinket klónoztuk és nukleotid sorrendjüket hagyományos Sanger szekvenálással is meghatároztuk. Ezt követően a vírus szekvenciák elhelyezésre kerültek az NCBI GenBank nemzetközi adatbázisba. Az sRNS HTS

alapú vírus diagnosztika eredményeit és összehasonlítását az RT-PCR eredményekkel a Függelék 1. táblázatában összegeztük. Az eredményeink azt mutatják, hogy az sRNS HTS, mint diagnosztikai eszköz alkalmazhatósága és megbízhatósága vírusról nagyon eltérő lehet.

Az alábbiakban az sRNS HTS, bioinformatika és molekuláris biológiai módszerek együttes kombinációjával azonosított szőlőt fertőző vírusok eredményeit foglalom össze.

6.4.2.4 Szőlő krómmozai vírus (GCMV)

Az egyetlen Nepovírus nemzetségbe tartozó vírus, melyet a felmérés során detektáltunk, a GCMV volt, amit a 12_DF tokaji ültetvényben mutattunk ki. A vírus CPgénjének egy részét amplifikáltuk, majd meghatároztuk az aminosav-szekvenciát (70. ábra).



70. ábra A/ A GCMV jelenlétének igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/ A magyar szőlőültetvényen talált GCMV rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

A filogenetikai vizsgálat során összehasonlítva a nemzetközi adatbázisban található izolátumok GCMV RNS2 köpenyfehérje szekvenciáit, melyek szintén magyarországi eredetűek (Elbeaino *et al.*, 2014b), azt találtuk, hogy azok egymással közelebbi rokonságban állnak (több mint 96% hasonlóság a CP régióban), mint az általunk azonosított variáns (88-89% hasonlóság). Az adatbázisban található magyar származású GCMV RNS2 izolátumok pontos eredete azonban nem ismert, így nem zárható ki azok közös eredete sem.

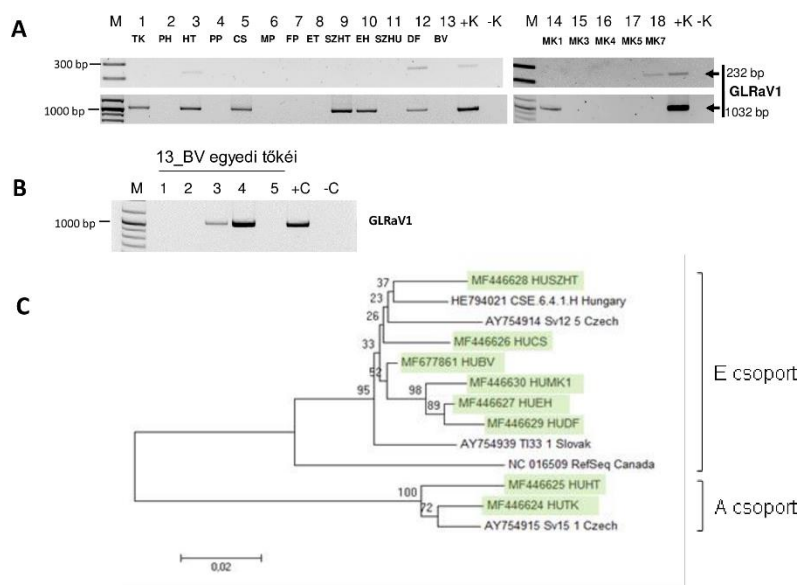
6.4.2.5 Szőlő levélsodródás asszociált vírus 1 és 3 (GLRaV1-3)

A szőlő levélsodródás vírus csoport tagjai közül két vírust azonosítottunk és igazoltuk vissza jelenlétüket az általunk vizsgált ültetvényeken.

A GLRaV-1 vírust összesen 9 mintában detektáltuk (1. táblázat). Az RT-PCR visszaigazolás során használt, az irodalomban publikált primerekkel azonban nem tudtuk mind a 9 mintában kimutatni a vírus jelenlétét (71. ábra/A felső panel).

A vírus egy kevésbé variábilis régiójára, HSP70 génjére, a mintáink sRNS szekvenciái alapján új primer párt terveztünk, melyekkel a 9-ből 8 mintában sikeresen igazoltuk a GLRaV-1 jelenlétét (71. ábra/A alsó panel). A 13_BV mintában azonban nem kaptunk PCR terméket. Ahhoz, hogy eldöntsük, hogy vajon ebben a mintában valóban jelen van-e ez a vírus, a továbbiakban az ültetvény pool helyett, visszanyúltunk a 13_BV ültetvény egyedeinek RNS keverékeihez. Az ültetvényt alkotó egyedek RT-PCR vizsgálata esetében az 5 egyedből csupán

2-ben kaptunk vírus-specifikus terméket (71. ábra/B). Ez megmagyarázza, mért nem tudtuk az ültetvény keverékből RT-PCR módszerrel kimutatni a jelenlétét.

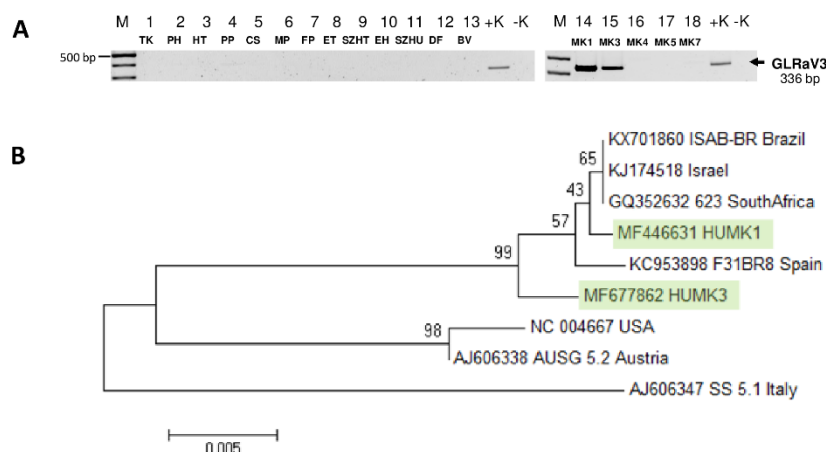


71. ábra A/ A GLRaV-1 jelenlétének igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/ A 13_BV ültetvény egyedeinek tesztelése GLRaV-1 vírus jelenlétére, C/ A magyar szőlőültetvényen talált GLRaV-1 rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz).

Az izolátumok HSP70 génjének 1032bp hosszú szakaszának filogenetikai elemzése szerint - Kominek és munkatársai (Kominek *et al.*, 2005) közleményében megjelentekhez hasonlóan - a genetikai változékonyságuk alapján két, A és E csoportot lehetett elkülöníteni (71. ábra/C). Továbbá az izolátumok és a referencia genom között csupán 82-92%-os hasonlóságot tapasztaltunk, mely a vírus nagymértékű változékonyságát mutatja. Változékonyságának köszönhetően a GLRaV-1 vírust a hagyományos diagnosztikai módszerek sok esetben nem tudják kimutatni (Esteves *et al.*, 2013). Az NCBI GenBank tartalmaz egy magyarországi eredetű, filogenetikailag E csoportba tartozó GLRaV-1 vírus izolátumot (CSE_6.4.1.H) (Cseh *et al.*, 2013), mely azonos földrajzi régióból származik, mint a mi HUTK és HUHT jelzésű mintáink, de azok nem az E, hanem az A csoportba klasztereződnek. Ez arra enged következtetni, hogy a fertőzés forrása nem földrajzi eredetű, hanem nagy valószínűséggel a fertőzött szaporítóanyag lehet.

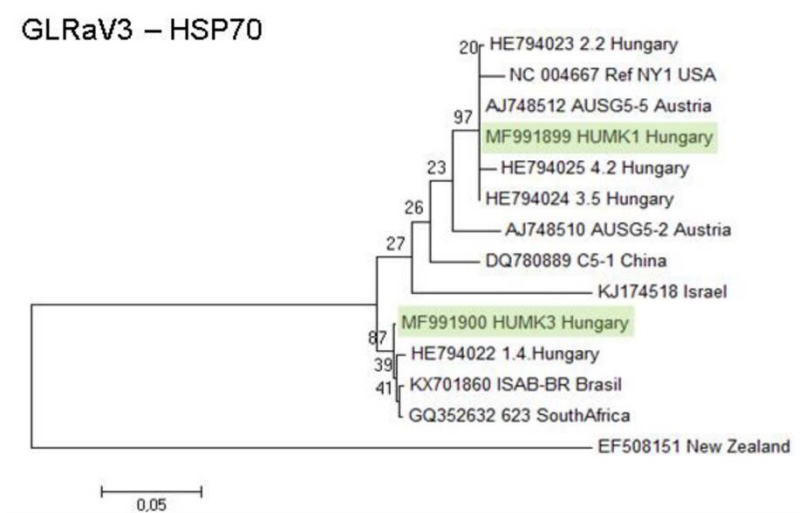
A GLRaV-3 vírust a 14_MK1 és a 15_MK3 könyvtárakban detektálta az sRNS szekvenálási elemzés, mely eredménnyel az irodalomban publikált primerekkel végzett RT-PCR visszaigazolási eredmények teljesen megegyeztek (72. ábra/A).

A két izolátum (HUMK1 és HUMK3) CP génje 336bp hosszú szekvenciájának filogenetikai analízise szerint 98%-ban megegyeznek, míg az amerikai referencia genomjukkal 91%-os hasonlóságot mutattak (72. ábra/B).



72. ábra A/ A GLRaV-3 jelenlétének igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/ A magyar szőlőültetvényen talált GLRaV-3 variánsok rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése a köpenyfehérje (CP) szekvenciák alapján (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz).

A két izolátum (HUMK1 és HUMK3) CP génje 336bp hosszú szekvenciájának filogenetikai analízise szerint 98%-ban megegyeznek, míg az amerikai referencia genomjukkal 91%-os hasonlóságot mutattak (72. ábra/B). Az izolátumok rokonsági viszonyait a szőlő levélsodródás vírus csoportra jellemző, HSP70 gén alapján is megvizsgáltuk, ahol izolátumaink két csoportra különülnek el az ország különböző pontjairól származó más, az adatbázisban megtalálható magyarországi izolátumokkal (Cseh *et al.*, 2013)(73. ábra).

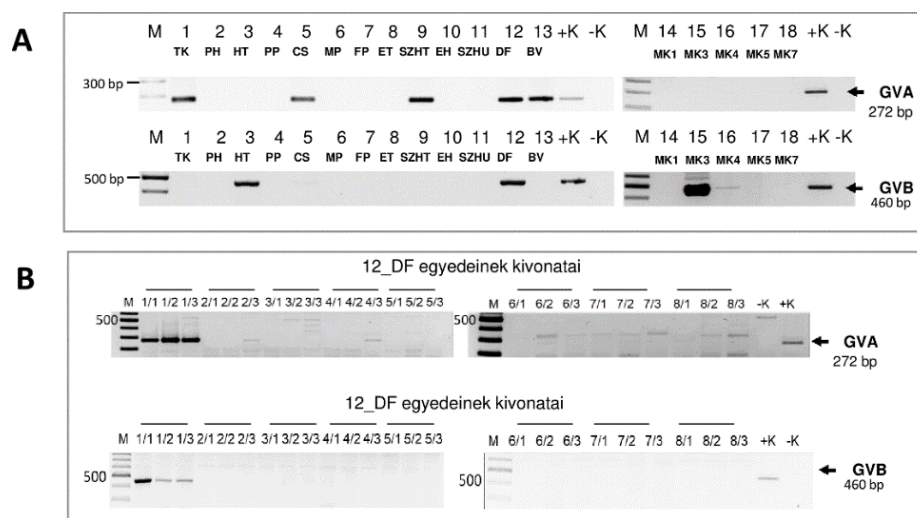


73. ábra A magyar szőlőültetvényen talált GLRaV-3 variánsok rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése a köpenyfehérje (HSP70) szekvenciák alapján.

A 14_MK1 és 15_MK3 minták, bár azonos ültetvényről származnak, de két eltérő fajtát képviselnek. Mivel ezek a földrajzilag azonos helyről származó változatok filogenetikailag eltértek egymástól, így valószínűbb, hogy a vírus variánsok jelenléte szaporítóanyag eredetű, mint egy esetleges helyszíni fertőzés eredménye.

6.4.2.6 Szőlő A és B vírus (GVA, GVB)

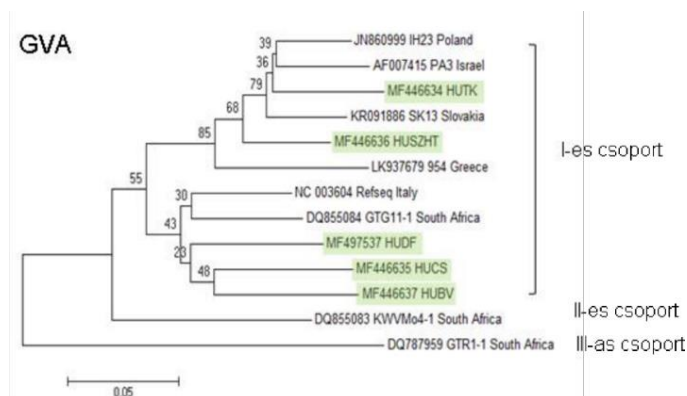
Két Vitivírus nemzetségbe tartozó vírus jelenlétét mutattuk ki: a GVA vírust 5 ültetvényben, míg a GVB vírust 2 ültetvényben detektáltuk (1. táblázat, 74. ábra/A).



74. ábra sRNS HTS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval A/ GVA és GVB vírus esetében, B/ a 12_DF ültetvény egyedeinek tesztelése GVA és GVB vírus jelenlétére. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

A 12_DF mintában a két vírus kimutatása nem volt egyértelmű. Annak ellenére, hogy PCR terméket kaptunk, az sRNS HTS eredmények a GVB vírust egyáltalán nem jelezték előre, és a GVA esetében sem volt egyértelmű jelenléte az ültetvényben. A kérdés tisztázására teszteltük az 12_DF ültetvény egyedeit a GVA és GVB vírusokra. Így fény derült arra, hogy az ültetvény egyetlen egyede volt fertőzött a vírusokkal (Függelék 1.táblázat, 74. ábra/B). Az HTS során erről az ültetvényről 8 egyedet vizsgáltunk, így a 7 egyed GVA és GVB vírusokat nem tartalmazó RNS hígította a kivonatot. Így lehetséges az, hogy ezekről a vírusokról keletkező sRNS-ek mennyisége a detektálási határ alá csökkent, és csökkentette a módszer érzékenységét.

A GVA vírus izolátumok filogenetikai vizsgálatuk szerint, az olaszországi eredetű referencia genommal (NC_003604) 85-90% hasonlóság mutatnak, valamint izolátumaink, más európai eredetű GVA variánsokkal együtt az I. filogenetikai csoportba tartoznak (Goszczynski, 2014) (75. ábra).



75. ábra A magyar szőlőültetvényen talált GVA variánsok rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése.

A GVB variánsok esetében nagyobb mértékű genetikai variabilitást tapasztaltunk: az izolátumok 85%-os hasonlóságot mutattak egymással összevetve, ennek megfelelően különböző rokonsági csoportokba tartoztak (Fonseca *et al.*, 2016) (76. ábra).

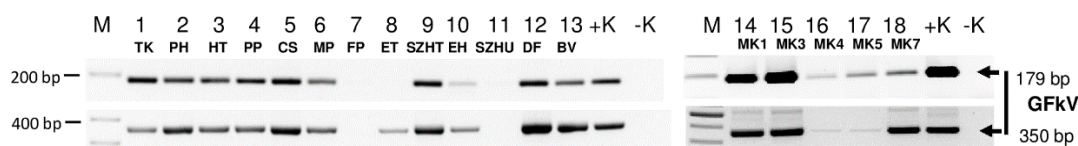


76. ábra A magyar szőlőültetvényen talált GVB variánsok rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése.

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

6.4.2.7 Szőlő foltosodás vírus (GFkV)

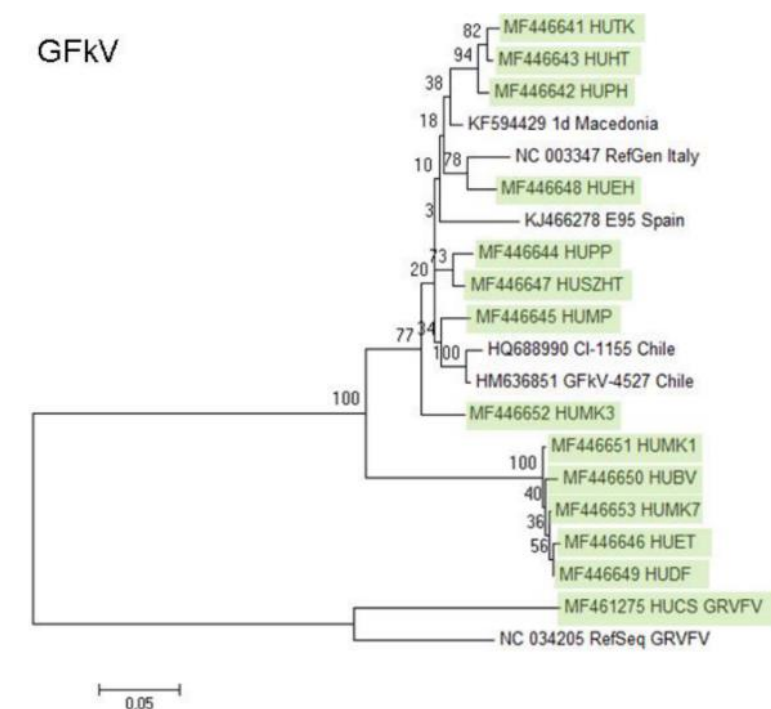
A GFkV vírus az egyik legelterjedtebb vírusnak bizonyult vizsgálatunk során: 18-ból 14 ültetvény esetében tapasztaltunk GFkV fertőzöttséget. Az sRNS HTS alapú vírus diagnosztika és a vírus RT-PCR visszaigazolása a legtöbb esetben, összhangban állt egymással (1. táblázat, 77. ábra).



77. ábra Az sRNS HTS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval GFkV vírus esetében. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

A 8_ET mintánál azt tapasztaltuk, hogy az irodalmi primerekkel nem volt sikeres a PCR alapú visszaigazolás, így a kapott sRNS szekvenciák alapján új primer párt terveztünk a vírusra, mely használatával alátámasztottuk az adott ültetvényben a vírus jelenlétét.

A GFkV izolátumok filogenetikai elemzése nagymértékű variabilitást mutatott: 85-95%-os hasonlóság az olasz referencia szekvenciával (NC_003347) (78. ábra).



78. ábra A magyar szőlőültetvényen talált GFkV variánsok rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése.

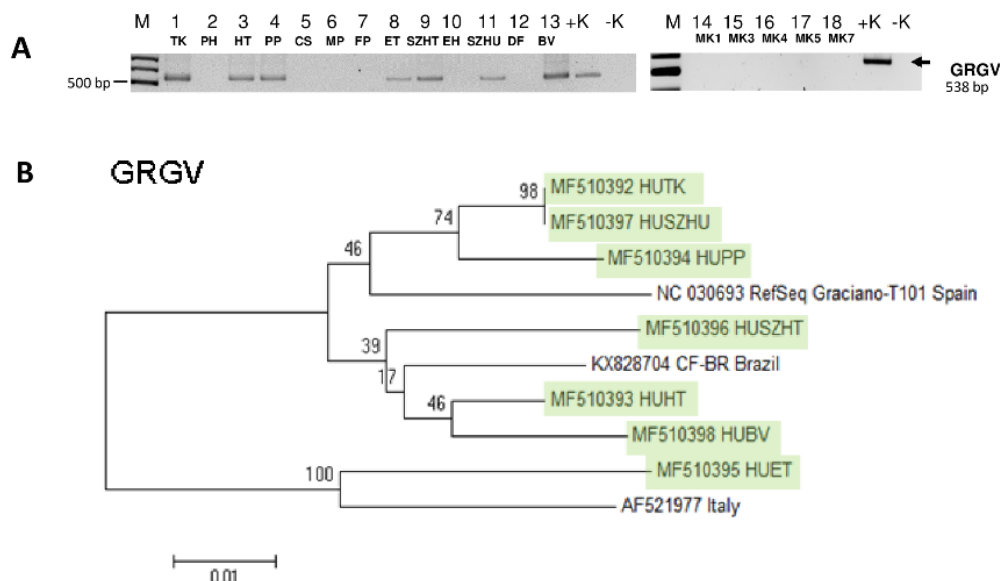
Az 5_CS minta esetében kiderült, hogy a klónozott PCR termék szekvenciája alapján az izolátum nem GFkV, hanem GRVfV (az izolátum NCBI GenBank azonosítója: MF461275) eredetű, ami a két vírus magas szintű hasonlóságára utalhat. A Tymovírusok közeli rokonságban állnak, sok esetben együtt is élhetnek ugyanabban a növényben. A GFkV vírusról leírták GRGV-al, GAMaV-al és GRVfV-val (Sabanadzovic *et al.*, 2000) és néhány esetben GSyV-1-el való együttes előfordulását is, ezért nem meglepő, hogy ezeket a vírusokat a legtöbb mintánkban detektálni tudtuk.

6.4.2.8 Grapevine redglobe vírus (GRGV)

Ugyan Európa különböző területein (Sabanadzovic *et al.*, 2000, Beuve *et al.*, 2015, Cretazzo *et al.*, 2017, Voncina *et al.*, 2017), valamint Brazíliában korábban már jelentették a vírus előfordulását (Fajardo *et al.*, 2017), a GRGV vírus hazánkban egy általunk újonnan azonosított szőlő vírus. Szekvenálási adataink több ültetvényben is jelezték a vírus lehetséges előfordulását (1. táblázat), majd a visszaigazolással 7 ültetvényben sikerült alátámasztani jelenlétét (79. ábra/A).

A GRGV vírust az ország különböző régióiban is megtaláltuk; a szekvenált törzsek 87-95% hasonlóságot mutattak a referencia szekvenciával (NC_030693), ezt a változékonyságot mutatta számunkra a variánsok rokonsági kapcsolatának vizsgálata is (79. ábra/B). A Red Globe egy kaliforniai eredetű csemege-szőlő fajta. Termesztését, Sabanadzovic szerint, Olaszországban kezdték meg először, így feltételezik a vírus olaszországi eredetét. A különböző izolátumok variabilitása és a tény, hogy a GRGV eddig nem fordult elő Csehországban és Szlovákiában – még HTS vizsgálattal sem detektálták (Eichmeier *et al.*, 2016) – alátámasztja azt a feltevésünket, hogy a vírus nem közép-európai eredetű, hanem

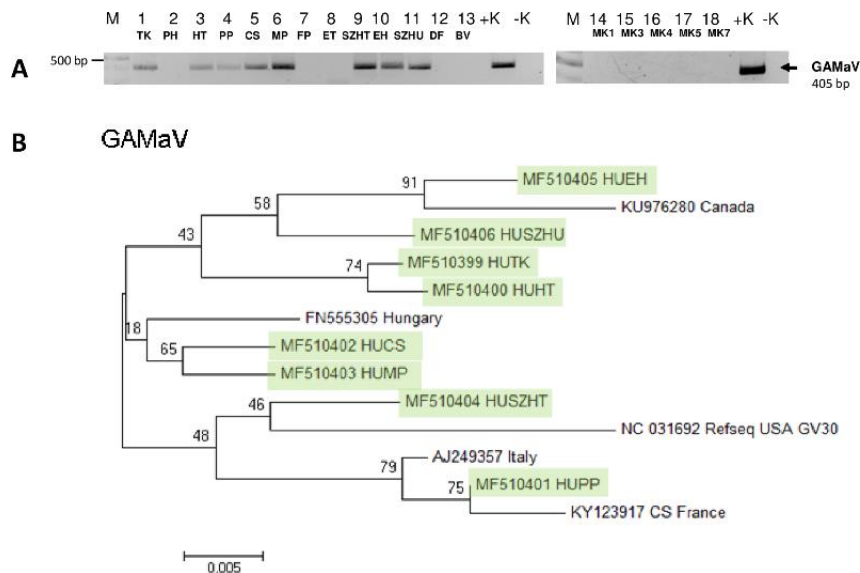
valószínűleg az eltérő földrajzi származású fertőzött szaporítóanyaggal kerülhetett be a térségbe.



79. ábra A/ A GRGV jelenlétének igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/ A magyar szőlőültetvényen talált GRGV variánsok rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

6.4.2.9 Grapevine asteroid mosaic associated virus (GAMaV)

A GAMaV szintén egy olyan vírus, mely hazánkban való előfordulása korábban nem volt ismert. Jelenlétét 8 mintában detektáltuk az sRNS HTS és az RT-PCR visszaigazolások során (1. táblázat, 80. ábra/A).

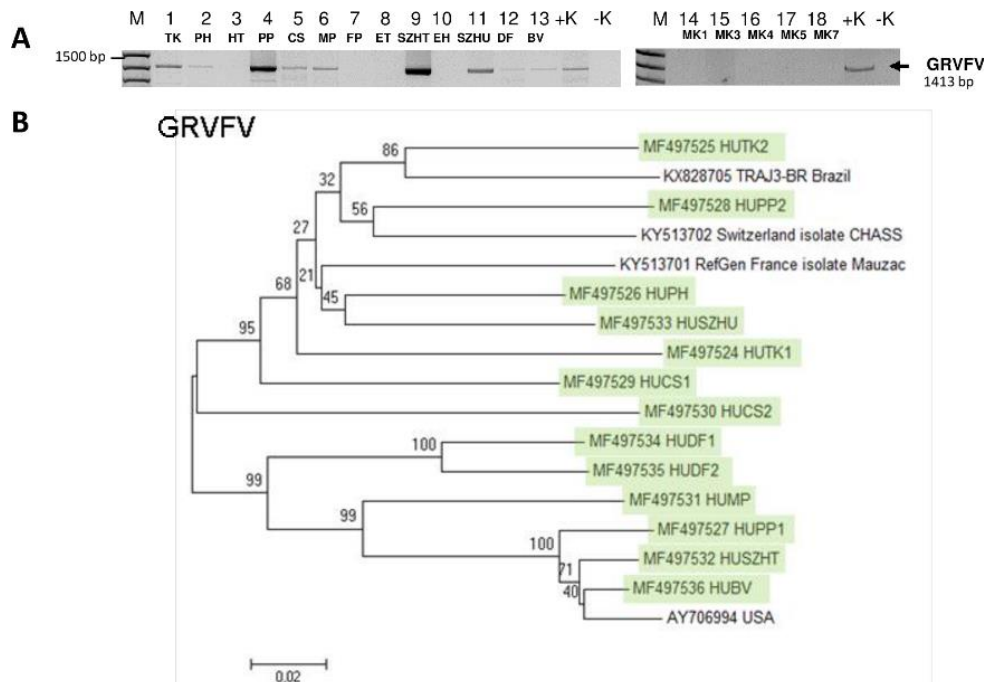


80. ábra A/ A GAMaV jelenlétének igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/ A magyar szőlőültetvényen talált GAMaV variánsok rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

Annak ellenére, hogy 1994 óta ismert a vírus (Boscia *et al.*, 1994), nagyon kevés szekvencia információ áll rendelkezésünkre vele kapcsolatban. Referencia genomját (NC_031692) 2016-ban tették közzé a NCBI GenBank-ban, és azóta - köszönhetően az HTS alapú kutatásoknak is - leírták a vírust Kanadában (Xiao & Meng, 2016) és Franciaországban (Candresse *et al.*, 2017a). A 8 klónozott izolátum 94-96%-ban azonos a referencia genommal, míg egymással 93-96%-os egyezést mutatnak. A filogenetikai vizsgálat szerint a magyar GAMaV izolátumok különböző földrajzi származású variánsokkal képeznek rokonsági csoportokat (80. ábra/B), így a vírusfertőzött szaporítóanyag használata a legkézenfekvőbb magyarázata a különböző GAMaV variánsok elterjedésének az országban.

6.4.2.10 Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVFFV)

A GRVFFV vírus, egy olyan Tymovirus, melyet először találtunk magyarországi szőlő ültetvényekben. A vírus detektálásához egy teljes genom szekvenciát (AY706994) és az időközben megjelent referencia genomot (NC_034205) (Reynard *et al.*, 2017) vettük alapul. Előbbivel 11, utóbbival 13 ültetvényben azonosítottuk a vírust bioinformatikai módszerekkel (1. táblázat). A francia referencia genom és a kaliforniai származású teljes GRVFFV genomszekvencia között 77%-os hasonlóságot találtunk, ami a vírus nagymértékű variabilitására utal. Ez a változékonyság lehet az oka a vírus sok esetben sikertelen detektálásának (Pantaleo *et al.*, 2010, Reynard *et al.*, 2017). A cDNS szintézist ez esetben vírus specifikus primerrel végeztük el, növelve a kimutatás érzékenységét. Az sRNS szekvenciák alapján tervezett primerekkel 9 ültetvényben kaptunk GRVFFV specifikus terméket, de 4 mintában nem volt sikeres az HTS eredmények visszaigazolása (81. ábra/A).

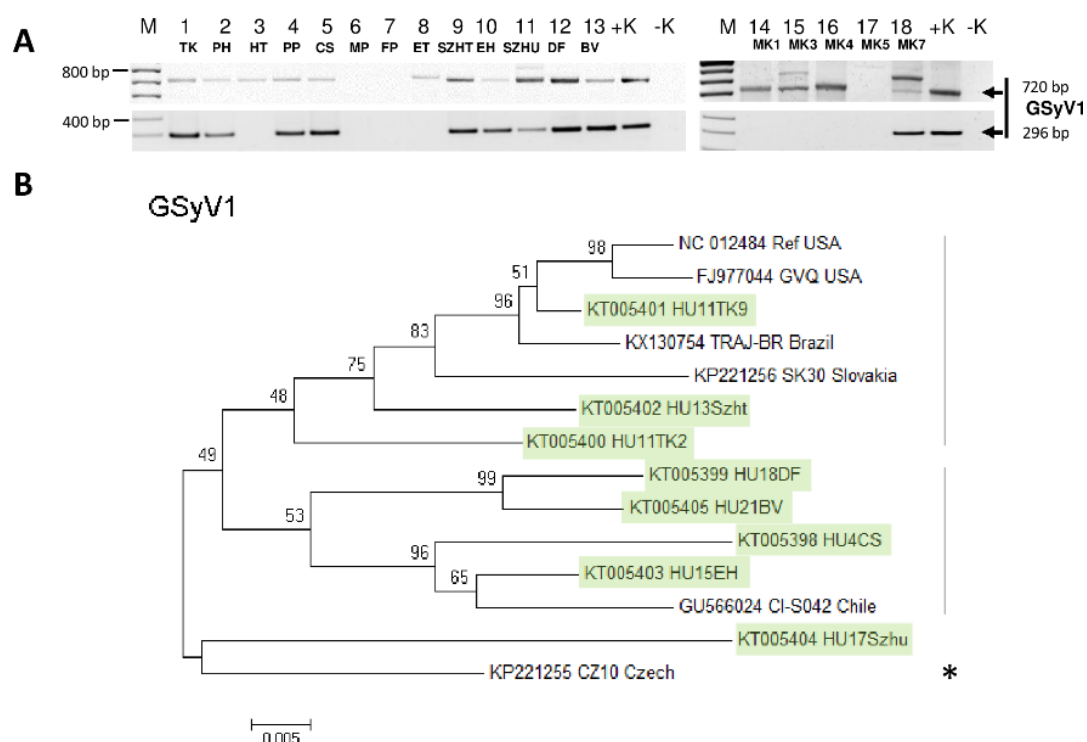


81. ábra A/ A GRVFFV jelenlétének igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/ A magyar szőlőültetvényen talált GRVFFV variánsok rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

A 9 izolátum 79-96% és 79-87% hasonlóságot mutatott az AY706994 és NC034205 genomokkal, megerősítve a különböző vírus izolátumok között mutatkozó diverzitást. Tovább vizsgálva a vírus variánsok sokféleségét, ugyanazon ültetvény (HUCS1-2, HUPP1-2, HUTK1-2, HUHF1-2) több egyedének szekvenciáját is meghatároztuk. Filogenetikai elemzésük rávilágított, hogy egy ültetvényen belül több GRVFFV vírus variáns is előfordul (78-92% azonosság az egyedek között) (81. ábra/B). Az eset megmutatta számunkra, hogy az sRNS HTS eljárás a variábilis vírusok pontos és érzékeny diagnosztizálására nem minden esetben alkalmas, de egy Tymovírus jelenléte pontosan meghatározható volt.

6.4.2.11 Szőlő Syrah vírus₁ (GSyV-1)

A szőlő Syrah vírus-1-et (grapevine Syrah virus - GSyV-1) egy Tymovirus, széles körű jelenlétét csoportunk írta le magyarországi ültetvényekben (Czotter *et al.*, 2015). A szekvenálási eredmények 15 mintában mutatták a vírus előfordulását (1. táblázat). A vírus mozgási fehérje génjére (MP) tervezett DetF-DetR primer párral (296bp-os termék)(Al Rwahnih *et al.*, 2009) 10 minta esetében kaptunk vírus specifikus terméket, míg a köpenyfehérje gén egy darabjának sokszorozásával (720bp-os termék)(Sabanadzovic *et al.*, 2009) maradéktalanul sikerült alátámasztani az HTS eredményeket (82. ábra/A).



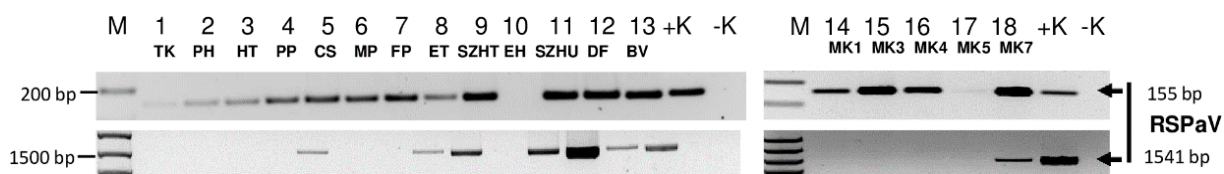
82. ábra A/ A GSyV-1jelenlétének igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/ A magyar szőlőültetvényen talált GSyV-1 variánsok rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

A vírus elterjedtségére Csehországban és Szlovákiában is felfigyeltek, és nagyfokú változékonyságot tapasztaltak a vírus 5' végén található, feltételezett MP régiójában (Glása *et al.*, 2015), mely álnegatív eredményeket eredményezhet az erre a régióra tervezett primerek diagnosztikai célú alkalmazásával, mint esetünkben is. Az izolátumokban azonosított CP gének

720bp hosszú szakaszának filogenetikai elemzése szerint (Glasa *et al.*, 2015) két fő csoport különíthető el, amelyen kívül egy izolátum elkülönülve képviseli a harmadik csoportot (82. ábra/B). Megvizsgálva ugyanazon ültetvény (11_TK) különböző egyedeiben azonosított GSyV-1 variánsokat (HU11TK2 és HU11TK9) azt találtuk, hogy ezek szintén nagymértékű variabilitást mutattak, ami alátámasztja azon elképzelésünket, miszerint a Közép-Európai GSyV-1 variánsok nagyobb mértékű változékonyságot mutatnak, mint az Észak-Amerikai változatok.

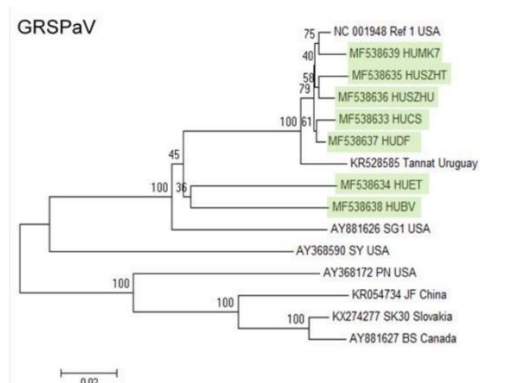
6.4.2.12 Szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus (GRSPaV)

A GRSPaV a világon és hazánkban is egy régóta ismert, széles körűen elterjedt szőlő fertőző vírus. A szekvenálási adatok szerint azonban csupán 3 ültetvényben bukkantunk a vírus nyomára, a vírus jelenlétének elfogadására vonatkozó feltételeink alapján (1. táblázat). Ezzel éles ellentétben a publikált, a replikáz gén egy nagyon rövid szakaszát amplifikáló, diagnosztikai primerrel végzett PCR reakcióval 16 mintában kaptunk vírus specifikus terméket (83. ábra).



83. ábra Az sRNS HTS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval a GRSPaV vírus esetében. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

A GRSPaV replikáz génjéről ismert, hogy gyakori rekombinációs események jellemzik, és viszonylag sokat hibázik (kicsi a proofreading aktivitása), ennek következtében a különböző variánsok együttléte ugyanabban a növényben eltérő vírus variánsok kialakulásához vezethet (Glasa *et al.*, 2017). Megvizsgáltuk, hogy a GRSPaV specifikus readok száma, illetve a genom lefedettség növekszik-e, ha a bioinformatikai elemzéshez 5 különböző teljes GRSPaV variáns genomját használjuk. Az elemzés szerint, 40%-nál magasabb lefedettséget csupán további 2 mintában tapasztaltunk. A GRSPaV főként vegetatív szaporítás útján terjed; ennek eredményeként, rendkívül nehéz eliminálni, mely így hosszú időn keresztül él együtt a szőlővel (Meng *et al.*, 2006).

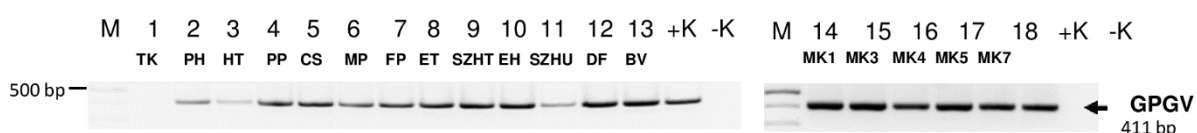


84. ábra A magyar szőlőültetvényen talált GRSPaV variánsok rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése.

Ez a koevolúció kölcsönös előnyök révén a gazdanövény génexpressziójának változásához vezetett, így a vírus jelenléte a stresszgének enyhe „down” regulációját eredményezte (Gambino *et al.*, 2012). Ennek köszönhető, hogy az együttélés következtében a vírus és a gazdaszervezet közötti védekezési reakció egyensúlyba került. Lehetséges azonban az is, hogy a GRSPaV kódolta VSR-ek gátolják a vírus eredetű sRNS-ek biogenezisét, de ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek. A GRSPaV izolátumok filogenetikai vizsgálata érdekében, egy hosszabb 3' végi CP genom darabot amplifikáltunk a vírusból. A filogenetikai vizsgálatok azt mutatják, hogy a magyarországi variánsok az amerikai és uruguayi izolátumokkal alkotnak közelebbi rokonsági csoportot (84. ábra).

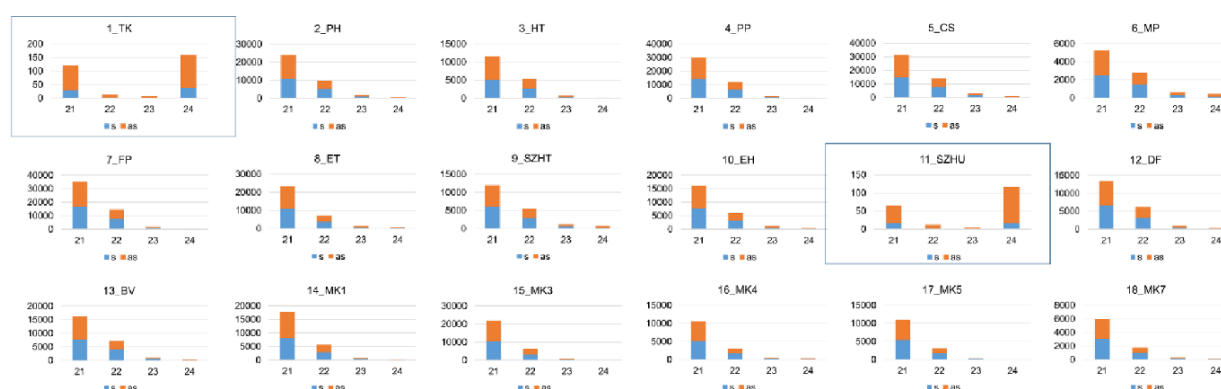
6.4.2.13 Grapevine Pinot gris virus (GPGV)

Vírusdiagnosztikai felmérésünk szerint a GPGV, mely hazánkban egy újonnan leírt vírus, rendkívül elterjedt, az általunk vizsgált ültetvények közül 17-ben találtuk meg (1. táblázat), melyet az RT-PCR alapú igazolás is alátámasztott (85. ábra).



85. ábra Az sRNS HTS eredmények igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval a GPGV vírus esetében. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

Ahogy korábban bemutattam, a szekvenált, vírus eredetű sRNS-ek esetében a 21 nukleotid hosszú sRNS-ek túlsúlya a jellemző, így a GPGV esetében is ezt tapasztaltuk. Azonban ezzel ellentétben, két mintában (1_TK és 11_SZHU) a 24nt hosszú GPGV eredetű antiszensz orientációjú read-ek dominanciáját tapasztaltuk (86. ábra).

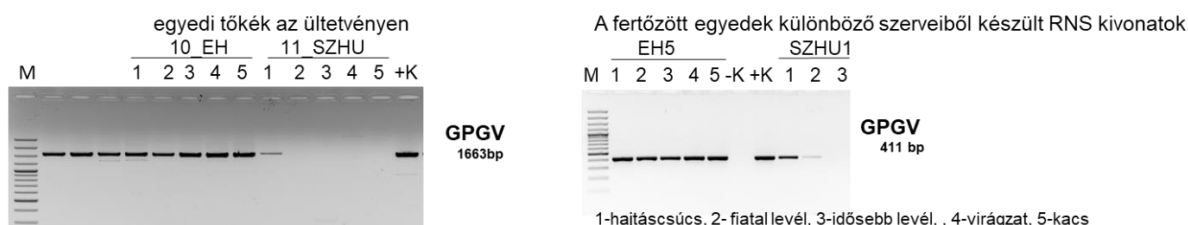


86. ábra A GPGV eredetű sRNS readek méret eloszlása (a narancssárga és a kék színek a pozitív-negatív orientációt jelzik, kék keret jelzi a 24nt read-ek dominanciáját).

Ezekben a mintákban a vírus specifikus read-ek száma nagyon alacsony volt, azonban mindkettőben kaptunk 2-2 db GPGV eredetű kontig szekvenciát, melyek a genom 5' régiójáról származnak. Ezt a genom régiót megvizsgálva (155-235bp) azt találtuk, hogy az olasz referencia genom (NC_015782) ezen régiója különbözik a többi adatbázisban levő GPGV teljes genomszekvenciától, mivel tartalmaz egy szakaszt, mely illeszkedik a *V. vinifera* szekvenciára.

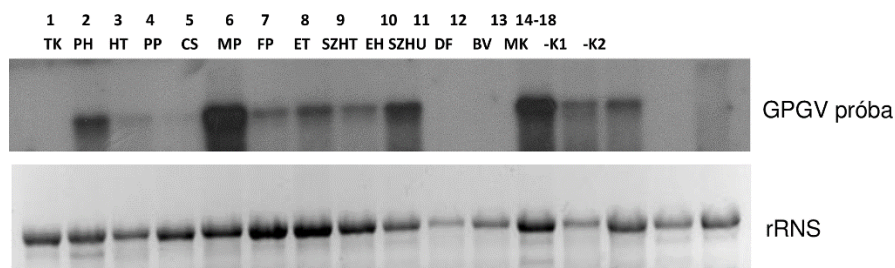
Hasonlóan a GPGV első leírásához (Giampetruzzi *et al.*, 2012), a bioinformatikai adatfeldolgozásunk során mi sem távolítottuk el a gazda/szőlő specifikus read-eket a vírusdiagnosztikai elemzés során. Így a GPGV vírusként azonosított sRNS szekvenciák ezekben a könyvtárakban álpozitív/gazda eredetű szekvenciák lehetnek, mely megmagyarázza méreteloszlásukat, valamint a kontig szekvenciák jelenléte és az sRNS-ek direkt illesztésével kapott eredmények közötti ellentmondást. Kísérleteink óta más kutatók, és a vírus leírói is észlelték ezt a hibát, és ezt javítva a GenBankban ma már egy olyan GPGV referencia genom található, ami ezt a régiót nem tartalmazza. További kérdésként merült fel, hogy miért kaptunk ennek ellenére GPGV-specifikus PCR terméket a 11_SZHU mintában (85. ábra).

Megvizsgáltuk az ültetvény egyedeit és azok különböző szerveit RT-PCR-rel, és kiderült, hogy ebben a nagyon fiatal ültetvényben csak egyetlen tesztelt egyed volt fertőzött, és csupán a fiatal levelekben és a hajtáscsúcsban volt kimutatható a GPGV vírus jelenléte (87. ábra).



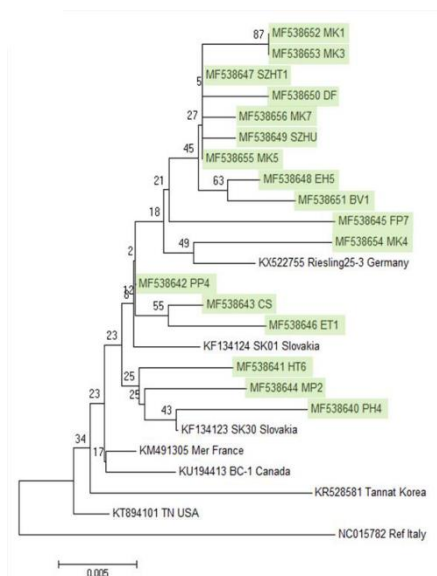
87. ábra A GPGV jelenlétének vizsgálata az EH és az SZHU ültetvényeken. A bal oldali panelen az 10_EH és 11_SZHU ültetvény egyedeinek, míg a jobb oldali panelen az EH5 és SZHU1 egyedek szerveinek tesztelése GPGV vírus jelenlétére. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-8: DF ültetvény 8 egyede, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

A GPGV jelenlétét 11 mintában (14-18 azonos ültetvény mintáit pooloztuk) Northern blottal is igazoltuk (88. ábra).



88. ábra Az sRNS HTS eredmények igazolása Northern blot hibridizációval a GPGV vírus jelenlétére. (1-13/ ültetvény pool, 14/ a 14-18 azonos ültetvények poolozásából készített RNS keverék. -K1: egészséges szőlő RNS, -K2: *Nicotiana benthamiana* negatív kontroll, az EtBR-dal festett gélen látható rRNS-ek a mintafelvétel egyenletességét mutatják.)

A 10_EH mintában a felvitt RNS alacsony mennyisége, míg a 11_SZHU mintánál az alacsony GPGV koncentráció lehet az oka, hogy nem kaptunk specifikus jelet a vizsgálat során. A vírus CP szekvenciájának vizsgálata alapján az izolátumok minimális eltéréseket mutattak, de filogenetikai vizsgálatuk során eltérő csoportokat alkottak és különböző földrajzi eredetű izolátumokkal mutattak közelebbi rokonságot (89. ábra).



89. ábra A magyar szőlőültetvényen talált GPGV variánsok rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése.

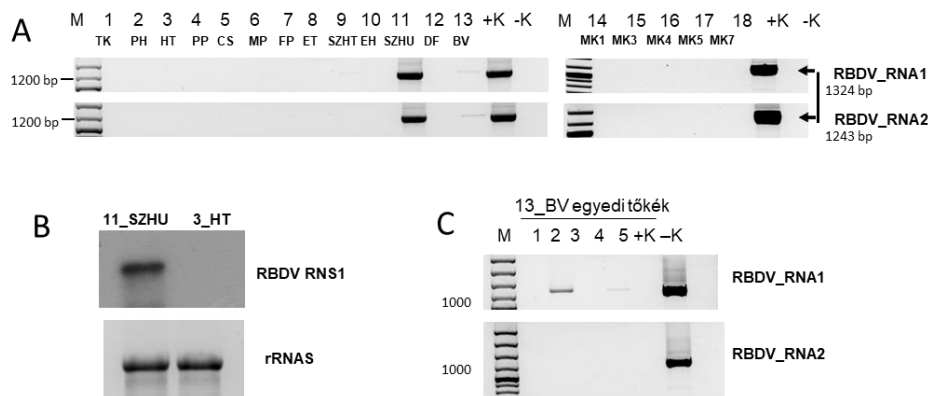
Ez alátámasztja azt a hipotézist, hogy a GPGV Kelet-Európából Olaszország irányába terjedt (Bertazzon *et al.*, 2016), majd Európából került el a világ más tájaira (Wu & Habili, 2017). Terjedésében feltételezhetően a fertőzött növényekről származó gubacsatka vektorok (Bertazzon *et al.*, 2017) játszanak szerepet, mely magyarázata lehet az egyéves ültetvényben (11_SZHU) való egyenlőtlen jelenlétének. Nagymértékű elterjedtségének ellenére, a GPGV által okozott és megjelenő tünetek ritkák, az általunk mintázott egyedek közül egy sem mutatott GPGV fertőzésre utaló tüneteket. A látens és virulens törzsekre vonatkozó információk jelenleg még nem egyértelműek (Saldarelli *et al.*, 2015); azonban a MP vég polimorfizmusa szerint, valamennyi izolátumunk a látens csoporthoz tartozik, amelynek képviselői MP végükön rövidebbek 6 aminosavval.

6.4.2.14 Málna bokros törpülés vírus (RBDV)

2003-ban közzétették először Szlovéniában, hogy az RBDV vírus természetes módon képes fertőzni szőlőt (Mavric *et al.*, 2003). Azóta kevés erre vonatkozó információra derült fény, 2012-ben azonban szintén megtalálták a vírust Magyarországon (Plesko *et al.*, 2012). Vizsgálataink során a 11_SZHU mintánk szintén RBDV jelenlétét mutatta (1. táblázat). A 11_SZHU ültetvény, egy nagyon fiatal, 1 éves Furmint ültetvény, melyben a vírus mindkét RNS-ét (RNS1, RNS2) sikerült RT-PCR-rel kimutatni (90. ábra/A), valamint az RNS1 esetében Northern blottal is kimutattuk a vírus jelenlétét (90. ábra/B).

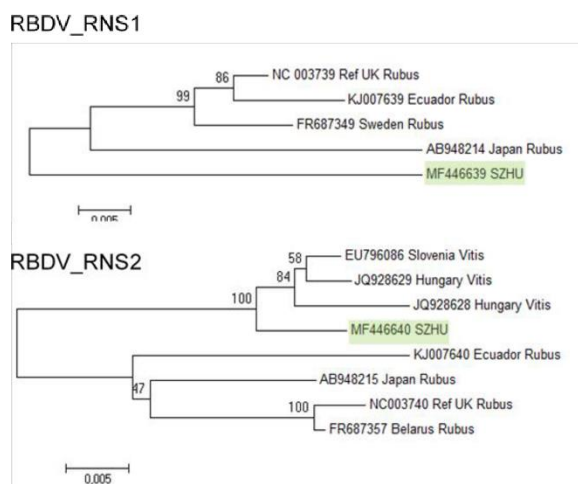
Habár a 13_BV ültetvényben is kaptunk RBDV specifikus sRNS read-eket, valamint mindkét RNS-e esetében a lefedettségi érték elérte a 40%-ot, ennek ellenére PCR terméket nem kaptunk. Ennek az ellentmondásnak a feloldásához az ültetvény egyedeit vizsgáltuk meg a vírus jelenlétére. Az RNS1 esetében, egyetlen egyednél (BV2) kaptunk terméket a várt méret tartományban (90. ábra/C). Sanger szekvenálással bizonyítottuk, hogy a BV2 egy RBDV specifikus szekvencia, mely 98.6%-os hasonlóságot mutatott a 11_SZHU izolátumunkkal. A BV2-vel jelölt egyed egy Balafánt, egy ősi, magyar fajta, amely sokáig jelen van a gyűjteményben. Felmerül a kérdés, hogy a vírus hogyan fertőzhetett az ország északkeleti

részén. A 11_SZHU RNS1, 1324bp hosszú szakaszának filogenetikai elemzése szerint jelentősen eltér az egyéb, *Rubus* gazdában talált RBDV RNS1 szekvenciáktól (91. ábra/A).



90. ábra Az sRNS HTS eredmények igazolása A/vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/Northern blot hibridizációval az RBDV vírus jelenlétére C/A 13_BV ültetvény egyedeinek tesztelése RBDV vírus jelenlétére (A, C/M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz, B/RBDV_RNS1 jelenlétét 11_SZHU ültetvényben vizsgáltuk, 3_HT pool RNS-ét használtuk negatív kontrollként.)

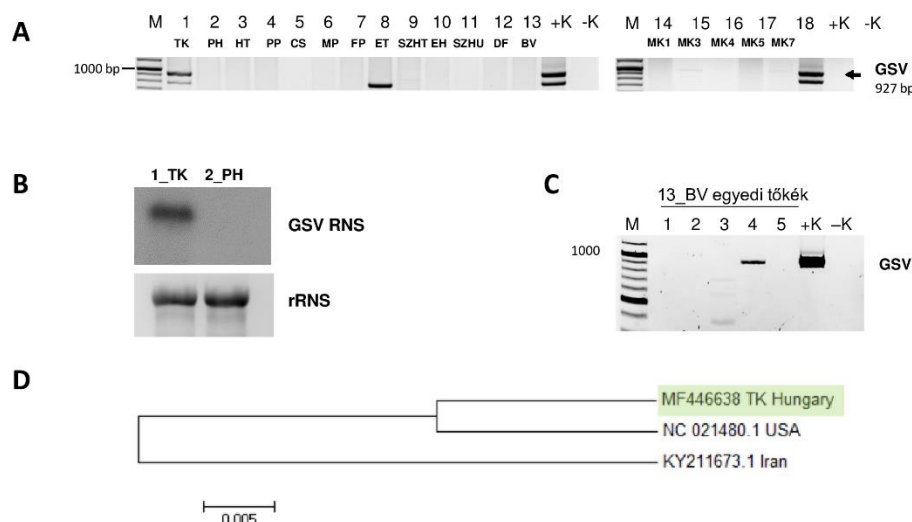
Hasonló elemzést végeztünk izolátumunk RNS2 MP régiójának 1243bp hosszú szakaszán (91. ábra/B, mely szerint a tokaji eredetű RBDV izolátumunk közelebbi rokonságban áll a Szlovén *Vitis* származású izolátummal, mint a magyarországi *V. vinifera* variánsokkal (JQ928628 és JQ928629). Ez azt sugallja, hogy a vírus megjelenése szaporítóanyag eredetű lehet.



91. ábra A magyar szőlőültetvényen talált RBDV RNS1 és RNS2 rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése.

6.4.2.15 Szőlő szatellit vírus (GSV)

A Szőlő szatellit vírust először Kaliforniában dsRNS szekvenálással azonosították (Al Rwahnih *et al.*, 2013), majd Iránban is leírták jelenlétét (Candresse *et al.*, 2017b). Mintáinkban 2 esetben (1_TK, 13_BV) azonosítottuk a GSV vírust (1. táblázat). Az 1_TK mintában RT-PCR-rel (92. ábra/A) és Northern blottal (92. ábra/B) is sikeresen igazoltuk a jelenlétét.



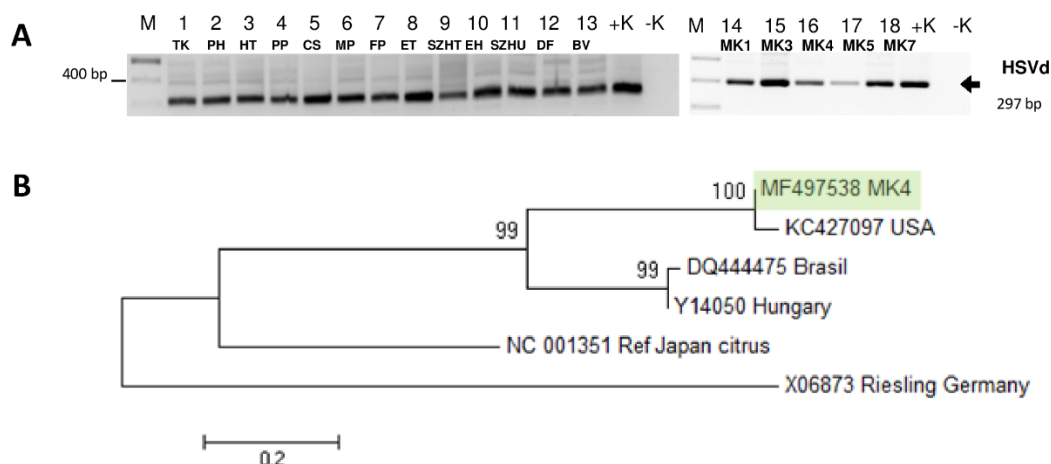
92. ábra Az sRNS HTS eredmények igazolása A/Vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/Northern blot hibridizációval GSV jelenlétére C/A 13_BV ültetvény egyedeinek tesztelése GSV jelenlétére, D/ a hazai GSV izolátum filogenetikai analízise. (A, C/M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz, B/ a 2_PH ültetvény pool RNS-ét használtuk negatív kontrollként.)

A 13_BV mintában azonban az ültetvény RNS pool-ból nem, csak az ültetvény egyedeinek tesztelése során kaptunk specifikus terméket (BV4) (92. ábra/C). Habár a GSV 'helper' vírusát még nem azonosították, megfigyelték, hogy a GSV-vel fertőzött szőlőben vitavírusokat és különböző GLRaV vírusokat is találtak (Al Rwahnih *et al.*, 2013). Esetünkben a 1_TK és 13_BV ültetvényekben a GVA és GLRaV-1 vírusok szintén megtalálhatóak voltak, ez alapján feltételezhető esetleges 'helper' vírus szerepük, de ez jelenleg még nem bizonyított. A 925bp méretű GSV klónunk (HUTK) szekvencia összehasonlítása szerint közelebbi rokonságban áll a kaliforniai izolátummal, mint az iráni eredetűvel, és némileg a másik BV4 egyed szekvenciájától is eltér, így eredete nehezen magyarázható (92. ábra/D).

6.4.2.16 Komló törpülés viroid (HSVd)

Felmérésünk szerint csaknem az összes könyvtárunkban kaptunk HSVd eredetű sRNS szekvenciákat (1. táblázat). Méreteloszlásuk és polaritásuk is összhangban állt Navarro és munkatársainak (Navarro *et al.*, 2009) viroidokra vonatkozó részletes vizsgálatával. Bioinformatikai eredményeinket RT-PCR-rel is sikerült alátámasztani (93. ábra/A).

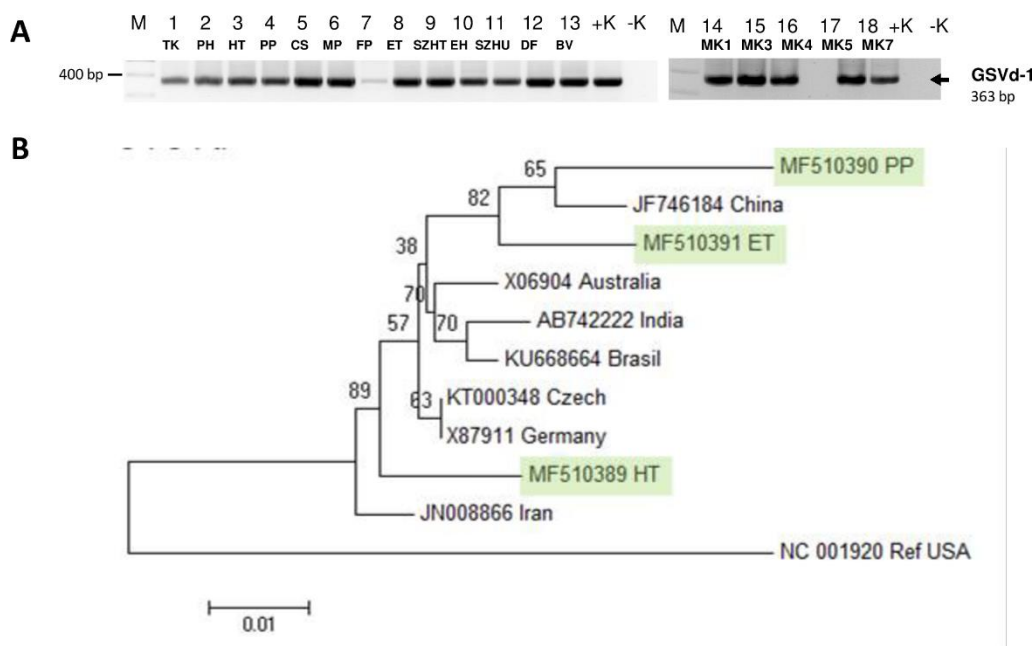
Mivel a különböző variánsok HSVd szekvenciái nagyon hasonlóak voltak, így egyetlen tokaji származású HSVd klón szekvenciáját határoztuk meg (MK4). A HUMK4 izolátum filogenetikai analízise azt mutatta, hogy 95%-ban azonos a referencia genommal, azonban az eredetileg Egerből származó ENTAV115 Pinot noir német izolátummal (Navarro *et al.*, 2009), X06873) és a másik hazai HSVd változattal (Y14050) nem áll közeli rokonsági kapcsolatban (93. ábra/B).



93. ábra A HSVd jelenlétének vizsgálata. A/ A HSVd jelenlétének igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/ A magyar szőlőültetvényen talált HSVd rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

6.4.2.17 Szőlő sárga foltosság viroid (GYSVd-1, 2)

A Szőlő sárga foltosság viroidot vizsgálatunk során összesen 16 mintában azonosítottuk (1. táblázat). Ahogy a táblázatban is látható, a GYSVd-1 viroid 16 mintában volt jelen, azonban a GYSVd-2 viroid jelenlétére vonatkozó bioinformatikai elemzések nem voltak olyan egyértelműek. A GYSVd-1 RT-PCR igazolása sikeres volt, valamennyi minta esetében (94. ábra/A), azonban a GYSVd-2 esetében specifikus PCR terméket egy esetben sem kaptunk.



94. ábra Az A/ GYSVd jelenlétének igazolása vírus-specifikus RT-PCR reakcióval, B/ a magyar szőlőültetvényen talált GYSVd rokonsági viszonyainak filogenetikai elemzése. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

Ezen eredmények arra utalhatnak, hogy a magyarországi ültetvényekben előforduló variánsok inkább a GYSVd-1 viroidhoz állhatnak közelebbi rokonságban. Az ország különböző

tájairól származó három GYSVd izolátum szekvenciájának vizsgálata során jelentős eltéréseket tapasztaltunk, ahogy ezt a filogenetikai fa is mutatja (94. ábra/B).

Összegezve az sRNS HTS alkalmazásának tapasztalatait az ültetvények vírusfertőzöttségének felmérésében elmondhatjuk, hogy mintáinkat random módon gyűjtöttük minden esetben, egy-egy tünetet mutató egyed mintázása helyett, és e mintákból a vírusdiagnosztikához RNS keverékeket készítettünk. Az ültetvények egészségi állapotát így felmérve, számos hazánkban ismert szőlőt fertőző vírust azonosítottunk. Az ültetvények mentesek voltak GFLV, ArMV és GLRaV-2 vírusoktól. A kötelezően szűrendő vírusok közül GCMV és GLRaV-3 fertőzöttséget egy, GVB esetében három, míg GVA vírus előfordulását 5 ültetvényben tapasztaltuk. Korábbi vizsgálatokkal és tapasztalatokkal megegyezően, ahogy várható volt, a GLRaV-1 és GFkV széleskörű elterjedtségét tapasztaltuk. A leggyakoribb előfordulást a HSVd és GYSVd-1 viroidok (14 és 13 ültetvényben), valamint a GRSPaV vírus (14 ültetvény) mutatta.

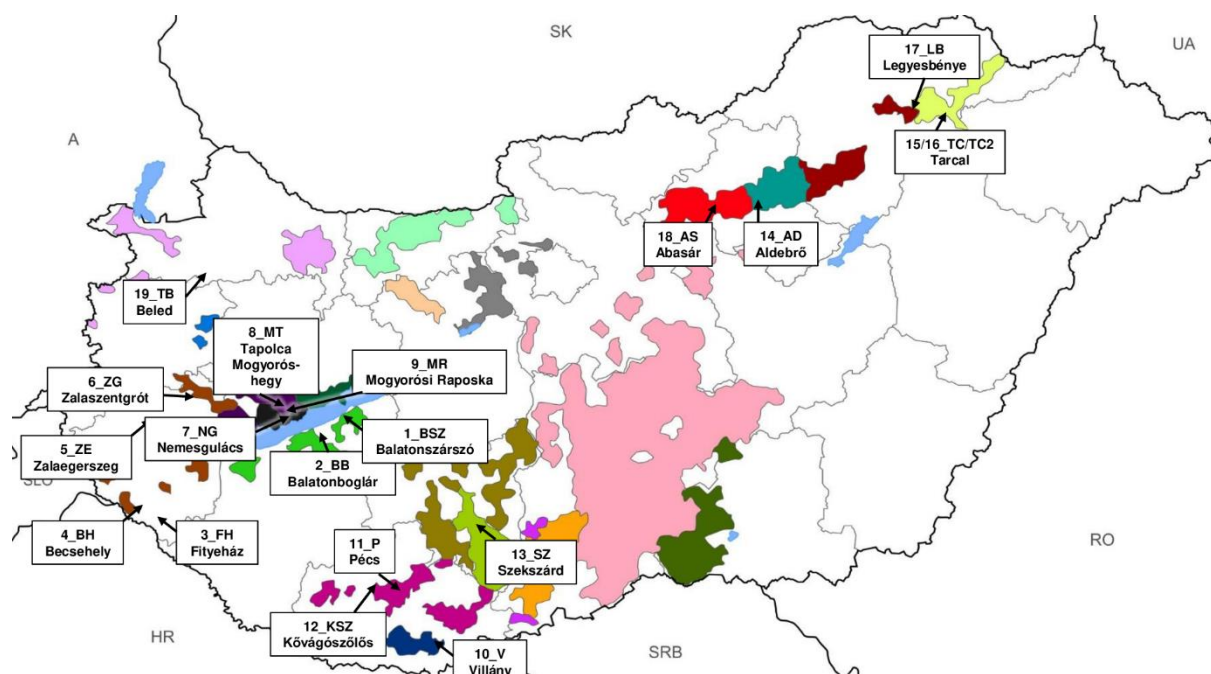
Az újgenerációs szekvenálás egyik legnagyobb előnye, hogy új vírusok detektálását is lehetővé teszi. Így sikerült leírunk számos, hazánkban újonnan megjelent virális kórokozót, melyek meglepő módon országszerte széles körben elterjedtek voltak, és az egyes újonnan megjelenő vírusok variánsai esetében nagymértékű genetikai variabilitást tapasztaltunk. Ilyen új vírusok a GRGV, GAMaV, GRVfV és meglepő módon a legnagyobb fertőzöttséget mutató GSyV-1 és GPGV vírusok. Két ültetvényben megtaláltuk a korábban hazánkban szőlőn már leírt RBDV vírust, illetve a világszerte még kevésbé ismert GSV szatellit vírust is. A dolgozatban szereplő vírus izolátumok szekvenciái és adatai elhelyezésre kerültek az NCBI GenBank, nemzetközi adatbázisban.

Eredményeinkből kitűnik, hogy a legtöbb esetben az ültetvények párhuzamosan több vírussal voltak fertőződve, sok esetben 10-13, illetve 2-3 vírus, viroid jelenlétét is tapasztaltuk egy-egy ültetvényben munkánk során (Függelék 1.táblázat). A jelenlevő vírusok száma és az ültetvény kora között azonban nem találtunk összefüggést. Az egyik legfertőzöttebb ültetvény (12_DF) több mint 100 éves és 12 vírust detektáltunk benne, míg egy alig egyéves ültetvényben (11_SZHU) 9 vírus egyidejű jelenlétét tapasztaltuk. Mindez arra enged következtetni, hogy a nagymértékű fertőzöttség és több vírus kevert fertőzésének együttes előfordulása a nem megfelelő, fertőzött szaporítóanyag használatának a következménye lehet. Ezt az elméletet támasztja alá a vírusok és variánsaik filogenetikai vizsgálatának eredménye, mely szerint egy adott vírus földrajzilag azonos helyről származó változatai filogenetikailag jelentősen eltérnek egymástól. A vírusok terjedésében az adatok alapján a kereskedelemnek és az ellenőrizetlen szaporítóanyag használatnak lehet a legnagyobb szerepe.

6.4.3 Szőlő alanyültetvények virológiai felmérése sRNS HTS-sel

A termő szőlőültetvények vírusfertőzöttségét vizsgáló felmérésünk eredményei azt mutatták, hogy a jelenlevő vírusfertőzések fő forrása maga a szaporítóanyag. A szőlő szaporítóanyag (általában oltvány) előállításakor a fajtajelleget – és a későbbi bor minőségét meghatározó fajtát a filoxérának ellenálló alanyra oltják, így a fertőzés a nemes fajtán kívül az alanyból is származhat. Szőlőalanyokat a XIX. század végi filoxéra vész óta használnak szerte Európában. Az akkori pusztítás után hazánk történelmi szőlőültetvényeinek 20-25%-át állították helyre oltványok segítségével. Míg az alanyok legfontosabb tulajdonsága napjainkban is a filoxéra-ellenállóság (még az újonnan megjelenő agresszív változatok ellen

is), az alany tulajdonságai határozzák meg többek között a szőlő ásványianyag- és vízfelvételét, valamint részben a tőke növekedését is. Egy új tanulmány szerint ezen kívül még a gyökér mikrobiális összetételére is hatással vannak, ami a szőlő terroir jellegét határozza meg (Marasco *et al.*, 2018). Az ültetvény telepítéskor a legmegfelelőbb alany kiválasztásakor ezeket a paramétereket mind figyelembe kell venni. E kihívásoknak megfelelően az elmúlt évszázadban számtalan alanyfajtát nemesítettek, de a Berlandieri-Riparia (SO4 és 5BB) és Berlandieri-Rupetris (110R, 1103P és 140Ru) hibridek közé tartozó öt fajta a kezdetektől megőrizte domináns szerepét (Ollat *et al.*, 2016). A Teleki Zsigmond által francia eredetű magoncpopulációkból előállított, illetve az ő anyagaiból más nemesítők által szelektált vonalak (Teleki 5C, Teleki-Fuhr SO4, Teleki-Kober 125 AA és a Teleki 5BB), a legkedveltebb alanyok közé tartoznak, és igen széles körben elterjedtek, így hazánkban is a leggyakrabban használt alanyok közé tartoznak (Pocza *et al.*, 2013). A Bakonyi Károly által nemesített Georgikon 28 szintén megtalálható hazánk alanyültetvényeiben, de a leginkább elterjedt alanyfajta, a francia eredetű Fercal (Laucou *et al.*, 2008). A hatályos jogszabályok szerint az oltványelőállításához használt nemes és alany szőlőnek is mentesnek kell lennie a legjelentősebb vírusoktól. Ugyan a modernebb módszerek, pl. az RT-PCR használata legalább 10%-kal érzékenyebb, mint az ELISA és a biotesztek, a hatósági teszteket még mindig szűrőpróba-szerűen ELISA tesztekkel végzik. Noha az új, metagenomikai megközelítésen alapuló nagy-áteresztőképességű szekvenáláson alapuló módszerekkel már több termő ültetvény diagnosztikai felmérésről készült tanulmány (Megrelishvili *et al.*, 2016, Buciumeanu *et al.*, 2010, Eichmeier *et al.*, 2018), az alanyültetvények fertőzöttségét bemutató diagnosztikai felmérésről nem tudunk. Munkánk során e hiányt pótlendő hazánk 17 alanyültetvényén és két szőlő alanygyűjteményben végeztünk virológiai felmérést sRNS-ek nagy-áteresztőképességű szekvenálásával (95. ábra).



95. ábra Hazánk szőlő alanyültetvényeinek vírusdiagnosztikai felmérése során mintázott ültetvények mintavételi helyei az sRNS könyvtár azonosítókkal.

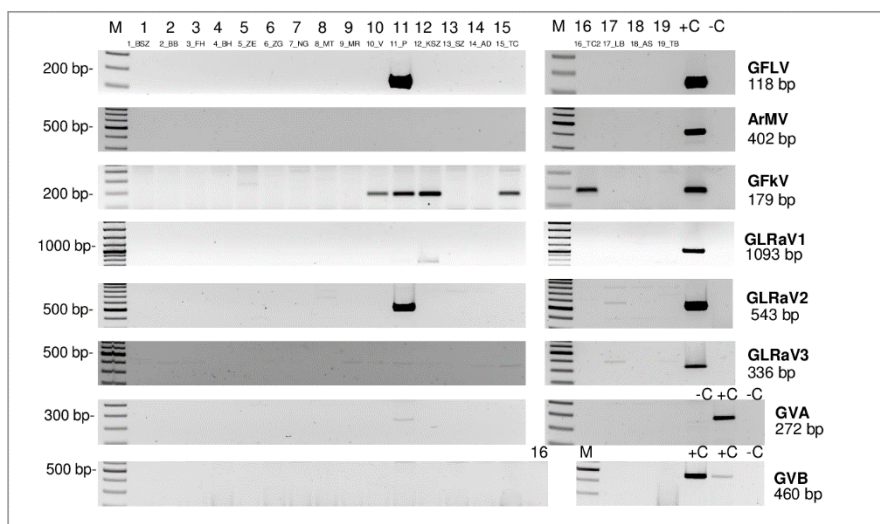
Magyarország 10 borvidékén, összesen 17 szőlőalany-ültetvényben történt a mintagyűjtés, amit úgy végeztünk el, hogy a véletlenszerűen kiválasztott 10-20 tőke az adott

ültetvény összes fajtáját képviselje. Így összesen 11 alanyfajtáról: Fercal, 5C, 5BB, S.O.4, Ruggeri, 125AA, Georgikon 28, Richter 110, Börner, Berlandieri, Paulsen; valamint két szőlőalany fajtagyűjteményt is vizsgálva további több mint 30 fajtájáról gyűjtöttünk mintát. A mintavétel a leveleken kívül hajtáscsúcsra, kacsra, és ahol volt lehetőség, a virágra is kiterjedt. Az egyedekből tisztított RNS kivonatokat ültetvényenként egyesítettük és 19 sRNS könyvtárat készítettünk, amelyet Illumina platformon szekvenáltattunk. A bioinformatikai elemzés eredményeit kísérletesen RT-PCR módszerrel igazoltuk vissza.

A könyvtárak szekvenálásakor 12,8-26,4 millió nyers szekvenciát kaptunk, melyeket a korábbiakkal ellentétben nem scripteken alapuló, korábban használt pipeline-nal, hanem a Qiagen CLC Genomic Workbench programcsomagjával elemeztünk (Az elemzés során kapott eredményeket független módszerrel – RT-PCR-rel igazoltuk vissza (Függelék 2. táblázat).

6.4.3.1 Az alanyültetvények mentesek voltak a vizsgálatköteles vírusoktól

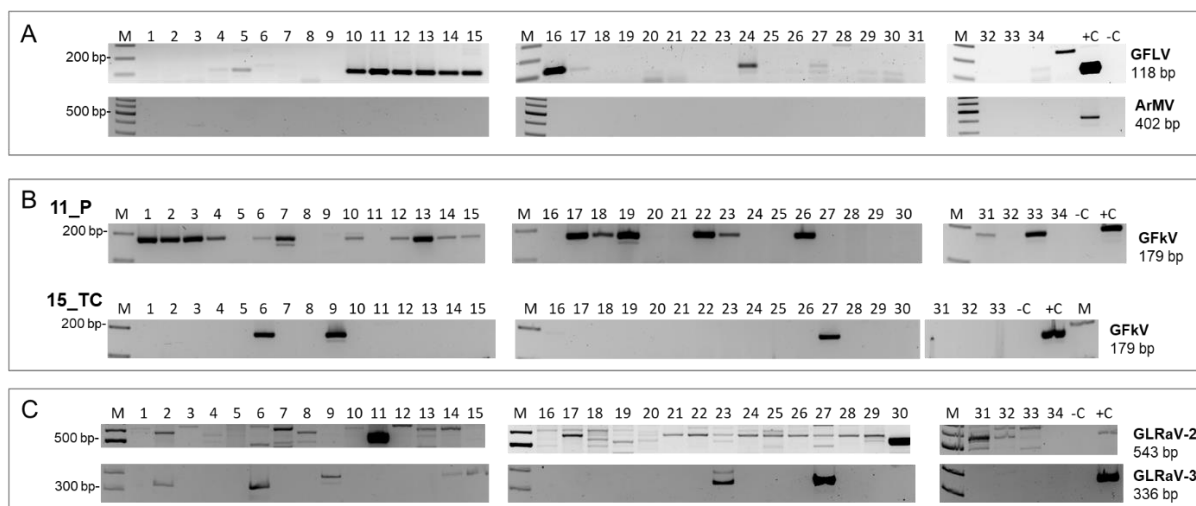
Hazánkban szőlő ültetvényeken vizsgálatköteles vírusok: GFLV, ArMV, GFkV, GLRaV1-3, GVA, GVB. A rendszeres szűréseknek köszönhetően az ültetvényeket mentesnek találtuk ezektől a vírusoktól, kivéve a 10_V, 12_KSZ és 12_TC2 ültetvényeket, ahol a GFkV jelenlétét észleltük. Az sRNS HTS eredményeinek visszaigazolása alátámasztotta ezt (96. ábra).



96. ábra Az sRNS HTS validálása RT-PCR-rel az alanyültetvényeken a vizsgálatköteles vírusok esetében (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

A fajtagyűjteményekben ez a rendszeres ellenőrzés nincs jelen. Az általunk vizsgált pécsi ültetvény kb. 20 éves, míg a tarcali igen fiatal, csupán 2 éves. Míg Pécsen GFLV, ArMV, GFkV és GLRaV-2 fertőzést is találtunk, Tarcalon csupán GFkV fertőzés mutatott az sRNS HTS (97. ábra).

Az eredmények RT-PCR-rel való visszaigazolása a GFLV (34-ből 13 egyed volt Pécsen fertőzött), a GFkV (Pécsen 19 egyed volt fertőzött, Tarcalon csupán 33-ból 3) és a GLRaV-2 (Pécsen volt jelen 3 egyedben) esetében sikeres volt.



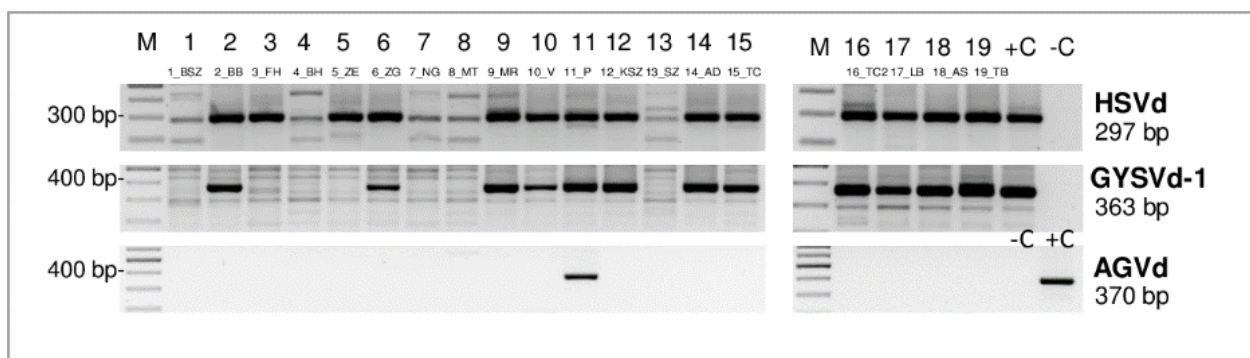
97. ábra Az sRNS HTS validálása RT-PCR-rel az alany fajtagyűjteményekben a vizsgálatköteles A/ Nepovírusok, B/ GFkV és C/ levélsodródás vírusok esetében. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

Noha detektáltuk az ArMV jelenlétét Pécsen, a vírus jelenlétét nem tudtuk RT-PCR-rel visszaigazolni. A GFLV és az ArMV igen közeli rokon Nepovírusok (mindkét RNS-ük igen hasonló – 72%-ban azonos). Amikor az ArMV-nek azonosított kontigokat az NCBI-ban található nem referencia genomokhoz hasonlítottuk azt vettük észre, hogy azok egy, a referenciagenomtól különböző variánshoz hasonlítanak (GFLV-GHu). Ezt a variánst hazánkban találták egy esettanulmány kapcsán, mely az egy növényben előforduló rokon vírusok között kialakuló interspecifikus hibridekről szólt (Vigne *et al.*, 2008). Az elemzés során találatot kaptunk a szőlő deformációs vírusra is (Grapevine deformation virus), mely a GFLV-GHu-hoz hasonlóan egy GFLV-ArMV hibrid. Az RT-PCR valószínűleg azért lett negatív, mert az ArMV diagnosztikai primerek erre a hibridre nem specifikusak. Így csupán azt mondhatjuk biztosan, hogy a pécsi fajtagyűjteményben jelen van egy ehhez hasonló hibrid nepovírus. A GLRaV-3 esetében pont az ellenkező problémával szembesültünk. Ugyan nem kaptunk GLRaV-3 specifikus kontigot az elemzés során, a vírus lefedettsége (annak ellenére, hogy egy 18000nt hosszú vírusról van szó), igen magas (87,1 %) volt. Amikor az ültetvényen jelenlevő egyedekben egyenként vizsgáltuk a vírus jelenlétét 4 pozitív mintát is találtunk. Ez esetben valószínűleg az történt, hogy a keverékként elemzett több negatív minta a keverék készítésénél a detektálási határ alá hígította a GLRaV-3 specifikus sRNS-ek koncentrációját. Ezt a jelenséget korábban, a termő ültetvények felmérésénél is tapasztaltuk, és arra hívja fel figyelmünket, hogy a sRNS könyvtár készítésekor maximálisan 8-10 egyed RNS-eit használhatjuk fel. Ennél több egyed RNS-ének keverése során az adott vírust nem tartalmazó minták meghígítják az esetlegesen fertőzött egyedekből származó keveréket, ami álnegatív eredményhez vezethet.

6.4.3.2 Az alanyok viroidokkal fertőzöttek

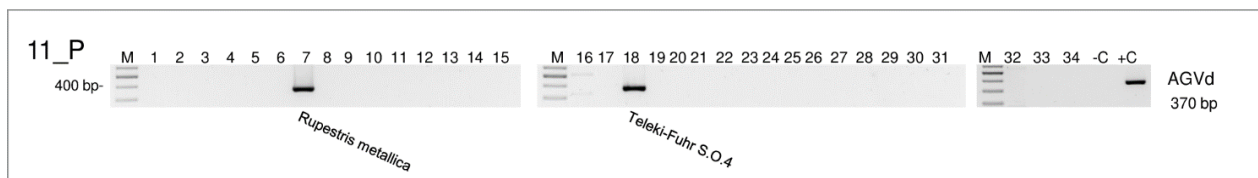
A könyvtárak bioinformatikai elemzése azt mutatta, hogy a HSVd mindenütt jelen van. Ugyan a normalizált redundáns readok száma néha a határérték alá esett, a viroid lefedettsége minden könyvtárban 100%-os volt. A GYSVd-1 viroid szintén gyakori, de nem volt jelen minden ültetvényen: az 1_BSZ, 3_FH, 5_ZE, 8_MT és a 13_SZ mind mentes volt e viroid

fertőzésétől. A pécsi alanygyűjteményben ezen kívül még egy: az ausztrál szőlő viroid (AHVd) fertőzését mutató kontigokat is találtunk. A viroidok jelenlétének validálása RT-PCR-rel a HSVd esetében sikeres volt (98. ábra)



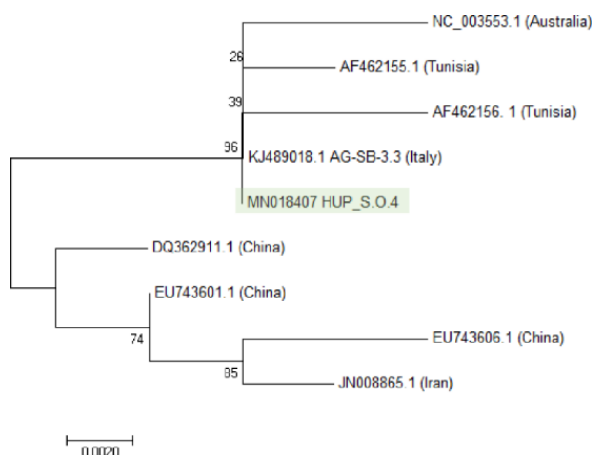
98. ábra Az sRNS HTS validálása az alanyültetvényeken a szőlőt fertőző viroidok esetében RT-PCR-rel. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

A GYSVd esetében a 4_BH mintában nem tudtuk a viroid jelenlétét kimutatni. Itt ugyan találtunk viroid specifikus kontigot, a normalizált redundáns readok száma kisebb volt, mint 200. Így lehetséges az, hogy ebben a mintában nem a GYSVd-1, hanem az ehhez hasonló, közel rokon GYSVd-2 volt jelen és a primerek ezt a variánst nem tudták felszaporítani. De ennek az elméletnek a bizonyításához további kísérletek szükségesek. Az AHVd-t a fajtagyűjteményben 2 fajtában is megtaláltuk (99. ábra).



99. ábra Az AHVd fertőzött fajták kimutatása RT-PCR-rel. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

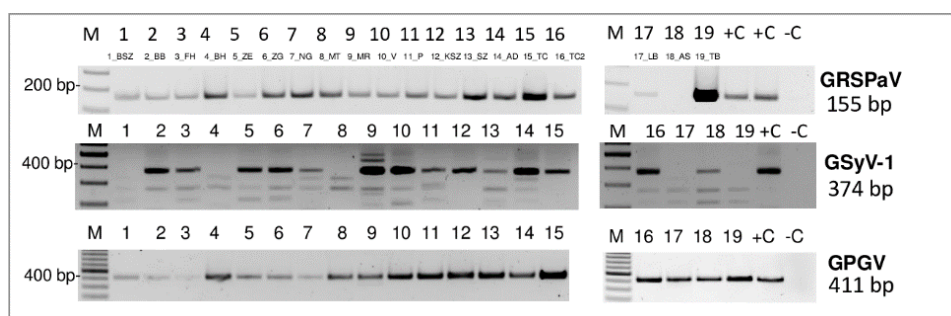
Mindkét AHVd fertőzött egyedből felszaporítottuk a teljes viroid genomot és hagyományos szekvenálással meghatároztuk a bázissorrendjét, ami azonosnak mutatkozott. A variáns az olasz, tunéziai és ausztrál variánssal mutat szorosabb rokonságot, az ázsiai variánsoknak távolabbi rokona. Sajnos azt nem tudjuk, hogy ezek a fajták honnan kerültek a fajtagyűjteménybe (100. ábra).



100. ábra A pécsi fajtagyűjteményben azonosított AHVd rokonsági vizsgálata.

6.4.3.3 A nem vizsgálatköteles vírusok szinte minden alanyültetvényen megtalálhatóak

A nem regulált vírusok közül könyvtárainkban a GRSPaV-t, a GPGV-t és a GDefV-t azonosítottuk. A GDefV-ről a korábbiakban ejtettünk szót. Ez a vírus valószínűleg egy, vagy több GFLV, ArMV hibrid jelenlétét jelzi a pécsi gyűjteményben. A GRSPaV esetében a korábbi munkáinkhoz hasonlóan azt találtuk, hogy ugyan az sRNS HTS nem mindig mutatta ki a jelenlétét, de RT-PCR módszerrel a mintákban detektálni tudtuk. Ugyan az sRNS HTS-sel csupán a 19_TB-ben volt kimutatható (ezt a könyvtárat hajtató vasszöből tisztított RNS-ből készítettük), az RT-PCR a 18_AS minta kivételével jelenlétét mindenütt kimutatta (101. ábra).

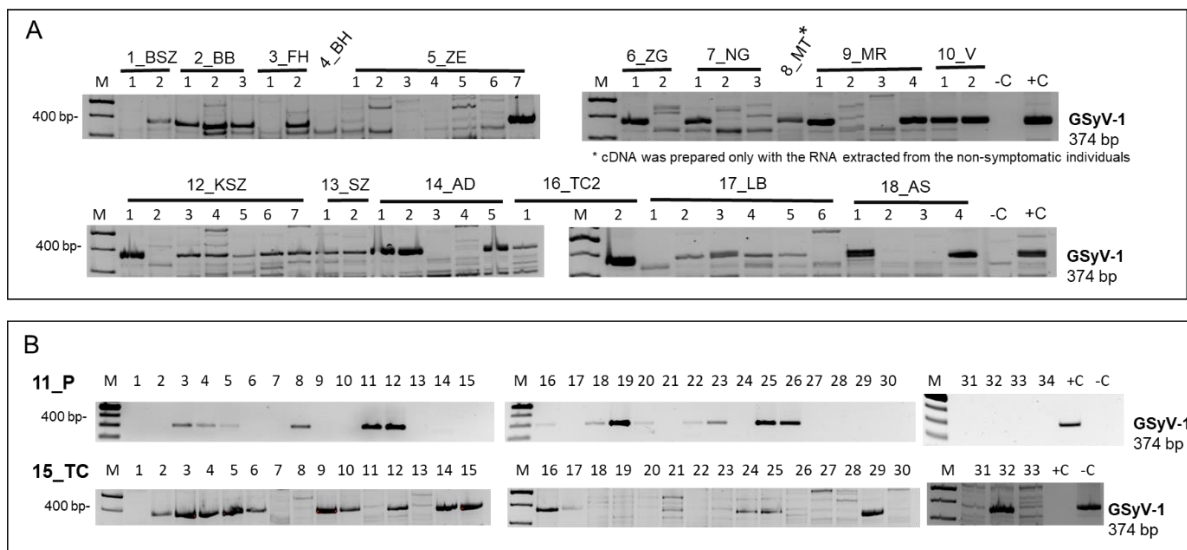


101. ábra Az sRNS HTS validálása RT-PCR-rel az alanyültetvényeken a nem regulált vírusok esetében. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

Ennek okát sajnos még mindig nem tudjuk, de szerepet játszhat benne: a/ az, hogy a vírus variánsai jelentősen különböznek (így, ha ne a referencia genomhoz hasonló variáns van a mintánkban esetleg nem mutatjuk ki), b/ a vírus VSR-e nem ismert, ha esetleg van és az gátolja az sRNS-ek keletkezését, akkor szintén félrediagnosticszálhatjuk jelenlétét ezzel a módszerrel, c/ a GRSPaV esetében kimutatták, hogy a hosszú ideig tartó koevolúció a vírus és a szőlő számára kölcsönös előnnyel járhat (Gambino et al., 2012), ami szintén csökkentheti a gazda védekezési reakcióit a vírus ellen.

Az sRNS HTS eredményét tanulmányozva meglepeten tapasztaltuk, hogy a GSyV-1 specifikus kontigot nem találtunk, annak ellenére, hogy a termő ültetvényeken igen elterjedt volt. A GSyV-1 európai variánsai sokkal diverzebbek, mint az amerikai variánsok, ezért a

kontigok azonosítását elvégeztük, egy európai (SK-30)(Glasa *et al.*, 2015) variáns szekvenciáját használva.

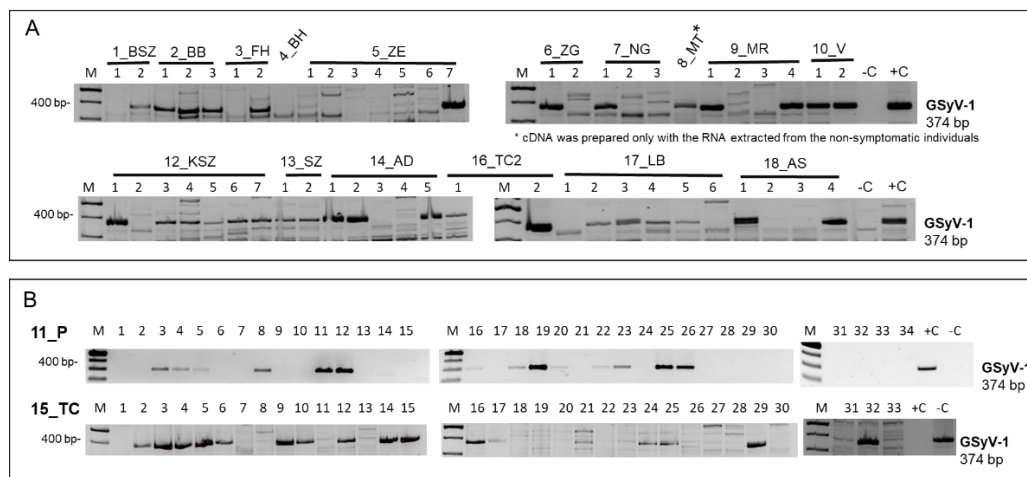


102. ábra Az sRNS HTS validálása RT-PCR-rel a GSyV-1 esetében az **A/** alanyültetvények, illetve a **B/**alany fajtagyűjtemények egyedeire. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítók, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

Ekkor már 6 könyvtárban találatot kaptunk a vírusra. RT-PCR segítségével további könyvtárakban, összesen 14-ben tudtuk kimutatni a jelenlétét (102. ábra).

Tovább vizsgálva a fajták fertőzöttségét a különböző ültetvényeken azt találtuk, hogy a fajták GSyV-1 fertőzöttsége nem egyenletes (102. ábra), ami azt jelzi, hogy a fertőzés nem az ültetvényben történt, hanem nagy valószínűséggel az alany ültetvénybe már a fertőzött szaporítóanyag került telepítésre.

A termőültetvényeken tapasztaltakkal összhangban GPGV specifikus kontigot minden könyvtárban találtunk, és a vírus jelenlétét minden könyvtárban sikeresen visszaigazoltuk (103. ábra). A GSyV-1-hez hasonlóan a fajták GPGV fertőzöttsége sem volt egyenletes (103. ábra).



103. ábra Az sRNS HTS validálása RT-PCR-rel GPGV esetében. A/ az alanyültetvényeken és a B/ fajtagyűjteményekben. (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, 1-18: a vizsgált ültetvények és azonosítóik, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

A GPGV igen elterjedt szerte Európában. Ugyan még mindig nem ismert pontosan, hogy mi az, ami a latens és tüneteket okozó variánst megkülönbözteti, az biztos, hogy a tüneteket okozó variánsok mozgási fehérjéjét kódoló ORF egy hat aminosavval rövidebb fehérjét kódol (Saldarelli *et al.*, 2015). Hazánkban eddig egyetlen esetben találtunk ilyen tünetes variánst, Csókakőn egy olasz szaporításból telepített Pinot gris ültetvényben (egyetlen tőké, 9. ábra). A termőültetvények felmérésekor ezt a variánst nem találtuk meg, míg az alanyültetvényeken négy esetben ezt a tüneteket okozó variánst is ki tudtuk mutatni (104. ábra).

Felmérésünk során, sRNS HTS-sel alanyültetvényeket és alany fajtagyűjtemények vírusfertőzöttségét vizsgáltuk szerte az országban. A felmérés során az adott ültetvény egyedeinek RNS-éből készített keveréket vizsgáltunk. Azzal, hogy az indexelésen kívül ezt a stratégiát használtuk, további költséghatékonyan növeltük az ültetvény reprezentáltságát. Azonban, ha ilyenkor csak egy egyed fertőzött a keverékben, annyira lecsökkenhet az sRNS koncentráció, hogy álnegatív eredményt kapunk. Tapasztalataink szerint ezért 8-10 mintánál többet nem érdemes egy keverékként kezelni.

könyvtár kód	Fercal		5C		5BB		S.O.4		Ruggeri		125AA		Georgikon		Richter		Börner		Berlandieri		Paulsen	
	GSyV1	GPGV	GSyV1	GPGV	GSyV1	GPGV	GSyV1	GPGV	GSyV1	GPGV	GSyV1	GPGV	GSyV1	GPGV	GSyV1	GPGV	GSyV1	GPGV	GSyV1	GPGV	GSyV1	GPGV
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_MT																						
9_MR				CAA																CAA		
10_V						CAA																
11_P			4.6		3.8																	
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																
az adott fajta gyakorisága		14		11		9		7		6		4		3		3		2		1		1
a fajta adott vírussal való fertőzöttsége %	GSyV1	4	9	7	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	GPGV	28,57	81,82	77,78	57,14	33,33	50	50	50	50	50	50	33,33	33,33	50	50	50	50	100	100	100	100

104. ábra A szőlőalany-ültetvényeken és fajtagyűjtemények fajtáinak GSyV-1 és GPGV vírusokkal való fertőzöttségének összehasonlító táblázata. (a szürke cellák jelzik, ha az adott fajta jelen volt az ültetvényen. sárga szín jelzi, ha a GSyV-1, míg zöld, ha a GPGV pozitív mintákat. A GPGV esetében feltüntetttük a tünetet okozó variánssal kapcsolt triplet fajtáját is)

Az alanyültetvények felmérése tovább erősítette azt az elképzelésünket, hogy a jövőben a rutin diagnosztikát bizonyos esetekben a HTS alapú módszernek kell felváltania, illetve kiegészítenie. Ahhoz azonban, hogy ezt elérjük, további standardizálások szükségesek, és feltétlenül össze kell hangolni a használt bioinformatikai módszereket. Az sRNS HTS validálás sok esetben nem sikerült, és ennek oka általában nem is a bioinformatikai módszerekben, hanem a nem megfelelő, vagy nem elegendő referencia szekvenciában keresendő. Azt

gondoljuk, hogy az adatbázisban található szekvenciák alapján készített „mester” referencia szekvenciák használata a jövőben jó megoldás lehet ilyen problémákra.

6.4.4 Kajszi törzsültetvények vizsgálata sRNS-ek újgenerációs szekvenálásával

A kajszi (*Prunus armeniaca*) hazánk kedvelt gyümölcsfája, hiszen nemcsak friss gyümölcsként fogyasztjuk, hanem lekvárt és pálinkát is készítünk belőle. 1950 óta intenzív nemesítési program folyik, melynek során sok új államilag elismert magyar fajtát nemesítettek. A nemzetközi rutinnak megfelelően (Varveri *et al.*, 2015) az új, elismert fajták vírusmentes anyafáit izolátorháló alatt tartják, hogy megelőzzék a vírus, elsősorban PPV fertőzéseket. A szaporítóanyag előállítás azonban nem ezekről a fákról, hanem ezek szabadföldi törzsültetvényekben fenntartott utódairól történik.

A kajszit sok virális patogén fertőzheti, melyek közül Magyarországon a PPV, a PNRSV, a szilva törülés vírus (prune dwarf virus - PDV), a kajszi látens vírus, az alma mozaik vírus, az alma klorotikus levélfoltosság vírus vizsgálatköteles vírusok, így jelenlétüket rendszeresen ellenőrizni kell a törzsültetvények egyedeiben (Barba *et al.*, 2015). Ezeket a hatósági tesztek hagyományos vírus diagnosztikai módszerekkel (DAS-ELISA és RT-PCR) végzik, melyek ugyan érzékenyek, de csak az adott, éppen tesztelt kórokozó kimutatására alkalmasak. Az elmúlt évtizedben a szekvenálási módszerekkel párhuzamosan a gyümölcsfák HTS alapú diagnosztikája is rohamosan fejlődött (Barba *et al.*, 2014, Boonham *et al.*, 2014, Hadidi *et al.*, 2016, Jones *et al.*, 2017). Tünetes fák HTS analízise számos új variáns, vagy eddig nem ismert vírus azonosítását eredményezte (Elbeaino *et al.*, 2014a, Marais *et al.*, 2016, Marais *et al.*, 2014, Villamor *et al.*, 2017, Acevedo-Garcia *et al.*, 2017b), és különböző variánsok egyidejű előfordulását és rekombinációs eredetüket derítette fel (Marais *et al.*, 2014, Koloniuk *et al.*, 2018, Marais *et al.*, 2016). HTS-sel vizsgálva a tünetmentes egyedeket új területeken (Šafářová *et al.*, 2016) és új gazdanövényben is találtak eddig nem detektált vírusokat (Šafářová *et al.*, 2016, Gilbertson *et al.*, 2018).

A CVA-t cseresznye gazdanövényben Jelkmann írta le Németországban (Jelkmann, 1995). Azóta ezt a capillovirust (genus a *Betaflexiviridae* családban) szerte a világon megtalálták, cseresznyén és meggyen is viszonylag gyakran előfordul (Gao *et al.*, 2017, Marais *et al.*, 2012). Több más *Prunus* gazdát (kajszi, őszi, szilva, japán kajszi) is fertőz (Kesanakurti *et al.*, 2017, Marais *et al.*, 2008, Marais *et al.*, 2012) és azonosítása sem biológiai indexeléssel, és (ellenanyag hiányában) ELISA-val sem lehetséges. A HTS megjelenése óta gyakran más jól ismert gyümölcsfákat fertőző vírussal együtt, kevert fertőzésekben azonosították, így nagyon nehéz jelenlétét speciális tünetekhez kötni (Marais *et al.*, 2012). Bár önmagában látens, nem okoz tüneteket, más vírusokkal együtt felerősítheti azok tüneteit. Vektorát eddig még nem azonosították, de oltással, szemzéssel nagyon könnyen átvihető, így a jelenlétét tanácsos elkerülni a faiskolákban. A CVA genomja pozitív egyszálú RNS, két ORF-et kódol: az ORF1 a replikáz és a köpenyfehérje, míg az ORF2 egy elcsúsztatott leolvasási keretben egy feltételezett mozgási fehérjét kódol.

A LChV1 a *Closteroviridae* család *Velarivirus* nemzettségébe tartozik és egy elaprosódó gyümölcsöt termő cseresznyén írták le (Keim-Konrad & Jelkmann, 1996). Azóta eltérő variánsait különböző rendellenességekhez társították, mint a Kwanzan törpülés (Di Serio *et al.*, 2009) és Shirofugen törpülés betegségek (Candresse *et al.*, 2013). Cseresznyén szerte a világban megtalálták (Glasa, 2015, Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.*, 2005, Komorowska & Cieślińska, 2004, Bajet *et al.*, 2008), sokszor a CVA-val közös fertőzésben. Igen sokféle gazdanövényben kimutatták (mandula, őszi, szilva) (Glasa, 2015, Di Serio *et al.*, 2009) és nemrég kajszin is leírták az előfordulását (Šafářová *et al.*, 2016). Oltással átvihető, és ugyan a közeli rokonát a cseresznye aprógyümölcsűség vírus 2-t viaszos pajzstetvek terjesztik, a

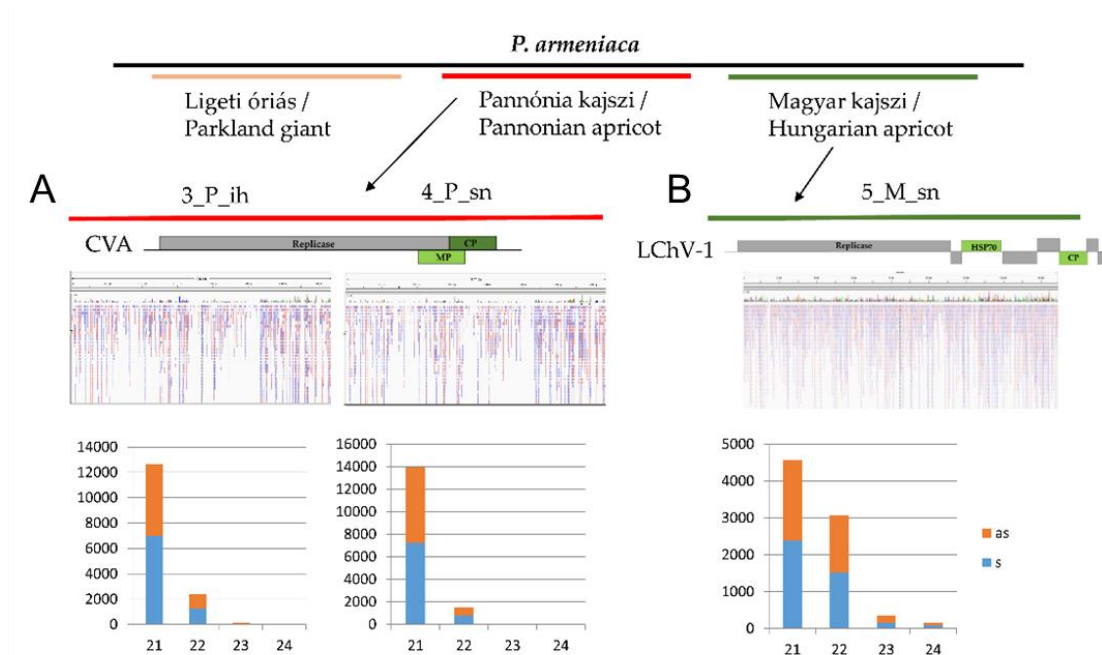
LChV1-nek eddig nem azonosították a vektorát. Pozitív egyszálú RNS genomja 8 ORF-et kódol, köztük az ORF3 egy hősokkfehérjét (HSP70), az ORF5 és 6 pedig két köpenyfehérjét (Katsiani *et al.*, 2018).

6.4.4.1 sRNS-ek újgenerációs szekvenálásával detektáltunk a CVA-t és LChV1-et kajsziiban

A gyümölcsfák virológiai felméréséhez a NAIK GYKI Elvira telepén kajszi fákról gyűjtöttünk levélmintákat. Olyan fajtákat választottunk, melyekből az izolátorházban és a törzsültetvényeken tartott egyedeken kívül a vírusmentesített *in vitro* tenyészetek is hozzáférhetőek voltak. Három ismert kajszi fajta (Ligeti óriás, Pannónia és Magyar kajszi) izolátorházban és szabadföldi törzsültetvényben fenntartott egyedeiről gyűjtöttünk levélmintákat. RNS-t Gambino és munkatársai által leírt, a laborunkban optimalizált CTAB alapú módszere alapján tisztítottunk (4.2.2.). Hat sRNS könyvtárat készítettünk, kettő-kettő mindhárom fajtából, melyekhez az izolátorházban és a szabadföldön talált egyedek RNS kivonatainak keverékét használtuk fel.

Az Illumina szekvenálás eredményeit bioinformatikai módszerekkel elemeztük (4.7.5). Az elemzés során a PPV fertőzést azonosítottunk a Ligeti óriás és a Magyar kajszi szabadföldi egyedeiben. Az egyedi fák PCR tesztje azonban megmutatta, hogy csupán 1-1 egyed volt fertőzött (105. ábra).

A PPV-re illeszkedő readeken kívül találatot kaptunk a CVA és a LChV1 vírusokra. A Pannónia kajszi izolátorházban és szabadföldön tartott egyedeinek keveréke is tartalmazott CVA specifikus sRNS-eket, míg LChV1 specifikus readeket csak a Magyar kajszi szabadföldi egyedeiben tudtunk azonosítani.

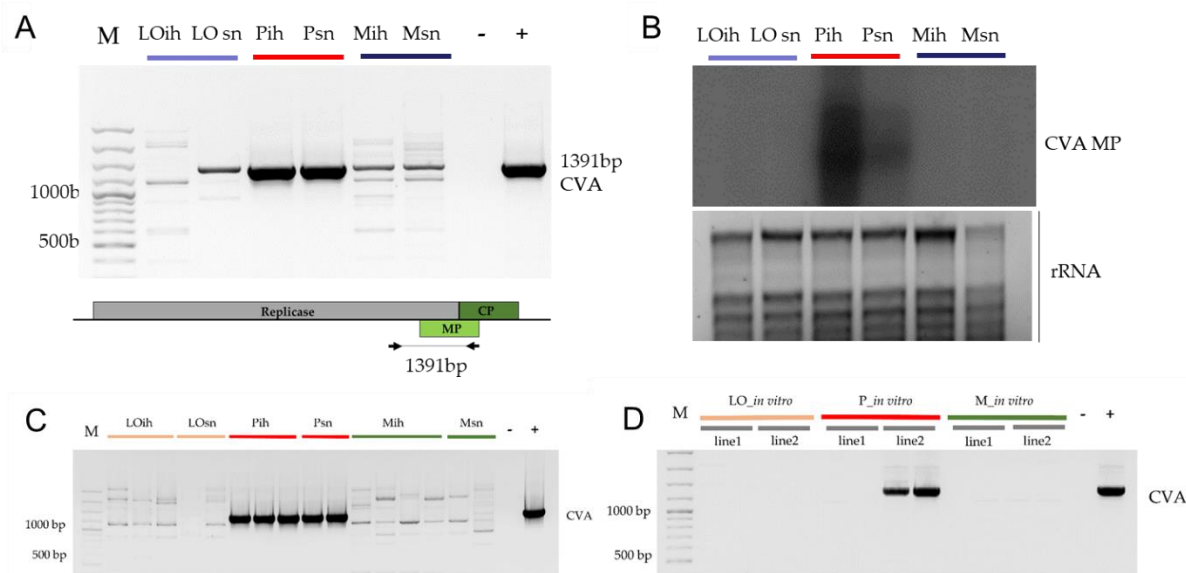


105. ábra A sárgabarack sRNS könyvtárak bioinformatikai analizisének eredménye azt mutatta, hogy a Pannónia kajszi minták A/ CVA, míg a Magyar kajszi törzsültetvényben található egyedei B/ LChV1 vírussal fertőzöttek. A vírus genomok sematikus ábrája alatt az illeszkedő sRNS readeket tüntettük fel. Az oszlopdiagrammok a vírusra illeszkedő readek méreteloszlását mutatják (kék – sense, piros/narancs – antisens irányultságú readek)

Az sRNS olvasatok mindkét vírus esetében az egész genomról elosztva képződtek. A CVA és LChV1 specifikus readek nagyrésze 21nt hosszú volt, de a LChV1-ről egészen sok 22nt hosszú sRNS is keletkezett, ami arra utal, hogy a DCL4-en kívül a DCL2 is részt vesz a biogenezisében (105. ábra) (Pantaleo *et al.*, 2010, Parent *et al.*, 2012).

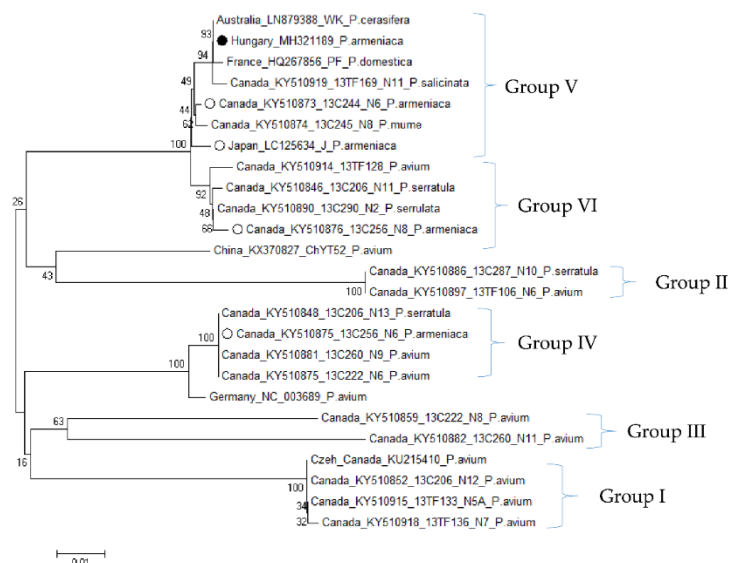
6.4.4.2 A CVA jelenlétének igazolása független módszerekkel

A CVA jelenlétét a Pannónia kajszi egyedeiben validálni tudtuk nemcsak RT-PCR-rel, amihez a vírus feltételezett mozgási fehérjéjére terveztünk indítószekvenciákat, hanem Northern blottal is (106. ábra/A, B). Ezen elemzések nemcsak azt mutatták ki, hogy a vírus az izolátorházban is jelen van, hanem azt is, hogy a fajta összes egyede fertőzött a vírussal (106. ábra/C).



106. ábra A CVA jelenlétének vizsgálata A/, C/, D/ RT-PCR-rel, B/ Northern blottal. C/ az összes egyed, D/ az izolátorházi egyedek szaporításakor felhasznált *in vitro* vonalak vizsgálata. (LO- Ligeti óriás, P-Pannónia, M-magyar kajszi, ih-izolátorház, sn-törzsültetvény) (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

Ez az eredmény azt a lehetőséget is felveti, hogy a vírus nem a környezetből jutott valahogyan a fába, hanem az anyafákban már benne volt, és a vírusmentesítés nem tudta azt hatékonyan eltávolítani. Éppen ezért leteszteltük a még fellelhető *in vitro* vonalak egyedeit és azt találtuk, hogy az egyik vonal mindkét *in vitro* egyede fertőzött volt a vírussal (106. ábra/D), ami alátámasztotta feltételezésünket. Mivel a CVA nincs a kötelezően tesztelendő vírusok listáján, a vírusmentesítés során nem is ellenőrizték a jelenlétét. A CVA jelenlétét eddig nem hozták összefüggésbe látható tünetek vagy betegségek kialakulásával, különösen nem kajszin. Mivel azonban más vírusokkal együtt előfordulva erősítheti azok tüneteit, a jövőben mindenképpen fontos lenne elkerülni a jelenlétét a szaporítóanyagban. Az RT-PCR reakciót nemcsak poolokból, hanem egyedekből is elvégeztük hibajavításra képes Q5 DNS polimerázt használva. Az így kapott terméket klónoztuk és szekvenciáját hagyományos Sanger szekvenálással is meghatároztuk (GenBank azonosító: MH321189). A klón a referencia genommal (NC_003689.1) nukleinsav szinten 92%-os aminosav szinten 91% homológiát mutat.

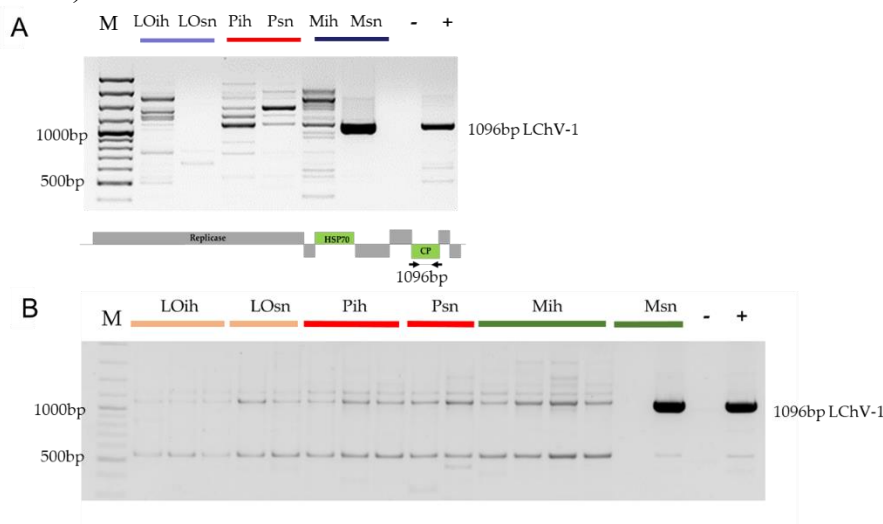


107. ábra A Pannónia kajsziról izolált CVA amplifikált régiójának filogenetikai analízise.

Filogenetikai analízise szerint a CVA V-ös csoportjába tartozik. Ez a csoport a nem cseresznye gazdáról leírt CVA-kat tartalmazza, köztük egy *P. armeniacaról* izolált CVA-t is (107. ábra). A különböző gazdák között a mozgási fehérjében levő nagyfokú homológia felveti azt a kérdést, hogy a vírus adaptációja során vajon miért nem alakult ki nagyobb változatosság, ahogy azt már Gao is megkérdőjelezte (Gao et al., 2017).

6.4.4.3 A LChV1 jelenlétének igazolása független módszerekkel

A kajsziról nem volt ismert, hogy a LChV1 gazdája lenne. Ráadásul ezzel a vírussal való mechanikai fertőzés is kudarcba fulladt (Jelkmann *et al.*, 1997). Eredményeink első, a 24. ICVF-en való bemutatásával egyidejűleg egy cseh kutatócsoport is beszámolt a kajszin való előfordulásáról (Šafářová *et al.*, 2016). A mi mintáinkban a LChV1-et Magyar kajszin szabadföldi fáinak sRNS könyvtárában azonosítottuk, és RT-PCR-rel vissza is igazoltuk a jelenlétét (108. ábra).

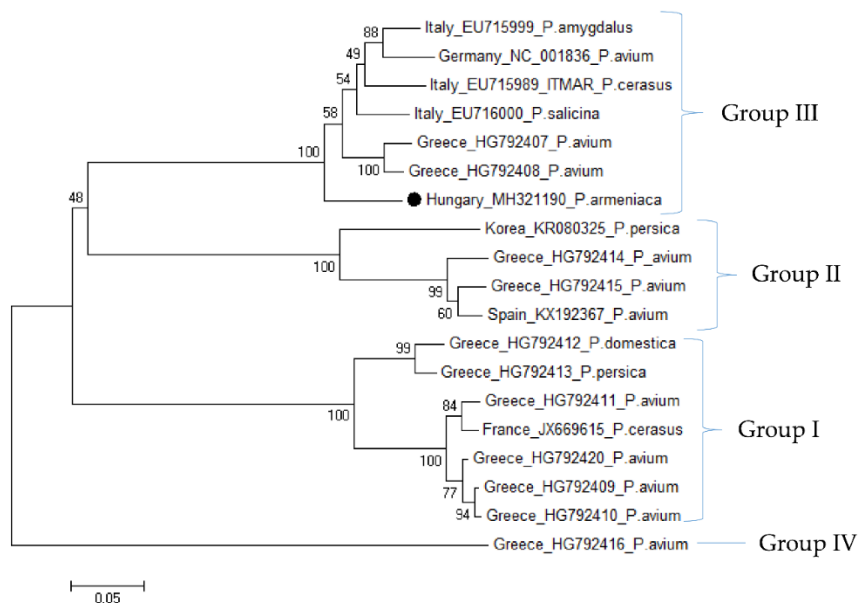


108. ábra A LChV1 jelenlétének visszaigazolása az a/ sRNS könyvtárakban, a b/ a Magyar kajszin törzsültetvényben fenntartott egyedeiben RT-PCR-rel. (LO-Ligeti óriás, P-Pannónia, M-magyar kajszin, ih-izolátorház, sn-törzsültetvény) (M: GeneRuler 100bp Plus DNS Marker, +K: fertőzött növényből kivont RNS-ről írt cDNS templát, -K: MQ víz)

Indítószekvenciákat nemcsak a köpenyfehérjére, hanem a rokonsági vizsgálatok során sokszor használt hősokkfehérjére is terveztünk. Ezek diagnosztikai célra nem megfelelőek (több-kevesebb aspecifikus terméket is amplifikálnak), de arra alkalmasak voltak, hogy a mintáinkból olyan terméket sokszorozzanak, amit klónozni tudtunk, és hagyományos Sanger szekvenálással is ellenőriztünk (GeneBank azonosító: MH321190 és MH321191). A vírus variáns nukleinsav szinten 92/95%, míg aminosav szinten 93/96%-ban azonos a referencia genommal (NC_001836.1). A fajta *in vitro* klónjainak tesztje azt mutatta, hogy a vírus az *in vitro* vonalakban nem fordul elő, ahogy azt valószínűsítettük is, hiszen az izolátorházban sem volt jelen. Ez arra utal, hogy a fertőzés a szabadföldön, a környezetből eredeztethető. A LChV1-et egyes feltételezések szerint a LChV2-höz hasonlóan a pajzstetvek terjesztik (Jelkmann *et al.*, 1997). Attól függetlenül, hogy ez igaz-e, a kajszi ültetvények közelében található cseresznye és meggy ültetvény akár fertőzési forrásul is szolgálhatott. Az egyedek vizsgálata azt mutatta, hogy csupány egyetlen fa volt fertőzött, de ez elegendő volt ahhoz, hogy leírjuk a LChV1-et a Magyar kajszi fajtáról. A dolog érdekessége, hogy a Csehországban leírt variánsot is ezen a fajtán, Magyar kajszin találták. A Magyar kajszi klónszelekcióval nemesített fajta, így nem elképzelhetetlen, hogy a LChV1 már hosszú ideje jelen van benne.

A magyar izolátum filogenetikai analízise szerint a III-as csoportba tartozik, ahová az olasz ITMAR izolátum (109. ábra), ami viszont a Kwanzan törpeség fő okozója (Candresse *et al.*, 2013).

A LChV1 köpenyfehérjék különböző országok és gazdafajok izolátumainak összehasonlítása szerint a legközelebbi rokona egy olasz *P. salicina*-ról és egy görög *P. avium*-ról leírt variáns. A HSP70h-t kódoló szakasz összehasonlítása alapján viszont a német referencia és az olasz ITMAR izolátum a legközelebbi rokona.

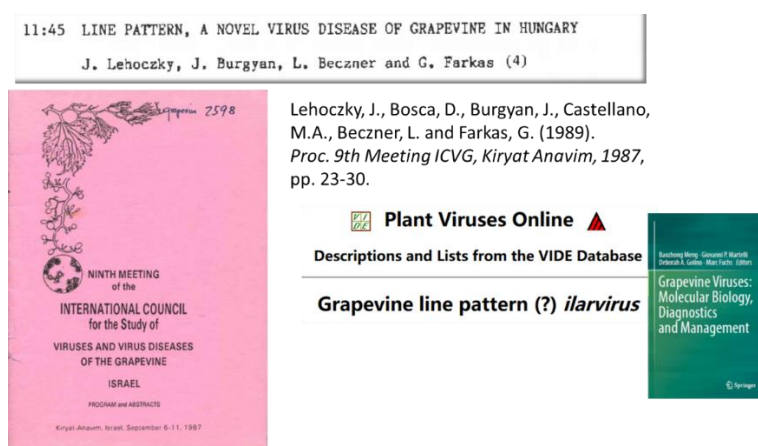


109. ábra A Magyar kajsziról izolált LChV1 amplifikált régiójának (fekete ponttal jelölve) filogenetikai analízise.

Sajnos a cseh variáns szekvenciája sem a CP, sem a HSP70 esetében nem hozzáférhető, így nem tudjuk mennyire hasonlítanak. Ehhez nekünk kell majd a mintáinkban talált LChV1-ből a cseh variáns szekvenciájával összevethető szakasz nukleinsav sorrendjét meghatároznunk.

6.4.5 A Szőlő vonalas mintázottság vírus szekvenciájának meghatározása HTS-sel

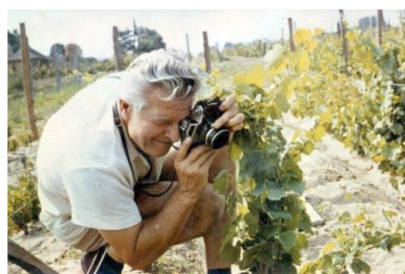
A szőlő vonalas mintázottság egy feltételezeten vírus okozta betegség, melyet 1987-ben Lehoczky János Magyarországon írt le (Lehoczky *et al.*, 1987). A vírus jelenlétéről és a tünetekről az ICGV 9. konferenciáján számolt be (110. ábra). A megbetegedés jellemző tüneteit (klorotikus foltok, gyűrűk, vonalas mintázottság) 3 érzékeny fajtán (Irsai Olivér, Limberger, Jubileum 75) figyelték meg. A szimptómák megjelenése együtt járt polimorf virionok megjelenésével, mely jellegzetesség alapján a feltételezett vírust az Ilarvírusok csoportjába sorolta. A vírus azóta is szerepel nemcsak az online adatbázisokban, hanem az összes szőlő virológiával foglalkozó összefoglalóban, könyvben. A vírusra jellemző tüneteket azóta sem találták meg máshol, és mivel szekvencia azóta sem rendelhető a vírushoz, esetleges latens jelenlétét sem tudták vizsgálni. Így nem csoda, hogy eredeti, 30 évvel ezelőtti leírása óta sem találták meg máshol, csupán hazánkban ismert a jelenléte.



110. ábra A Szőlő vonalas mintázottság vírus eredeti leírása.

Lehoczky János nemcsak leírta a megbetegedést, hanem a vírusos tőkékről egy indikátor fajtára (Baco22A) oltva a potenciális kórokozót fenntartotta Kecskeméten a patológiai gyűjteményben. A tőke azóta is fellelhető ott, bár tünetek nem mindig jelentkeztek rajta (111. ábra).

Felkeresve a kecskeméti patogénkertet, a GLPV-t feltételezeten tartalmazó tőkéről mintát szedtünk és azt a célt tűztük ki, hogy sRNS HTS-sel szekvencia információt gyűjtünk és bizonyítjuk a vírus jelenlétét.



Lehoczky János

Kecskemét, Katonatelep patológiai kert



Tünetek 2017-ben a patogén kertben (Baco22A)

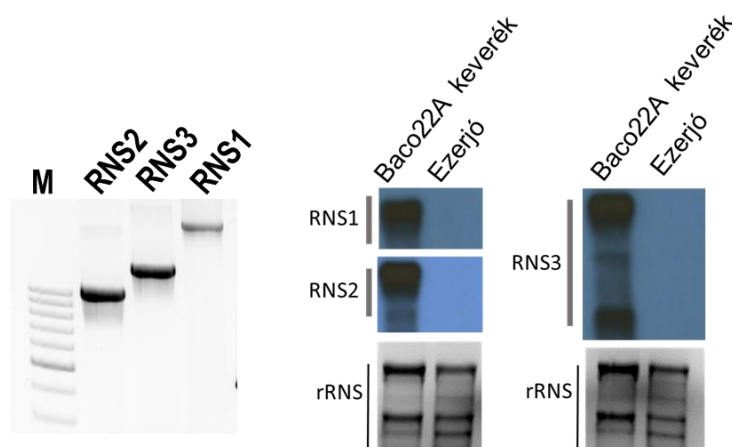
111. ábra Lehoczky János, és a GLPV krónikus tünetei a Baco22 alanyfajtán, Kecskeméten, a patogénkertben.

A vírusos tökérről gyűjtött mintákból RNS-t tisztítottunk, majd sRNS könyvtárát készítettünk, melyet szekvenáltattuk. A kapott több mint 4 millió read-et bioinformatikai módszerekkel elemeztük.

A kezdeti elemzések után a tisztított RNS-t egy COST pályázat keretében egy másik, ribodepleciós eljárással is, szekvenáltattuk. Az elemzéseket ez esetben szintén a COST keretein belül egy Training School-on genious prime programcsomaggal elemeztük.

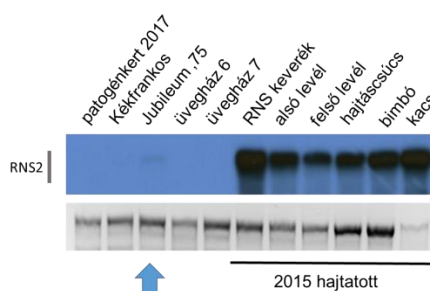
6.4.5.1 A GLPV egy anulavírus

A bioinformatikai elemzések során az átfedő sRNS szekvenciákat egymásba illesztve hosszabb szakaszokat építettünk és ezeket az NCBI-ban található vírusgenomokhoz hasonlítottuk. Az összehasonlítások során a legnagyobb hasonlóságot a 2013-ban leírt, Amazon lily mild mottle vírussal (ALiMMV) kaptuk, ami az Ilar vírusokhoz nagyon hasonló Anula vírusok csoportjába tartozik. Az ALiMMV genomját referenciaként használva az HTS-sel kapott sRNS-ekből hosszabb szakaszokat tudtunk építeni, ami lehetővé tette, hogy a vírus osztott genomjának mindhárom RNS-ére az RT-PCR-rel való visszaigazolásához indító szekvenciákat tervezhessünk. Az RNS kivonatokról cDNS-t szintetizáltunk és az eddig csak feltételezett GLPV jelenlétét RT-PCR-rel visszaigazoltuk (112. ábra).



112. ábra A GLPV mindhárom RNS-ének visszaigazolása RT-PCR-rel és Northern blottal.

A vírus jelenlétét megvizsgáltuk a szőlő különböző szerveiben és azt találtuk, hogy levélben, virágban és kacsban is megtalálható (113. ábra).

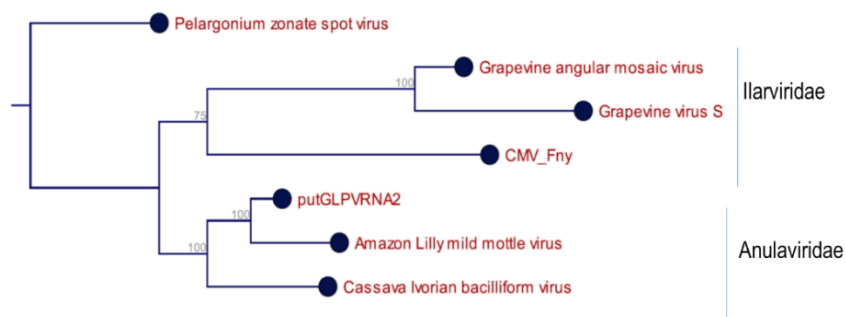


113. ábra A GLPV RNS2 kimutatása a Baco22A különböző szerveiben és az átoltott érzékeny fajtákon.

Mivel a NAIK SZBKI-ben dolgozó kollegánk, Lázár János, 2017-ben átoltotta a Baco22-öt a korábban érzékenynek talált fajtákra, az oltványokból is megpróbáltuk kimutatni a jelenlétét, annak ellenére, hogy tüneteket nem tapasztaltunk. Ez a próbálkozásunk csupán a Jubileum 75 esetében sikerült.

Olasz kollegákkal való együttműködésünk keretében, a Baco 22A-ról dsRNS szekvenálás is történt és a kollegák 5' és 3' RACE vizsgálatokkal a teljes vírus genomot meghatározták (a szekvenciák NCBI azonosítói: RNS1 -MT319109, RNS2 - MT319110, RNS3 - MT319111).

A kapott termékek hagyományos Sanger szekvenálása lehetővé tette a vírus genomjának filogenetikai vizsgálatát (114. ábra).



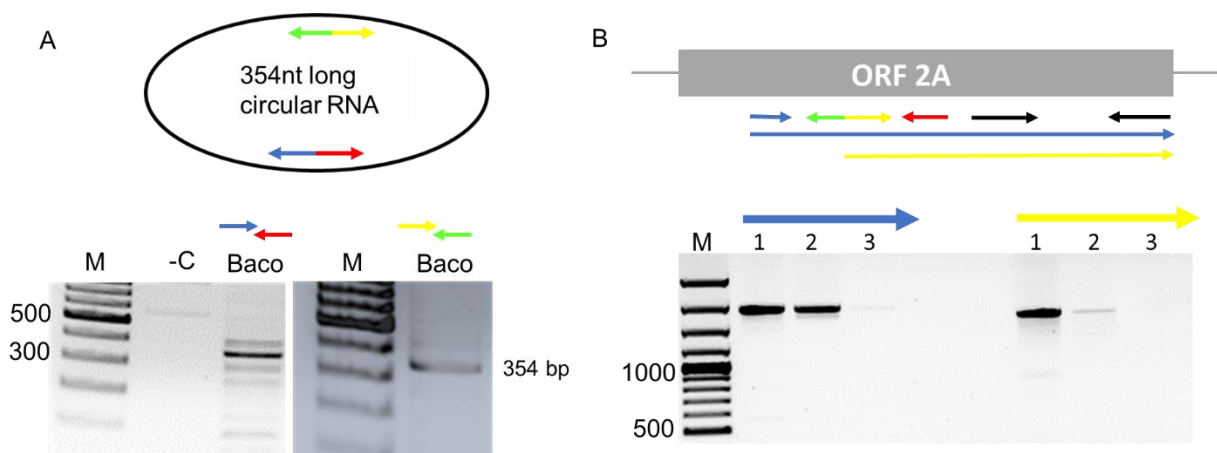
114. ábra A GLPV RNS2 filogenetikai vizsgálata.

A vizsgálat során meglepően nagy hasonlóságot kaptunk a Kínában leírt komló sárga vírus (hop yellow virus – HYV) mindhárom RNS-ére, mely vírusról egyelőre csak szekvenciainformáció létezik. A hasonlóság azonban olyan magas fokú, hogy a jelek szerint a HYV és a GLPV ugyanazon vírus két különböző variánsa. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a GLPV valóban létezik, az Anula vírusok csoportjába tartozik, és szekvenciájának ismeretében vizsgálhatjuk elterjedését és szerepét a szőlőn megjelenő tünetek kialakulásában. Genomjának szekvenciájának birtokában pedig szerte a világban vizsgáljuk jelenlétét.

6.4.5.2 Egy RNS2 eredetű cirkuláris RNS is jelen van a fertőzött növényben

A GLPV teljes genom birtokában az sRNS és RNS seq olvasatokat újra illesztettük a genomra. Az illesztés után egy 167bp-os kontigot találtunk, mely az RNS2-höz nagyon hasonló szekvenciájú volt, és egy hajtű struktúrát alkotott. Ahhoz, hogy ellenőrizzük, ennek az RNS-nek a valóságát, és esetleg azt, hogy nem egy nagyobb, esetleg cirkuláris RNS része, primereket terveztünk, melyek használatával csak az RNS cirkularitása esetén amplifikálható RT-PCR termék.

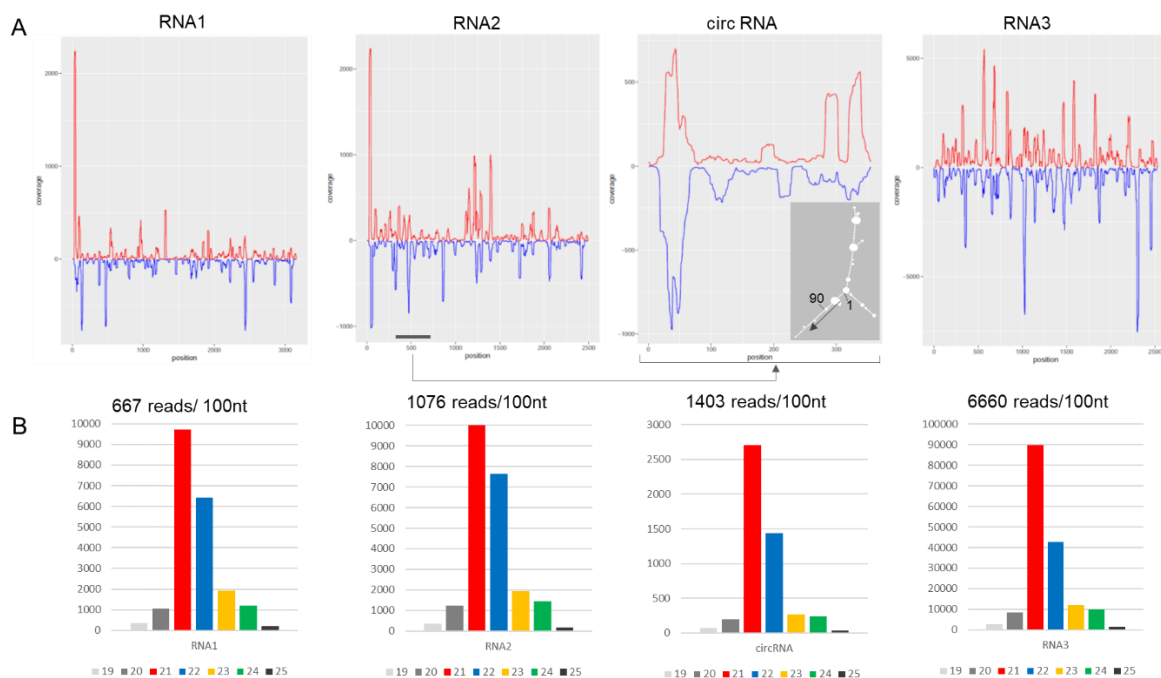
A kísérleteink eredménye azt mutatta, hogy a fertőzött növényben valóban jelen van egy cikuláris RNS. Klónozása és Sanger szekvenálása után megállapítottuk, hogy 354bp hosszú, és szekvenciája 96% azonosságot mutat a GLPV RNS2 349-703 régiójával (NCBI azonosítója MT358428). A szekvenálás valóságát egy másik helyre tervezett primer pár használatával amplifikált, majd klónozott PCR termék szekvenálásával is ellenőriztük (115. ábra/A).



115.ábra Egy 354bp-os cirkuláris RNS jelenlétének igazolása a GLPV fertőzött Baco22a-ban. A/ és B/ felső panelek a validálás során tervezett primerek sematikus elhelyezkedése a genomon. Alsó panelek a primerek használatával készült PCR reakció termékeinek képe M: GeneRuler 100 bp Plus DNS marker (Thermo Fisher Scientific). (1-2-3, 50-56-64°C annealing hőmérséklet használatakor).

6.4.5.3 A GLPV indukálja az RNSi-t

A GLPV eredetű sRNS-ek vizsgálata azt mutatta, hogy mind sense, mind antisense irányultságú sRNS-ek keletkeztek, igen nagy számban: a GLPV 3 RNS-ről 21091; 26828 illetve 168456 read keletkezett, melyek mérete általában 21nt volt (116.ábra).

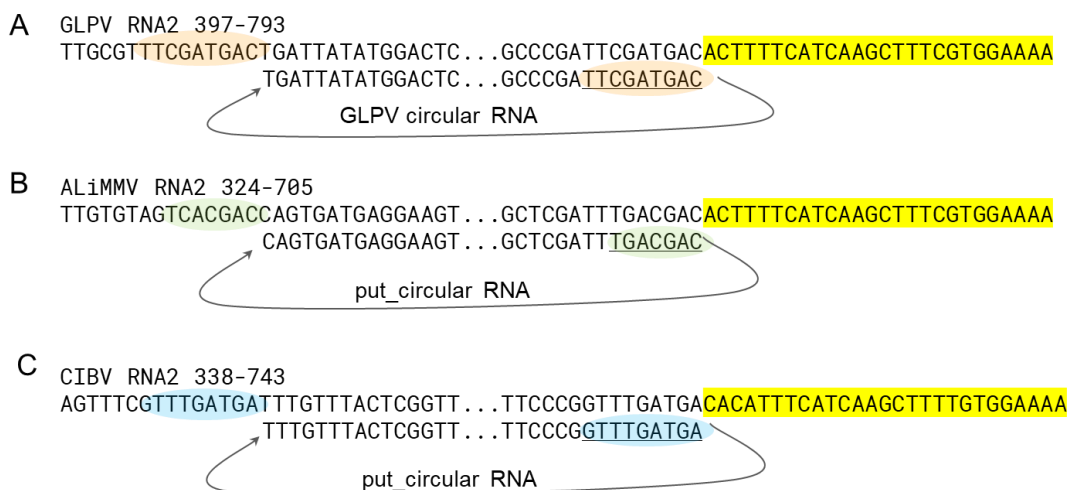


116.ábra A GLPV eredetű sRNS-ek jellemzői A/ elhelyezkedésük a GLPV 3 RNS-én és a cirkuláris RNS-en (a sense orientációt piros, míg az antisense-et kék jelzi). A cirkuláris RNS panelén feltüntettük az RNS MFOLD programmal generált másodlagos szerkezetét. B/ a GLPV eredetű sRNS-ek méreteloszlása.

Mivel a 21nt virális siRNS-ek az RNAi során a gazdában aktiválódó DCL2 és DCL4 aktivitása során keletkeznek, ezen adatok a GLPV jelenlétét és a Baco 22A-ban való aktív replikációját bizonyítják.

Ahogy az várható volt a legtöbb siRNS a köpenyfehérjét is kódoló és sgRNS-sel is rendelkező RNS3-ról keletkezett (6600 reads/1000nt). A cirkuláris RNS-ről szintén nagyon sok sRNS keletkezett (1403 reads/1000nt), különösen annak igen erős másodlagos szerkezetet mutató stem-loop régiójáról, tovább erősítve jelenlétének, és aktív replikációjának tényét.

A cirkuláris RNS RNS2-n való keletkezési helyének további szekvenciaelemzése során találtunk egy kilenc nukleotid hosszúságú ismétlődő szekvenciát (117/A.ábra).



117. ábra. Az anulavírusok RNS2 egy részének, a GLPV-ben azonosított cirkuláris RNS keletkezési helyének megfelelő régiójának szekvenciaelemzése. A cirkuláris RNS keletkezési helyét határoló konzervatív szakaszokat az(a) a GLPV-ben narancs, míg az ezzel homológ régiót az(b) ALiMMV-ben zölddel, míg a (c) CIBV-ben kékkel jeleztük. Az RdRp konzervatív doménjét kódoló szakaszt sárgával emeltük ki.

Ehhez hasonló repetitív elemek hasonló pozícióban, az RdRp egy igen konzervatív motívumát kódoló szakasz előtt, az ALiMMV és a CIBV RNS2-n is találhatóak (117/B és C ábra). Így felmerül annak lehetősége, hogy esetleg RNS2 eredetű cirkuláris RNS ezekben a vírusokban is jelen van.

Az anulavírusok az ilavírusoktól eltérően nem kódolnak VSR-t az RNS2-n, de az általunk azonosított RNA2 eredetű cirkuláris RNS jelenléte egy alternatív mechanizmust vet fel. Ahogy azt a cirkuláris RNS-ről keletkezett sRNS readok elemzése során láttuk erről a szakasról relatíve jóval több sRNS (1403 read/100nt) keletkezik, mint az RNS2 többi részéről (1076 read/100nt) (116/A ábra). Lehetséges, hogy a cirkuláris RNS-ről keletkező nagy mennyiségű sRNS megzavarja a genom többi részéről keletkezett sRNS-ek RISC komplexbe való épülését. Az így “telített” RISC pedig elsősorban a cirkuláris RNS-t targetálja majd, lehetőséget adva a genom többi részének az RNSi elkerülésére. A cirkuláris és lineáris RNS-ek szimultán előfordulása és replikálódása sokáig kizáró tényezőként volt számon tartva a virológiában. Az RBDV (5.4.2.10 fejezet), egy szőlőt is fertőző Idaeovírus. Ez a genus sokban hasonlít az ilavírusokhoz, és így az anulavírusokhoz is (isometrikus partikulumok, osztott genom, mag és pollen átvitel). 2014-ben az RBDV-ben (Quito-Avila et al., 2014), 2018-ban

pedig egy másik Idaeovírusban, a blackcurrant leaf chlorosis associated virus-ban is azonosítottak egy cirkuláris RNS-t (James et al., 2018). Ezek az eredmények annak a lehetőségét sugallják, hogy hatékony VSR hiányában az anulavírusok (és talán az ideoavírusok és az ilarvírusok egy része) egy alternatív stratégiát fejlesztettek ki: nem egy fehérjét, hanem egy cirkuláris RNS-t kódolnak.

Ugyan elvben ez a stratégia létezhet, valós jelenlétének igazolására még sok kísérletet kell elvégezni.

7 Új tudományos eredmények

1/ Igazoltuk, hogy különböző vírusok nem rokon VSR fehérjéi egyaránt képesek a miR168 indukcióján keresztül transzlációsán gátolni a gazda AGO1 aktivitását.

2/ Kimutattuk, hogy aCIRV p19 VSR fehérjének miR168 indukáló képessége független az sRNS kötő képességétől, de azzal párhuzamosan együttműködve képes a gazda RNSi alapú védekezésifolyamatait hatékonyan gátolni.

3/ Akut és perzisztens vírusfertőzési folyamatokat mircoarray és mRNS HTS technikákat használva, *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényeken, v kimutattuk, hogy akut fertőzés során a gazdagének igen nagy részének expressziós állapota változik. A fotoszintézis gének nagymértékű expressziós változását fiziológiai mérésekkel is párhuzamba állítottuk. Perzisztens vírusfertőzések során kimutattuk, hogy gazdagének expressziós állapota csak kis mértékben változik és gazdanövény stresszének expressziójának indukciója ezekben a fertőzésekben elmarad.

4/ Működőképes VIGS vektort készítettem a pillangósvirágúakat fertőző SHMV tobamovírusból.

5/ SHMV VIGS kísérletekkel igazoltuk, hogy az *MLO* gén csendesítése búza növényen a növények lisztharman-ellenállóságát eredményezi.

6/ Elterjedt VIGS vektorokat használva *N. benthamiana*, *S. lycopersicum*, *C. annuum* és *T. aestivum* növények fertőzésére bemutattuk, hogy alkalmazásuk során sok esetben nemcsak a célzott gének szintje változik meg hanem a molekuláris vizsgálatokban gyakran használt referencia géneké is, így használatuk különös körültekintéssel végezhető csak.

7/ Adaptáltuk az sRNS HTS-t és a kapcsolódó bioinformatikai eljárásokat, mint vírusdiagnosztikai módszert, és részt vettünk a módszer hazai használatának bevezetésében.

8/ sRNS HTS módszerrel virológiai felmérést végeztünk hazánk termő- és szőlőalany ültetvényein, miközben nemcsak először írtuk le több szőlőt fertőző vírus: GPGV, GSyV-1, GVS) jelenlétét hazánkban, hanem arra a következtetésre jutottunk, hogy a vírusfertőzések elsődlegesen a fertőzött szaporítóanyaggal terjednek.

9/ Csonthéjas gyümölcsfa törzsültetvények sRNS HTS-sel történő vírusdiagnosztikájával először írtuk le a CVA, a LChV1 hazai előfordulását.

10/ sRNS HTS-sel szekvencia információt gyűjtöttünk a több, mint 30 éve leírt GLPV mindhárom RNS-éről és így bizonyítottuk, hogy a vírus valóban létezik.

8 Következtetések, javaslatok

1/ A miR168 által történő AGO1 regulációt vizsgáló kísérleteink eredményei alapján felállított modellünk szerint a VSR-ek miR168 indukáló képessége az ezen keresztül elért AGO1 fehérje szint csökkenésével együtt, a szupresszor molekulák eredeti funkciójától függetlenül alakulhatott ki. Igazoltuk, hogy ez a kontroll mechanizmus hatással van a fertőzött növényben jelenlevő vírus koncentrációjára és a fertőzés során kialakult tünetek súlyosságára, alátámasztva azt a hipotézist, hogy a VSR-ek fő funkciója mellett a miR168 indukción keresztül megvalósuló AGO1 gátlás mindegyikére is szükség van ahhoz, hogy a vírus hatékonyan tudja gátolni a gazdanövény RNSi alapú védekező reakcióit. Ezt a jelenséget a tombusvírus p19 VSR esetében kísérletesen igazoltuk, de mivel a növényi vírusok különböző VSR-ei hasonló mechanizmussal regulálják a gazda AGO1 szintjét, valószínűsíthető, hogy a miR168 által történő AGO1 reguláció más vírusok fertőzésekor is alapvetően fontos a tünetek kialakulásában és a fertőzés lefolyásának meghatározásában.

2/ A nagy-áteresztőképességű szekvenálások új utat nyitottak a vírusok felfedezésére (Roossinck *et al.*, 2015). Noha e technikákat használva nap mint nap újabb vírusokat írnak le, nagyon nehéz ezen új vírusok fontosságát és esetleges veszélyét megbecsülni. A jövőben ez egy alapvető kérdés lesz nemcsak az alapkutatás, hanem azon döntéshozók számára is, akik a zárlati és karantén szabályokat meghatározzák. (Massart *et al.*, 2017a).

A különböző vírusfertőzésekről nyert ismeretek segíthetnek abban, hogy megtaláljuk az akut és perzisztens vírusfertőzések közötti molekuláris és fiziológiai különbségeket (Sanfaçon, 2017). Kísérleteinkben két különböző nagy-áteresztőképességű módszerrel: microarray hibridizációval és genom szintű mRNS szekvenálással vizsgáltuk a vírusfertőzés során bekövetkező génexpressziós változásokat. A microarray vizsgálatban több DEP-et azonosítottunk, mint ahány DEG-et az mRNS szekvenálással. A csökkent expressziót mutató DEP-ek aránya a megnövelt expressziót mutató DEP-ekhez képest magasabb volt, mint ugyanez az arány a DEG-ek esetében. Ennek elsődleges oka véleményünk szerint nem az eltérő gazdanövények, hanem az eltérő detektálási módszerek voltak: bizonyos géneket a chipen több próba is képviselt, míg sok esetben egyáltalán nem találtunk specifikus próbát. Ez az eredményünk figyelmeztető jel lehet arra nézve, hogy a microarray adatok alapján, az egyes anyagcsereutak egészében bekövetkező változásokra könnyen téves következtetéseket vonhatunk le.

Vírusfertőzés során a fotoszintézisben és a kapcsolódó anyagcsereutak kifejeződésében bekövetkező változások, jól mérhető fiziológiai változásokkal párosultak. A levél hőmérsékletét és a fotoszintetikus aktivitást jellemző hőkamerás és klorofill fluoreszcencia mérések igen jól mérik ezeket a változásokat. Az akut fertőzés során bekövetkező nagymértékű változások a fertőzés korai szakaszában, a súlyos tünetek megjelenése előtt detektálják ezeket. A távérzékelési és drón alapú érzékelési módszerek ugyan alkalmasak ezen fiziológiai jellemzők detektálására (Gaborjanyi *et al.*, 2003, Mahlein, 2015, Albetis *et al.*, 2017), de ahhoz, hogy erre alapozva rutin módszereket dolgozzunk ki, szükség van a vírusfertőzött növények nemcsak fiziológiai, hanem az e változások hátterében húzódó génexpressziós változásainak azonosítására. Ezért azt gondoljuk, hogy eredményeink hosszabb távon hasznosíthatóak lesznek a precíziós mezőgazdaságban használt távérzékelési technológiák fejlesztésében, és a fertőzések kockázatának előrejelzésével segíthetik a gazdálkodást.

A nagy-áteresztőképességű szekvenálások egyre több és több új vírus leírásához vezet(tek)nek, de ezen újonnan leírt vírusok valós fontosságát (betegség okozó potenciálját) igen nehéz megbecsülni. Az ilyen új, vírus-gazdanövény kapcsolatokban a gazdanövény génexpressziós változásának vizsgálata, néhány markánsan változó gén expressziójának monitorozásával, segítheti a kockázatelemzést annak megállapításában, hogy milyen lefolyású a fertőzés.

3/ Munkánk során fertőzőképes transzkriptumot állítottunk elő az SHMV-ből, ami a pillangós modellnövényben, a *M. truncatula*-ban, jól replikálódott és szisztemizálódott. A vírus jelenlétét a gyökérgümőkben is ki tudtuk mutatni *in situ* hibridizációval. Az SHMV-ből egy olyan VIGS vektort készítettünk, ami megőrizte fertőzőképességét *M. truncatula*-ban is. A vektorba épített idegen szekvencia mérete azonban hatással volt a vektor replikációjára. A *M. truncatula*-ból klónozott CH42 40bp-os darabját az SHMVProSHMV vektorba építve sikeresen csendesítettük ezt az endogén gént és gén hiányára jellemző fenotípust is megfigyeltük. Bár a sikeres gazdagén csendesítés hatékonysága elmaradt a várakozásainktól, igen alacsony (10%) volt, igazoltuk, hogy építhető biológiailag aktív VIGS vektor a *M. truncatula* génjeinek tanulmányozására. Azt gondoljuk, hogy esetleg a *M. truncatula* gazdanövényen történő passzálásokkal jobban adaptálhatjuk a vektort a gazdára, illetve a beépített gazdagén darab méretének optimalizálásával ez a hatékonyság a továbbiakban esetleg növelhető lesz. Mivel kísérleteinkben csak egy gént, a CH42-t, csendesítettük nem tudjuk, hogy ez a hatékonyság más gének esetében változik-e majd. Ahhoz azonban, hogy nagyszámú mintában sokféle endogén gén funkcióját vizsgálhassuk, a vektor és használatának további optimalizálása szükséges.

4/ BSMV VIGS vektor használatával bizonyítottuk, hogy az *MLO* gén inaktiválása a hexaploid búzán is a növény lisztharmat ellenállóságát eredményezi. A kísérleteink óta megjelent genomszerkesztési módszerek lehetővé tették nullmutánsok előállítását. Ennek eredményeképpen 2014-ben Wang és munkatársai TALEN technológiával (Wang *et al.*, 2014), 2017-ben pedig Acevedo-Garcia és munkatársai TILLING technológiával állítottak elő *mlo* mutáns búzát, melyek a vártnak megfelelően szélesspektrumú lisztharmatrezisztenciával rendelkeztek (Acevedo-Garcia *et al.*, 2017a).

5/ Az általunk vizsgált VIGS vektorok számos esetben nagymértékű génexpressziós változást idéztek elő a gazdanövényben. Kísérleteink rávilágítottak arra, hogy egy idegen szekvencia jelenléte a VIGS vektorban képes befolyásolni a gazdanövény génexpressziós mintázatát, ezért VIGS vektor használatakor és az eredmények kiértékelésekor fokozottan körültekintőnek kell lenni. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a VIGS csak megfelelő kontroll kísérletek mellett és csak bizonyos gének esetében alkalmazható endogén gének funkciójának megállapítására. Eredményeink azt jelzik, hogy az adott VIGS vektorok specifikus módon képesek megváltoztatni a gazdanövény génexpresszióját. Az pedig, hogy az üres és a PDS-t tartalmazó vektorok fertőzése különböző módon változtatta meg a gazdanövény génexpresszióját arra enged következtetni, hogy a VIGS vektorba épített idegen szekvencia jelenléte ezt közvetlenül befolyásolhatja. A vírus vektor használata előtt tehát feltétlenül fontos megvizsgálni, hogy az adott vírusvektor a gazdanövény génexpresszióját hogyan változtatja meg és ez alapján meghatározni a megfelelő referencia géneket.

6/ Az sRNS HTS-en alapuló vírusdiagnosztika segítségével az adott ültetvényen, vagy tünetes növényben jelenlevő összes vagy csaknem összes virális kórokozó azonosítása lehetségessé válik. Az új, vagy eddig figyelmen kívül hagyott vírusok új variánsainak elterjedése, a különböző vírusok együttes jelenléte az érzékeny fajtákon új tünetek megjelenésével járhat együtt, melynek okát csak a teljes vírus metagenom ismeretében tudjuk elemezni, melyre e módszer szintén alkalmas.

Szőlő- és gyümölcsfa ültetvényeinket hosszú évtizedekre tervezzük. Ha a szaporítóanyag olyan vírust tartalmaz, melyre nincs kötelező hatósági szűrés, illetve, ha nincs tudomásunk a víusról, a vírusmentesnek gondolt ültetvényen pár év alatt megjelenhetnek a fertőzés tünetei, ami a tőkéék leromlását, termésvesztést, súlyosabb esetekben a tőke és az ültetvény pusztulását eredményezhetik, jelentős gazdasági károkat okozva. Mivel a módszer elvileg minden jelenlevő kórokozót kimutat a hazánkban előállított vagy esetleg külföldről importált szaporítóanyagban, a vírushatás időben felderíthető.

Az új fajták, melyek szaporítása vegetatívan történik, állami elismeréséhez vírusmentes anyatövekre, prebázis állományra van szükség. A nemesítés hosszú évekig, vagy akár évtizedekig is tarthat, és a szelektált, a fajtaminősítés alapjául szolgáló álló egyedek vírusmentesítése után a vírusmentességet jelenleg biotesztekkel kell (kellene) igazolni, melyek szintén évekig tartanak. Az sRNS HTS módszer önmagában vagy kombinálva más diagnosztikai módszerekkel ezt az időt jelentősen lerövidíti, így a nemesítőnek idő-, a tesztelő hatóságnak pedig jelentős munkaerő- és anyagi megtakarítást eredményez. Jelenleg már folynak az egyeztetések, hogy a hatósági vizsgálatokat hogyan tudja majd felváltani az új, szekvenálás alapú vírusdiagnosztika. Amennyiben a fajtaelismerés ideje így módon jelentősen csökken, akkor az új fajtákat, amelyek valamilyen új tulajdonság (rezisztencia, szárazságtűrés, kiegyensúlyozottabb terméshozam) szempontjából kedvezőbbek, hamarabb telepíthetjük. Különösen nagy segítség lenne a nemesítőknek már a szelekció előtt elvégezni a széleskörű vírusvizsgálatot, hiszen a tapasztalt fenotípusos tulajdonságokat a vírusok egyedül vagy különböző kombinációkban jelentősen megváltoztathatják.

Mind a szőlő, mind a gyümölcsfa szaporítóanyagának csupán egy része a nemes fajta, hiszen telepítéskor legtöbbször oltványt használunk. Ha az általában ellenállóbb alanyok, melyeket törzsültetvényekben tartanak fenn, és jelenleg csak szerológiai módszerekkel néhány vírusra vizsgálnak, vírust tartalmaznak, az a fiatal ültetvényeken a nemesbe átkerülve azonnal tüneteket, termésvesztést és így anyagi kárt okozhat.

A vírusmentesítés folyamata összetett biotechnológiai eljárás, hatékonyságát optimális esetben minden vírusra ellenőrizni kellene. Ha ezt az ellenőrzést nem megfelelő érzékenységgű módszerekkel végezzük, vírusmentesítettnek nyilváníthatunk általunk nem ismert, vagy nem vizsgált vírusokat tartalmazó növényi anyagot is. Az sRNS HTS a vírusmentesítési folyamatok tesztelését is sokkal hatékonyabbá teheti.

A módszer, mint diagnosztikai szolgáltatásként való bevezetéséhez elsősorban nem a módszer egyszerűsítését, hanem annak hatósági elfogadását kell elérni. Erre vannak törekvések – így nem elképzelhetetlen, hogy a nem túl távoli jövőben, megfelelően meghatározott határértékekkel, a módszer diagnosztikai szolgáltatással fejlődik. A módszer használatát, és a tervezett jövőbeli felhasználását segített segíteni, előkészíteni a 2014-2018 között működő COST-DIVAS pályázat: FA1407 - Application of next generation sequencing for the study and diagnosis of plant viral diseases in agriculture (<http://www.cost-divas.eu/>).

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

Vizsgálatunkban, a legtöbb esetben az sRNS HTS és a más molekuláris módszerekkel való visszaigazolás eredményei megegyeztek, azonban számos esetben tapasztaltunk eltéréseket a két eredmény között. Ezen különbségek lehetséges okainak feltárása szintén hozzájárult az sRNS HTS alapú diagnosztika alkalmazhatóságának optimalizálásához. Eredményeink szerint ezen eltérések több okra vezethetők vissza: (1) Sok esetben a vírusok és variánsaik változékonysága következtében az irodalomban ismertetett primer szekvenciákkal végzett PCR reakciókkal sikertelen volt a vírusok visszaigazolása. Ennek kiküszöbölésére a hazánkban fellelhető izolátumok kimutatására sRNS szekvenciáink alapján számos primert terveztünk, melyekkel a visszaigazolások már általában sikeresek voltak. (2) Más esetben, eredményeink alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy ha az ültetvény egyedeinek RNS keveréke (pool) sok, nem fertőzött egyed RNS kivonatait is tartalmazza, az jelentősen csökkentheti a kimutatás érzékenységét és további kiegészítő vizsgálatok nélkül (RT-PCR, ültetvény poolok kibontása egyedekre) az egyenlőtlen, alacsony titerben, vagy kevés egyedben jelenlevő fertőzések nem mutathatóak ki egyértelműen. (3) Előfordult, hogy az RT-PCR látszólag érzékenyebbnek tűnt az HTS-nél (pl.: GRSPaV). Ebben az esetben a vírusok és gazdájuk közötti koevolúciós kölcsönhatás és akár a víruseredetű VSR-ek jelenléte és aktivitása is befolyásolhatja a víruseredetű sRNS-ek biogenezisét, de ennek a hipotézisnek a teszteléséhez további vizsgálatok szükségesek. Eredményeink alapján elmondható, hogy a három módszer (sRNS HTS, bioinformatikai elemzés, RT-PCR visszaigazolás) kombinációja hatékony vírusdiagnosztikát eredményezett, azonban a módszerek alkalmazása és összehangolása több nyitott kérdést és megoldandó problémát vet fel, melyek megoldása feltétlenül szükséges lesz, mielőtt a metagenomikai módszerek felválthatják a hagyományos vírusdiagnosztikát.

8/ Hazánk alanyültetvényei mentesek voltak a vizsgálatköteles vírusoktól, ami azt mutatja, hogy a sok kritikával illetett hagyományos vizsgálati módszerek mégiscsak képesek kontroll alatt tartani ezen vírusok jelenlétét. Az ültetvényekben azonban igen nagymértékű fertőzöttséget találtunk viroidokra és a nem vizsgálatköteles vírusokra. Az azonos ültetvényekben található különböző fajták vírusfertőzöttsége különböző volt, ami arra utal, hogy a fertőzés nem a helyszínen történt, hanem már az alanyültetvényekbe is fertőzött szaporítóanyaggal került. Az újonnan, jórészt HTS-sel, azonosított vírusok esetében mindig felmerül az, hogy vajon szükséges-e a regulációjuk, amit mindig megfelelő kockázatbecslésnek kell megelőznie (Maree *et al.*, 2018, Golino *et al.*, 2017, Massart *et al.*, 2017b). Ezen vírusok jelenléte az alanyültetvényeken azonban egy új, nem kontrollált kockázati tényezőre hívja fel a figyelmet és hangsúlyozza ezen felmérések és szabályozások sürgető voltát.

9/ A csonthéjas gyümölcsfaültetvények sRNS HTS-sel végzett vírusdiagnosztikája több új, hazánkban eddig nem vizsgált vírus jelenlétére derített fényt. Mivel az újgenerációs

szekvenálások sok esetben tünetmentes mintából is nagyon sok vírus jelenlétét mutatják ki, komoly problémát jelent, hogy egy új vírus bejelentését mikor és hogyan kell megfelelő karantén intézkedéseknek követnie? Egyáltalán szükség van-e az új vírusokra kiterjedő korlátozó jogszabályokra, és ha igen milyen feltételek között. Hiszen könnyen előfordulhat, hogy az adott vírus latens kórokozóként már igen régóta jelen van az adott gazdában vagy az adott területen, csak azért nem derült fény a jelenlétére, mert eddig még sohasem keresték. Ha viszont tudunk ezekről a vírusokról, akkor szemet hunyhatunk-e a jelenlétük felett? Hogyan és mikor állíthatjuk biztonsággal, hogy jelenlétük nem jelent veszélyt ültetvényeinkre? Mivel gyümölcsfáink fásszárú évelők, bennük egyszerre több, akár rokon vírus is jelen lehet, ami lehetővé teszi a vírusok rekombinálódását, új vírusok keletkezését.

10/ Az sRNS HTS nemcsak virológiai felmérésekre alkalmas. Használatával szekvencia információt gyűjthetünk olyan vírusokról is, melyek eddig csupán az adott gazdán okozott tünetek alapján kerültek leírásra. Az így nyert szekvenciák lehetővé teszik a későbbiekben azt, hogy a vírus elterjedését attól függetlenül vizsgáljuk, hogy az adott növényen vagy faján okoz-e tüneteket. Ezen információk birtokában pedig eddig nem látott mélységben nyerhetünk információt a környezetünkben élő növényi vírusokról.

Egy 30 éve leírt vírus, a GLPV szekvenciájának meghatározása nemcsak azt teszi lehetővé, hogy jelenlétét vizsgáljuk a föld bármely pontján. A szekvenciaelemzés közben azonosított cirkuláris RNS egy potenciális, a VSR-t kódoló fehérjék alternatívájaként működő RNSi gátló mechanizmus lehetőségét veti fel, de e mechanizmus létezésének funkcionális bizonyítása még előttünk áll.

9 Összefoglalás

Kísérleteimben vírusfertőzött növényeket vizsgáltam molekuláris biológiai módszerekkel. Lágyszárú modellnövényeken kutattam, hogy milyen folyamatok állhatnak a vírusfertőzések okozta tünetek kialakulásának hátterében, hiszen ezek a tünetek azok, amik a vírusfertőzésekhez köthető gazdasági károkat okozzák.

A vírusfertőzés tüneteinek kialakulását eredményező molekuláris változások vizsgálata során megállapítottam, hogy a vírusok VSR fehérjéi indukálják az AGO1 szintjét szabályozó miR168 expresszióját, ami a növényi védekezőreakció hatékonyságának csökkenését idézi elő, és e tulajdonság független a speciális gátló funkciójuktól, legtöbb esetben az sRNS kötő képességüktől. Akut és perzisztens vírusfertőzési folyamatokat vizsgálva kimutattuk, hogy akut fertőzés során a gazdagének expressziója tömegesen és eltérően változik, míg a perzisztens vírusfertőzések során ezek a változások nagyban korlátozottak és a gazda stresszgénjeinek expressziója is elmarad. Ezek a visszafogottabb változások a perzisztens fertőzések esetén lehetővé tehetik a gazda és a vírus békés egymás mellett élését, ami evolúciós léptékben akár a gazda és a vírus számára lönyös lehet.

A VIGS vektorokkal kapcsolatos kutatásaim során VIGS vektort építettem egy pillangósvirágúakat fertőző vírusból, és BSMV VIGS vektor használatával igazoltam, hogy az *MLO* gén csendesítése búzában lisztharmatrezisztenciát eredményez. Azt is bemutattam, hogy a VIGS vektorok használata során a vizsgált növényben nem célzott génexpressziós változások is történhetnek, amelyek megnehezíthetik a kísérletek kiértékelését.

Adaptáltam az sRNS-ek nagy-áteresztőképességű szekvenálását és a kapott eredmények bioinformatikai elemzését fásszárúak vírusfertőzöttségének diagnosztizálására. A módszer használatával felmértem több termő és alany szőlőültetvény, valamint kajszi ültetvények vírusfertőzöttségét. A felmérés során több vírus Magyarországi jelenlétét először állapítottam meg. Bemutattam, hogy a módszer arra is alkalmas, hogy a régen, hagyományos módszerekkel azonosított vírusokról szekvenciainformációt szerezzünk. Az ültetvények felmérése során vizsgált vírusvariánsok rokonsági vizsgálatai alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a fertőzések hátterében legtöbbször a fertőzött szaporítóanyag használata áll.

Az sRNS-ek nagy-áteresztőképességű szekvenálását, mint vírusdiagnosztikai módszert, sikerült meghonosítanunk és most már egyre több kérdést vizsgálhatunk rutinszerű használatával.

A PhD fokozatom megszerzése óta 40 közleményben foglaltam össze a legfontosabb eredményeimet (IF: 111,949, idegen hivatkozás:1234). Az értekezés alapját a 12.1 fejezetben felsorolt 10 impakt faktoros közlemény és egy könyvfejezet képezte, melyekben 2 esetben első szerző, 9 esetben levelező szerző voltam. Eredményeim nemzetközi konferencián 22 előadás és 28 poszter formájában kerültek bemutatásra, míg hazai konferencián 86 előadás és 13 poszter szerepelt társszerzőségemmel.

A doktori értekezés fokozatszerzésre való benyújtásáig 2 PhD hallgatóm szerzett fokozatot és 23 szakdolgozat készült témavezetésemmel.

10 Köszönetnyilvánítás

Kutatásaimat az egyetemi diploma megkezdése után, 1990-től a gödöllő Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban végzem. PhD dolgozatom és gyerekeim megszületése után a biokémiai munka folytatása helyett Burgyán József Virologia csoportjában kezdtem új kutatásokba. A Virologiai csoport után a Havelda Zoltán által vezetett Növényi Fejlődésbiológiai csoportban folytattam munkámat egészen 2013-ig, amikor saját csoportot alakíthattam.

Köszönöm az intézet vezetőinek: Balázs Ervinnek, Nagy Ferencnek, Kis György Botondnak, Burgyán Józsefnek, Bősze Zsuzsannának, Olasz Ferencnek, Posta Katalinnak, hogy lehetővé tették, hogy az intézetben dolgozhassak.

Kutatásaimhoz az AM, az NKFIH: PD 78049, K 108718, K 115625, K 127951, a GAK2005: Tripatol, és a KTIA_AIK_12 pályázatok nyújtottak anyagi fedezetet. Nemzetközi kapcsolataim megerősödését a COST DIVAS pályázat segítette.

Szeretném megköszönni Burgyán Józsefnek a bizalmat és a lehetőséget, hogy felvett a csoportjába és később csoport alakítással bízott meg – mindkét esetben egy elnyert pályázattal segítve a kutatások elindulását.

Havelda Zoltánnak, férjemnek, köszönöm a közös kutatásokkal eltelt éveket, mely kutatási pályafutásom legeredményesebb időszakának bizonyult – miközben gyerekeinket is sikerült felnevelnünk.

Köszönöm PhD hallgatóimnak: Jaksa-Czotter Nikinek, Demián Emesének, Baráth Daninak, Pesti Rékának, Oláh Enikőnek, hogy tanultak tőlem, és segítettek abban, hogy a csoportunk szakmai sikereket érjen el és baráti, szakmai kapcsolatokat alakítson ki.

Köszönöm szakdolgozóim érdeklődését, kitartását.

Köszönöm Poldán Erzsike, Szigeti Anikó és Carmen Iliescu kiváló asszisztenciáját, ami nélkül nagyon nehéz lett volna.

Köszönöm a Növényi Fejlődésbiológia és Virologia csoport tagjainak folyamatos segítségét. Salamon Palinak a virológia megszerettetését.

Köszönöm csoportvezető kollegáim, barátaim: Silhavy Dani, Hiripi Laci, Szitty Gyuri, Csorba Tibi társaságát.

Köszönöm együttműködő partnereim, a NAIK SZBKI és GYDKI, a Pannon Egyetem Georgikon Kar Kertészeti Tanszék és Növényvédelmi Intézet, a Pécsi Egyetem SZBKI, a NÉBIH Velencei Virologiai labor dolgozóinak szakmai együttműködését és barátságát.

Köszönöm a doktori értekezés kritikus javítását Oláh Robinak és Havelda Zolinak.

Köszönöm Zoli szüleinek a folyamatos támogatást.

Nagy köszönet gyerekeimnek: Lucának és Marcellnek a sok türelemért.

”Gyökerek nélkül nem lehet repülni.” Köszönöm szüleimnek, hogy biztató, inspiráló szeretettel vettek körül és állandó biztonságot nyújtottak.

11 Irodalomjegyzék

- Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Digiario, M. and Martelli, G. P. (2005) Complete nucleotide sequence of the RNA-2 of grapevine deformation and Grapevine Anatolian ringspot viruses. *Virus genes*, **30**, 335-340.
- Acevedo-Garcia, J., Spencer, D., Thieron, H., Reinstadler, A., Hammond-Kosack, K., Phillips, A. L., *et al.* (2017a) mlo-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. *Plant Biotechnol J*, **15**, 367-378.
- Acevedo-Garcia, J., Spencer, D., Thieron, H., Reinstädler, A., Hammond-Kosack, K., Phillips, A. L., *et al.* (2017b) mlo-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. *Plant biotechnology journal*, **15**, 367-378.
- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D. C. and Harberd, N. P. (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, **131**, 3357-3365.
- Ahmed, M. M. S., Ji, W., Wang, M., Bian, S., Xu, M., Wang, W., *et al.* (2017) Transcriptional changes of rice in response to rice black-streaked dwarf virus. *Gene*, **628**, 38-47.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D. and Rowhani, A. (2009) Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, **387**, 395-401.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Sudarshana, M. R. and Rowhani, A. (2013) Gene from a novel plant virus satellite from grapevine identifies a viral satellite lineage. *Virus genes*, **47**, 114-118.
- Al Rwahnih, M., Sudarshana, M. R., Uyemoto, J. K. and Rowhani, A. (2012) Complete Genome Sequence of a Novel Vitivirus Isolated from Grapevine. *Journal of virology*, **86**, 9545-9545.
- Albetis, J., Duthoit, S., Guttler, F., Jacquin, A., Goulard, M., Poilvé, H., *et al.* (2017) Detection of Flavescence dorée Grapevine Disease Using Unmanned Aerial Vehicle (UAV) Multispectral Imagery. *Remote Sensing*, **9**, 308.
- Allie, F. and Rey, C. (2013) *Transcriptional alterations in model host, Nicotiana benthamiana, in response to infection by South African cassava mosaic virus.*
- Aranda, M. and Maule, A. (1998) Virus-Induced Host Gene Shutoff in Animals and Plants. *Virology*, **243**, 261-267.
- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., *et al.* (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev*, **24**, 904-915.
- Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N. F., Reinstadler, A., Lotti, C., *et al.* (2008) Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of mlo function. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **21**, 30-39.
- Bajet, N. B., Unruh, T. R., Druffel, K. L. and Eastwell, K. C. (2008) Occurrence of Two Little Cherry Viruses in Sweet Cherry in Washington State. *Plant Disease*, **92**, 234-238.
- Barba, M., Czosnek, H. and Hadidi, A. (2014) Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses*, **6**, 106.
- Barba, M., Ilardi, V. and Pasquini, G. (2015) Chapter Three - Control of Pome and Stone Fruit Virus Diseases. In: *Advances in virus research*. (Loebenstein, G. and Katis, N. I., eds.). Academic Press, pp. 47-83.
- Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356.
- Baulcombe, D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current opinion in plant biology*, **2**, 109-113.
- Benschop, J. J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A. J. R., Slijper, M. and Menke, F. L. H. (2007) Quantitative Phosphoproteomics of Early Elicitor Signaling in Arabidopsis. *Molecular & Cellular Proteomics*, **6**, 1198-1214.
- Bertazzon, N., Filippin, L., Forte, V. and Angelini, E. (2016) Grapevine Pinot gris virus seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy. *Arch Virol*, **161**, 711-714.

- Bertazzon, N., Forte, V., Filippin, L., Causin, R., Maixner, M. and Angelini, E. (2017) Association between genetic variability and titre of Grapevine Pinot gris virus with disease symptoms. *Plant Pathology*, **66**, 949-959.
- Beuve, M., Candresse, T., Tannières, M. and Lemaire, O. (2015) First Report of Grapevine redglobe virus (GRGV) in Grapevine in France. *Plant Disease*, **99**, 422-422.
- Blouin, A. G., Keenan, S., Napier, K. R., Barrero, R. A. and MacDiarmid, R. M. (2018) Identification of a novel vitivirus from grapevines in New Zealand. *Arch Virol*, **163**, 281-284.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., *et al.* (2014) Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus research*, **163**, 262-268.
- Boscia, D., Sabanadzovic, S., Savino, V., Kyriakopoulou, P. E., Martelli, G. P. and Laforteza, R. (1994) A Non-Mechanically Transmissible Isometric Virus-Associated with Asteroid Mosaic of the Grapevine. *Vitis*, **33**, 101-102.
- Brodersen, P. and Voinnet, O. (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet*, **22**, 268-280.
- Buciumeanu, E.-C., Visoiu, E., Guță, I. and Popescu, C. (2010) *Continuity of grapevine virology at NRDIH Ștefănești-Argeș in the service of a viable viticulture in Romania.*
- Burgyan, J. and Havelda, Z. (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci*, **16**, 265-272.
- Burgyan, J., Hornyik, C., Szittya, G., Silhavy, D. and Bicztray, G. (2000) The ORF1 products of tombusviruses play a crucial role in lethal necrosis of virus-infected plants. *J Virol*, **74**, 10873-10881.
- Burton, R. A., Gibeau, D. M., Bacic, A., Findlay, K., Roberts, K., Hamilton, A., *et al.* (2000) Virus-Induced Silencing of a Plant Cellulose Synthase Gene. *The Plant cell*, **12**, 691-706.
- Buschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., *et al.* (1997) The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, **88**, 695-705.
- Calil, I. P. and Fontes, E. P. B. (2017) Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Annals of Botany*, **119**, 711-723.
- Candresse, T., Faure, C., Theil, S., Beuve, M., Lemaire, O., Spilmont, A. S., *et al.* (2017a) First Report of Grapevine asteroid mosaic-associated virus Infecting Grapevine (*Vitis vinifera*) in France. *Plant Disease*, **101**, 1061-1061.
- Candresse, T., Marais, A., Faure, C. and Gentit, P. (2013) Association of Little cherry virus 1 (LChV1) with the Shirofugen Stunt Disease and Characterization of the Genome of a Divergent LChV1 Isolate. *Phytopathology*, **103**, 293-298.
- Candresse, T., Marais, A., Theil, S., Faure, C., Lacombe, T. and Boursiquot, J. M. (2017b) Complete Nucleotide Sequence of an Isolate of Grapevine Satellite Virus and Evidence for the Presence of Multimeric Forms in an Infected Grapevine. *Genome announcements*, **5**.
- Catoni, M., Miozzi, L., Fiorilli, V., Lanfranco, L. and Accotto, G. P. (2009) Comparative Analysis of Expression Profiles in Shoots and Roots of Tomato Systemically Infected by Tomato spotted wilt virus Reveals Organ-Specific Transcriptional Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**, 1504-1513.
- Chapman, E. J., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Dolja, V. V. and Carrington, J. C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & development*, **18**, 1179-1186.
- Chen, J., Nolan, T. M., Ye, H., Zhang, M., Tong, H., Xin, P., *et al.* (2017) Arabidopsis WRKY46, WRKY54, and WRKY70 Transcription Factors Are Involved in Brassinosteroid-Regulated Plant Growth and Drought Responses. *The Plant cell*, **29**, 1425-1439.
- Chen, J., Zhang, H., Feng, M., Zuo, D., Hu, Y. and Jiang, T. (2016) Transcriptome analysis of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) response to the infection by Strawberry vein banding virus (SVBV). *Virology Journal*, **13**, 128.
- Choi, H., Jo, Y., Lian, S., Jo, K. M., Chu, H., Yoon, J. Y., *et al.* (2015) Comparative analysis of chrysanthemum transcriptome in response to three RNA viruses: Cucumber mosaic virus, Tomato spotted wilt virus and Potato virus X. *Plant molecular biology*, **88**, 233-248.

- Coetzee, B., Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J. and Burger, J. T. (2010) Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, **400**, 157-163.
- Consonni, C., Humphry, M. E., Hartmann, H. A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., *et al.* (2006) Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature genetics*, **38**, 716-720.
- Constantin, G. D., Krath, B. N., MacFarlane, S. A., Nicolaisen, M., Johansen, I. E. and Lund, O. S. (2004) Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **40**, 622-631.
- Conti, G., Rodriguez, M. C., Venturuzzi, A. L. and Asurmendi, S. (2017) Modulation of host plant immunity by Tobamovirus proteins. *Annals of Botany*, **119**, 737-747.
- Cook, D. R. (1999) Medicago truncatula--a model in the making! *Current opinion in plant biology*, **2**, 301-304.
- Cretazzo, E., Padilla, C. V. and Velasco, L. (2017) First Report of Grapevine Red Globe virus in grapevine in Spain. *Plant Disease*, **101**, 264-265.
- Cui, J., You, C. J. and Chen, X. M. (2017) The evolution of microRNAs in plants. *Current opinion in plant biology*, **35**, 61-67.
- Czotter, N., Molnár, J., Pesti, R., Demián, E., Baráth, D., Varga, T., *et al.* (2018) Use of siRNAs for Diagnosis of Viruses Associated to Woody Plants in Nurseries and Stock Collections. In: *Viral Metagenomics: Methods and Protocols*. (Pantaleo, V. and Chiumenti, M., eds.). New York, NY: Springer New York, pp. 115-130.
- Czotter, N., Szab, xf, E., Molnar, J., Kocsis, L., *et al.* (2015) FIRST DESCRIPTION OF GRAPEVINE SYRAH VIRUS 1 IN VINEYARDS OF HUNGARY. *Journal of Plant Pathology*, **97**, S74-S74.
- Cseh, E., Takács, A. s. P. t., Gőcörjőnyi, R., Palkovics, L. s. and Kocsis, L. s. (2013) Rt-PCR Analysis and Evolutionary Relationship of Some Hungarian & Grapevine leafroll associated virus& 1 and 3 Isolates. *American Journal of Plant Sciences*, **Vol.04No.10**, 5.
- Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T. and Burgyán, J. (2007) The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *Journal of virology*, **81**, 11768-11780.
- Csorba, T., Kontra, L. and Burgyan, J. (2015) viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, **479-480**, 85-103.
- Dalmay, T., Russo, M. and Burgyan, J. (1993) Repair Invivo of Altered 3'-Terminus of Cymbidium Ringspot Tombusvirus Rna. *Virology*, **192**, 551-555.
- Dardick, C. (2007) Comparative Expression Profiling of Nicotiana benthamiana Leaves Systemically Infected with Three Fruit Tree Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, 1004-1017.
- Dawson, W. O., Lewandowski, D. J., Hilf, M. E., Bubrick, P., Raffo, A. J., Shaw, J. J., *et al.* (1989) A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. *Virology*, **172**, 285-292.
- Devoto, A., Hartmann, H. A., Piffanelli, P., Elliott, C., Simmons, C., Taramino, G., *et al.* (2003) Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family. *Journal of molecular evolution*, **56**, 77-88.
- Di Serio, F., Gisela, A., Navarro, B., Delgado, S., de Alba, A. E. M., Donvito, G., *et al.* (2009) Deep Sequencing of the Small RNAs Derived from Two Symptomatic Variants of a Chloroplastic Viroid: Implications for Their Genesis and for Pathogenesis. *PloS one*, **4**.
- Ding, S. W. (2010) RNA-based antiviral immunity. *Nature reviews. Immunology*, **10**, 632-644.
- Ding, S. W. V., O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, **130**, 413-426.
- Donson, J., Kearney, C. M., Hilf, M. E. and Dawson, W. O. (1991) Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 7204-7208.
- Downen, R. H., Pelizzola, M., Schmitz, R. J., Lister, R., Downen, J. M., Nery, J. R., *et al.* (2012) Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, E2183-E2191.

- Dunoyer, P., Lecellier, C.-H., Parizotto, E. A., Himber, C. and Voinnet, O. (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant cell*, **16**, 1235-1250.
- Eichmeier, A., Kominkova, M., Kominek, P. and Baranek, M. (2016) Comprehensive Virus Detection Using Next Generation Sequencing in Grapevine Vascular Tissues of Plants Obtained from the Wine Regions of Bohemia and Moravia (Czech Republic). *PloS one*, **11**.
- Eichmeier, A., Peňázová, E. and Muljukina, N. (2018) Survey of Grapevine Pinot gris virus in certified grapevine stocks in Ukraine. *European Journal of Plant Pathology*, **152**, 555-560.
- Elbeaino, T., Giampetruzzi, A., De Stradis, A. and Digiario, M. (2014a) Deep-sequencing analysis of an apricot tree with vein clearing symptoms reveals the presence of a novel betaflexivirus. *Virus research*, **181**, 1-5.
- Elbeaino, T., Kiyi, H., Boutarfa, R., Minafra, A., Martelli, G. P. and Digiario, M. (2014b) Phylogenetic and recombination analysis of the homing protein domain of grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates associated with 'yellow mosaic' and 'infectious malformation' syndromes in grapevine. *Arch Virol*, **159**, 2757-2764.
- Elliott, C., Zhou, F., Spielmeier, W., Panstruga, R. and Schulze-Lefert, P. (2002) Functional conservation of wheat and rice Mlo orthologs in defense modulation to the powdery mildew fungus. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **15**, 1069-1077.
- Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schön, H., Sonnewald, S., Weis, E. and Scharfe, J. (2008) RNA Interference-Mediated Repression of Cell Wall Invertase Impairs Defense in Source Leaves of Tobacco. *Plant physiology*, **147**, 1288-1299.
- Esteves, F., Santos, M. T., Eiras-Dias, J. E. and Fonseca, F. (2013) Molecular data mining to improve antibody-based detection of Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1). *Journal of virological methods*, **194**, 258-270.
- Fajardo, T. V. M., Silva, F. N., Eiras, M. and Nickel, O. (2017) High-throughput sequencing applied for the identification of viruses infecting grapevines in Brazil and genetic variability analysis. *Trop Plant Pathol*, **42**, 250-260.
- Fan, H., Zhang, Y., Sun, H., Liu, J., Wang, Y., Wang, X., et al. (2015) Transcriptome Analysis of Beta macrocarpa and Identification of Differentially Expressed Transcripts in Response to Beet Necrotic Yellow Vein Virus Infection. *PloS one*, **10**, e0132277.
- Flores, R., Delgado, S., Rodio, M.-E., Ambros, S., Hernandez, C. and DiSerio, F. (2006) Peach latent mosaic viroid: not so latent. *Molecular plant pathology*, **7**, 209-221.
- Fonseca, F., Duarte, V., Santos, M. T., Brazao, J. and Eiras-Dias, E. (2016) First molecular characterization of grapevine virus B (GVB) in Portuguese grapevine cultivars and improvement of the RT-PCR detection assay. *Arch Virol*, **161**, 3535-3540.
- Gaborjanyi, R., Pasztor, L., Papp, M., Szabo, J., Mesterhazi, A., Nemeth, T., et al. (2003) Use of remote sensing to detect virus infected wheat plants in the field. *Cereal Research Communications*, **31**, 113-120.
- Gambino, G., Cuzzo, D., Fasoli, M., Pagliarini, C., Vitali, M., Boccacci, P., et al. (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**, 5919-5933.
- Gambino, G. P., I.; Gribaudo, I. (2008) A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical analysis : PCA*, **19**, 520-525.
- Gao, R., Xu, Y., Candresse, T., He, Z., Li, S., Ma, Y., et al. (2017) Further insight into genetic variation and haplotype diversity of Cherry virus A from China. *PloS one*, **12**, e0186273.
- Garcia, J. A., Glasa, M., Cambra, M. and Candresse, T. (2014) Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular plant pathology*, **15**, 226-241.
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., et al. (2012) A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus research*, **163**, 262-268.

- Gilbertson, S., Federspiel, J. D., Hartenian, E., Cristea, I. M. and Glaunsinger, B. (2018) Changes in mRNA abundance drive shuttling of RNA binding proteins, linking cytoplasmic RNA degradation to transcription. *eLife*, **7**, e37663.
- Giorgio, G., Irene, P. and Ivana, G. (2008) A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, **19**, 520-525.
- Glasa, M. (2015) First report of little cherry virus-1 in Slovakia. *Journal of plant pathology*, **v. 97**, pp. 542-542-2015 v.2097 no.2013.
- Glasa, M., Predajna, L., Soltys, K., Sabanadzovic, S. and Olmos, A. (2015) Detection and molecular characterisation of Grapevine Syrah virus-1 isolates from Central Europe. *Virus genes*, **51**, 112-121.
- Glasa, M., Predajna, L., Soltys, K., Sihelska, N., Nagyova, A., Wetzel, T., *et al.* (2017) Analysis of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus in Slovakia Reveals Differences in Intra-Host Population Diversity and Naturally Occurring Recombination Events. *The plant pathology journal*, **33**, 34-42.
- Golino, D. A., Fuchs, M., Al Rwahnih, M., Farrar, K., Schmidt, A. and Martelli, G. P. (2017) Regulatory Aspects of Grape Viruses and Virus Diseases: Certification, Quarantine, and Harmonization. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. (Meng, B., Martelli, G., Golino, D. and Fuchs, M., eds.). Springer, Cham, pp. 581-598.
- Gómez-Aix, C., Pascual, L., Cañizares, J., Sánchez-Pina, M. A. and Aranda, M. A. (2016) Transcriptomic profiling of Melon necrotic spot virus-infected melon plants revealed virus strain and plant cultivar-specific alterations. *BMC genomics*, **17**, 429.
- Goszczynski, D. E. (2014) Complete genome sequence of a natural mutant of grapevine virus A (GVA). *Arch Virol*, **159**, 2523-2528.
- Gronlund, M., Constantin, G., Piednoir, E., Kovacev, J., Johansen, I. E. and Lund, O. S. (2008) Virus-induced gene silencing in Medicago truncatula and Lathyrus odorata. *Virus research*, **135**, 345-349.
- Gualandri, V., Asquini, E., Bianchedi, P., Covelli, L., Brilli, M., Malossini, U., *et al.* (2017) Identification of herbaceous hosts of the Grapevine Pinot gris virus (GPGV). *European Journal of Plant Pathology*, **147**, 21-25.
- Guenin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C. and Gutierrez, L. (2009) Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of experimental botany*, **60**, 487-493.
- Guo, Y. and Gan, S. (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, **46**, 601-612.
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T. and Barba, M. (2016) Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology. *Frontiers in Microbiology*, **7**.
- Hamel, L.-P., Benchabane, M., Nicole, M.-C., Major, I. T., Morency, M.-J., Pelletier, G., *et al.* (2011) Stress-Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases Interact with the EAR Motif of a Poplar Zinc Finger Protein and Mediate Its Degradation through the 26S Proteasome. *Plant physiology*, **157**, 1379-1393.
- Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.
- Havelda, Z., Hornyik, C., Válczi, A. and Burgyán, J. (2005) Defective Interfering RNA Hinders the Activity of a Tombusvirus-Encoded Posttranscriptional Gene Silencing Suppressor. *Journal of Virology*, **79**, 450-457.
- Havelda, Z. and Maule, A. J. (2000) Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible Cucurbita pepo cotyledons. *The Plant cell*, **12**, 1975-1986.
- Havelda, Z., Várallyay, E., Valóczi, A. and Burgyán, J. (2008) Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **55**, 278-288.

- Hein, I., Barciszewska-Pacak, M., Hrubikova, K., Williamson, S., Dinesen, M., Soenderby, I. E., *et al.* (2005) Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant physiology*, **138**, 2155-2164.
- Herr, A. J. and Baulcombe, D. C. (2004) RNA silencing pathways in plants. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, **69**, 363-370.
- Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C. and Pogue, G. P. (2002) Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *The Plant Journal*, **30**, 315-327.
- Huang, C., Cun, Y., Yu, H., Tong, Z., Xiao, B., Song, Z., *et al.* (2017) Transcriptomic profile of tobacco in response to Tomato zongate spot orthotospovirus infection. *Virology Journal*, **14**, 153.
- Huang, J., Yang, M. L., Lu, L. and Zhang, X. M. (2016) Diverse Functions of Small RNAs in Different Plant-Pathogen Communications. *Frontiers in Microbiology*, **7**.
- James, D., Phelan, J. and Sanderson, D. (2018) Blackcurrant Leaf Chlorosis Associated Virus: Evidence of the Presence of Circular RNA during Infections. *Viruses*, **10**.
- Jarosova, J. and Kundu, J. K. (2010) Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. *BMC plant biology*, **10**, 146.
- Jelkmann, W. (1995) Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. *The Journal of general virology*, **76 (Pt 8)**, 2015-2024.
- Jelkmann, W., Fechtner, B. and Agranovsky, A. A. (1997) Complete genome structure and phylogenetic analysis of little cherry virus, a mealybug-transmissible closterovirus. *J Gen Virol*, **78**, 2067-2071.
- Jing, L., Günter, B., Tarja, K. and E., T. P. (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant Journal*, **46**, 477-491.
- Jo, Y., Song, M.-K., Choi, H., Park, J.-S., Lee, J.-W., Lian, S., *et al.* (2017) Genome sequence of grapevine virus T, a novel foveavirus infecting grapevine. *Genome Announc.*, **5**, e00995-00917.
- Jones, S., Baizan-Edge, A., MacFarlane, S. and Torrance, L. (2017) Viral Diagnostics in Plants Using Next Generation Sequencing: Computational Analysis in Practice. *Frontiers in plant science*, **8**.
- Katsiani, A., Maliogka, V. I., Katis, N., Svanella-Dumas, L., Olmos, A., Ruiz-Garcia, A. B., *et al.* (2018) High-Throughput Sequencing Reveals Further Diversity of Little Cherry Virus 1 with Implications for Diagnostics. *Viruses*, **10**.
- Kaur, H., Yadav, C. B., Alatar, A. A., Faisal, M., Jyothsna, P., Malathi, V. G., *et al.* (2015) Gene expression changes in tomato during symptom development in response to leaf curl virus infection. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **24**, 347-354.
- Keim-Konrad, R. and Jelkmann, W. (1996) Genome analysis of the 3'-terminal part of the little cherry disease associated dsRNA reveals a monopartite clostero-like virus. *Arch Virol*, **141**, 1437-1451.
- Kesanakurti, P., Belton, M., Saeed, H., Rast, H., Boyes, I. and Rott, M. (2017) Comparative analysis of cherry virus A genome sequences assembled from deep sequencing data. *Arch Virol*, **162**, 2821-2828.
- Kim, H. J., Hong, S. H., Kim, Y. W., Lee, I. H., Jun, J. H., Phee, B.-K., *et al.* (2014) Gene regulatory cascade of senescence-associated NAC transcription factors activated by ETHYLENE-INSENSITIVE2-mediated leaf senescence signalling in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, **65**, 4023-4036.
- Koloniuk, I., Sarkisova, T., Petrzik, K., Lenz, O., Přibylková, J., Fránová, J., *et al.* (2018) Variability Studies of Two Prunus-Infecting Fabaviruses with the Aid of High-Throughput Sequencing. *Viruses*, **10**, 204.
- Kominek, P., Glasa, M. and Bryxiova, M. (2005) Analysis of the molecular variability of Grapevine leafroll-associated virus 1 reveals the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines. *Virus genes*, **31**, 247-255.
- Komorowska, B. and Cieślińska, M. (2004) First Report of Cherry virus A and Little cherry virus-1 in Poland. *Plant Disease*, **88**, 909-909.
- Konishi, S., Sasakuma, T. and Sasanuma, T. (2010) Identification of novel Mlo family members in wheat and their genetic characterization. *Genes & genetic systems*, **85**, 167-175.

- Kontra, L., Csorba, T., Tavazza, M., Lucioli, A., Tavazza, R., Moxon, S., *et al.* (2016) Distinct Effects of p19 RNA Silencing Suppressor on Small RNA Mediated Pathways in Plants. *PLOS Pathogens*, **12**, e1005935.
- Kumagai, M. H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. and Grill, L. K. (1995) Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 1679-1683.
- Lange, M., Yellina, A. L., Orashakova, S. and Becker, A. (2013) Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems. *Methods in molecular biology*, **975**, 1-14.
- Laucou, V., Boursiquot, J.-M., Lacombe, T. and Bordenave, L. (2008) *Parentage of grapevine rootstock 'Fercal' finally elucidated*.
- Lehoczky, J., Boscia, D., Burgyan, J., Castellano, M., Beczner, L. and Farkas, G. (1987) Line pattern, a novel virus disease of grapevine in Hungary. In: *Proc. 9th Meeting ICVG, Kiryat Anavim*. . pp. 23-30.
- Lehoczky, J., Burgyán, J (1986) A paradicsom fekete gyűrűs foltosság virus előfordulása szőlőben Magyarországon. *Kertgazdaság*, **18**, 47-57.
- Lehoczky, J., Farkas, G. (1981) A szőlő látens foltosságának előfordulása Magyarországon. *Kertgazdaság*, **13**, 15-25.
- Li, H. and Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25**, 1754-1760.
- Liu, D., Shi, L., Han, C., Yu, J., Li, D. and Zhang, Y. (2012) Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PloS one*, **7**, e46451.
- Liu, H.-W., Liang, C.-Q., Liu, P.-F., Luo, L.-X. and Li, J.-Q. (2015) Quantitative proteomics identifies 38 proteins that are differentially expressed in cucumber in response to cucumber green mottle mosaic virus infection. *Virology Journal*, **12**, 216.
- Liu, J., Yang, J., Bi, H. and Zhang, P. (2014) Why mosaic? Gene expression profiling of African cassava mosaic virus-infected cassava reveals the effect of chlorophyll degradation on symptom development. *Journal of Integrative Plant Biology*, **56**, 122-132.
- Lozsa, R., Csorba, T., Lakatos, L. and Burgyan, J. (2008) Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. *Nucleic acids research*, **36**, 4099-4107.
- Mahlein, A.-K. (2015) Plant Disease Detection by Imaging Sensors – Parallels and Specific Demands for Precision Agriculture and Plant Phenotyping. *Plant Disease*, **100**, 241-251.
- Maliogka, V. I., Minafra, A., Saldarelli, P., Ruiz-Garcia, A. B., Glasa, M., Katis, N., *et al.* (2018) Recent Advances on Detection and Characterization of Fruit Tree Viruses Using High-Throughput Sequencing Technologies. *Viruses*, **10**.
- Mallory, A. and Vaucheret, H. (2010) Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *The Plant cell*, **22**, 3879-3889.
- Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Bartel, D., Vance, V. B. and Bowman, L. H. (2002) A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 15228-15233.
- Mallory, A. C. and Vaucheret, H. (2009) ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO reports*, **10**, 521-526.
- Marais, A., Faure, C. and Candresse, T. (2016) New Insights into Asian Prunus Viruses in the Light of NGS-Based Full Genome Sequencing. *PloS one*, **11**, e0146420.
- Marais, A., Faure, C., Mustafayev, E., Barone, M., Alioto, D. and Candresse, T. (2014) Characterization by Deep Sequencing of Prunus virus T, a Novel Tepovirus Infecting Prunus Species. *Phytopathology*, **105**, 135-140.
- Marais, A., Faure, C., Svanella-Dumas, L. and Candresse, T. (2008) First Report of Cherry virus A in Prunus mume in China. *Plant Disease*, **92**, 1589-1589.

- Marais, A., Svanella, D. L., Barone, M., Gentit, P., Faure, C., Charlot, G., *et al.* (2012) Development of a polyvalent RT-PCR detection assay covering the genetic diversity of Cherry capillovirus A. *Plant Pathology*, **61**, 195-204.
- Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Michoud, G. and Daffonchio, D. (2018) Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality. *Microbiome*, **6**, 3.
- Maree, H. J., Fox, A., Al Rwahnih, M., Boonham, N. and Candresse, T. (2018) Application of HTS for Routine Plant Virus Diagnostics: State of the Art and Challenges. *Frontiers in plant science*, **9**.
- Martelli, G. P. (2014) Directory of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine and Their Agents. *Journal of Plant Pathology*, **96**, 1-136.
- Martelli, G. P. and Lehoczy, J. (1968) Isolation of Arabis mosaic virus from Hungarian grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, **7**, 129-133.
- Martelli, G. P., Lehoczy, J., Quacquarelli, A. (1965) Host range and properties of a virus associated with Hungarian grapevines showing macroscopic symptoms of fanleaf and yellow mosaic. In: *International conference on virus and vector on perennial hosts, with special reference to Vitis*. Davis, California, USA, pp. 389–401.
- Mascia, T., Santovito, E., Gallitelli, D. and Cillo, F. (2010) Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. *Molecular plant pathology*, **11**, 805-816.
- Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H. and Candresse, T. (2014) Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus research*, **188**, 90-96.
- Massart, S., Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnikar, M., *et al.* (2017) A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies. *Frontiers in Microbiology*, **8**.
- Mavric, I., Virscek, M., Marn, M. V. and Koron, D. (2003) First report of raspberry bushy dwarf virus on red raspberry and grapevine in Slovenia. *Plant Disease*, **87**, 1148-1148.
- Mazen, A. and Na-Sheng, L. (2015) Roles of plant hormones in the regulation of host–virus interactions. *Molecular plant pathology*, **16**, 529-540.
- Megrelishvili, I., Khidesheli, Z., Ujmajuridze, L. and Chiqovani, N. (2016) The study of viral diseases in georgian vine grafted nurseries. *International Journal of Development Research*, **06**, 8299-8302.
- Meng, B., Rebelo, A. R. and Fisher, H. (2006) Genetic diversity analyses of grapevine Rupestris stem pitting-associated virus reveal distinct population structures in scion versus rootstock varieties. *The Journal of general virology*, **87**, 1725-1733.
- Meraï, Z., Kerenyi, Z., Molnar, A., Barta, E., Valoczi, A., Bisztray, G., *et al.* (2005) Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J Virol*, **79**, 7217-7226.
- Mlotshwa, S., Schauer, S. E., Smith, T. H., Mallory, A. C., Herr, J. M., Roth, B., *et al.* (2005) Ectopic *DICER-LIKE1* Expression in P1/HC-Pro *Arabidopsis* Rescues Phenotypic Anomalies but Not Defects in MicroRNA and Silencing Pathways. *The Plant cell*, **17**, 2873-2885.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R. and Schaffer, A. A. (2008) Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, **24**, 1757-1764.
- Naidu, R., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D. and Martelli, G. P. (2014) Grapevine Leafroll: A Complex Viral Disease Affecting a High-Value Fruit Crop. *Plant Disease*, **98**, 1172-1185.
- Nakaune, R., Toda, S., Mochizuki, M. and Nakano, M. (2008) Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. *Arch Virol*, **153**, 1827.
- Navarro, B., Pantaleo, V., Gisela, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., *et al.* (2009) Deep Sequencing of Viroid-Derived Small RNAs from Grapevine Provides New Insights on the Role of RNA Silencing in Plant-Viroid Interaction. *PloS one*, **4**.
- Nemes, K., Gellert, A., Balazs, E. and Salanki, K. (2014) Alanine scanning of cucumber mosaic virus (CMV) 2b protein identifies different positions for cell-to-cell movement and gene silencing suppressor activity. *PloS one*, **9**, e112095.

- Ollat, N., Bordenave, L., Tandonnet, J. P., Boursiquot, J. M. and Marguerit, E. (2016) Grapevine rootstocks: origins and perspectives. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, pp. 11-22.
- Panstruga, R. (2005) Discovery of novel conserved peptide domains by ortholog comparison within plant multi-protein families. *Plant molecular biology*, **59**, 485-500.
- Pantaleo, V., Szittyá, G., Moxon, S., Miozzi, L., Moulton, V., Dalmay, T., *et al.* (2010) Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. *Plant Journal*, **62**, 960-976.
- Parent, J.-S., Martínez de Alba, A. E. and Vaucheret, H. (2012) The origin and effect of small RNA signaling in plants. *Frontiers in plant science*, **3**.
- Paudel, D. B. and Sanfaçon, H. (2018) Exploring the Diversity of Mechanisms Associated With Plant Tolerance to Virus Infection. *Frontiers in plant science*, **9**.
- Peter, S., Cécile, C., Kaouthar, S., Marianne, B., Arnould, S. and Hans-Peter, B. (2014) Biochemical characterization of proline dehydrogenase in Arabidopsis mitochondria. *The FEBS Journal*, **281**, 2794-2804.
- Peyret, H. and Lomonosoff, G. P. (2015) When plant virology met Agrobacterium: the rise of the deconstructed clones. *Plant biotechnology journal*, **13**, 1121-1135.
- Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., *et al.* (2002) The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant physiology*, **129**, 1076-1085.
- Plesko, I. M., Marn, M. V., Nyerges, K. and Lazar, J. (2012) First Report of Raspberry bushy dwarf virus Infecting Grapevine in Hungary. *Plant Disease*, **96**, 1582-1582.
- Pocza, P., Hyvönen, J., Taller, J., Jahnke, G. and Kocsis, L. (2013) Phylogenetic Analyses of Teleki Grapevine Rootstocks Using Three Chloroplast DNA Markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, **31**, 371-386.
- Pooggin, M. M. (2018) Small RNA-Omics for Plant Virus Identification, Virome Reconstruction, and Antiviral Defense Characterization. *Frontiers in Microbiology*, **9**.
- Quito-Avila, D. F., Ibarra, M. A., Alvarez, R., Peralta, E. L. and Martin, R. R. (2014) A raspberry bushy dwarf virus isolate from Ecuadorean Rubus glaucus contains an additional RNA that is a rearrangement of RNA-2. *Archives of virology*, **159**, 2519-2521.
- Ramegowda, V., Mysore, K. S. and Senthil-Kumar, M. (2014) Virus-induced gene silencing is a versatile tool for unraveling the functional relevance of multiple abiotic-stress-responsive genes in crop plants. *Frontiers in plant science*, **5**, 323.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M. and Baulcombe, D. C. (2001) Technical Advance: Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal*, **25**, 237-245.
- Reynard, J. S., Brodard, J., Dubuis, N., Yobregat, O., Kominek, P., Schumpp, O., *et al.* (2017) First Report of Grapevine rupestris vein feathering virus in Swiss Grapevines. *Plant Disease*, **101**, 1062.
- Robatzek, S. and Somssich, I. E. (2002) Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev*, **16**, 1139-1149.
- Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V. and Mysore, K. S. (2014) Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in plant science*, **5**, 17.
- Roossinck, M. J., Martin, D. P. and Roumagnac, P. (2015) Plant Virus Metagenomics: Advances in Virus Discovery. *Phytopathology*, **105**, 716-727.
- Rotenberg, D., Thompson, T. S., German, T. L. and Willis, D. K. (2006) Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *Journal of virological methods*, **138**, 49-59.
- Ruiz-Ferrer, V. and Voinnet, O. (2009) Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual review of plant biology*, **60**, 485-510.
- Ruiz, M. T., Voinnet, O. and Baulcombe, D. C. (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant cell*, **10**, 937-946.
- Sabanadzovic, S., Abou-Ghanem, N., Castellano, M. A., Digiario, M. and Martelli, G. P. (2000) Grapevine fleck virus-like viruses in Vitis. *Arch Virol*, **145**, 553-565.

- Sabanadzovic, S., Ghanem-Sabanadzovic, N. A. and Gorbalenya, A. E. (2009) Permutation of the active site of putative RNA-dependent RNA polymerase in a newly identified species of plant alpha-like virus. *Virology*, **394**, 1-7.
- Sablowski, R. W. M. and Meyerowitz, E. M. (1998) A Homolog of *NO APICAL MERISTEM* Is an Immediate Target of the Floral Homeotic Genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell*, **92**, 93-103.
- Šafářová, D., Faure, C., Candresse, T., Navrátil, M., Nečas, T. and Marais, A. (2016) First Report of Little cherry virus 1 Infecting Apricot in the Czech Republic. *Plant Disease*, **101**, 845.
- Saldarelli, P., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Malossini, U., Pirolo, C., Bianchedi, P., *et al.* (2015) Genetic Variability of Grapevine Pinot gris virus and Its Association with Grapevine Leaf Mottling and Deformation. *Phytopathology*, **105**, 555-563.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1983) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1982. ISBN 0-87969-136-0.
- Sanfaçon, H. (2017) Grand Challenge in Plant Virology: Understanding the Impact of Plant Viruses in Model Plants, in Agricultural Crops, and in Complex Ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, **8**.
- Satoh, K., Yoneyama, K., Kondoh, H., Shimizu, T., Sasaya, T., Choi, I.-R., *et al.* (2013) Relationship between gene responses and symptoms induced by Rice grassy stunt virus. *Frontiers in Microbiology*, **4**, 313.
- Schweizer, P., Pokorny, J., Schulze-Lefert, P. and Dudler, R. (2000) Technical advance. Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **24**, 895-903.
- Seo, J.-K., Kim, M.-K., Kwak, H.-R., Choi, H.-S., Nam, M., Choe, J., *et al.* (2018) Molecular dissection of distinct symptoms induced by tomato chlorosis virus and tomato yellow leaf curl virus based on comparative transcriptome analysis. *Virology*, **516**, 1-20.
- Seo, J.-K., Wu, J., Lii, Y., Li, Y. and Jin, H. (2013) Contribution of Small RNA Pathway Components in Plant Immunity. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **26**, 617-625.
- Shivprasad, S., Pogue, G. P., Lewandowski, D. J., Hidalgo, J., Donson, J., Grill, L. K., *et al.* (1999) Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology*, **255**, 312-323.
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M., *et al.* (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21-to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *Embo J*, **21**, 3070-3080.
- Silver, S., Quan, S. and Deom, C. M. (1996) Completion of the nucleotide sequence of sunn-hemp mosaic virus: a tobamovirus pathogenic to legumes. *Virus genes*, **13**, 83-85.
- Soledad, R. Y., Miguel, C. N., Georgina, F. and Elena, A. M. (2017) Differential control and function of Arabidopsis ProDH1 and ProDH2 genes on infection with biotrophic and necrotrophic pathogens. *Molecular plant pathology*, **18**, 1164-1174.
- Strathmann, A., Kuhlmann, M., Heinekamp, T. and Dröge-Laser, W. (2001) BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development. *The Plant Journal*, **28**, 397-408.
- Sun, F., Fang, P., Li, J., Du, L., Lan, Y., Zhou, T., *et al.* (2016) RNA-seq-based digital gene expression analysis reveals modification of host defense responses by rice stripe virus during disease symptom development in Arabidopsis. *Virology Journal*, **13**, 202.
- Szathmáry, E., Tóbiás, I., Dragoyski, K. and Palkovics, L. (2009) Partial molecular characterization of an unusual, recombinant Plum pox virus isolate from Bulgaria. *Acta virologica*, **53**, 65-67.
- Szittya, G., Molnár, A., Silhavy, D., Hornyik, C. and Burgyán, J. (2002) Short Defective Interfering RNAs of Tombusviruses Are Not Targeted but Trigger Post-Transcriptional Gene Silencing against Their Helper Virus. *The Plant cell*, **14**, 359-372.
- Szittya, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, Á., Lakatos, L., *et al.* (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *The EMBO Journal*, **22**, 633-640.

- Thomas, C. L., Leh, V., Lederer, C. and Maule, A. J. (2003) Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology*, **306**, 33-41.
- Tim, I., Anne, S., Stefan, B., Thomas, Z., Thorsten, H., Anne, G. h., *et al.* (2010) Homo- and heterodimers of tobacco bZIP proteins counteract as positive or negative regulators of transcription during pollen development. *The Plant Journal*, **63**, 155-166.
- Turnage, M. A., Muangsan, N., Peele, C. G. and Robertson, D. (2002) Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **30**, 107-114.
- Umer, M., Liu, J., You, H., Xu, C., Dong, K., Luo, N., *et al.* (2019) Genomic, Morphological and Biological Traits of the Viruses Infecting Major Fruit Trees. *Viruses*, **11**.
- Valon, C., Smalle, J., Goodman, H. M. and Giraudat, J. (1993) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene (TMKL1) encoding a putative transmembrane protein with an unusual kinase-like domain. *Plant molecular biology*, **23**, 415-421.
- Varallyay, E., Burgyan, J. and Havelda, Z. (2007) Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods*, **43**, 140-145.
- Varallyay, E., Burgyan, J. and Havelda, Z. (2008) MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc*, **3**, 190-196.
- Varallyay, E., Olah, E. and Havelda, Z. (2014) Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. *Nucleic acids research*, **42**, 599-608.
- Varallyay, E., Valoczi, A., Agyi, A., Burgyan, J. and Havelda, Z. (2010) Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *Embo J*, **29**, 3507-3519.
- Vargason, J. M., Szittyá, G., Burgyan, J. and Hall, T. M. (2003) Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell*, **115**, 799-811.
- Varveri, C., Maliogka, V. I. and Kapari-Isaia, T. (2015) Chapter One - Principles for Supplying Virus-Tested Material. In: *Advances in virus research*. (Loebenstein, G. and Katis, N. I., eds.). Academic Press, pp. 1-32.
- Vaucheret, H. (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & development*, **20**, 759-771.
- Vaucheret, H. (2009) AGO1 Homeostasis Involves Differential Production of 21-nt and 22-nt miR168 Species by MIR168a and MIR168b. *PloS one*, **4**, e6442.
- Vaucheret, H., Mallory, A. C. and Bartel, D. P. (2006) AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Molecular cell*, **22**, 129-136.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P. and Bartel, D. P. (2004) The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & development*, **18**, 1187-1197.
- Vigne, E., Marmonier, A. and Fuchs, M. (2008) Multiple interspecies recombination events within RNA2 of Grapevine fanleaf virus and Arabis mosaic virus. *Arch Virol*, **153**, 1771-1776.
- Villamor, D. E. V., Pillai, S. S. and Eastwell, K. C. (2017) High throughput sequencing reveals a novel fabavirus infecting sweet cherry. *Arch Virol*, **162**, 811-816.
- Vogelmann, K., Drechsel, G., Bergler, J., Subert, C., Philippar, K., Soll, J., *et al.* (2012) Early Senescence and Cell Death in *Arabidopsis* *saul1* Mutants Involves the *PAD4*-Dependent Salicylic Acid Pathway. *Plant physiology*, **159**, 1477-1487.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M. and Baulcombe, D. C. (1999) Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 14147-14152.
- Voncina, D., Al Rwahnih, M., Rowhani, A., Gouran, M. and Almeida, R. P. P. (2017) Viral Diversity in Autochthonous Croatian Grapevine Cultivars. *Plant Disease*, **101**, 1230-1235.
- Wang, M.-B., Masuta, C., Smith, N. A. and Shimura, H. (2012) RNA Silencing and Plant Viral Diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **25**, 1275-1285.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., *et al.* (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, **32**, 947.

- Weiberg, A., Wang, M., Bellinger, M. and Jin, H. L. (2014) Small RNAs: A New Paradigm in Plant-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, Vol 52, **52**, 495-516.
- White, J. L. and Kaper, J. M. (1989) A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples. *Journal of virological methods*, **23**, 83-93.
- Woo, H. R., Kim, H. J., Nam, H. G. and Lim, P. O. (2013) Plant leaf senescence and death – regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of Cell Science*, **126**, 4823.
- Wu, Q. and Habili, N. (2017) The recent importation of Grapevine Pinot gris virus into Australia. *Virus genes*.
- Wu, Q. F., Wang, Y., Cao, M. J., Pantaleo, V., Burgyan, J., Li, W. X., *et al.* (2012) Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 3938-3943.
- Xiao, H.-J., Liu, K.-K., Li, D.-W., Arisha, M. H., Chai, W.-G. and Gong, Z.-H. (2015) Cloning and characterization of the pepper CaPAO gene for defense responses to salt-induced leaf senescence. *BMC Biotechnology*, **15**, 100.
- Xiao, H. and Meng, B. (2016) First Report of Grapevine asteroid mosaic-associated virus and Grapevine rupestris vein feathering virus in Grapevines in Canada. *Plant Disease*, **100**, 2175-2175.
- Yang, F., Wang, G.-p., Jiang, B., Liu, Y.-h., Liu, Y., Wu, G.-w., *et al.* (2013) Differentially expressed genes and temporal and spatial expression of genes during interactions between Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) and a severe Citrus tristeza virus isolate. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **83**, 17-24.
- Yang, L., Du, Z., Gao, F., Wu, K., Xie, L., Li, Y., *et al.* (2014) Transcriptome profiling confirmed correlations between symptoms and transcriptional changes in RDV infected rice and revealed nucleolus as a possible target of RDV manipulation. *Virology Journal*, **11**, 81-81.
- Yu, Y., Jia, T. R. and Chen, X. M. (2017) The "how" and "where" of plant microRNAs. *New Phytologist*, **216**, 1002-1017.
- Zerbino, D. R. and Birney, E. (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, **18**, 821-829.
- Zhang, C. and Ghabrial, S. A. (2006) Development of Bean pod mottle virus-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology*, **344**, 401-411.
- Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J., *et al.* (2006) Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev*, **20**, 3255-3268.
- Zhang, Z., Li, D. W., Jin, J. H., Yin, Y. X., Zhang, H. X., Chai, W. G., *et al.* (2015) VIGS approach reveals the modulation of anthocyanin biosynthetic genes by CaMYB in chili pepper leaves. *Frontiers in plant science*, **6**, 500.
- Zhang, Z., Qi, S., Tang, N., Zhang, X., Chen, S., Zhu, P., *et al.* (2014) Discovery of Replicating Circular RNAs by RNA-Seq and Computational Algorithms. *PLOS Pathogens*, **10**, e1004553.
- Zhao, H., Zhao, K., Wang, J., Chen, X., Chen, Z., Cai, R., *et al.* (2015) Comprehensive Analysis of Dicer-Like, Argonaute, and RNA-dependent RNA Polymerase Gene Families in Grapevine (*Vitis Vinifera*). *Journal of Plant Growth Regulation*, **34**, 108-121.
- Zhu, X., Chen, J., Qiu, K. and Kuai, B. (2017) Phytohormone and Light Regulation of Chlorophyll Degradation. *Frontiers in plant science*, **8**.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., *et al.* (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature*, **428**, 764.
- Zvereva, A. S. and Pooggin, M. M. (2012) Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. *Viruses*, **4**, 2578-2597.

12 Várallyay Éva közleményeinek jegyzéke.

12.1 Az értekezés alapját képező közlemények.

1. **É. Várallyay***, Zs. Lichner, J. Sáfrány, Z. Havelda, P. Salamon, Gy. Bisztray and J. Burgyán (2010): Development of a virus induced gene silencing vector from a legumes infecting tobamovirus **Acta Biologica Hungarica** 61(4):457-69. **IF:0,793**, idegen hivatkozás: **8**
2. **Várallyay E***, Giczey G., Burgyán J. (2012): Virus induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in Triticum aestivum. **Archives of Virology** 157:1345–1350. **IF:2,03**, idegen hivatkozás: **24**
3. **É. Várallyay** and Z. Havelda (2013): Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. **Molecular Plant Pathology** 14: (6) pp. 567-575. **IF:4,485**, idegen hivatkozás: **39**
4. **É. Várallyay**, E. Oláh and Z. Havelda (2013): Independent paralleled functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. **Nucleic Acid Research** 42: pp. 599-608. **IF:9,112**, idegen hivatkozás: **20**
5. Oláh, R. Pesti, D. Taller, Z. Havelda and **É. Várallyay*** (2016) Non-targeted effects of VIGS vectors on host endogenous gene expression, **Archives of Virology** 161:2387–2393 doi:10.1007/s00705-016-2921-9. **IF:2,058**, idegen hivatkozás: **2**
6. N. Czotter, J. Molnar, E. Szabó, E. Demian, L. Kontra, I. Baksa, Gy. Szittyá, L. Kocsis, T. Deak, Gy. Bisztray, G. E. Tusnady, J. Burgyán and **E. Várallyay*** (2018) NGS of virus-derived small RNAs as a diagnostic method used to determine viromes of Hungarian vineyards., **Frontiers in Microbiology** 9, 122 doi.org/10.3389/fmicb.2018.00122. **IF:4,259**, idegen hivatkozás: **8**
7. Czotter, N., Molnár, J., Pesti, R., Demián, E., Baráth, D., Varga, T., **Várallyay, É.*** (2018) Use of siRNAs for Diagnosis of Viruses Associated to Woody Plants in Nurseries and Stock Collections. In: Viral Metagenomics: **Methods and Protocols**. (Pantaleo, V. and Chiumenti, M., eds.). New York, NY: Springer New York, pp. 115-130. doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_9 idegen hivatkozás: **1**
8. Baráth, D.; Jaksa-Czotter, N.; Molnár, J.; Varga, T.; Balássy, J.; Szabó, L.K.; Kirilla, Z.; Tusnady, G.E.; Preininger, É.; **Várallyay, É.*** (2018) Small RNA NGS Revealed the Presence of Cherry Virus A and Little Cherry Virus 1 on Apricots in Hungary. **Viruses** 10, 318. doi.org/10.3390/v10060318. **IF:3,811** idegen hivatkozás: **2**
9. R. Pesti, L. Kontra, K. Paul, I. Vass, T. Csorba, Z. Havelda and **Éva Várallyay*** (2019) Differential gene expression and physiological changes during acute or persistent plant virus interactions may contribute to viral symptom differences. **PLoS ONE** 14(5): e0216618. doi.org/10.1371/journal.pone.0216618. **IF:2,776** idegen hivatkozás: **1**
10. Demian, E., Jaksa-Czotter, N., Molnar, J., Tusnady, G. E., Kocsis, L. and **Várallyay, E.*** (2020) Grapevine rootstocks can be a source of infection with non-regulated viruses. **European Journal of Plant Pathology** doi.org/10.1007/s10658-020-01942-w. **IF:1,774** idegen hivatkozás:-
11. Elbeaino, T.; Kontra, L.; Demian, E.; Jaksa-Czotter, N.; Slimen, A.B.; Fabian, R.; Lazar, J.; Tamisier, L.; Digiario, M.; Massart, S.; **Várallyay, E.*** (2020) Complete Sequence, Genome Organization and Molecular Detection of Grapevine Line Pattern Virus, a New Putative Anulavirus Infecting Grapevine. **Viruses**, 12, 602. doi.org/10.3390/v12060602. **IF:3,811** idegen hivatkozás:-

Összes IF:34,879, idegen hivatkozások:104

12.2 Az értekezéshez kapcsolódó további közlemények.

11. E.Farkas, N. Czotter, R. Lózsa, T. Dula, I. Ember, **É. Várallyay**, E. Szegedi (2014) Conventional PCR primers for the detection of grapevine pathogens disseminated by propagating material. **International Journal of Horticultural Sciences** 20(3-4):69-80
12. Czotter N, Deák T, Lázár J, Bisztray Gy, Burgyán J, **Várallyay Éva** (2014): Diagnosztikai módszerek fejlesztése a szőlő vírus fertőzöttségének megállapítására. **Növényvédelem** 50(12): 547-555.
13. Czotter, N., Manduláné Farkas, E., Lózsa, R., Ember, I., Szűcsné Varga, G., **Várallyay, É.**, Szegedi, E. (2015). Primers designed for the detection of grapevine pathogens spreading with propagating material by quantitative real-time PCR. **International Journal of Horticultural Science** 21 (1–2): 21–30.
14. Czotter, N, E. Szabó, J. Molnár, L. Kocsis, J., T. Deák, Gy. Bisztray, G. E. Tusnády, J. Burgyán, **É. Várallyay**. (2015) First description of Grapevine Syrah virus-1 in vineyards of Hungary, *Journal of Plant Pathology* 97 (S), S74.
15. Czotter Nikoletta, Szabó Emese, Molnár János, Pesti Réka, Oláh Enikő, Deák Tamás, Bisztray György, Tusnády E. Gábor, Kocsis László, Burgyán József és **Várallyay Éva** (2015) Szőlőültetvényeink metagenomikai diagnosztikája új, hazánkban eddig nem leírt vírusok jelenlétét mutatta ki. **Növényvédelem** 51 (12), 550-559.
16. Czotter N, Molnár J, Deák T, Tusnády E. G, Kocsis L, Burgyán J, **Várallyay É.** (2016) Magyarországon megjelenő új szőlő vírusok azonosítása kisRNS-ek szekvenálásán alapuló metagenomikai módszerekkel, **Georgikon for Agriculture** 20 (1), 34-38.
17. Czotter Nikolett, Czakó Kamilla, Várallyay Éva és Szegedi Ernő (2016): Molekuláris diagnosztikai módszerek a szőlő szaporítóanyaggal terjedő károsítóinak kimutatására, **Kertgazdaság** 48(2), 37-44.
18. Czotter Nikoletta, Demián Emese, Molnár János, Tusnády E. Gábor, Kocsis László, Burgyán József és **Várallyay Éva** (2016): szőlő vírusdiagnosztika új megközelítésben, **Borászati füzetek** 26(4) 22-27.
19. Endre Barta, Zsófia Bánfalvi, Zoltán Havelda, László Hiripi, Zoltán Jeney, János Kiss, Balázs Kolics, Ferenc Marincs, Dániel Silhavy, **Éva Várallyay** (2016) Agricultural genomics: an overview of next generation sequencing projects at the NARIC-Agricultural Biotechnology Institute, **Hungarian Agricultural Research** 25:10-21
20. Baráth Dániel, Czotter Nikoletta, Bükki Alexandra, Oláh Beatrix, Balássy Júlia, Varga Tünde, Szabó Luca, Tóth Tímea, Kirilla Zoltán, Kocsis László, Preininger Éva, Lakatos Tamás, **Várallyay Éva** (2018): Új csonthéjasokat fertőző vírusok kimutatása Magyarországon, **Georgikon for Agriculture**, 22 (1): 28-33.
21. Massart, S., Chiumenti, M., De Jonghe, K., Glover, R., Haegeman, A., Koloniuk, I., Komínek, P., Kreuze, J., Kutnjak, D., Lotos, L., Maclot, F., Maliogka, V.I., Maree, H., Olivier, T., Olmos, A., Pooggin, M., Reynard, J.-S.S., Ruiz-García, A.B., Safarova, D., Schneeberger, P.H.H., Sela, N., Turco, S., Vainio, E.J., **Várallyai, E.**, Verdin, E., Westenberg, M., Brostaux, Y. and Candresse, T. (2018) Virus detection by high-throughput sequencing of small RNAs: large scale performance testing of sequence analysis strategies. *Phytopathology*. 2018 Aug 2. doi: 10.1094/PHYTO-02-18-0067-R. **IF:3,264** idegen hivatkozás: 6

12.3 A PhD megszerzése óta megjelent, az értekezésben nem tárgyalt impact faktoros nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények.

Malik Z, Amir S, Pal G, Buzás Zs, **Várallyay É**, Antal J, Szilágyi L, Vekey K, Asbóth B, Patthy A, Gráf, L (1999): Proteinase inhibitors from desert locust, *Schistocerca gregaria*: engineering of both P (1) and P (1)' residues converts a potent chymotrypsin inhibitor to a potent trypsin inhibitor. **Biochim Biophys Acta.** 1434(1):143-50. **IF:2,59**, idegen hivatkozás: **29**

Molnar A, Csorba T, Lakatos L, **Varallyay E**, Lacomme C, Burgyan J.(2005):Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. **Journal of Virology** 79(12):7812-8. **IF:5,178**, idegen hivatkozás: **256**

Valoczi A, **Varallyay E**, Kauppinen S, Burgyan J, Havelda Z. (2006): Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. **Plant Journal** 47(1):140-51. **IF:6,565**, idegen hivatkozás: **89**

Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z. (2007): Detection of microRNAs by northern blot analyses using LNA probes. **Methods** 43(2):140-145. **IF:3,667**, idegen hivatkozás: **49**

Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z. (2008): MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. **Nature Protocols.** 3(2):190-6. **IF:4,17**, idegen hivatkozás: **274**

Havelda Z.+, **Várallyay É+**, Válóczy A., Burgyán, J. (2008): Plant virus infection induced persistent host gene down regulation in systemically infected leaves **Plant Journal** 55(2):278-288. **IF:6,493**, idegen hivatkozás: **49**

Várallyay É*, Válóczy A., Burgyán, J., Havelda Zoltán (2009): Vírusos fertőzés indukálta génexpressziós változások vizsgálata növényekben. **Növényvédelem** 45 (3), 109-114.

Várallyay Éva*, Vida Gyula, Giczey Gábor, Veisz Ottó, Burgyán József és Havelda Zoltán (2010): Egyszerű festési eljárás egyszikűek liszttharमतfertőzésének megállapítására és alkalmazása búzafajták jellemzésére. **Növényvédelem** 46 (5), 233-239.

Salamon Pál, **Várallyay Éva**, Nemes Katalin és Salánki Katalin (2010): Termesztett és vadon élő burgonyafélék vírusos betegségei és vírusai Magyarországon. 7. Az uborka mozaik vírus (cucumber mosaic virus, cmv) fehér törzsének előfordulása dohányon (*Nicotiana tabacum* L.) És a cmv-ntw izolátum tulajdonságai **Növényvédelem** 46 (5), 218-225.

Éva Várallyay, Anna Válóczy, Ákos Ágyi, József Burgyán and Zoltán Havelda (2010): Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation **EMBO J.** 20;29(20):3507-19. **IF:10,124**, idegen hivatkozás: **122**

Várallyay E, Havelda Z. (2011): Detection of microRNAs in Plants by In Situ Hybridisation. **Methods Mol Biol.** 732:9-23. idegen hivatkozás: **5**

Zsolt Czimmerer, Julianna Hulvely, Zoltan Simandi, **Eva Varallyay**, Zoltan Havelda, Erzsebet Szabo, Attila Varga, Balazs Dezso, Maria Balogh, Attila Horvath, Balint Domokos, Zsolt Torok, Laszlo Nagy, Balint L. Balint (2013). A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules. **PLoS One.** 2013;8(1):e55168. doi: 10.1371/journal.pone.0055168. **IF:3,534**, idegen hivatkozás: **44**

Péter Vilmos, Ágnes Bujna, Milán Szuperák, Zoltán Havelda, **Éva Várallyay**, János Szabad, Lucie Kucerova, Kálmán Somogyi, Ildikó Kristó, Tamás Lukácsovich, Ferenc Jankovics, László Henn, Miklós Erdélyi (2013):The miR-282 *Drosophila melanogaster* microRNA gene regulates viability, longevity, and egg production. **Genetics** 195: (2) pp. 469-480. **IF:4,886**, idegen hivatkozás: **44**

Kis A, Tholt G, Ivanics M, **Várallyay É**, Jenes B, Havelda Z. (2015). Polycistronic artificial miRNA-mediated resistance to Wheat dwarf virus in barley is highly efficient at low temperature. **Molecular Plant Pathology**, 2015 Jul 1. doi: 10.1111/mpp.12291. **IF:4,697** idegen hivatkozás: **36**

Baksa I, Nagy T, Barta E, Havelda Z, **Várallyay É**, Silhavy D, Burgyán J, Szittya G (2015) Identification of *Nicotiana benthamiana* microRNAs and their targets using high throughput sequencing and degradome analysis. **BMC Genomics**. 2015 Dec 1;16(1):1025. doi: 10.1186/s12864-015-2209-6. **IF:3,867**, idegen hivatkozás: **18**

Zsolt Czimmerer; Tamas Varga; Mate Kiss; Cesaré Ovando Vázquez; Quang Minh Doan-Xuan; Dominik Rückerl; Sudhir Gopal Tattikota; Xin Yan; Zsuzsanna S. Nagy; Bence Daniel; Szilard Poliska; Attila Horvath; Gergely Nagy; **Eva Várallyay**; Matthew N. Poy; Judith E. Allen; Zsolt Bacso; Cei Abreu-Goodger; Laszlo Nagy. The IL4-STAT6 signaling axis establishes a conserved microRNA signature in human and mouse macrophages regulating cell survival via miR-342-3p (2016) **Genome Medicine** 8:63. **IF:7,071**, idegen hivatkozás: **19**

Gábor Reuter, **Éva Várallyay**, Dániel Baráth, Gábor Földvári, Sándor Szekeres, Ákos Boros, Beatrix Kapusinszky, Eric Delwart, Péter Pankovics (2019) Analysis of a novel RNA virus in a wild northern white-breasted hedgehog (*Erinaceus roumanicus*.) **Archives of Virology**, doi.org/10.1007/s00705-019-04414-7. **IF:2,261** idegen hivatkozás: -

Ezek impakt faktora: **66,086**, idegen hivatkozása:**1006**

Első, utolsó, vagy levelezőszerzős közlemények impakt faktora a dolgozatban tárgyalt közleményeken kívül: **17,961**, idegen hivatkozása:**445**

13 Függelék

13.1 Táblázatok

Könyvtár kód	az ültetvény kora éveken	az analízis típusa	Nepovíruses										Vitiviruses				Tymoviruses				rutinszerűen emm vizsgált vírusok						víroldok		az ültetvényen előforduló összes vírális patogén száma																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
			ArMV		GCMV		GLRaV1		GLRaV2		GLRaV3		GVA		GVB		GRGV		GAMaV		GRFV új		GRFV		GSW		GRSPaV			RBDVs		GSV		HSVd		GYSW-1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
			GFLV																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					

1.táblázat A termő szőlőültetvények vírusdiagnosztikai eredményeinek összehasonlító táblázata
(0 – nincs találat, 1- van találat, vagy termék, S- a termék Sanger szekvenálása is megtörtént.

könyvtár kód	az analízis típusa	vizsgálatköteles vírusok								Viroidok			nem vizsgálatköteles vírusok		
		GFLV	ArMV	GFkV	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GVA	GVB	HSVd	GYVd-1	AGV	GRSPaV	GSyV	GPGV
1_BSZ	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	S
2_BB	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S
3_FH	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	S	S
4_BH	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	S
5_ZE	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	S	S
6_ZG	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S
7_NG	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	S	S
8_MT	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	S
9_MR	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S
10_V	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	PCR	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S
11_P	contig blast	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1
	read mapping	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
	PCR	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	S	1	S	S
12_KSZ	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	PCR	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S
13_SZ	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	S	S
14_AD	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S
15_TC	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
	PCR	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S
16_TC2	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
	PCR	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S
17_LB	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	S
18_AS	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	S	S
19_TB	contig blast	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
	read mapping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	S

2. táblázat A szőlő alanyültetvények vírusdiagnosztikai eredményeinek összehasonlító táblázata
(0 – nincs találat, 1- van találat, vagy termék, S- a terméke Sanger szekvenálása is megtörtént.

13.2 Rövidítések jegyzéke

AGO - Argonaute fehérje
ALiMMV - Amazon lily mild mottle virus
ARF – auxin response faktor (auxin response factor)
ArMV - Arabisz mozaik vírus (Arabidopsis mosaic virus)
BPMV - bean pod mottle virus
BSMV - árpa csíkos mozaik vírus (barley stripe mosaic virus)
BZL - bázikus leucin zipzár (BZL)-4
cDNS – komplementer DNS (complementary DNA)
CESA - sejtfal szintáz (cell wall synthase)
CH42 - chalcone szintáz (chalcone synthase)
CIRV - szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus (carnation Italian ringspot virus)
CMV - uborkamozaik vírus (cucumber mosaic virus)
CP - köpenyfehérje (coat protein)
Cph – ciklofillin
CPs - klorofill a/b kötő fehérje
crTMV - keresztesvirágúakat fertőző dohánymozaik vírus (crucifer infecting tobamovirus)
CVA - cseresznye A vírus (cherry virus A)
CWINV - sejtfal invertáz (cell wall invertase)
CymRSV - Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (Cymbidium ringspot virus)
DCL – DICER like
DEG - különbözően expresszáló gének (differentially expressed genes)
DEP – különböző expressziót mutató próbák (differentially expressed probes) (DEPs))
DI – defektív interferáló (defecting interfering)
DNS - deoxiribonukleinsav
dsRNS - kétszálú RNS (double stranded RNS – dsRNS)
EF - elongációs faktor
GAMaV - grapevine asteroid mosaic-associated virus
Gapdh - gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz
GCMV - szőlő króm mozaik vírust (grapevine chrome mosaic virus)
GLD - szőlő-levélsodródás betegség (grapevine leafroll disease)
GFkV - szőlő foltosodás vírus (grapevine fleck virus)
GFLV - szőlő fertőző leromlás (grapevine fanleaf virus)
GFP - zöld fluoreszcens fehérjét (green fluorescent protein)
GLPV - szőlő vonalas mintázottság vírust (grapevine line pattern virus)
GLRaV - szőlő levélsodródás asszociált vírus (grapevine leafroll associated virus)
GPGV - szőlő Pinot gris vírust (grapevine Pinot gris virus)
GRGV - grapevine redglobe virus
GRSPaV - szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus (grapevine rupestris stem pitting associated virus)
GRVfV - grapevine rupestris vein feathering virus
GST - glutation S-transzferáz (glutathione S-transferase)
GSyV-1 – szőlő Syrah vírus (grapevine Syrah virus)
GUS - β -glukuronidáz
GVA, GVB, GVD - szőlő vírus A, B, E...(grapevine virus A, B, E...)
GYSVd - szőlő sárga foltosság viroid (grapevine yellow speckle viroid)
H1E - hiszton

HSP - hősokk fehérjét (heat shock protein)
HSVd - komló törpülés viroid (hop stunt viroid)
HTS - nagy-áteresztő képességű szekvenálás (high-throughput sequencing)
JA - jázmonát
LChV - cseresznye aprógyümölcsűség vírus (little cherry virus)
LDH - laktát-dehidrogenáz
LRR - leucin gazdag (leucin rich repeat)
miRNS - mikro RNS
MLO – lisztharmat rezisztencia gén o (powdery mildew resistance o)
MP - mozgási fehérje (movement protein)
MQ – MilliQ tisztaságú desztillált víz
ORF - nyitott leolvasási keretet (open reading frame)
PLMVd - őszibarack látens mozaik viroid (peach latent viroid)
PAO - pheoforbid-a oxigenáz
PCR – polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PDF protodermal faktor
PDS - fitoen deszaturáz (phytoen desaturase)
PDV - szilva törpülés vírus (prune dwarf virus)
PEBV - pea early brown virus
PNRSV - Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (Prunus necrotic ringspot virus)
PPV – szilvahimlő vírus (plum pox virus)
PR – patogén kapcsolt (patogen related)
ProDH - prolin dehidrogenáz
PVX - burgonya X vírus (potato virus X)
qRT-PCR – kvantitatív reverz transzkripciót követő PCR (quantitative real time RT-PCR)
RCC - vörös klorofill intermedier (red Chl catabolite intermediate)
RdRp - RNS-függő RNS-polimeráz (RNA dependent RNA polymerase)
RISC – RNS indukált géncsendesítési komplex (RNA induced silencing complex)
RNS - ribonukleinsav
RNSi – RNS interferencia (RNA interference)
RT-PCR - reverz transzkripciót követő PCR
Rubisco - ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz/oxigenáz
SA - szalicilsav
SHMV - sunnhemp mosaic vírus
siRNS - kis interferáló (small interfering)
sRNS – kis RNS (small RNA)
TCV - tarlórépa gödrösödés vírus (turnip crinkle virus)
TEV - tobacco etch virus
TGS - transzkripcionális RNSi (transcriptional gene silencing)
TMKL - transzmembrán kinázszerű (transmembrane kinase like)
TMV - dohánymozaik vírus (tobacco mosaic virus)
ToMV – paradicsom mozaik vírus (tomato mosaic virus)
TRV - dohány zörgőlevelűség vírus (tobacco rattle virus)
UTR – nem transzlálódó (untranslated)
VANA - vírus associated nucleic acid
VIGS - vírus indukált géncsendesítésen alapuló (virus induced gene silencing based)
VSR - RNSi gátló fehérje (viral silencing repressor)
ZF – cin ujj (zinc finger)

13.3 Az értekezéshez kapcsolódó publikációk első oldalainak másolata.

Acta Biologica Hungarica 61(4), pp. 457–469 (2010)
DOI: 10.1556/ABiol.61.2010.4.9

DEVELOPMENT OF A VIRUS INDUCED GENE SILENCING VECTOR FROM A LEGUMES INFECTING TOBAMOVIRUS

ÉVA VÁRALLYAY,^{1*} ZSUZSANNA LICHNER,¹ JUDIT SÁFRÁNY,¹ Z. HAVELDA,¹
P. SALAMON,² GY. BISZTRAY³ and J. BURGÁN¹

¹Agricultural Biotechnology Centre, Plant Biology Institute, Szent-Györgyi Albert út 4,
H-2100 Gödöllő, Hungary

²Rákóczi út 14, H-4521 Berkesz, Hungary

³Department of Viticulture, Faculty of Horticultural Sciences, Corvinus University of Budapest,
Ménesi út 44, H-1118 Budapest, Hungary

(Received: October 28, 2009; accepted: January 14, 2010)

Medicago truncatula, the model plant of legumes, is well characterized, but there is only a little knowledge about it as a viral host. Viral vectors can be used for expressing foreign genes or for virus-induced gene silencing (VIGS), what is a fast and powerful tool to determine gene functions in plants. Viral vectors effective on *Nicotiana benthamiana* have been constructed from a number of viruses, however, only few of them were effective in other plants. A Tobamovirus, *Sunhemp mosaic virus* (SHMV) systemically infects *Medicago truncatula* without causing severe symptoms. To set up a viral vector for *Medicago truncatula*, we prepared an infectious cDNA clone of SHMV. We constructed two VIGS vectors differing in the promoter element to drive foreign gene expression. The vectors were effective both in the expression and in the silencing of a transgene Green Fluorescent Protein (GFP) and in silencing of an endogenous gene Phytoene desaturase (PDS) on *N. benthamiana*. Still only one of the vectors was able to successfully silence the endogenous Chlorata 42 gene in *M. truncatula*.

Keywords: VIGS – SHMV – *Medicago truncatula* – gene silencing – functional genomics

INTRODUCTION

Medicago truncatula is a model plant of legume research [4] because it has a small, diploid genome, autogamous genetics and a fast life cycle. Its genome has been sequenced; *M. truncatula* genome 3.0 assembly release is available at www.medicago.org. Although it is widely used in genome research there is no detailed description about it as a viral host.

RNA interference (RNAi) is an ultimate tool to determine the function of genes. RNAi is triggered by double-stranded RNA molecules that either enters or is generated in the cell and eventually triggers the cleavage of cognate mRNAs [1]. Virus infection in plants also generates 21–25 nt long small interfering (si) RNAs [11]. These siRNAs are recruited by the RISC complex which guides the sequence specific breakdown of any RNA species showing sequence similarity to the inducing

*Corresponding author; e-mail: varallya@abc.hu

Author's personal copy

Arch Virol (2012) 157:1345–1350
DOI 10.1007/s00705-012-1286-y

BRIEF REPORT

Virus-induced gene silencing of *Mlo* genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*

Éva Várallyay · Gábor Giczey · József Burgyán

Received: 6 October 2011 / Accepted: 14 February 2012 / Published online: 24 March 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Powdery mildew is one of the most important cereal diseases worldwide. Genetic analysis has revealed that mutant alleles of the *Mlo* gene cause broad-spectrum resistance against this pathogen in barley. In this study, the possibility of inducing broad-spectrum powdery mildew resistance against this pathogen by RNAi of the barley *Mlo* ortholog in wheat was examined using virus-induced gene silencing (VIGS). A clear correlation was found between resistance and accumulation of *Mlo*-specific siRNAs, raising the possibility of designing powdery mildew resistance in wheat by RNA silencing using both transgenic and non-transgenic approaches.

Powdery mildew, caused by the obligate biotrophic fungus *Blumeria graminis*, is one of the most important diseases of cereals worldwide. While broad-spectrum resistance against this pathogen exists in barley as a result of a natural and induced mutation in the *Mlo* gene [11], wheat varieties exhibit only gene-for-gene, interaction-based, race-specific resistance. As new races of the pathogen can easily break this type of resistance, there is a constant demand for non-race-specific resistance in wheat.

MLO is a transmembrane protein [13] and functions as a negative regulator that suppresses plant defenses in uninfected tissues. It is involved in protection against cell death as well as in responses to biotic and abiotic stresses [14]. In

the absence of the functional protein, the threshold for triggering the cell's defense reaction is lowered [4], and successful entry of powdery mildew spores into host epidermal cells is inhibited not only in monocot but in dicot plant species [1, 5]. In hexaploid wheat, seven *Mlo* cDNAs have been found [12]. Three of them (TaMlo-1A, 1B and 1D) represent the three ancient genomes and show exceptional similarity to the barley orthologue [6, 7]. Wild-type TaMlo1B of wheat can complement *mlo* mutant barley at the single-cell level [7], indicating that the function of these genes has been preserved during evolution.

RNA interference (RNAi), triggered by double-stranded RNA molecules, is an important tool for determining or silencing the functions of genes. Dicer enzymes of the plant generate 21- to 24-nt-long small interfering (si) RNAs from the dsRNA precursor. One strand of these siRNAs is recruited by the RISC complex, which guides functional impairment, either by breakdown or translational inhibition, of any RNA species showing sequence similarity to the inducing small RNA [2]. Transient double-stranded-RNA-induced RNAi of the *Mlo* gene has been shown to result in a significant decrease in the germination and penetration efficiency of the fungal structures of powdery mildew at the single-cell level in barley [15]. VIGS is an RNAi-based tool for determining or silencing the functions of genes. A barley stripe mosaic virus (BSMV)-based silencing system used in VIGS studies in monocot plants [10] has been adopted and used successfully in wheat for functional analysis of Lr21-mediated leaf rust resistance [16].

In this study, we demonstrate that targeting endogenous *Mlo* by the BSMV-based VIGS approach can result in broad-spectrum powdery mildew resistance in wheat at the organism level. In addition, we have found a clear correlation between the accumulation of *Mlo*-specific siRNA

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-012-1286-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

É. Várallyay (✉) · G. Giczey · J. Burgyán
Agricultural Biotechnology Center, Plant Virology Group,
Szent Györgyi A. út 4, Gödöllő 2100, Hungary
e-mail: varallya@abc.hu



MOLECULAR PLANT PATHOLOGY

DOI: 10.1111/mpp.12029

Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level

ÉVA VÁRALLYAY AND ZOLTÁN HAVELDA*

Plant Developmental Biology Group, Agricultural Biotechnology Center, Szent Györgyi A. út 4, Gödöllő H-2100, Hungary

SUMMARY

Various plant viruses ubiquitously mediate the induction of miR168, resulting in the control of ARGONAUTE 1 (AGO1), which is the pivotal component of the microRNA (miRNA) regulation pathway and can also exhibit antiviral function. Here, we demonstrate that miR168-driven control of AGO1 can persist for a long time in virus-infected plants and can be an important component of symptom development. We also show that infection of RNA viruses belonging to various genera is associated with the transcriptional induction of the *MIR168* precursor gene. Moreover, in a transient expression study, we reveal that different unrelated viral suppressors of RNA silencing (VSRs) are responsible for the enhanced accumulation of miR168. The induction of miR168 accumulation is an early function of VSRs and this activity is associated with the control of the endogenous AGO1 protein level. The common ability of unrelated VSRs to induce the miR168 level implies that this activity might be a component of the host defence suppression in plant–virus interactions.

INTRODUCTION

RNA silencing is a conserved regulatory mechanism controlling endogenous gene expression and also serving as an antiviral defence system (Ding, 2010; Ding and Voinnet, 2007; Mlotshwa *et al.*, 2005). Virus infection in plants triggers the production of virus-specific small interfering RNAs (siRNAs) by the RNA silencing machinery, which are then incorporated into the RNA-induced silencing complex (RISC), inducing the sequence-specific degradation of the complementary viral RNAs (Pantaleo *et al.*, 2007). However, as a counteracting strategy, plant viruses have evolved to encode potent suppressor proteins (viral suppressors of RNA silencing; VSRs) to disable the RNA silencing-based host defence system (Burgyn, 2008; Burgyn and Havelda, 2011; Mlotshwa *et al.*, 2008).

The ARGONAUTE (AGO) proteins are the executor components of RISCs, bringing about the degradation or translational inhibition of target RNA specified by the incorporated small RNA (Mallory and Vaucheret, 2010). The role of AGO1 as the key constituent of the major antiviral RISC is supported by the following observations: (i) AGO1 recruits virus-specific siRNAs (Zhang *et al.*, 2006); (ii) virus-specific siRNAs of *Cymbidium ringspot virus*

(CymRSV) co-fractionate with large protein complexes that contain AGO1 and probably correspond to RISCs (Csorba *et al.*, 2010; Pantaleo *et al.*, 2007); (iii) several VSRs are able to interact directly with AGO1 inhibiting its antiviral functions (Azevedo *et al.*, 2010; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Csorba *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2010; Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006); (iv) *ago1* hypomorphic mutants are more susceptible to viral infections (Morel *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008). In addition to AGO1, other AGO proteins can be involved in RNA silencing-based defence reactions (Alvarado and Scholthof, 2011; Harvey *et al.*, 2011; Jaubert *et al.*, 2011; Scholthof *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). AGO1 also plays a role, as the key RISC component, in the microRNA (miRNA) pathway regulating target RNAs through cleavage or translational inhibition (Mallory and Bouche, 2008; Mallory and Vaucheret, 2010; Mallory *et al.*, 2008). The level of AGO1 is controlled by the action of an miRNA (miR168) (Rhoades *et al.*, 2002; Vaucheret *et al.*, 2004); however, fine regulation of the AGO1 level requires additional factors, such as the action of AGO1-derived siRNAs on AGO1 mRNA (Mallory and Vaucheret, 2009), AGO1 mediated post-transcriptional stabilization of miR168 and the co-regulated expression of the AGO1 and *MIR168* genes (Vaucheret *et al.*, 2006). Recent studies have described the increased expression of miR168 and AGO1 mRNA in virus-infected plants (Csorba *et al.*, 2007; Havelda *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2011; Várallyay *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006). In line with the vital role of AGO1 in RNA silencing-based defence, we have shown previously that the induction of AGO1 mRNA expression is a potential host defence mechanism enhancing the concentration of the main executor molecule, whereas the induction of miR168 and the subsequent translational control of AGO1 protein accumulation is a viral counter defence strategy (Várallyay *et al.*, 2010). Using a transient expression system and virus infection studies, it was revealed that the p19 VSR of CymRSV is responsible for the induction of miR168 and the subsequent regulation of the AGO1 level (Várallyay *et al.*, 2010). However, the potential role of AGO1 level control in symptom development and the factors responsible for miR168 induction in various unrelated virus infections were not investigated.

In this study, we reveal that the control of AGO1 accumulation in *Nicotiana benthamiana* is mediated by several viruses belonging to different genera. We demonstrate that, during the infection process of different viruses, the transcriptional activity of the *MIR168a* gene is induced in *Arabidopsis thaliana*. Using a transient protein expression assay, we show that VSRs of different

*Correspondence: Email: havelda@abc.hu

Published online 22 September 2013

Nucleic Acids Research, 2014, Vol. 42, No. 1 599–608
doi:10.1093/nar/gkt846

Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity

Éva Várallyay, Enikő Oláh and Zoltán Havelda*

Agricultural Biotechnology Center, Institute for Plant Biotechnology, Plant Developmental Biology Group, Szent-Györgyi A. út 4, Gödöllő H-2100, Hungary

Received May 31, 2013; Revised August 9, 2013; Accepted August 30, 2013

ABSTRACT

Plant viruses ubiquitously mediate the induction of miR168 through the activities of viral suppressors of RNA silencing (VSRs) controlling the accumulation of ARGONAUTE1 (AGO1), one of the main components of RNA silencing based host defence system. Here we used a mutant Tombusvirus p19 VSR (p19-3M) disabled in its main suppressor function, small interfering RNA (siRNA) binding, to investigate the biological role of VSR-mediated miR168 induction. Infection with the mutant virus carrying p19-3M VSR resulted in suppressed recovery phenotype despite the presence of free virus specific siRNAs. Analysis of the infected plants revealed that the mutant p19-3M VSR is able to induce miR168 level controlling the accumulation of the antiviral AGO1, and this activity is associated with the enhanced accumulation of viral RNAs. Moreover, saturation of the siRNA-binding capacity of p19 VSR mediated by defective interfering RNAs did not influence the miR168-inducing activity. Our data indicate that p19 VSR possesses two independent silencing suppressor functions, viral siRNA binding and the miR168-mediated AGO1 control, both of which are required to efficiently cope with the RNA-silencing based host defence. This finding suggests that p19 VSR protein evolved independent parallel capacities to block the host defence at multiple levels.

INTRODUCTION

RNA silencing is a small RNA-based regulatory system that controls target RNAs by endonucleotic cleavage or translational repression through the activities of ARGONAUTE (AGO) proteins (1,2). Plant virus

infections are associated with the accumulation of virus-specific small interfering RNAs (siRNAs) generated by the activity of Dicer-like proteins, which are then incorporated into the AGO protein containing RNA-induced silencing complex (RISC) bringing about the sequence specific degradation of viral RNAs (3). To evade the siRNA-based antiviral host defence plant viruses have evolved viral suppressors of RNA silencing (VSRs) interfering with the RNA-silencing pathway mainly by sequestering viral siRNAs or interacting with key RNA silencing components (4,5). Micro RNAs (miRNAs) represent another RNA-silencing pathway, which are indispensable for the control of wide variety of biological functions, including development, hormone responses, feed-back mechanisms, biotic and abiotic stresses (2). miRNAs are generated by sequential processing of genome-coded long single-stranded RNA. AGO1 is one of the most important AGO proteins playing central role in miRNA-mediated regulation of endogenous mRNAs and siRNA-directed control of virus infections (6). *AGO1* mRNA itself is a subject of an miRNA-mediated regulation via the activity of miR168 (7–9). Plant virus infections are often associated with increased miR168 level leading to the downregulation of the antiviral AGO1 (10). Tombusvirus p19 VSR was shown to be responsible for over-accumulation of miR168, which resulted in downregulation of AGO1 protein level (10). Previously, it was demonstrated that the main activity of p19 VSR is to bind selectively and hence sequester viral specific siRNAs (11,12). Recently, it was found that other unrelated VSRs are responsible for miR168 induction and the subsequent AGO1 level control (13). This observation indicates that miR168-mediated alleviation of RNA silencing-based host defence might be a widespread viral counter defence mechanism. However, it remained to be elusive whether miR168 induction is the consequence of the main suppressor activity of VSRs or it is an independently evolved parallel function. All of the investigated VSRs possessing the ability to induce the miR168 level

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +36 28526155; Fax: +36 28526101; Email: havelda@abc.hu

© The Author(s) 2013. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com



Non-targeted effects of virus-induced gene silencing vectors on host endogenous gene expression

Enikő Oláh¹ · Réka Pesti¹ · Dénes Taller¹ · Zoltán Havelda¹ · Éva Várallyay¹

Received: 7 January 2016 / Accepted: 31 May 2016 / Published online: 9 June 2016
© Springer-Verlag Wien 2016

Abstract Virus-induced gene silencing (VIGS) uses recombinant viruses to study gene function; however, the effect of the virus vector itself on the gene expression of the host is not always considered. In our work, we investigated non-targeted gene expression changes of the host in order to see how often these changes appear. Effects of various VIGS vector infections were analysed by monitoring gene expression levels of housekeeping genes by Northern blot analysis in four different hosts. We found that non-targeted changes happens very often. More importantly, these non-targeted effects can cause drastic changes in the gene-expression pattern of host genes that are usually used as references in these studies. We have also found that in a tobacco rattle virus (TRV)-based VIGS, the presence of foreign sequences in the cloning site of the vector can also have a non-targeted effect, and even the use of an internal control can lead to unpredicted changes. Our results show that although VIGS is a very powerful technique, the VIGS vector, as a pathogen of the host, can cause unwanted changes in its gene-expression pattern, highlighting the importance of careful selection of both the genes to be tested and those to be used as references in the planned experiments.

Introduction

Virus-induced gene silencing (VIGS) is an RNA interference (RNAi)-based method to study gene function. The VIGS vector itself is a recombinant virus engineered to be able to carry a piece of an endogenous gene from the host. During infection with this modified vector, the host's defence reaction will be induced against the cloned host gene itself, and a loss-of-function phenotype makes it possible to identify the function of the gene. To easily monitor the efficiency of the test, a fragment of the host's phytoene desaturase (PDS) gene is usually also cloned into the vector. Reduction in the internal PDS mRNA level and activity leads to a decreased carotenoid level and ability to protect against photo bleaching, and as a consequence of efficient silencing, white leaves appear. As the host range of plant viruses varies, different VIGS vectors are used for different plant species [1, 14, 16, 20] (Supplementary Table 1).

Virus infection not only induces RNAi but also can alter the gene expression pattern of the host and induce efficient mRNA downregulation ("shut-off") of important endogenous host genes [1, 4, 5]. "Shut-off" affects a number of host genes in the nucleus, at the transcription level, by an unknown mechanism. Its presence differs from one plant-virus interaction to another and can be monitored by detecting changes in the endogenous ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression levels [5]. VIGS vectors usually behave similarly to their virus of origin during virus infection; however, as they are engineered, changes in their movement, replication ability, their potential to suppress RNAi and also their effect on endogenous genes can be changed. In our work, we studied the effect of different widely used VIGS vectors on the expression pattern of host genes in four different hosts to

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-016-2921-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Éva Várallyay
varallya@abc.hu

¹ Plant Developmental Biology and Diagnostics Groups, Agricultural Biotechnology Institute, National Agricultural Research and Innovation Centre, Szent-Györgyi Albert utca 4., 100 Gödöllő, Hungary



NGS of Virus-Derived Small RNAs as a Diagnostic Method Used to Determine Viromes of Hungarian Vineyards

Nikoletta Czotter¹, Janos Molnar^{2,3}, Emese Szabó¹, Emese Demian¹, Levente Kontra¹, Ivett Baksa¹, Gyorgy Szittya¹, Laszlo Kocsis⁴, Tamas Deak⁵, Gyorgy Bisztray⁵, Gabor E. Tusnady², Jozsef Burgyan¹ and Eva Varallyay^{1*}

¹ National Agricultural Research and Innovation Center, Agricultural Biotechnology Institute, Gödöllo, Hungary, ² Research Center of Natural Sciences, Institute of Enzymology, HAS, Budapest, Hungary, ³ Department of Biotechnology, Nanophage-therapy Center, Enviroinvest Corporation, Pécs, Hungary, ⁴ Department of Horticulture, Georgikon Faculty, University of Pannonia, Keszthely, Hungary, ⁵ Department of Viticulture, Institute of Viticulture and Oenology, Szent-Istvan University, Budapest, Hungary

OPEN ACCESS

Edited by:

Gabor Jakab,
University of Pécs, Hungary

Reviewed by:

Massimiliano Morelli,
Istituto per la Protezione Sostenibile
delle Pianta (CNR), Italy
Stefanie Christine Becker,
University of Veterinary Medicine
Hannover, Germany

*Correspondence:

Eva Varallyay
varallyay.eva@abc.naik.hu

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Microbe Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 30 October 2017

Accepted: 18 January 2018

Published: 06 February 2018

Citation:

Czotter N, Molnar J, Szabó E,
Demian E, Kontra L, Baksa I,
Szittya G, Kocsis L, Deak T,
Bisztray G, Tusnady GE, Burgyan J
and Varallyay E (2018) NGS of
Virus-Derived Small RNAs as a
Diagnostic Method Used to Determine
Viromes of Hungarian Vineyards.
Front. Microbiol. 9:122.
doi: 10.3389/fmicb.2018.00122

As virus diseases cannot be controlled by traditional plant protection methods, the risk of their spread have to be minimized on vegetatively propagated plants, such as grapevine. Metagenomic approaches used for virus diagnostics offer a unique opportunity to reveal the presence of all viral pathogens in the investigated plant, which is why their application can reduce the risk of using infected material for a new plantation. Here we used a special branch, deep sequencing of virus-derived small RNAs, of this high-throughput method for virus diagnostics, and determined viromes of vineyards in Hungary. With NGS of virus-derived small RNAs we could detect not only the viruses tested routinely, but also new ones, which had never been described in Hungary before. Virus presence did not correlate with the age of the plantation, moreover phylogenetic analysis of the identified virus isolates suggests that infections are mostly caused by the use of infected propagating material. Our results, validated by other molecular methods, raised further questions to be answered before this method can be introduced as a routine, reliable test for grapevine virus diagnostics.

Keywords: grapevine, vineyard, virus, virome, diagnostics, metagenomics, small RNA, NGS

INTRODUCTION

Grapevine can host more than 60 viruses and viroids (Al Rwahnih et al., 2009; Martelli, 2014), often as multiplied infection. Vegetative propagation and long lifetime of the plantation increase the risk of virus infection which cannot be controlled by traditional plant protection methods. The use of highly adaptive cultivars globalizes not only the presence of the particular cultivar but also the spread of new pathogens and their vector organisms. Safety regulations deal only with a limited number of known viruses and ignore new invading pathogens, which can lead to the use of infected propagating material and produce a new level of persistent infection risk. Traditional diagnostic methods can only answer the question whether or not the investigated virus is present in our sample, and need preliminary information about the pathogen (antigen for ELISA and sequence information of the particular variant for PCR-based methods). In striking contrast, deep sequencing



Chapter 9

Use of siRNAs for Diagnosis of Viruses Associated to Woody Plants in Nurseries and Stock Collections

Nikoletta Czotter, János Molnár, Réka Pesti, Emese Demián, Dániel Baráth, Tünde Varga, and Éva Várallyay

Abstract

Woody perennial plants like grapevine and fruit trees can be infected by several viruses even as multiple infections. Since they are propagated vegetatively, the phytosanitary status of the propagation material (both the rootstock and the variety) can have a profound effect on the lifetime and health of the new plantations. The fast evolution of sequencing techniques provides a new opportunity for metagenomics-based viral diagnostics. Viral derived small RNAs produced by the host immune system during viral infection can be sequenced by next-generation techniques and analyzed for the presence of viruses, revealing the presence of all known viral pathogens in the sample. This method is based on Illumina sequencing of short RNAs and bioinformatics analysis of virus-derived small RNAs in the host. Here we describe a protocol for this challenging technique step by step with notes, in order to ensure success for every user.

Key words Virus, Diagnostics, Small RNA, Next-generation sequencing

1 Introduction

Next-generation sequencing (NGS) methods and discovery of RNA interference opened new possibilities in virus diagnostics [1–3]. During virus infection, small interfering RNAs of viral origin (21–25 nt long) representing the exact sequence of the infecting viruses are formed by the plant immune system [4]. Deep sequencing and bioinformatics analysis of the small RNA population extracted directly from field-grown plants offer a unique opportunity to reveal the presence of any virus or viroid present in the sample [5, 6], even if they were not described before [2, 7]. Small RNA NGS can also be used to test in parallel for the presence of all quarantined viruses in the sample. The probable decrease in the price of sequencing and more experience in the use and validation of this new method will revolutionize virus diagnostics by the authorities in the near future [8]. We used this technique to filter out virus infection in grapevine and fruit trees even in the stock collections and rootstock plantations.



Communication

Small RNA NGS Revealed the Presence of Cherry Virus A and Little Cherry Virus 1 on Apricots in Hungary

Dániel Baráth ¹, Nikolett Jaksá-Czotter ¹, János Molnár ², Tünde Varga ¹, Júlia Balássy ¹, Luca Krisztina Szabó ³, Zoltán Kirilla ³, Gábor E. Tusnády ⁴, Éva Preininger ³ and Éva Várallyay ^{1,*}

- ¹ Agricultural Biotechnology Institute, NARIC, 2100 Gödöllő, Hungary; barath.daniel@abc.naik.hu (D.B.); czotter.nikoletta@abc.naik.hu (N.J.-C.); varga.tunde07@gmail.com (T.V.); sargarigofutty@gmail.com (J.B.)
² Department of Biotechnology, Nanophagetherapy Center, Enviroinvest Corporation, 7632 Pécs, Hungary; molnarjanesz@gmail.com
³ Fruitculture Research Institute, NARIC, 1223 Budapest, Hungary; szabo.luca.krisztina@fruitresearch.naik.hu (L.K.S.); zoltan.kirilla@gmail.com (Z.K.); e.preininger@resinfra.hu (É.P.)
⁴ Institute of Enzymology, Research Center of Natural Sciences, HAS, 1117 Budapest, Hungary; tusnady.gabor@ttk.mta.hu
* Correspondence: varallyay.eva@abc.naik.hu; Tel.: +36-28-526140

Received: 11 May 2018; Accepted: 9 June 2018; Published: 11 June 2018



Abstract: Fruit trees, such as apricot trees, are constantly exposed to the attack of viruses. As they are propagated in a vegetative way, this risk is present not only in the field, where they remain for decades, but also during their propagation. Metagenomic diagnostic methods, based on next generation sequencing (NGS), offer unique possibilities to reveal all the present pathogens in the investigated sample. Using NGS of small RNAs, a special field of these techniques, we tested leaf samples of different varieties of apricot originating from an isolator house or open field stock nursery. As a result, we identified Cherry virus A (CVA) and little cherry virus 1 (LChV-1) for the first time in Hungary. The NGS results were validated by RT-PCR and also by Northern blot in the case of CVA. Cloned and Sanger sequenced viral-specific PCR products enabled us to investigate their phylogenetic relationships. However, since these pathogens have not been described in our country before, their role in symptom development and modification during co-infection with other viruses requires further investigation.

Keywords: small RNA NGS; metagenomics; diagnostics; fruit tree viruses; Cherry virus A; little cherry virus 1; apricot

1. Introduction

Apricot (*Prunus armeniaca*) is one of the most popular fruits in central Europe, especially in Hungary, where it is not only consumed as a fresh fruit, but also serves as a raw material for jam and “Palinka” (a distilled spirit) production. Thanks to intensive breeding programs since 1950, many varieties have become available with improved characteristics for these specific purposes. In accordance with the usual routine [1], mother trees of the new, approved varieties free from viruses are kept in isolator houses to prevent subsequent exposure to viruses, especially the Plum pox virus (PPV), and infections. They are also kept in open field stock nurseries which provide propagation material for the future.

RESEARCH ARTICLE

Differential gene expression and physiological changes during acute or persistent plant virus interactions may contribute to viral symptom differences

Réka Pesti¹, Levente Kontra^{1‡a}, Kenny Paul^{2‡b}, Imre Vass², Tibor Csorba³, Zoltán Havelda⁴, Éva Várallyay^{1*}

1 Diagnostic Group, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute, National Agricultural Research and Innovation Centre, Gödöllő, Hungary, **2** Institute of Plant Biology, Biological Research Centre, Szeged, Hungary, **3** Virology Group, Department of Plant Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute, National Agricultural Research and Innovation Centre, Gödöllő, Hungary, **4** Plant Developmental Biology Group, Department of Plant Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute, National Agricultural Research and Innovation Centre, Gödöllő, Hungary

‡a Current address: Agricultural Genomics and Informatics Group, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute, National Agricultural Research and Innovation Centre, Gödöllő, Hungary
 ‡b Current address: RTG Research & Development Centre, Reliance Industries Limited, Reliance Corporate Park, Navi-Mumbai, India

* varallyay.eva@abc.naik.hu

OPEN ACCESS

Citation: Pesti R, Kontra L, Paul K, Vass I, Csorba T, Havelda Z, et al. (2019) Differential gene expression and physiological changes during acute or persistent plant virus interactions may contribute to viral symptom differences. PLoS ONE 14(5): e0216618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216618>

Editor: Sek-Man Wong, National University of Singapore, SINGAPORE

Received: January 15, 2019

Accepted: April 24, 2019

Published: May 3, 2019

Copyright: © 2019 Pesti et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The datasets for this study can be found at the NCBI-GEO: GSE113774/ GPL21056 (*N.benthamiana* microarray) and GSE113774/ GPL24943 (*S.lycopersicum* RNA-seq). All other relevant data are within the manuscript and Supporting Information files.

Funding: This research was funded by the National Research, Development and Innovation Office – NKFIH: PD78049 (EV), K108718 (EV), K119783 (EV), K115934 (TC) and EU EPPN2020 - Grant

Abstract

Viruses have different strategies for infecting their hosts. Fast and acute infections result in the development of severe symptoms and may cause the death of the plant. By contrast, in a persistent interaction, the virus can survive within its host for a long time, inducing only mild symptoms. In this study, we investigated the gene expression changes induced in CymRSV-, crTMV-, and TCV-infected *Nicotiana benthamiana* and in PVX- and TMV-U1-infected *Solanum lycopersicum* plants after the systemic spread of the virus by two different high-throughput methods: microarray hybridization or RNA sequencing. Using these techniques, we were able to clearly differentiate between acute and persistent infections. We validated the gene expression changes of selected genes by Northern blot hybridization or by qRT-PCR. We show that, in contrast to persistent infections, the drastic shut-off of housekeeping genes, downregulation of photosynthesis-related transcripts and induction of stress genes are specific outcomes with acute infections. We also show that these changes are not a consequence of host necrosis or the presence of a viral silencing suppressor. Thermal imaging data and chlorophyll fluorescence measurements correlated very well with the molecular changes. We believe that the molecular and physiological changes detected during acute infections mostly contribute to virus symptom development. The observed characteristic physiological changes associated with economically more dangerous acute infections could serve as a basis for the elaboration of remote monitoring systems suitable for detecting developing virus infections in crops. Moreover, as molecular and physiological changes are characteristics of different types of virus life-styles, this knowledge can support risk assessments of recently described novel viruses.

Eur J Plant Pathol
<https://doi.org/10.1007/s10658-020-01942-w>



Grapevine rootstocks can be a source of infection with non-regulated viruses

Emese Demian · Nikolett Jaksá-Czotter ·
Janos Molnar · Gabor E. Tusnady · Laszlo Kocsis ·
Eva Várallyay

Accepted: 29 January 2020
© The Author(s) 2020

Abstract Grapevine can be infected by several viruses and viroids, the presence of which can lead to yield losses and vineyard decline. Our previous survey of vineyards in Hungary suggested that viral infection originates from infected propagation material. To investigate whether rootstocks can be a source of virus infections, we surveyed seventeen rootstock vineyards and two rootstock collections in Hungary to determine the virome by high-throughput sequencing of small RNAs. The presence of the viruses was also tested by RT-PCR. The results showed that viruses whose presence is routinely checked were almost absent in rootstock vineyards but were present in rootstock genotype collections. Moreover, first the time in Hungary, we

detected the presence of Australian grapevine viroid in the rootstock genotype collection at Pecs. In contrast, viruses that are not regulated or not routinely tested, namely, grapevine rupestris stem-pitting-associated virus, grapevine Syrah virus-1 and grapevine Pinot gris virus, were detected in almost all locations in most of the varieties. The presence and absence of infected rootstock genotypes in the same vineyard together with phylogenetic analysis suggested that viral infections originated from infected propagation material. Moreover, we found the symptomatic variant of grapevine Pinot gris virus in several rootstock vineyards without symptoms, suggesting the possibility for leaf mottling and deformation disease symptoms to manifest on susceptible cultivars following grafting onto these rootstocks.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10658-020-01942-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Demian · N. Jaksá-Czotter · E. Várallyay (✉)
Agricultural Biotechnology Research Institute, NARIC,
Szent-Györgyi Albert Street 4, Gödöllő 2100, Hungary
e-mail: varallyay.eva@abc.naik.hu

J. Molnar · G. E. Tusnady
Institute of Enzymology, Research Center of Natural Sciences,
HAS, Budapest, Hungary

L. Kocsis
Department of Horticulture, Georgikon Faculty, University of
Pannonia, Deák F Street 16, Keszthely 8360, Hungary

Present Address:

J. Molnar
Turbine Ltd., Bem József utca 9, Budapest 1027, Hungary

Keywords Grapevine · Rootstock · Viral diagnostics ·
Virus infection · Small RNA HTS · GPGV

Introduction

Grapevine is a perennial, woody plant established in vineyards that are maintained for decades. The lifespan of vineyards is based on their health, which decrease considerably with the presence of pathogens.

Grapevine rootstocks have been used since the end of the nineteenth century, when grape phylloxera appeared in Europe. A total of 20–25% of the “historical” vineyards of Hungary was

Published online: 06 February 2020

Springer



Article

Complete Sequence, Genome Organization and Molecular Detection of Grapevine Line Pattern Virus, a New Putative Anulavirus Infecting Grapevine

Toufic Elbeaino ^{1,†}, Levente Kontra ^{2,†}, Emese Demian ², Nikolettta Jaksá-Czotter ², Amani Ben Slimen ¹, Richard Fabian ², Janos Lazar ³, Lucie Tamisier ⁴, Michele Digiaro ¹, Sebastien Massart ⁴ and Eva Varallyay ^{2,*}

¹ Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Via Ceglie 9, 70010 Valenzano, BA, Italy; elbeaino@iamb.it (T.E.); b.slimen.a@gmail.com (A.B.S.); digiaro@iamb.it (M.D.)

² Agriculture Biotechnology Research Institute, National Research and Innovation Center, Szent-Gyorgyi A street4, 2100 Godollo, Hungary; kontra.levente@abc.naik.hu (L.K.); emese.demian@abc.naik.hu (E.D.); czotter.nikolettta@abc.naik.hu (N.J.-C.); richard6fabi@gmail.com (R.F.)

³ Research Institute for Viticulture and Enology, Experimental Station of Kecskemét, National Research and Innovation Center, Katona Jozsef street 5, 6000 Kecskemét, Hungary; lazar.janos@abc.naik.hu

⁴ Plant Pathology Laboratory, TERRA-Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, Passage des Déportés, 2, 5030 Gembloux, Belgium; lucie.tamisier@uliege.be (L.T.); sebastien.massart@uliege.be (S.M.)

* Correspondence: varallyay.eva@abc.naik.hu

† These authors contributed equally to this work.

Received: 5 May 2020; Accepted: 29 May 2020; Published: 31 May 2020

Abstract: Grapevine line pattern virus (GLPV) was first described 30 years ago in Hungary. The lack of its genomic sequences and of an available antiserum made its detection impossible in other parts of the world. Three different high-throughput sequencing (HTS) protocols applied on a GLPV-infected vine allowed the construction of the full genome sequence of this virus. It includes three RNA segments, encoding four proteins: methyltransferase-helicase (1a), RNA-dependent RNA polymerase (2a), movement protein (3a) and coat protein (3b). The obtained sequences were used to design specific primers for its detection by RT-PCR and Northern blot hybridization, respectively. These diagnostic methods were used to test the presence of GLPV in graft-inoculated plants and in 220 grapevine accessions of different Mediterranean origins. The three RNAs-encoding proteins of GLPV shared a very high amino acid identity with those of hop yellow virus, a tentative member of the *Anulavirus* genus, leaving no doubt that both are two isolates of the same viral species. A circular RNA originating from the RNA2 was found, for which an alternative silencing suppressor role is hypothesized. Further investigation is needed to determine this possibility and also the host range and pathological significance of the virus.

Keywords: grapevine; virus; line pattern; anulavirus; small RNA; HTS

1. Introduction

The number of grapevine-infecting viruses (over 80) has increased drastically in recent years [1], mainly due to high-throughput sequencing technology (HTS). Line pattern disease of grapevine, characterized by bright yellow discolorations of the leaves and rings of variable size, scatted spots or blotches or Norway maple leaf-like patterns, was first reported in Hungary in the eighties, on *cvs* Jubileum 75, Limberger and Irsai Oliver [2]. Infected grapevines showed the presence of polymorphic virus-like particles that could be mechanically transmitted onto a range of herbaceous hosts