



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Vírusmentesítési eljárások fejlesztése a szőlő  
szaporítóanyag előállításban

DOI: 10.54598/006820

Turcsán Mihály

Budapest

2025

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

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

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

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

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető(k) jóváhagyása

# TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. BEVEZETÉS .....                                                                                        | 9  |
| 2. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK .....                                                                 | 11 |
| 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....                                                                              | 12 |
| 3.1. A szőlőtermesztés helyzete és kihívásai .....                                                        | 12 |
| 3.2. Viroidok.....                                                                                        | 13 |
| 3.2.1. Szőlő viroidok.....                                                                                | 14 |
| 3.3. Növényi vírusok.....                                                                                 | 15 |
| 3.4. Szőlő vírusmentesítési munkák Magyarországon.....                                                    | 20 |
| 3.5. Vírusmentesítési módszerek .....                                                                     | 21 |
| 3.5.1. Hajtáscsúcs és merisztéma tenyészetek .....                                                        | 21 |
| 3.5.2. Szomatikus embriogenezis.....                                                                      | 24 |
| 3.5.3. Növényi kemoterápia .....                                                                          | 28 |
| 3.6. Háztartási gének gének .....                                                                         | 37 |
| 3.6.1. Konvencionálisan referenciagénként használt növényi háztartási gének.....                          | 37 |
| 4. ANYAG ÉS MÓDSZER .....                                                                                 | 42 |
| 4.1. Felhasznált növényanyagok.....                                                                       | 42 |
| 4.1.1. A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyészetekkel kapcsolatos kísérletek növényanyaga..... | 42 |
| 4.1.2. Kemoterápiás kísérletekhez felhasznált növényanyag.....                                            | 42 |
| 4.1.3. Referenciagénekkel kapcsolatos kísérletek növényanyaga.....                                        | 42 |
| 4.1.4. Az <i>in vitro</i> kultúrák létrehozása .....                                                      | 43 |
| 4.2. Kísérletek intront tartalmazó génszakaszra specifikus referenciagén primerekkel                      | 43 |
| 4.3. Alkalmazott vírusmentesítési módszerek .....                                                         | 44 |
| 4.3.1. Merisztéma kultúrák .....                                                                          | 44 |
| 4.3.2. Szomatikus embriogenezis.....                                                                      | 44 |
| 4.3.3. Növényi kemoterápia .....                                                                          | 44 |
| 4.4. Nukleinsav-izolálás.....                                                                             | 47 |
| 4.4.1. Nukleinsav izolálás növényi mintákból .....                                                        | 47 |
| 4.4.2. Nukleinsav-izolálás baktérium mintákból.....                                                       | 48 |
| 4.5. cDNS szintézis.....                                                                                  | 49 |
| 4.6. Felhasznált vírusdiagnosztikai módszerek.....                                                        | 50 |
| 4.6.1. RT-PCR.....                                                                                        | 50 |
| 4.6.2. kis RNS-ek nagy áteresztőképességű szekvenálása .....                                              | 54 |
| 5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....                                                                        | 57 |
| 5.1. A referenciagénekkel kapcsolatos kísérletek .....                                                    | 57 |
| 5.1.1. Konvencionális és intront tartalmazó referenciagén-szakaszra specifikus primer párok .....         | 57 |

|        |                                                                                                                           |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.2. | Intront tartalmazó génszakaszra specifikus referenciagén primerek tesztelése különböző eredetű szöveteken.....            | 58  |
| 5.1.3. | Referenciagén és vírus specifikus primerek egyidejű használata .....                                                      | 60  |
| 5.2.   | A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyészetek hatékonyságának vizsgálata érzékeny diagnosztikai módszerrel.....  | 62  |
| 5.2.1. | A kiválasztott anyanövények vírusdiagnosztikai vizsgálata.....                                                            | 62  |
| 5.2.2. | Szomatikus embriogenezis indukálása és embriókból történő növényregeneráció.....                                          | 64  |
| 5.2.3. | Merisztéma kultúrák létesítése és növényregeneráció.....                                                                  | 65  |
| 5.2.4. | A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyészetek vírusmentesítési hatékonyságának összehasonlítása .....            | 65  |
| 5.3.   | Kemoterápiás kísérletek .....                                                                                             | 70  |
| 5.3.1. | Ribavirin előkísérletek Sárfehér fajtán .....                                                                             | 70  |
| 5.3.2. | A kemoterápiás kísérletek növényanyagának vírus- és viroiddiagnosztikai elemzése .....                                    | 73  |
| 5.3.3. | A ribavirin kezelés hatásainak vizsgálata a kijelölt fajtákon .....                                                       | 75  |
| 5.3.4. | A kijelölt fajták zidovudinnal történő kemoterápiás kezelése .....                                                        | 80  |
| 5.3.5. | A kijelölt fajták ribavirinnel és zidovudinnal történő kombinált kezelése .....                                           | 82  |
| 5.3.6. | A kijelölt fajták 2-thiouracillal történő kemoterápiás kezelése .....                                                     | 83  |
| 6.     | KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK .....                                                                                     | 87  |
| 7.     | ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....                                                                                             | 90  |
| 8.     | ÖSSZEFOGLALÁS .....                                                                                                       | 91  |
| 9.     | SUMMARY.....                                                                                                              | 93  |
| 10.    | MELLÉKLETEK .....                                                                                                         | 95  |
| M1.    | Irodalomjegyzék .....                                                                                                     | 95  |
| M2.    | A különböző szöveti eredetű mintákon végzett RT-PCR tesztek eredménye az oligo(dT) primerrel szintetizált cDNS-ekből..... | 110 |
| M3.    | A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyészet kísérleti növényanyagának szekvenálási eredményei .....              | 110 |
| M4.    | A kemoterápiás kísérletek növényanyagának szekvenálási eredményei .....                                                   | 111 |
| M5.    | A 10 mg/l 2-TU-lal kezelt Sárfehér A1 hajtások állapota a kísérlet különböző időpontjaiban .....                          | 112 |
| M6.    | A 10 mg/l-es 2-TU kezelésen átesett Sárfehér A1 és Kadarka P131 A1 növények RT-PCR eredményei.....                        | 112 |
| M7.    | A 20 mg/l-es 2-TU kezelésen átesett Sárfehér A1 növények RT-PCR eredményei.....                                           | 113 |
| M8.    | A 20 mg/l-es 2-TU kezelésen átesett Furmint P51 ÜH2 növények RT-PCR eredményei .....                                      | 113 |
| 11.    | KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....                                                                                                 | 114 |

## JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

*18S rRNS* - 18S riboszómális ribonukleinsav

2,4-D - 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-diklórfenoxi ecetsav)

2-TU - 2-thiouracil

ACLSV - apple chlorotic leaf spot virus (alma klorotikus levélfoltosság vírus)

*ACT* - actin

AFLP - Amplified fragment length polymorphism (amplifikált fragment hossz polimorfizmus)

AGVd - Australian grapevine viroid (ausztrál szőlő viroid)

AIDS - acquired immunodeficiency syndrome (szerzett immunhiányos állapot)

ArMV - Arabis mosaic virus (Arabisz mozaik vírus)

ATP - adenosine triphosphate (adenozin trifoszfát)

AZT – azidothymidine (azidotimidin)

BA – benzyladenine (benzil adenin)

cDNS – copy DNS

CEVd - citrus exocortis viroid (citrus kéreg rendellenesség viroid)

CMV - cucumber mosaic virus (uborka mozaik vírus)

CTAB - Cetyltrimethylammonium bromide (cetil-trimetil-ammónium-bromid)

CVB - chrysanthemum virus B (krizantém vírus B)

DHPA -dihydroxypropyl adenine (di-hidroxipropil-adenin)

DNS - deoxiribonukleinsav

dNTP - deoxyribonucleotide triphosphate (deoxinukleotid trifoszfát)

EDTA – ethylen diamine tetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)

*EFl $\alpha$*  – elongation factor-1  $\alpha$  (elongációs factor-1 $\alpha$ )

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat)

G3P – glyceraldehyde-3-phosphate (gliceraldehid-3-foszfát)

*GAPDH* - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz)

GCLV - garlic common latent virus (fokhagyma közönséges rejtett vírusa)

GCMV - grapevine chrome mosaic virus (szőlő króm mozaik vírus)

gDNS- genomi DNS

GFkV – grapevine fleck virus (szőlő látens foltosság vírus)

GFLV - grapevine fanleaf virus (szőlő fertőző leromlás vírus)

GLPV- grapevine line pattern virus (szőlő vonalas mintázottság vírus)

GLRaV - grapevine leafroll-associated virus (szőlő levélsodródás vírus)

GPGV – grapevine Pinot gris virus (szőlő Pinot gris vírus)

GRSPaV - grapevine rupestris stem pitting-associated virus (szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus)

GRVFV – grapevine rupestris vein feathering virus

GSyV-1 – grapevine Syrah virus-1 (szőlő Syrah vírus-1)

GTP - guanosine-triphosphate (guanizon-trifoszfát)

GVA – grapevine virus A (szőlő A vírus)

GVB – grapevine virus B (szőlő B vírus)

GVD – grapevine virus D (szőlő D vírus)

GVQ – grapevine virus Q (szőlő Q vírus)

GVT – grapevine virus T (szőlő T vírus)

GYSVd – grapevine yellow speckle viroid (szőlő sárgapettyeség viroid)

HCV - hepatitis C virus (hepatitisz C vírus)

HIV - human immunodeficiency virus (emberi immunhiány vírus)

HSVd – hop stunt viroid (komlósatnyulás viroid)

HTS – high-throughput sequencing (nagy áteresztőképességű szekvenálás)

IBA - Indole-3-butyric acid (indol-3-vajsav)

ICRSV - Indian citrus ringspot virus (indiai citrus gyűrűs foltosság vírus)

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses (vírusok taxonómiájáért felelős nemzetközi bizottság)

IMPDH - Inosine-monophosphate dehydrogenase (inozin-monofoszfát dehidrogenáz)

ISSR - inter-single sequence repeat

LDA - low density array

LSV - lily symptomless virus (lily tünetmentes vírus)

mRNS – messenger RNS (hírvivő RNS)

MS - Murashige & Skoog

MSAP – methylation sensitive amplification polymorphism (metiláció érzékeny amplifikációs polimorfizmus)

mT- meta-Topolin

NA – neuraminidase (neuraminidáz)

NAA - naphthylacetic acid (naftil-ecetsav)

NAD - nicotinamide adenine dinucleotide (nikotinamid-adenin-dinukleotid)

NOA - naphthoxyacetic acid (naftoxi-ecetsav)

NRTI - nucleoside reverse transcriptase inhibitor (nukleozid reverz transzkriptáz inhibitor)

PCR – polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PEP - phosphoenolpyruvate (foszfoenolpiruvát)

PG – polygalacturonase (poligalakturonáz)

PLRV - potato leafroll virus (burgonya levélsodródás vírus)

PNRSV - Prunus necrotic ring spot virus (Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus)

PPV - plum pox virus (szilvahimlő vírus)

PSTV - potato spindle tuber viroid (burgonya orsógumó viroid)

PVP - polyvinylpyrrolidone (polivinil-pirrolidon)

PVX - potato virus X (burgonya X vírus)

qPCR - quantitative polymerase chain reaction (kvantitatív polimeráz láncreakció)

RAPD - random amplified polymorphic DNA (random amplifikált polimorf DNS)

RBDV - raspberry bushy dwarf virus (málna bokros törpeség vírus)

RdRp - RNS-függő RNS polimeráz

RNS - ribonukleinsav

RSV - respiratory syncytial virus (respiratorikus szinciciális vírus)

RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction (reverz transzkripció polimeráz láncreakció)

SAH - S-adenosyl-homocysteine (S-adenozil-homocisztein)

SDV - Satsuma dwarf virus (Satsuma törpülés vírus)

SLV - shallow latent virus (shallow látens vírus)

SSR - simple sequence repeat (egyszerű szekvencia ismétlődés)

TBRV - tomato black ring virus (paradicsom fekete gyűrűs vírus)

TDZ - thidiazuron

TMV – tobacco mosaic virus (dohánymozaika vírus)

tRNS - transzfer RNS

*TUB* - tubulin

UBQ - ubiquitin

ZDV - zidovudine

# 1. BEVEZETÉS

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

Az elmúlt évtizedekben a kutatók számos módszert dolgoztak ki a különböző kórokozók eltávolítására. A gombák és a fitoplazmák koncentrációjának csökkentésére az egyszerűen kivitelezhető melegvizes kezelés is alkalmas, míg a vírusok és viroidok eltávolítása csak bonyolultabb szövettenyésztési módszerekkel érhető el. Ilyenek a merisztéma tenyészetek, a szomatikus embriogenezis és az ezeket kiegészítő kemoterápia is. Ezek az eljárások más és más mechanizmus alapján hatnak, így eltérő hatékonysággal alkalmazhatók a különböző szőlővírusok és viroidok eltávolítására. A vírusmentesítési protokollok fejlesztésére folyamatos igény van, akár a felhasznált szövettypusok milyensége, akár a felhasznált antivirális szerek

tekintetében. A vírusmentesítési folyamat hosszának csökkentése fontos tényező, ugyanis ezzel növelhető az adott időintervallum alatt előállítható egészséges növényegyedek száma is.

A merisztémák regenerációs ideje lényegesen hosszabb, mint a nagyobb hajtáscsúcsoké, így utóbbiak alkalmazásával idő spórolható, de ilyenkor különböző kiegészítő kezelések is szükségesek lehetnek. Ilyen a hőterápia, a krioterápia vagy az antivirális szerekkel végzett kemoterápia is. Az antivirális szereknek a növényekre nézve sokszor negatív hatásaik is vannak (pl. klorózis, növekedésgátlás, pusztulás), amelyeket felhasználásuk közben figyelembe kell venni. A kezelt szövettípusnak, a kezelés hosszának és a vegyszer koncentrációjának megválasztása is nagy körültekintést igényel. A szomatikus embriogenezis vírusmentesítési hatása bizonyított, de a portok és ovárium alapú tenyészetek létesítése csak a virágzatok meglétekor kivitelezhető és ha nem járunk sikerrel, akkor más módszerek alkalmazására van szükség.

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

## 2. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

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

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A szőlőtermesztés helyzete és kihívásai

A *Vitis vinifera* (bortermő szőlő) a *Vitaceae* családba (szőlőfélék), azon belül a *Vitis* nemzetségbe (szőlő nemzetség) tartozik. A bortermő szőlő a család legnevezetesebb és gazdaságilag is legjelentősebb faja, amelyet az Antarktis kivételével a világ összes kontinensén termesztanak. A szőlőt ma legnagyobb részt bor és friss gyümölcs, valamint ivólé formájában fogyasztják, de fontos megemlíteni az antioxidánsokban gazdag szőlőmagból kinyert olaj jótékony hatását is (This et al. 2024; Martin et al. 2020). Ezeken kívül a szőlő mazsola formájában, megfelelő előkezeléseket követően hosszú ideig eltartható és fontos ásványi anyagok és vitaminok forrása is lehet (Singh et al. 2022).

Az 1860-as években Észak-Amerikából Európába behozott szőlőgyökértetű (filoxéra) hatalmas pusztításokat végzett, amely a termőterületek csökkenését eredményezte, ugyanis az európai fajták gyökere fogékony volt erre a kártevőre. A filoxéravész követő rekonstrukció következtében a világ szőlőterületének nagysága folyamatosan növekedett és 1975-ben 10,2 millió hektárnál tetőzött. 2024-re ez 7,1 millió hektárra csökkent és jelenleg stagnálni látszik. Ez a csökkenés főleg Európában volt megfigyelhető és köszönhető volt többek között a fejlettebb technológiák és az új, innovatív fajták megjelenésének, amelyek lehetővé tették ugyanakkora mennyiségű és minőségű termés előállítását kisebb területen is. A kemizálás és az európai uniós szabályozások is ezt az irányt erősítették. A fogyasztói társadalom igénye is egyre inkább a minőségi borok irányába fordult, így a mennyiségi termelést a minőségi termelés váltotta fel (Barker 2024; Teleki & Csipkés 2017).

Európa 2023-ban a globális szőlőprodukció 45%-át tudhatta magáénak, amely arányos az általa birtokolt szőlőterületek nagyságával, azonban a bor előállítás tekintetében már nagyobb, 61%-os részesedéssel zárt, amelyet 2024-ben is tartott (OIV 2024; OIV 2025). Az európai szőlőtermő területek nagysága ma nagyjából 3,2 millió hektár, amiből Magyarországon nagyjából 58 ezer hektár található a 22 bortermő vidéken. Ezen területek 94%-án borszőlő termesztés folyik, amelyen a Hegyközségek Nemzeti Tanácsának (HNT) 2024-es statisztikai adatai szerint a fehérbort adó szőlőfajták (különösképpen a ‘Bianca’, ‘Cserszegi fűszeres’, ‘Olasz rizling’ és ‘Irsai Olivér’) területi részesedése összességében nagyobb (41 ezer hektár), ugyanakkor a legnagyobb területtel (7 ezer hektár) a vörösbort adó ‘Kékfrankos’ fajta rendelkezik, de jelentős területen termesztik a szintén vörösbort adó ‘Merlot’, a

‘Cabernet sauvignon’, ‘Cabernet franc’ és ‘Pinot noir’ fajtákat is. A filoxéra megjelenése Magyarországon is szükségessé tette különböző szőlőalanyfajták használatát a termesztésben, amelyek közül Teleki Zsigmond szőlőalany nemesítő a 20. század elején a meszes talajt kedvelő *Vitis berlandieri* szabad beporzásából származó hibrideket szelektált, amelyekből további szelekciót követően Európa szerte máig használt alanyfajták kerültek kiválogatásra (pl. ‘Teleki 5C’, ‘Teleki-Kober 5BB’, ‘Teleki-Fuhr S.O.4’, ‘Teleki-Kober 125AA’) (Kocsis 2018). Habár a változatos tulajdonságokkal rendelkező *Vitis vinifera* fajták alanyfajtákra történő oltása azóta is hatékony védekezés a szőlőgyökértetű ellen, nem véd a különböző szőlőt veszélyeztető kórokozók fertőzésével szemben. Kémai védekezéssel több kórokozó ellen is tudunk védekezni, de vannak, amelyek esetében ez nem lehetséges. A kizárólag bonyolult szövettenyésztési eljárások alkalmazásával eliminálható vírusok fertőzése komoly gazdasági károkat tud okozni. Adott vírusokra fogékony fajták esetében a kár mértéke akár 80%-os is lehet (Pocsai 2018). Bell et al. (2021) felmérései alapján például az egyik legkomolyabb károkozásra képes vírus, a GLRaV-3 (grapevine leafroll associated virus-3/szőlő levélsodródás vírus-3) 20%-os gyakoriságú előfordulása egy Új-zélandi ültetvényben akár 10500 Új-zélandi dollár értékű kárt képes okozni évente 1 hektár szőlőre vetítve, amely egy 1 hektár nagyságú ‘Merlot’ ültetvény esetében a teljes bevétel 83%-át jelenti.

A szintén csak szövettenyésztési eljárásokkal eliminálható viroidok fertőzése is veszélyt jelent. A legtöbb viroid önmagában ritkán okoz tüneteket szőlőn, de a fertőzött növények fiziológiáját képesek megváltoztatni. A tünetek megjelenése függ többek között a klímától, környezeti tényezőktől és az érintett fajtától is, azonban a vírusokkal történő komplex fertőzésük már jelentős károkat okozhat (Bisztray et al 2012). Ezen kórokozók ismerete és vizsgálata éppen ezért szükséges az ellenük folytatott védekezésben.

### **3.2. Viroidok**

A viroidok a növények legkisebb ismert kórokozói, amelyek közül ma már 44-t azonosítottak be (Hao et al. 2024). Erősen strukturált, egyszálú, cirkuláris RNS örökítőanyaggal rendelkeznek, amelyen nincs kapszid fehérje, és nem mutatnak semmiféle hírvivő (messenger) aktivitást sem, vagyis nem kódolnak fehérjét. A gazdanövényekben való terjedésük és replikációjuk teljes mértékben a saját genomjuk és a gazdanövény genomja közti interakción múlik. Annak ellenére, hogy nem kódolnak fehérjét, mégis képesek tüneteket okozni a fogékony gazdanövényeiken, amelyek sokszor a vírusok által okozott tünetekre is hasonlítanak. Ez a jelenség azt

indikálja, hogy a viroidok genomja valószínűleg szabályozó szerepet tölthet be a vírusok genomjánál ismert mRNS funkcióval ellentétben. A fertőzés szőlő esetében legtöbbször látens módon történik (Adkar-Purushothama & Perreault 2020; Kofalvi et al. 1997).

### **3.2.1. Szőlő viroidok**

A mai ismeretek alapján eddig hét szőlőt fertőző viroidot azonosítottak, melyek közül hat a *Pospiviridae* családba tartozik. A legfontosabbak az ausztrál szőlőviroid (australian grapevine viroid - AGVd), a citrom kéregelhalás viroid (citrus exocortis viroid - CEVd), a szőlő sárgafoltosság viroid-1 és 2 (grapevine yellow speckle viroid-1, -2 - GYSVd 1-2) és a komlótörpülés viroid (hop stunt viroid - HSVd). Ezen kívül később írták le a szőlő látens viroidot (grapevine latent viroid - GLVd) és egy viroidszerű RNS-t is, amely az *Avsunviroidae* családra jellemző szerkezeti tulajdonságokkal rendelkezik (Jiang et al. 2009; Martelli 2017).

#### **3.2.1.1. A *Pospiviridae* családba tartozó szőlő viroidok**

A *Pospiviridae* családba tartozó viroidok egyszálú, párszáz nukleotid hosszúságú cirkuláris RNS genommal rendelkeznek, amely általában pálca-szerű (rod-ike) szerkezetet vesz fel. A fertőzött növény vegetatív szaporítása során képesek terjedni (Di Serio et al. 2021). Az ebbe a családba tartozó viroidok genomjának középső szakaszán rendelkeznek egy központi konzervált régióval (central conserved region - CCR), amely elkülöníti őket az *Avsunviroidae* családba tartozóktól (Marquez-Molins et al. 2021).

Az AGVd genomja 369 nt hosszúságú és kevesebb mint 50% szekvencia azonosságot mutat bármelyik korábban leírt viroiddal. Kutatók szerint a HSVd, a GYSVd-1, a GYSVd-2 és a CEVd RNS-ek rekombinációjából eredeztethető ez a viroid. Mi több, eddig csak olyan szőlőből izolálták, amelyek rend szerint kevert fertőzésben tartalmazták az említett viroidokat is (Adkar-Purushothama et al. 2014).

A citrus exocortis viroid (CEVd) a citrus exocortis megbetegedés kórokozója a citrusféléken. Genomja 371 nt hosszúságú. A fertőzésével érintett növények megtorpant növekedést és csökkent terméshozamot produkálnak. A tünetek főleg akkor jelentkeznek, ha a növényt korábban a viroidra fogékony alanyfajtára oltották (Hardy et al. 2008). Szőlő esetében a CEVd fertőzés nem jár tünetek megjelenésével (Morgan 2023).

A GLVd a legújabban leírt szőlő viroid és az új-generációs szekvenálás (next generation sequencing - NGS) megjelenésének köszönhetően tudták beazonosítani.

Genomja 328 nt hosszúságú. Ahogy arra neve is utal, szőlőn nem okoz tüneteket (Zhang et al. 2014).

A GYSVd-1, -2 viroidok a szőlő sárgafoltosság megbetegedés (yellow speckle disease) kórokozói. Genomjuk 366 és 363 nt hosszúságú. A betegség fő tünete a kicsi sárga pöttyök elszórt megjelenése a levélfelületen, amely melegebb hónapok alatt válik kifejezettebbé, akár üvegházi körülmények között is. Az ismert szőlő viroidok közül csak a GYSVd-1 és GYSVd-2 voltak képesek tünetek kialakítására. Gyakran kevert fertőzésekben mutatták ki őket a GFLV-vel, ahol érpöttyözöttség tünetet okoztak (Singhal et al. 2019; Martelli 2017).

A HSVd egy széles gazdanövénykörrel rendelkező, világszerte elterjedt viroid, genomja 302 nt hosszúságú. Legalapvetőbb gazdanövénye a komló, amelyen csökkenti a növény növekedését és terméshozamát is, de a tünetek csak több évvel a fertőzés után jelennek meg (Kappagantu et al. 2017; Marquez-Molins et al. 2021). Fertőzhet ezen kívül számos lágyszárú és fásszárú növényt is, köztük a szőlőt, de a *Prunus* és *Citrus* nemzetségbe tartozó növényeket is. Szőlőn a fertőzés csak nagyon ritkán eredményez tüneteket. A HSVd terjedhet vegetatív szaporítás során, mechanikai sérüléseken keresztül, de akár szőlőmaggal is (Fajardo et al. 2018).

### 3.3. Növényi vírusok

A vírusok obligát intracelluláris sejtparaziták, amelyek jelentős károkat okoztak és okoznak a növényeknek, állatoknak és embernek egyaránt, és az egyik legjelentősebb veszélyforrást jelentik bármely élőlény számára (Chauhan et al. 2019).

A növényi vírusok tanulmányozása az 1890-es években kezdődött. A dohánymozaik vírus (tobacco mosaic virus - TMV) volt az első leírt és jellemzett vírus, amelynek köszönhetően a vírusokat a betegségek kórokozójaként azonosították (Roossinck 2010). A vírusok taxonómiájáért felelős nemzetközi bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) tizedik jelentése alapján több mint 1500 növényi vírust azonosítottak és még számos új vár felfedezésre (Lefkowitz et al. 2018).

A növényi vírusok túlnyomó része egyszálú RNS vírus, azon belül is leginkább pozitív szálúak, amelyek polaritása megegyezik a hírvivő RNS-ekével. Ezen kívül léteznek negatív egyszálú RNS vírusok és kétszálú DNS vírusok is. Ezeknek a genombeli eltéréseknek köszönhetően az egyes vírusok reprodukív ciklusa merőben eltérő is lehet. Minden vírusnak legalább háromfajta fehérje képződéséért felelős gént kell kódolnia, amelyek közül az egyik a replikációs fehérje, ami a nukleinsav másolásáért felelős. RNS vírusok esetében a legfontosabb ilyen gén az RdRP, ami az

RNS-függő RNS polimeráz fehérjét kódolja. Ezen kívül a strukturális fehérjéket kódoló gének is fontosak, amelyek a vírusok fehérje burkának és egyéb alkotóinak kialakításában vesznek részt. Ilyen a CP (coat protein/burok fehérje) gén, amely a vírus fehérje burkának kialakítását végző fehérjéket kódolja. Végezetül a mozgási fehérjéket kódoló gének, amely közül az MP (movement protein/mozgási fehérje) a vírusok sejtről sejtre való terjedését segítő fehérjeit irányítja (Gergerich & Dolja 2011).

A termesztett növényeket érintő fertőzések legnagyobb hányada akut, vagyis rövid időn belül drasztikus tüneteket eredményez, míg a vad fajok esetében általában perzisztens élelciklust mutatnak, amelyet a növényi gazda segítségével folytatnak tovább. Ezek a vírusfertőzések a növényekben jelentős károkat okoznak a termés mennyiségét és minőségét tekintve is (Chauhan et al. 2019).

### **3.3.1. Szőlő vírusok**

A szőlőnek ma már több mint 102 fertőző vírusa ismert, amelyek közül az utóbbi években sokat a nagy áteresztőképességű szekvenálás (high throughput sequencing - HTS) segítségével azonosítottak. Ez kiemelkedően magas szám, hiszen a szőlőt több vírus képes fertőzni, mint bármely egyéb termesztett növényünket (Martelli 2018; Fuchs 2024).

Magyarországon a 87/2006. (XII. 28.) FVM (Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium) rendelet szerint a kiindulási (prebázis) állományok létrehozására szolgáló növényeken vizsgálandó vírusok a szőlő fertőző leromlás vírus (grapevine fanleaf virus - GFLV), a paradicsom fekete gyűrűs vírus (tomato black ring virus - TBRV), a szőlő króm mozaik vírus (grapevine chrome mosaic virus - GCMV), az Arabisz mozaik vírus (Arabis mosaic virus - ArMV), a szőlő látens foltosság vírus (grapevine fleck virus - GFkV), a szőlő levélsodródás vírus-1, 2, 3 (grapevine leafroll-associated virus-1, -2, -3 - GLRaV-1, 2, 3), valamint a szőlő vírus A, B és D (grapevine virus A, B, D - GVA, GVB, GVD). Európában az Európai Bizottság 2020/177 végrehajtási irányelve szerint a prebázis szaporítóanyagok vizsgálatköteles nemzárati károsítói az ArMV, GFLV, GLRaV-1,-3.

Habár a szőlő vírusok száma kiemelkedően magas, jelen értekezésben területi korlátozások miatt csak a gazdaságilag jelentős, patogénmentesítési munkálatok során is leggyakrabban kimutatott és tesztelt RNS vírusok és vírus családok ismertetését teszem meg.

A lent ismertetett vírusok fertőzését nem feltétlenül követi a tünetek megjelenése, ugyanis határozatlan ideig látens formában maradhatnak, így a látszólag egészséges, tünetmentes növények is veszélyes kórokozókat hordozhatnak, amelyek a

vegetatív szaporítás során is terjedhetnek és komoly gazdasági károkat, valamint termés kiesést okozhatnak (Bisztray et al. 2012). Mivel nincs megfelelően kidolgozott és környezetbarát védekezési módszer a szőlő vírusos megbetegedéseinek kezelésére, ezért az egészséges szaporítóanyagok használata kulcsfontosságú, amelyek előállításánál során a különböző kórokozók detektálásának kiemelkedő szerepe van (Oláh et al. 2017; Szegedi et al. 2018).

### 3.3.1.1. A *Closteroviridae* családba tartozó szőlő vírusok

A *Closteroviridae* családba tartozó vírusok külső burok nélküli, egyszálú, pozitív (+ ssRNS) egy-, két-, vagy hámosztatú (RNS1, RNS2 és RNS3) RNS genommal rendelkeznek. Méretük általában 650-2200 nm és 13-19 ezer nukleotid hosszúságúak (Fuchs et al. 2020). A szőlő levélsodródás megbetegedést okozó vírusok is ebbe a családba sorolandók, amely betegség a gazdaságilag legkárosabb és világszerte legelterjedtebb szőlő betegség és akár 40%-os termésvesztést is okozhat (Naidu et al. 2014). Három legelterjedtebb kórokozója a GLRaV-1, GLRaV-2 és GLRaV-3, amelyek a többinél erőteljesebb levéltüneteket okoznak (Maree et al. 2013). Az utóbbi években a GLRaV-4 is egyre nagyobb figyelmet kap, ugyanis több független fajnak feltételezett vírusról kiderült, hogy valójában ennek a vírusnak a különböző variánsai (Adiputra et al. 2019).

A GLRaV-k az *Ampelovirus* nemzetségébe tartoznak, kivéve a GLRaV-2-t, amely a *Closterovirus* nemzetség tagja. A GLRaV-1 egy 1 db RNS-ből álló, 18659 nukleotid hosszúságú genommal rendelkezik, amely replikációhoz, fehérje burokhoz és hősokk fehérjéhez szükséges géneket is kódol.

Habár ezen vírusok elsődlegesen a vegetatív szaporítás során terjednek, a GLRaV-1, -3 és -4 ültetvényen belüli terjedését is megfigyelték pajzstetvek által. A GLRaV-1 esetében ilyen vektor például többek között a *Pseudococcus maritimus* vagy a *Planococcus citri* is (Naidu 2017).

A levélsodródás megbetegedés a szőlő egészségére és a termése minőségére is hatással van. A fő tünetek megjelenése őszi tehető, amikor a leveleken kék bogyójú fajták esetében erőteljes vörösödés, míg a fehér bogyójú fajtáknál klorózis figyelhető meg a levelek között. Másik egyértelmű tünete a levelek fonákirányba történő pöndörödése. A fertőzés hatással lehet még a növény növekedésére, a termés hozamra, a bogyók színére és cukortartalmára, de késleltetheti a rügyfakadást, virágzást és a bogyók színeződését is (Tsai et al. 2008).

### 3.3.1.2. A *Betaflexiviridae* családba tartozó szőlő vírusok

A *Betaflexiviridae* családba tartozó vírusok külső burok nélküli, egyszálú, pozitív RNS genommal (+ ssRNS) rendelkeznek. Az ide tartozó vírusok hossza általában 6,5-9 kilobázis (Yoshikawa & Yaegashi 2021). Közülük a GVA és GVB vírusok a szőlő faszöveti barázdáltság megbetegedés kórokozói, a szőlő vírus D (GVD) és a szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírussal (grapevine rupestris stem pitting-associated virus - GRSPaV) egyetemben (Martelli et al. 2007). A GVA és GVB a *Vitivirus* nemzetségbe sorolandó, osztatlan genommal rendelkező vírusok. Genomjuk hasonló méretű, 7351 nt és 7599 nt, míg a *Foveavirus* nemzetségbe sorolandó GRSPaV szintén egy RNS-ből álló genomja már 8744 nt hosszúságú. A GRSPaV-t faszöveti barázdáltság megbetegedés oltással terjedő kórokozójaként azonosították 1976-ban Kaliforniában, amikor az oltás indikátor fajtájaként választott *Vitis rupestris* St. George fás részein barázdák jelentek meg (Meng & Rowhani 2017). *Vitis vinifera* esetén a betegség tipikus tünetei a fás rész kéreg alatti régióiban megjelenő lyukak és barázdák, amelyek a víz és ásványi anyagok szállítására is negatív hatással vannak (Maliogka et al. 2015). A faszöveti barázdáltság megbetegedésen belül a GVA a Kober faszöveti barázdáltság (Kober stem growing), a GVB a parakérgűség (Corky bark), a GRSPaV pedig a Rupestris faszöveti barázdáltság (Rupestris stem pitting) rendellenesség kórokozói (Du Preez et al. 2011).

A szőlő vírus T (grapevine virus T - GVT) szintén a *Foveavirus* nemzetségébe tartozó vírus, amely 52-62%-os aminosav szekvencia azonosságot mutat a GRSPaV-vel. Genomja 8701 nt hosszúságú. Először Németországban írták le 'Pinot gris' szőlőfajtán, ahol kevert fertőzésben volt jelen több vírussal és viroiddal. (Glaser et al. 2018). A GVT-ről fellelhető tudás még igen hézagos, hiszen az első leírása óta csak néhány publikációban szerepel. A GVT szőlő állapotára való hatásairól a mai napig nem készült átfogó elemzés, habár legközelebbi rokona, a GRSPaV levél nekrozist és a faszöveti barázdáltság tüneteit okozza (Díaz-Lara et al. 2020).

A szőlő Pinot gris vírust (grapevine Pinot gris virus – GPGV) 2003-ban írták le először Olaszországban 'Pinot gris' és 'Pinot blanc' fajtákon. Genomja 7259 nt hosszúságú. A fertőzött növényen klorotikus foltokat és levéldeformitásokat okozhat, de nem köthető egyértelmű tünetekhez. A *Betaflexiviridae* család *Trichovirus* nemzetségébe tartozik és jelenleg nem vizsgálatköteles vírus a szőlő szaporítóanyag előállítása során. A vírus vektora a szőlő gubacsatka (*Colomerus vitis*) (Saldarelli 2017).

### 3.3.1.3. A *Secoviridae* családba tartozó szőlő vírusok

A *Secoviridae* családba tartozó vírusok burok nélküli, egy-, vagy kétszattú, pozitív RNS szállal rendelkeznek. Általában 9-13,7 kilobázis hosszúságúak (Thompson et al. 2017). A GFLV a család *Nepovirus* nemzetségébe tartozó vírus. Két RNS-ből álló genomja összesen 11116 nt hosszúságú. Az RNS1 replikációhoz szükséges fehérjét, míg az RNS2 burok fehérjét kódol. A vírus a szőlő legyezőlevél deformitás megbetegedés kórokozója. Ennek az Európában és Észak-Amerikában előforduló betegségnek jellemző tünetei a torz levél, citromsárga mozaikosság a főerek közelében, világossárga érpöttyözöttség, szélesen nyitott levélváll, dupla nóduszok és rövid, torz internódiumok (Basso et al. 2017). A vírus szőlőről szőlőre való terjesztését a *Xiphinema index* ektoparazita fonálféreg végzi. A fent említett tüneteken kívül a GFLV a gyümölcs minőségét is negatívan érinti, ugyanis csökken a cukor- és a titrálható savtartalma is (Andret-Link et al. 2004).

Az ArMV szintén a család *Nepovirus* nemzetségébe tartozik a GFLV-vel együtt, amelynek sárgamozaik törzsével alkotott komplex fertőzése, a fertőző leromlás is igen gyakori. Genomja ugyancsak 2 db RNS-ből áll össze, amely együttes hossza 11154 nt. A GFLV-hez hasonlóan az RNS1 replikációs, az RNS2 burok fehérjét kódol. Terjedését a *Xiphinema diversicaudatum* fonálféreg segíti. A vírus fő tünete a főerek és helyenként a kisebb erek mentén kialakuló élénksárga elszíneződések, amelyek esetenként kiterjedt foltokká fejlődnek. Tünete lehet még az aszimmetrikus levél, madárkás fürt és kis terméshozam is (Wetzel et al. 2004; Lázár 2011).

### 3.3.1.4. A *Tymoviridae* családba tartozó szőlő vírusok

A *Tymoviridae* családba tartozó vírusok pozitív, egyszálú RNS genommal rendelkeznek és általában 6-7,5 kilobázis hosszúságúak (Wang et al. 2012). A szőlő foltosodás megbetegedés az összes szőlőt termesztő országban előfordul (Martelli 2014), kórokozója a *Maculavirus* nemzetségébe sorolt szőlő látens foltosság vírus (grapevine fleck virus - GFkV). A GFkV egy 7564 nt méretű 1 db pozitív, egyszálú RNS-ből álló genommal rendelkezik. A fertőzése önmagában nagyon sok szőlőfajtán nem eredményezi a tünetek megjelenését. A vírus jellemző tünetei főleg a *Vitis rupestris*-en jelennek meg: tavasszal a fiatal levelek kisebb levélerei kivilágosodnak, amik az idősebb leveleken már összefüggő foltokká fejlődhetnek és a levelek széle felfelé pöndörödhethet. Ezek a tünetek a melegebb nyári időszakban eltűnnek. A GFkV egy floémre korlátozott vírus, amely a szőlő vegetatív szaporítása során terjed. Ismert rovarvektora nincs (Contsable & Rodoni 2011).

A szőlő Syrah vírus 1 (grapevine Syrah virus 1 – GSyV-1) egy újabban azonosított vírus. A *Marafivirus* nemzetségbe tartozik. Genomja 1 RNS-ből áll és 6506 nt hosszúságú. Először 2009-ben írták le Kaliforniában, ahol is egy addig nem ismert hanyatlásos tünet kórokozóját próbálták azonosítani ‘Syrah’ szőlőfajtán. Ezzel párhuzamosan egy tünetmentes *Vitis muscadinia* viromjának szekvenálással történő vizsgálata közben találtak egy addig ismeretlen vírust, amit szőlő vírus Q-nak (grapevine virus Q – GVQ) neveztek el. A két vírus genomot egymásra illesztve kiderült, hogy egy és ugyanaz (Sabanadzovic et al. 2017).

A szőlő rupestris értollasodás vírus A GRVFFV (grapevine rupestris vein feathering virus) a család *Marafivirus* nemzetségébe tartozó vírus, genomja 6730 nt hosszúságú és 1 RNS-ből áll. Először 2001-ben *Vitis rupestris*-re oltott ‘Sultanina’ fajtán írtak le Görögországban. Itt a vírus nevét is adó értollasodás tünetet figyelték meg egyéb, aszteroida-szerű (asteroid-like) levéltünetek kíséretében (Glasa et al. 2019).

### **3.4. Szőlő vírusmentesítési munkák Magyarországon**

A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Szőlészeti és Borászati Intézetének kecskeméti kutatóállomásának jogelődjeiben a szőlő vírusesztelés és a vírusmentes növényegyedek szelekciója az 1970-es évekig nyúlik vissza. Ekkor Miklóstelepen Lehoczky János irányításával és Lázár János közreműködésével szövetátoltásos módszerek alkalmazásával folyt a tesztelt vírusoktól mentes növények szelekciója és vírusmentes ültetvény létrehozása, amelyet később Kisfáiba telepítettek át a 80-as években (Lehoczky et al. 1984). Ezen munkálatok eredményeként először írták le Magyarországon többek között komoly gazdasági károkozásra képes vírusok (pl. GFLV, GRSPaV, GVB, több GLRaV), valamint a világon először a szőlő vonalas mintázottság vírus (grapevine line pattern virus – GLPV) jelenlétét is (Lázár & Bisztray 2011).

Ezzel párhuzamosan 1981-ben, szintén Miklóstelepen Haydu Zsolt irányításával *in vitro* labor kialakítását kezdeményezték, ahol több hónapos hőterápiát követő hajtáscsúcs-tenyészetek alkalmazásával vírusmentes növényvonalak előállítását kezdték el. Ezt követően a víruseszteztelt növényekből fajtánként 38 tőkét tartalmazó ültetvényt alakítottak ki, amelyek felszaporítását *in vitro* mikroszaporításon keresztül végezték. Haydu (2002) megfigyelte, hogy a mikroszaporítás során a hajtások az első két tenyésztési ciklusban még a szőlőre nem jellemző morfológiát mutatnak, amely a negyedik ciklusra normalizálódott. Ezt az endogén és exogén hormonok együttes hatásának tulajdonította.

A szőlő szaporítóanyag komplex patogénmentesítése és ELISA, valamint RT-PCR alapú tesztelése, majd a vírusmentes prebázis állományok izolátorházi fenntartása 2005-ben Szegedi Ernő munkásságával kezdődött el Miklóstelepen, majd később 2014-től Katonatelepen folytatódott. Ez a folyamat a nyugalmi állapotban lévő fás vesszők melegvizes kezelésével kezdődött, amely gomba és fitoplazma fertőzések eltávolítására vagy ezen kórokozók gyérítésére hatékony módszernek bizonyult, ám pl. az agrobaktérium ellen nem volt teljes mértékben hatásos. A baktériumok eltávolítására az *in vitro* állomány létrehozásának céljából leválasztott, nagyjából fél centiméteres, felületileg fertőtlenített zöld hajtáscsúcsok felnevelése adott lehetőséget. Végül a vírusmentesítést merisztéma tenyészetek alkalmazásán keresztül érték el (Szegedi et al. 2014). Az alkalmazott módszerek mára a szomatikus embriogenezis és a növényi kemoterápia bevonásával is kibővültek és folyamatos fejlesztések zajlanak.

### **3.5. Vírusmentesítési módszerek**

A leghatékonyabb vírusmentesítési módszerek közé tartozik az *in vitro* merisztéma- és hajtáscsúcsstenyészetek alkalmazása (Panattoni et al. 2013). A szomatikus embriogenezis is ígéretesnek tűnik, habár a regenerációs rendszere erősen genotípusfüggő (San Pedro et al. 2017). Hajtáscsúcs tenyészetek vírusmentesítési hatékonyságát növelő, gyakran alkalmazott kiegészítő módszer a hőterápia, ahol is az *in vitro* vagy akár konténeres növényanyag aktív növekedésben lévő növényi részeinek hőkezelését követően kaphatunk vírusmentes hajtáscsúcsokat. A kezelés nagy általánosságban 4-6 hétig zajlik 35-42 °C-on (Wang et al. 2018). A krioterápiát is több esetben alkalmazták a vírusmentesítés hatékonyságának növelésére, amely során a hajtáscsúcs vaszkuláris régiójában lévő, magasabb víztartalmú fertőzött sejtek nem élnek túl az extrém alacsony hőmérsékleten (-196 °C) történő inkubációt, míg a kisebb víztartalmú, differenciálatlan sejtekből később növények regenerálhatók (Bettoni et al. 2016). A növényi vírusok elleni küzdelemben egyes antivirális szerek is segítségünkre lehetnek, amelyek csökkenthetik a vírus titert és megváltoztatják a vírusok növényen belüli eloszlását. Ezen anyagok használatakor sokszor keskeny a határ az antivirális hatás elérése és az erős fitotoxicitás megjelenése között, ezért nem mindig alkalmazhatók praktikusán (Tomlinson 2013).

#### **3.5.1. Hajtáscsúcs és merisztéma tenyészetek**

A hajtáscsúcs és merisztéma tenyésztést több évtizede használják vírusok vegetatívan szaporított növényekből történő eltávolítására és különösen hatékony technikáknak bizonyultak a floémre korlátozott vírusok esetében (Chauhan et al.

2019). Ezen vírusok nem képesek a merisztéma régió sejtjeinek fertőzésére a differenciálódott szállítószövet-rendszer hiánya miatt, amelyben a hosszútávú transzportjuk jelentős része történik (Panattoni & Triolo 2010; Magyar-Tábori 2021). A növények merisztémái differenciálatlan sejteket tartalmaznak, amelyek a növények életén át tartó növekedéséért felelősek. Mivel a merisztémában lévő apikális kupola régió sejtjei és az első levél primordiumok általában nem vírusfertőzöttek, így ennek a résznek a leválasztásával és *in vitro* növényé nevelésével vírusmentes egyedeket hozhatunk létre. A kipreparált explantum méretének nagyon fontos szerepe van a folyamat során (Ramgareeb et al. 2010). A hajtásregeneráció mértéke és a felhasznált szövet mérete között egyenes összefüggés mutatkozik, de a vírusmentesítés szempontjából a kisebb hajtáscsúcsok (0,2-0,4 mm) alkalmazása ajánlott (Wang & Valkonen 2009). Megfigyelések alapján a legoptimálisabb, ha legalább 1-2 levél primordiumot is tartalmazó apikális hajtáscsúccsal dolgozunk, amely biztosítja a növény fejlődése szempontjából esszenciális auxinok és citokininek termelődését. A preparálás során fontos, hogy gyorsan dolgozzunk, ugyanis a polifenolt termelő fajok (pl. szőlő) esetében a szövetsebzést követő barnulás rövid idő alatt végbemegy és értékes sejtek pusztulhatnak el. A merisztémák túlélését számos egyéb tényező is befolyásolja, mint a genotípus, az anyanövény fiziológiai állapota vagy az iniciációs táptalaj hormontartalma, amely szőlő esetében különösen fontosnak bizonyult.

Habár a legtöbb esetben a merisztémák vírusmentesek, egyes vírusokról ismeretes, hogy képesek azok fertőzésére is. Ezeket parenchimatikus vírusoknak is nevezik, amelyek a sejtfalakat összekötő plazmodezmákon keresztül képesek terjedni. Megfigyelések szerint a vírusokat nem tartalmazó sejtek sejtfalában jelentősen alacsonyabb ezen struktúrák mennyisége is, ezért a merisztéma tenyészetek alkalmazása ebben az esetben is sikerrel járhat, de sokszor egyéb előzetes kezelések, pl. krioterápia vagy hőterápia is szükségesek lehetnek (Panattoni & Triolo 2010; Magyar-Tábori 2021).

A hajtáscsúcs és merisztéma tenyésztés egyik nagy előnye tehát, hogy olyan kisméretű explantumokkal dolgozunk, amelyek mentesek lehetnek a donornövényben fellelhető patogénektől. A másik előnye a pl. szomatikus embriogenezishez képest magasabb genetikai stabilitás, amely mértéke nagyban növelhető az *in vitro* stádiumban töltött idő csökkentésével is (Vivek & Modgil 2018).

Számos esetben sikerrel távolítottak el szőlővírusokat merisztéma tenyészetek alkalmazásával, például a GFLV-t (Weiland et al. 2003; Youssef et al. 2009) és a GLRaV-1-t is (Youssef et al. 2009). Fayek et al. (2009) szintén ugyanezen vírusokkal

fertőzött 'Flame Seedless' szőlőfajtát vírusmentesítettek. Két mérettartományban (0,5 mm és 1 mm) preparáltak merisztémát. Azt találták, hogy az 1 mm-es explantumokból általában több hajtás (nagyjából kétszeres) fejlődött és azok átlagos hossza is meghaladta a 0,5 mm-es explantumokból regeneráltakét, de a gyökérnyúlványok száma és hossza is nagyobb volt az egyes növényeken. Az RT-PCR vizsgálatok eredményét nézve vírusmentesítési szempontból a 0,5 mm-es hajtások voltak kedvezőbbek, ugyanis a GLRaV-1-fertőzött növényekről leválasztott hajtáscsúcsok regenerációja 25%-kal, míg a GFLV esetében 22,5%-kal több vírusmentes növényt eredményezett.

Gribaudo et al. (2006) 6 különböző, GRSPaV-vel fertőzött szőlőfajtán végeztek vírusmentesítést. A merisztéma tenyészet vírusmentesítési hatékonysága erős genotípusfüggőséget mutatott, mivel fajtától függően 0-73% sikerrel eliminálták a vírust, ahol is 3 fajta vírusmentesítése sikertelennek bizonyult. Maliogka et al. (2009) is sikerrel eliminálták a GRSPaV-t görög szőlőfajtákból hajtáscsúcs tenyészetek alkalmazásával.

Shatnawi et al. (2011) GLRaV-1, GLRaV-3 és GFLV-vel fertőzött szabadföldi szőlőnövények hajtáscsúcsokból 0,1–0,2 mm nagyságú merisztémákat preparáltak. Az RT-PCR vizsgálatokkal kimutatták, hogy a merisztéma eredetű növényeik mindegyike mentes volt a korábban detektált vírusoktól.

Marković et al. (2021) két kizárólag GLRaV-3-mal fertőzött őshonos horvát szőlőfajtán vizsgálták az 1 mm-es hajtáscsúcsok regenerációjával történő vírusmentesítést. Azt találták, hogy a vírusmentesítés az egyik fajta esetében 100%-os hatékonyságú volt, míg a másik esetében teljesen sikertelen. Vizsgálták továbbá 18, szintén őshonos fajtán két fenológiai stádium hatását a merisztémák regenerációs arányára és azt találták, hogy egy fajta kivételével a virágzást követő 10. nap után szedett hajtásokból preparált merisztémák túlélési és regenerációs aránya lényegesen nagyobb volt, valamint hatékonyabban is gyökereztek, mint a virágzás előtt 10 nappal szedett hajtásokból preparáltak. Ez a különbség némelyik fajta esetében kétfélszeres is volt, amelynek oka szerintük az lehetett, hogy ebben a fenológiai stádiumban nagyobbak voltak az apikális merisztémák, ezáltal az izolálásuk is könnyebb folyamat volt.

A hajtáscsúcs tenyészetek kombinálása egyéb technikákkal szintén sok esetben sikerrel járt. Kioterápiát követő hajtáscsúcs tenyésztéssel Wang et al. (2003) 97%-ban vírusmentesítettek GVA-val fertőzött szőlőnövényeket, amely kísérlet alapján később Bayati et al. (2011) szintén sikerrel jártak, de esetükben a regenerált növények 42%-a

bizonyult csak GVA fertőzéstől mentesnek. A különbséget eredményezhette az eltérő szőlőfajta, illetve az alkalmazott vírusdiagnosztikai módszerek, ugyanis Wang et al. Western blot-ot használtak, míg Bayati et al. RT-PCR-t, amelynek érzékenysége köztudottan magasabb. Pathirana et al. (2015) GLRaV-1, -2 és -3 vírusokat elimináltak sikeresen hasonló módszerrel. Bi et al. (2018) GLRaV-3 fertőzött bor- és csemegeszőlő fajtákat vírusmentesítettek 1 órás krioterápiát követő hajtáscsúcs tenyésztéssel. Azt találták, hogy a regenerált növények mindegyike mentes volt a GLRaV-3-tól, függetlenül attól, hogy mekkora hajtáscsúcsból regenerálták.

A hajtáscsúcs és merisztéma tenyészeteket hőterápiával is gyakran kombinálták. Skiada et al. (2009) sikeresen távolították el eképpen a GLRaV-1 és GRSPaV vírusokat az 'Agiorgitiko' szőlőfajtából. A hőterápia és a hajtáscsúcs tenyészetek kombinálásának hatékonyságára szintén jó példa Maliogka et al. (2009) publikációja, amelyben két szőlőfajtából távolították el a GRSPaV és GLRaV-4 vírusokat. Leírták, hogy a hőterápiát követő hajtásregeneráció szignifikánsan hatékonyabb, ha a 2 mm alatti hajtáscsúcsok helyett 2 és 5 mm közötti hajtáscsúcsokat választanak le a növényekről. Salami et al. (2009) GFLV fertőzött 'Bidaneh Sefid' és 'Shahroodi' szőlőfajtákból indítottak merisztéma (0,2-0,3 mm) tenyészeteket 7 hetes hőterápiát követően és a regenerált egyedek 100%-ban vírusmentesek lettek. Miljanić et al. (2022) 6 *Vitis vinifera* fajta, összesen 28 klónjának vírusmentesítését és viroidmentesítését vizsgálták hőterápiát követő merisztéma tenyészetek létrehozásával. Vizsgálat alá vonták a GRSPaV, GPGV, GFLV, GLRaV-3, GFkV, GRVFV, GSyV-1 és a málna bokros törpülés vírusokat (raspberry bushy dwarf virus – RBDV), valamint a HSVd és a GYSVd-1 viroidokat. Azt találták, hogy az összes regenerált egyedük 100%-ban mentes volt a 8 vizsgált vírustól, valamint nagyjából 40%-ban a két vizsgált viroidtól is.

### **3.5.2. Szomatikus embriogenezis**

A szomatikus embriogenezist korábban már alkalmazták vírus és/vagy viroid fertőzésektől mentes növények regenerálására, de a technika a szakirodalmi közlemények adatai alapján erős genotípusfüggőséget mutat, így a többi vírusmentesítési módszernél ritkábban alkalmazzák. A fogékony genotípusok esetében a módszer igen hatékony, mivel vírust vagy viroidot tartalmazó sejtekből, illetve néhány sejtől álló sejtcsoportból ritkán regenerálódik embrió (Malenica et al. 2020; Oláh et al. 2019). A folyamat során végbemenő gyors sejtosztódás és a vaszkuláris rendszer kialakulásának eltolódása tovább gátolja a vírusok terjedését az

újonnan fejlődő embriókba. Habár a módszer hatékonysága kiemelkedő a legtöbb vírus esetében, mégis több limitáló tényező léphet fel, amelyek közül az egyik legkritikusabb az embrió növényé regenerálódása. A folyamat sikerének aránya szakirodalmi adatok alapján 0 és 83% között alakul (Malenica et al. 2020). Ezen kívül limitáló tényező az alkalmazott explantum típusa. *Vitis vinifera* esetében már sikeresen végeztek szomatikus embriogenezist levéllyél, levélszegmens, hajtáscsúcs, zigotikus embrió, kacs, szárcsomó stb. felhasználásával is, de legelterjedtebb a portok, az ovárium vagy a teljes virágzatok felhasználása. A táptalajok hormonkombinációja és a kiindulási növény fiziológiai állapota is fontos tényező. Mindezeket figyelembe véve a különböző fajták esetében sokszor nehézkes a megfelelő protokollok kidolgozása (Catalano et al. 2021; Malenica et al. 2020).

Gribaudo et al. (2006) számos GRSPaV-vel fertőzött szőlőfajtán végeztek szomatikus embriogenezist, többek között éretlen portokokat és ováriumokat felhasználva. Azt találták, hogy az összes szomatikus embriogenezissel regenerált vonal mentes volt a vírustól. Gambino et al. (2006) vírusmentesítés céljából ovárium és portok eredetű embriogén kultúrákat hoztak létre különböző szőlőfajtákból. Vizsgálataik során megállapították, hogy a módszer mindkét explantum felhasználásával alkalmas a floémre korlátozott vírusok, mint a GLRaV-1, GLRaV-3, GRSPaV és GVA eltávolítására. Ugyanezen kutatók (Gambino et al. 2009) elsőként regeneráltak GFLV fertőzéstől mentes növényeket kizárólag szomatikus embriogenezis alkalmazásával.

Borroto-Fernandez et al. (2009) portoktenyészetek indításával sikerrel eliminálták az ArMV fertőzést 'Domina' szőlőfajtából. San Pedro et al. (2017) számos, GFkV és/vagy GFLV vírussal fertőzött, valamint négy, GLRaV-3 vírussal fertőzött fajta portokjain indukáltak szomatikus embriogenezist. A kísérlet végén regenerált növények 100%-a bizonyult GFkV-mentesnek, 68%-a GFLV-mentesnek és 92%-a GLRaV-3-mentesnek. Oláh & Bordé (2017) szintén jó eredményeket értek el a GFkV fertőzés leküzdésében. A módszer szűk keresztmetszetét az embriogén kallusz indukcióra felhasznált hormonkombinációk genotípusfüggősége adja. Tapasztalataik alapján a 2,4-D (2,4-diklór-fenoxi-ecetsav) és BA (benzil-adenin) vagy a 2,4-D és TDZ (thidiazuron) tartalmú táptalajok használata alkalmas erre a célra, míg Malenica et al. (2020) hét őshonos horvát szőlőfajtán végzett kísérlete alapján a naftoxi-ecetsav (naphthoxyacetic acid - NOA) és 2,4 D-t tartalmú táptalajok alkalmazása is sikerrel járhat.

Gambino et al. (2011) a szomatikus embriogenezis viroidok eltávolítására gyakorolt hatását is vizsgálták. Ehhez négy HSVd és GYSVd-1 fertőzött szőlőfajta szabadföldi növényeinek portokjait és ováriumait használták fel. A kísérlet során azt is vizsgálták, hogy az embriogén kultúrák létrehozására felhasznált képletek (portokok és ováriumok), illetve a folyamat során létrejött kalluszok (embriogén és nem embriogén), valamint a szomatikus embriók fertőzöttek-e az említett viroidokkal. Azt találták, hogy a portokok és az ováriumok egyaránt fertőzöttek voltak a két viroiddal, valamint az ezekből fejlődő kalluszokban is gyakori (60-100%) volt az előfordulásuk, ám a fejlődő szomatikus embriók már vírusmentesek voltak. Ez arra utalt, hogy a HSVd és a GYSVd-1 viroidok az embriók differenciálódásának már egy korai szakaszában eltűnhetnek. RT-PCR alapján az összes regenerált *in vitro* növényegység mentesnek bizonyult a két viroidtól, valamint az állomány egy részét az üvegházban további 3 évig tesztelték, ahol a viroidmentes státuszuk továbbra is megmaradt.

Nuzzo et al. (2022) hét szabadföldi szőlőfajta viromját térképezték fel nagy-áteresztőképességű RNS szekvenálás alkalmazásával. Azt találták, hogy a fajták különböző kombinációkban voltak fertőzöttek a GFkV, GFLV, GLRaV-2, -3, -4, GPGV, GRSPaV, GVA, GVD és GVT és vírusokkal, valamint a GYSVd-1 és HSVd viroidokkal. Annak érdekében, hogy ezektől a kórokozóktól megszabaduljanak fiatal portokokon és ováriumokon indukáltak szomatikus embriogenezist. A kísérlet végén regenerált szomatikus embrió eredetű növényeik fertőzöttségét nagy-áteresztőképességű RNS szekvenálás és RT-qPCR segítségével vizsgálták meg. Azt találták, hogy a legtöbb vírus az összes regenerált vonalukból eltűnt, de a GPGV és GYSVd-1 fertőzések az egyik fajta regenerált egyedeinek egy részében (9% és 27%) továbbra is jelen voltak. A HSVd viroidot 3 fajta regenerált egyedei között mutatták ki 5, 40 és 100%-os előfordulással, utóbbit a nagyon alacsony egyedszám eredményezhette (1 db.).

A szomatikus embriogenezis alkalmazásánál gyakran felmerülő kérdés a szomaklonális variabilitás kérdése, amely hatással lehet a vírusmentesítési folyamaton átesett növények genetikai állományára és esetlegesen negatívan is befolyásolhatja a fajta tulajdonságait is. A fenotípusos változások azonosítására már számos szempontot dolgoztak ki, de ehhez az egyedek hosszútávú vizsgálata is szükséges, amely igen időigényes folyamat. Bouamama-Gzara et al. (2017) 50 szomatikus embrióból regenerált szőlőnövényt hasonlítottak az anyanövényekhez különböző ampelográfiai szempontok alapján és azt találták, hogy 46 esetben teljes volt az egységesség. A

maradék 4 vonal esetében főleg a kifejlett levelek morfológiájában történt változás, de a fiatal levelek és a hajtások alaktanilag megegyeztek az anyanövényével. Catalano et al. (2021) 15 ampelográfiai szempont alapján vizsgálták egy diploid és két tetraploid szomatikus embriogenezis eredetű növényüket levél és hajtás morfológiai különbségek után kutatva. Azt találták, hogy a diploid és a két tetraploid mindössze 3 szempontban egyeztek meg teljes mértékben. Különbség volt pl. a fiatal hajtáscsúcs kinézetében, amely a diploid növény esetében zárt volt, míg a tetraploidok esetében teljesen nyitott. Ez azt mutatja, hogy a poliploid egyedek esetenként könnyedén azonosíthatóak, szelektálhatóak előzetes vizsgálatok elvégzése nélkül, pusztán a fenotípus alapján is.

Sok esetben azonban a megváltozott gének és fehérjék szerkezetének változása nem eredményezi azok biológiai funkcióinak megváltozását is, így azok nem azonosíthatók fenotípusosan (Prado et al. 2010). A poliploidia esetében ilyenkor a flow-citometria alkalmazása a legelterjedtebb. Acanda et al. (2013), Catalano et al. (2021) és Yang et al. (2008) is ezzel a módszerrel vizsgálták az egyedeik ploiditását. Előbbi kettő esetben 5,6% és 9,3% volt a poliploid egyedek aránya, míg utóbbi esetben nem találtak. Ezek az egyedek valószínűleg endoreduplikáció útján jöttek létre, amely a sejt replikációját követő sejtosztódás hiányában alakul ki. Ezen kívül vizsgálták továbbá a növények átlagos sejtmagi DNS tartalmát is és azt találták, hogy a szomatikus embriogenezis eredetű *in vitro* növényekben átlagosan 6,7%-kal alacsonyabb volt, mint a szabadföldi növényekben. Ennek oka lehet szerintük a szomatikus embriogenezis során végbemenő intenzív sejtosztódás is, amely során egyes genetikai részletek könnyebben elveszhetnek. Ez azonban nem köthető egyértelműen a módszer alkalmazásához, hiszen az intenzíven mikroszaporított növények esetében (mint amilyenek a jelen kísérletben is vizsgált SE eredetű *in vitro* növények is voltak) a gének mutációja, kromoszómák újrendeződése, a delécio és az inzercio is gyakrabban előforduló jelenségek (Butiuc-Keul & Coste 2023).

A poliploiditás vizsgálatán felül a regenerált vonalak DNS profiljának összehasonlítása is eszközölhető. Catalano et al. (2021) random amplifikált polimorf DNS (Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD), ISSR (inter-single sequence repeat) és SSR (single sequence repeat) markerek segítségével vizsgálták a szomaklónjaikat és azt találták, hogy nincs különbség a diploid és tetraploid egyedek, valamint az anyanövények DNS profiljában. Carra et al. (2016) korábban szintén RAPD és ISSR markerek segítségével vizsgálták a regenerált egyedeket és minden esetben monomorfizmust tapasztaltak az anyanövényekkel, valamint fajtán belül az

összes *in vitro* egyed között is. Schellenbaum et al. (2008) 6 különböző SSR marker segítségével vizsgálta 6 szőlőfajta regenerált egyedeit és mind a hat lókuszban azonos mikroszatellit profilt mutattak az anyanövényekkel és egymással is. Amplifikált fragmentum hossz-polimorfizmussal (amplified fragment length polymorphism - AFLP) tovább vizsgálva a genetikai változásokat kimutattak néhány polimorf fragmentumot. Ezekről a metiláció érzékeny amplifikációs polimorfizmus (methylation sensitive amplification polymorphism -MSAP) módszer segítségével kiderült, hogy az anyanövényekben megfigyelt DNS metilációs mintázattól való eltérés eredményezte.

### 3.5.3. Növényi kemoterápia

Az antivirális vegyületek alkalmazhatók a növényi vírusos megbetegedések kezelésére is. Manapság egyre bővülő érdeklődés övezi az erre a célra kifejlesztett szintetikus szerek utáni kutatást. Szerencsére a virális replikációban résztvevő összes enzim célpontja lehet ezeknek a szereknek (Panattoni et al. 2007). Az ilyen vegyületek kifejlesztésének fő mozgatóereje eredetileg a különböző embereket fertőző betegségek kezelése volt, de az állati és növényi sejtekben lévő hasonlóságoknak köszönhetően egy részük növényi vírusok ellen is alkalmazható (Magyar-Tábori et al. 2021). A leghatásosabb szerek az inozin monofoszfát dehidrogenáz (IMPDH) inhibitorok, az S-adenozil-homocisztein (SAH) hidroláz inhibitorok és a neuraminidáz (NA) inhibitorok közül kerültek ki.

Az IMPDH inhibitorok (pl. ribavirin, zidovudin) közvetlenül a ribonukleotid-trifoszfátokat mozgósító transzkripcióban vesznek részt és ezzel gátolják a virális RNS-ek szintézisét. Az SAH hidroláz inhibitorok (pl. dihidroxipropiladenin - DHPA) metilálják a virális nukleinsavakat és ellehetetlenítik azok érését, különösen az 5' sapka kialakulását. Az NA inhibitorok (pl. oseltamivir) a virális neuraminidáz enzimhez kapcsolódnak és gátolják az újonnan szintetizált virionok egészséges sejtekbe történő eljutását. A növényekben nincs neuraminidáz fehérjéhez köthető replikációs lépés, így az ebből a csoportból kikerülő szerek (pl. oseltamivir) hatásmechanizmusa növények esetében még ismeretlen (Panattoni et al. 2013).

Az antivirális szerek alkalmazásával végzett kemoterápia az *in vitro* növények esetében vírusmentes hajtáscsúcsokat biztosíthat, elkerülve a bonyolult merisztéma tenyészetek használatát. A folyamat során a kezelni kívánt növények, hajtások, merisztémák, szárszegmensek, hagymák stb. az antivirális hatást kifejtő vegyszert tartalmazó táptalajra kerülnek, majd a tápanyagfelvétel során ezek a vegyszerek a

növénybe jutva fejtik ki hatásukat, pl. a virális RNS-ek replikációjának gátlását (Magyar-Tábori et al. 2021; Lal et al. 2015). Az egyes vegyületek különböző hatásmechanizmussal bírnak (De Clercq 2005) és általában magasabb koncentrációban alkalmazva sem hatásosak hosszú távon *in vivo* körülmények között (Chinestra et al. 2015), de *in vitro* körülmények között több kutató is jelentős sikereket ért el a használatukkal.

### 3.5.3.1. Ribavirin

A szőlővírusok eliminálására leginkább használt vegyület az inozin-monofoszfát-dehidrogenáz (IMPDH) inhibitorok közé sorolható ribavirin vagy kereskedelmi nevén Virazole. Az 1972-ben szabadalmaztatott ribavirin antivirális hatást fejt ki számos RNS és DNS vírus ellen. A humán gyógyászatban interferon- $\alpha$ -val kombinálva használják hepatitis C vírus (hepatitis C vírus - HCV) fertőzések kezelésére, de önmagában a Lassa láz vírus és a légzőszervi szinciciális vírus (respiratory syncytial virus - RSV) ellen is hatásosnak bizonyult (Loustaud-Ratti et al. 2016). A ribavirin elsődleges hatásának kezdetben az IMPDH enzim gátlását nevezték meg, amely következtében gátolta az inozin 5-foszfát xantozin 5-foszfáttá történő átalakulását a sejten belül. Ez közvetve csökkentette az érintett sejtek intracelluláris GTP szintjét akár 90%-kal, ezáltal nehezítve a virális RNS-ek szintézisét. Később megfigyelték, hogy ez a hatás 25  $\mu$ M ribavirint alkalmazva maximalizálódik, de a szer hatása töményebb koncentrációkat alkalmazva is fokozódik. A szer egyfajta pre-drogként működik, amely metabolizálódása során nukleozid analóggá alakul és ebben a formában a karboxamid csoportja különböző helyzetet vehet fel. Ennek következtében szerkezete az adenzinéra és a guanozinéra is hasonlítani fog és beépül a készülő RNS láncba. Mivel citozinnal és uracillal is képes párosodni, így mutációk keletkeznek, amit a vírusok RNS-függő RNS polimerázai proofreading aktivitás hiányában nem tudnak kijavítani. A kutatók ezt a letális mutagenézist okozó mechanizmust nevezték meg a ribavirin elsődleges hatásmechanizmusaként, amely mellett az intracelluláris GTP szint csökkentése csupán másodlagos (Magyar-Tábori et al. 2021; Crotty et al. 2002; Nyström et al. 2016).

A ribavirin növényi vírusok elleni alkalmazását már a 70-es években is kutatták. Lerch (1977) burgonya vírus x (potato virus x - PVX) kórokozóval fertőzött üvegházi dohánynövényeket Erlenmeyer lombikokban. Az alsó leveleket fertőzte, majd ribavirint is tartalmazó tápoldatba áztatta azokat. Azt találta, hogy a kezelt levelekben alacsonyabb volt a PVX mennyisége és a terjedése is lassabb volt, ugyanis

az inokulációs ponttól távolodva a vírusszám is egyre alacsonyabbnak bizonyult. A növekvő egyedek legfelső leveleiben a vírus koncentráció már a nullához közelített, tehát a növény úgymond „kinőtte” a vírust.

Később gyümölcsöknél is sikeresen alkalmazták a ribavirint, például cseresznyeszilvánál és kerti szilvánál a *Prunus* nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (*Prunus necrotic ring spot virus* -PNRSV), kerti szilvánál az alma klorotikus levélfoltosság vírus (*apple chlorotic leaf spot virus* - ACLSV), málnánál a málna bokros törpülés vírus (*raspberry bushy dwarf virus* - RBDV), ‘Kinnow’ (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora) hibrid mandarinnál az indiai citrus gyűrűsfoltosság vírus (*Indian citrus ringspot virus* - ICRSV) vagy burgonya esetében a burgonya levélsodródás vírus (*potato leaf roll virus* – PLRV) eliminálására (Cielinksa 2007; Mathew et al. 2021; Asghar et al. 2007; Singh 2015).

Az évek során több kutató is sikeresen használta ezt a vegyületet különböző szőlőfajták *in vitro* kultúráiban pl. a GRSPaV, a GLRaV-1, a GFkV és a szőlő Pinot gris vírus (GPGV) eliminálására (Guta & Buciumeanu 2011; Skiada et al. 2013; Komínek et al. 2016).

Panattoni et al. (2007) GVA fertőzött növények esetében alkalmazták a ribavirint és az SAH hidroláz inhibitorok csoportjába tartozó dihidroxi-propil-adenint (DHPA). A vegyszereket külön és kombinációban is használták és azt figyelték meg, hogy az együttes alkalmazásuk a legcélravezetőbb, ugyanis mindkét szer gátolja a GVA terjedése szempontjából esszenciális lépést, az 5’ sapka kialakulását. A két vegyszer valószínűleg eltérő úton fejti ki ugyanazt a hatást és így szinergista módon erősítik egymást.

Hu et al. (2018) ‘Kyoho’ szőlőfajta esetében qPCR-rel kimutatták, hogy már a kezelés ötödik napjától megkezdődik a vírus titer csökkenése a GRSPaV-vel fertőzött növényekben. Hatékonyan kombinálták a ribavirin és a merisztéma tenyészetek alkalmazását, amivel 81,7%-ban voltak képesek GRSPaV-mentes növényeket regenerálni.

Eichmeier et al. (2019) a GLRaV-1 és a GFkV mellett GVA-val, valamint viroidokkal fertőzött ‘Olasz rizling’ fajta esetében alkalmaztak ribavirint. A kezelés nyolchetes időszaka után további három évig *in vitro* állományban tartották a növényeket és időszakosan kis RNS szekvenálással vizsgálták azokat vírusok és viroidok jelenléte után kutatva. A vírusok az érzékeny technika ellenére sem voltak kimutathatóak, míg a viroidok továbbra is jelen voltak.

Hu et al. (2020) GLRaV-3 fertőzött *Vitis champini* növényekkel dolgoztak. Vírusmentesítési céllal 15 és 25 mg/l ribavirint alkalmaztak, de önmagában a 40 napig tartó kezelést követően sem tudtak vírusmentes növényt regenerálni. A 37 °C-os *in vitro* hőterápiát is kipróbálták, amelynek eredményeképpen 42,9% vírusmentes növényt kaptak. Amikor a 15 mg/l-es ribavirin kezelést kombinálták hőterápiával, akkor már 93,3% vírusmentes növényt kaptak, amely jól mutatja, hogy a két módszer szinergista módon erősíti egymást, hiszen csak az egyik alkalmazásával nem regeneráltak ilyen nagy arányú egészséges növényt.

Aiter et al. (2020) GLRaV-3 és GFLV fertőzött *Vitis vinifera* fajtákat kezeltek 20 mg/l ribavirinnel. Nyolc hetes kezelést követően az összes regenerált növényük GLRaV-3 mentes volt, míg a GFLV-t átlagosan 75%-ban sikerült eliminálni. Erős kontraszt mutatkozik Hu et al. és Aiter et al. kísérletében a GLRaV-3 eliminálás tekintetében, hiszen előbbiek 25 mg/l ribavirinnel sem tudtak vírusmentes növényt előállítani. Ennek oka az is lehet, hogy Aiter et al. 8 hétig kezelték a növényeket, ők pedig csak 40 napig, de ami valószínűbb, hogy a vírusdiagnosztikai módszerek okozták az eltérést. Hu et al. RT-qPCR módszerrel vizsgálták a növényeket, Aiter et al. pedig ELISA teszttel, amely esetükben fals negatív eredményekhez vezethetett. Eltérést okozhatott továbbá, hogy egyik esetben *Vitis vinifera*, míg a másikban *Vitis champini* növényekkel dolgoztak.

Hu et al. (2021) GRSPaV és GFkV fertőzött *Vitis vinifera* növényeket kezeltek 15 és 25 mg/l ribavirinnel. A kísérlet végén a 25 mg/l-es koncentrációt alkalmazva 79,5%-ban kaptak GFkV és 13,6%-ban GRSPaV fertőzéstől mentes egyedeket. A 15 mg/l-es koncentrációt alkalmazva rosszabb, 56% és 9%-os eredményeket értek csak el. A kezelést 37 °C-os hőterápiával megtámogatva a növényeik teljesen vírusmentesek lettek.

Doroshenko et al. (2021) a szőlő klónok mikroszaporításának optimalizálásán dolgoztak. Habár a ribavirin vírusmentesítési hatásáról nem esett szó cikkükben, de arra használták, hogy növeljék a merisztémák túlélési arányát. Kiindulásképpen 0,1-0,2 mm nagyságú merisztémákat preparáltak ki és vizsgálták azok regenerációját egészen 90 napon keresztül. Megfigyelték, hogy 10 mg/l ribavirint alkalmazva a regenerációs táptalajban a merisztémák regenerációs arányát maximalizálni tudták. A kontroll növényekről leválasztott merisztémák 77%-a regenerálódott 90 napos tenyésztést követően, míg a 10 mg/l ribavirint tartalmazó táptalajon ez a szám már 84,5% volt. Ezt ők azzal magyarázták, hogy ezt a koncentrációt alkalmazva valószínűleg csökkent a merisztémák fertőzés okozta pusztulása, de a

hajtásképződésre még nem volt jelentős negatív hatással, ellentétben a magasabb koncentrációkkal. Ennél magasabb ribavirin koncentrációt alkalmazva a regenerációs arány drasztikus csökkenésnek indult és 40 mg/l-nél elérte a 0%-ot. Ez a hatás szalicilsav alkalmazásával még tovább volt növelhető. Ezek az eredmények jól indikálják, hogy az antivirális hatású szerek növények élettani állapotának javítására és szaporíthatóságára irányuló vizsgálatai is jövedelmezők lehetnek.

### 3.5.3.2. Zidovudin

A zidovudin (zidovudine - ZDV) vagy más néven azidotimidin (azidothymidine - AZT) az első volt a nyolc beazonosított nukleozid reverz transzkriptáz inhibitor (NRTI) között. 1985 óta a szerzett immunhiányos tünetegyüttes (acquired immunodeficiency syndrome - AIDS) betegek kezelésére is használják. A ZDV egy antiretrovirális hatású szer, amely az IMPDH gátlók csoportjába tartozik. A kezelt sejteken belül lévő timidin kinázok alakítják az 5'-trifoszfát formává, amely már egy aktív metabolit. Ebben a formában nagy affinitással köt pl. a humán immundeficiencia vírus (human immunodeficiency virus - HIV) reverz transzkriptázához és verseng a normál nukleotid-trifoszfátokkal a pro-virális DNS-be való beépülésért. Amikor ebben a dideoxinukleotid-trifoszfát állapotában beépül a DNS láncba, akkor láncterminátorként megszakítja annak további szintézisét, ugyanis hiányzik róla a 3'-hidroxil csoport, amely esszenciális a kovalens kötés kialakulásához. Ezzel a lépéssel már azelőtt ellehetetleníti a vírus replikációját, hogy az a gazdasejt genomjába ékelődhetne (Cihlar & Ray 2010; Liu et al. 2020).

Növényi vírusok elleni alkalmazását csak később, a 2000-es években kezdték meg. Asghar et al. (2007) az ICRSV vírussal fertőzött 'Kinnow' hibrid mandarin növényeket próbálták vírusmentesíteni 5, 10, 15, 20 és 25 mg/l ZDV-nal *in vitro* körülmények között. Az ELISA tesztek alapján 20 mg/l-ig nem volt kimutatható vírusmentesítési hatása. A 25 mg/l-os koncentrációt alkalmazva már a regenerált növények 11,1%-a mentes volt a vírustól, de az azt követő RT-PCR ezt cáfolta. Ennél nagyobb koncentráció alkalmazásával nem kísérleteztek, mert véleményük szerint az már túlságosan fitotoxikus lett volna a növényekre nézve.

Ohta et al. (2011) Satsuma dwarf virus (SDV) fertőzött 'Ueno-wase' mandarinok vírusmentesítését végezték különböző antivirális szerekkel. Kísérletüket szabadföldi növényegyedeken végezték. Az ágakat visszavágták, hogy további hajtásnövekedést indukáljanak. Nedvszívó pamutokat áztattak 50 mg/l koncentrációjú ZDV oldatba és azokkal tekerték be a hajtásokat. A fejlődő, 2-4 cm-es nagyságot elért

hajtásokat begyűjtötték és 0,3 mm-es hosszúságú hajtáscsúcsukat mikro-oltással alanyfajtára oltották. Végül kb. 2 hónappal később az oltást túlélő hajtások levelét RT-PCR-rel tesztelték. Azt találták, hogy a regenerálódott hajtások 50%-a mentes volt az SDV-től, amely a kezeletlen növényekhez képest is rosszabb eredmény, ott ugyanis 81% volt az arány. Ezt a kísérletet párhuzamosan, más antivirális szereket (ribavirin, foscarnet) alkalmazva is végig vitték, amelynek eredményeképpen a kezeletlen kontrollhoz képest nagyobb arányban regeneráltak SVD fertőzéstől mentes növényeket (100% és 90%). Leírták azonban, hogy a szakirodalomban a ribavirinén kívül a többi antivirális szer esetében nem találtak optimális koncentrációt növényi vírusok elleni alkalmazásra, ezért nem kizárt, hogy magasabb ZDV koncentráció alkalmazásával kedvezőbb eredményeket érhettek volna el. Mindemellett megjegyzendő, hogy a kontroll növényekhez képest a ZDV kezelt hajtások növekedési erélye jelen kísérletben lassabbnak mutatkozott.

Kudelková et al. (2013) fokhagyma növényekből szerették volna eliminálni a fokhagyma közönséges rejtett vírusát (garlic common latent virus - GCLV) és a shallow látens vírust (shallow latent virus - SLV). A ZDV-t 25 és 50 mg/l-es koncentrációban alkalmazták és a kezelés 2 hétig tartott. Ezt követően 1 mm-es hajtáscsúcsokból regeneráltak növényeket és 2 hónap után RT-PCR-rel tesztelték azokat. Eredményeik alapján az SLV eliminálása sikeres volt, de a GCLV-t nem tudták eltávolítani. Megfigyeléseik alapján ők sem tapasztaltak negatív hatást a növények egészségügyi állapotára nézve, sőt esetükben a kezelt növények növekedése üteme gyorsabb is volt.

Pavelkova et al. (2015) zidovudin és ribavirin alkalmazásával szerették volna eliminálni a korábban őszibarack növényeiből RT-PCR-rel detektált 3 vírust (prune dwarf virus - PDV, prune necrotic ringspot virus - PNRSV, plum pox virus - PPV). A zidovudint 25 és 50 mg/l-es, a ribavirint pedig 20 mg/l-es koncentrációban alkalmazták és a kezelés 3 hétig tartott. Ezután a kezelt növények hajtáscsúcsából növényregenerációt hajtottak végre és RT-PCR-rel tesztelték őket. Azt találták, hogy a zidovudin mindkét alkalmazott koncentrációban 100%-os hatékonysággal tudta eliminálni mindhárom vírust. A ribavirinnel szintén jó eredményeket értek el, de a hatás nem volt 100%-os. Ellentétben a ribavirinnel a zidovudin nem volt negatív hatással növények egészségügyi állapotára, sőt a kezelt növények jobban is növekedtek a kontroll növényekhez képest, ahogy azt már Kudelková et al. (2013) a kísérletükben szintén leírták.

Singh (2015) PLRV fertőzött burgonyanövényből próbálták eliminálni a vírust különböző antivirális szerek használatával, köztük zidovudinnal is. A 20 mg/l alatti koncentrációkkal történő kezelések nem eredményeztek vírusmentes egyedeket. Az RT-PCR tesztek alapján a négy hétig tartó 20 mg/l, 25 mg/l és 30 mg/l ZDV-nel történő kezelések eredményeként a regenerált egyedek 4,3%-a, 12,9 %-a, valamint 16,7%-a mentesnek bizonyult a vizsgált vírustól.

A szőlővírusok és viroidok zidovudinnal történő eliminálásáról a szakirodalomban nem találtam közleményt.

### **3.5.3.3. 2-thiouracil**

A 2-thiouracil (2-TU) egy uracil analóg az IMPDH gátlók csoportjából, amely számos biológiai tulajdonsággal rendelkezik, mint az antikarcinogén, antifungális, antiprotozoális és antivirális aktivitás (Alcolea et al. 2019). Ezzel a vegyülettel először Commoner & Mercer (1952) kísérleteztek növényen. TMV vírussal fertőzött dohányleveleket kezeltek 2-TU oldattal és azt találták, hogy a szer gátolja a vírus replikációját, de az esetlegesen mégis létrejött vírusok fertőzőképességére nem volt negatív hatással. Jenner & Rossels (1953) ezt követően leírta, hogy a 2-TU az RNS szintézis során kompetitív módon gátolja az uracil beépülését az újonnan szintetizálódó RNS láncokba, majd Jeener (1957) ezt kiegészítette azzal, hogy a vírus genetikai anyagát irreverzibilisen módosítja. Francki & Matthews (1959) később azt találták, hogy a TMV vírus esetében fertőzőképesség csökkenése jelentősebb volt (58-80%), mint a vírusok számának csökkenése, tehát valószínűleg fertőzőképtelen vírusok képződtek. Ezt a megállapítást később Barta & Föglein (1981) is megerősítette dohány protoplasztokkal végzett kísérletekkel. Francki 1962 kimutatta azt is, hogy a dohány nekrozis vírus Rothamsted törzsével (Rothamsted strain of tobacco necrosis virus - RTNV) fertőzött dohány és francia bab esetében a 2-TU eltérő időintervallumban hat a kezelés előrehaladtával. Ralph et al. (1965) azt találták, hogy vizsgált dohány és káposztanövényeken végzett kezelés hatására a keletkező vírusok fehérjeburka eltért a megszokottól. Ennek következtében a vírusok csökkent ellenállóképességet mutattak a hőstresszel szemben és az ultraibolya abszorpciójuk is megváltozott. Ez valószínűleg annak volt köszönhető, hogy a 2-TU a vírus fehérjét kódoló régióba épült be.

A vegyszer patogén eliminációs hatását az elmúlt évtizedekben számos növényfaj esetében tesztelték. Xu et al. (1999) liliom tünetmentes vírus (lily symptomless virus - LSV), tulipán színtörő vírus – lily (tulip breaking virus-lily -

TBV-L) és uborka mozaik vírus (cucumber mosaic virus - CMV) fertőzött *Lilium longiflorum* növényekkel dolgoztak. A növényeiket 0,5, 5 és 50 mg/l 2-thiouracillal kezelték. A 0,5 mg/l 2-TU koncentráció nem eredményezett vírusmentes növényt, míg az 5 mg/l-es kezelés 12%-ban, az 50 mg/l-es pedig 43%-ban adott vírusmentes vonalakat.

Woo et al. (2004) LSV fertőzött 'Casa Blanca' nevű keleti liliommal dolgoztak. A kísérlet során a növényeiket 0, 20, 40, 80 mg/l 2-TU-lal kezelték 12 héten keresztül. A kezelt szervek hagymapikkelyek és sarjhagymák voltak. Azt figyelték meg, hogy a hagymapikkelyek hamarabb pusztultak el a szer hatására. A hagymák növekedését a 20 mg/l-es koncentráció kis mértékben serkentette. A kontroll növények mindegyike fertőzött maradt a vírussal, míg a kezelést túlélő egyedek 100%-ban vírusmentesek lettek.

Verma et al. (2005) 2-TU alkalmazásával szerették volna begónia növényekből eliminálni a PNRSV fertőzést. A vegyszert 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 és 50 mg/l koncentrációkban alkalmazták. A 2-TU 25 mg/l-es koncentrációja 15% vírusmentes növényt eredményezett. Ennél magasabb koncentrációt alkalmazva csaknem az összes kezelt hajtás elpusztult. A 20 mg/l-es koncentrációt alkalmazva csaknem az összes kezelt hajtás túlélte a kezelést, de a vírusmentes egyedek aránya csekély, mindössze 5% volt.

Ram et al. (2005) Chrysanthemum B carlavirus (CVB) fertőzött *in vitro* *Chrysanthemum morifolium* növényekkel dolgoztak. A 2-TU-t 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 és 40 mg/l koncentrációban adták a gyökereztető táptalajhoz. Az elvégzett RT-PCR tesztek alapján a 40 mg/l-es 2-TU bizonyult a leghatásosabbnak, ugyanis a regenerált növények 26,7%-a vírusmentes lett.

Asghar et al. (2007) 'Kinnnow' nagy hozamú mandarin növényeknél használták a 2-TU-t az ICRSV eliminálására 5, 10, 15, 20 és 25 mg/l koncentrációkban. A kezelések után 0,5-0,9 mm-es nagyságú hajtáscsúcsokat választottak le az *in vitro* növényekről és mikrooltással *Citrus jambhiri* citromra oltották azokat. A fejlődő hajtások levelét ezután RT-PCR-rel tesztelték és azt találták, hogy a 25 mg/l 2-TU 21,7% vírusmentes egyedet eredményezett. Megfigyeléseik alapján a 15 mg/l alatti koncentrációknak nem volt kimutatható vírusmentesítési hatása. Az általuk kipróbált több vegyszer (ribavirin, acikloguanozin, zidovudin, 2-TU) közül a 2-TU bizonyult a legfitotoxikusabbnak, ugyanis a 25 mg/l-es koncentrációt a hajtások 19,4%-a élte csak túl, majd az oltások 12,5%-a volt csak sikeres.

Jakab-Ilyefalvi et al. (2012) PPV fertőzött szilva növényekkel dolgoztak. Ők 25 és 35 mg/l koncentrációban alkalmazták a 2-TU-t. A kezelések során erős fitotoxicitás mutatkozott, valamint klorózis és csökkent hajtásnövekedés is megfigyelhető volt. Összesen 4 vírusmentes növényt sikerült regenerálniuk. Javaslataik alapján a fitotoxicitást is figyelembe véve a 10-25 mg/l közötti koncentrációk vírusmentesítésre történő alkalmazása lehet optimális.

Singh (2015) burgonyából próbálta eliminálni a PLRV-t 2-TU alkalmazásával. A 15 mg/l-es koncentráció alatt nem figyelt meg vírusmentesítési hatást, viszont a 30 mg/l-es koncentráció esetében már csak a hajtások 10%-a regenerálódott. A legjobb eredményt a 25 mg/l-es koncentrációt alkalmazva érte el, ahol a hajtások harmada még regenerálódott és a regenerálódott hajtások 38%-a az RT-PCR vizsgálatok alapján vírusmentesnek is bizonyult.

A 2-TU vírusmentesítési hatásán kívül egyes kutatók a vegyszer viroidmentesítési hatását is vizsgálták. Mahfouze et al. (2010) burgonya orsógumó viroid (potato spindle tuber viroid - PSTV) fertőzött 'Diamond' burgonyanövényekkel dolgoztak. A kemoterápiás kezelésekhez 2-TU-t használtak 10, 20, 30, 40 és 50 mg/l-es koncentrációban. Azt találták, hogy a koncentráció emelésével fokozatosan nőtt a PSTV-mentes növények száma, de a túlélési arányuk csökkent. A 10 mg/l 2-thiouracil kezelést a növények 63,3%-a élte túl és a regenerált növények fele PSTV-mentes lett. Az 50 mg/l-es koncentráción már csak nagyjából harmad annyi növény (25,3%) élte túl, de azok 85,7%-a volt mentes a viroidtól.

Látható tehát, hogy az antivirális szerek számos esetben hatásosak a szőlővírusok elleni küzdelemben, de a virális nukleinsavak szintézisének gátlása mellett sok esetben sajnos gazda eredetű, pl. mRNS molekulák is érintettek, ami a növény fejlődését gátolhatja és szélsőséges esetben annak pusztulását is eredményezheti. A fitotoxicitást számos publikációban meg is jelölték, mint a vírusmentesítési folyamatot gátló tényezőt (Asghar et al. 2007; Guta et al. 2014; Singh 2015). Ahogy Guta & Buciumeanu (2021) is már leírták, a regenerált vírusmentes egyedek száma függ az egyes genotípusok regenerációs potenciáljától és a kezelés alatt mutatott toleranciájától, valamint a használt antivirális szerek fitotoxikus hatásaitól is.

A fent részletezett vírusmentesítési eljárások szerves részét képezi rutinszerű vírusdiagnosztika is, ennek megfelelően a különböző szövettenyésztési technikákkal regenerált növényegedek vírusmentességét ellenőrizni szükséges. Erre a célra az RT-PCR széleskörűen elterjedt módszer. Megbízható működéséhez azonban megfelelő referenciagének is szükségesek, amelyet a következő részben tárgyalok.

### 3.6. Háztartási gének gének

A háztartási gének konstitutívan expresszálnak, hogy a normál sejtfunkciókat fenntartsák. Mint olyanok, feltételezhetően a normál sejtfiziológia fenntartásához szükséges, lehető legkisebb mennyiségű transzkriptumot állítják elő (Butte et al. 2001). Mivel ezek a gének a normál sejtműködés fenntartásában résztvevő gének közé tartoznak, így elvárnánk, hogy konstans módon expresszáljanak az összes sejtben a különböző fejlettségi stádiumokban, eltérő sejtciklus fázisokban vagy szövetekben. Ezek a gének a különböző biotechnológiai és genomikai vizsgálatok során referenciagénként fontos kalibrációs szerepet tölthetnek be (Eisenberg & Levanon 2013).

Egy háztartási génnek számos kritériumnak kell megfelelnie, hogy referenciagénként is használható legyen. Egy ideális referencia gén viszonylag függetlenül expresszál a vizsgált kísérleti körülményektől és ennek általában kevés gén tesz eleget. Éppen ezért a megfelelő referenciagén kiválasztásánál az aktuális kísérleti körülményeket kell figyelembe venni (Gu et al. 2011). Sok publikációban leírták már, hogy egyes, tökéletesnek tűnő referenciagén-jelöltek expressziója eltér a különböző kísérleti körülmények között. Mi több ugyanazon organizmus eltérő szöveteiben sem mindig egyforma a génexpresszió szintje. Ez problémát okozhat, ugyanis számos protokoll szerint végezhető el egy kísérlet és nem mindig ugyanazokkal a tényezőkkel kell számolni.

A szakirodalomban leginkább használatos konvencionális növényi referenciagének a *18S rRNS* (18S riboszómális RNS), a *GAPDH* (gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), az *EF1 $\alpha$*  (elongációs faktor-1 alfa/elongation factor-1 alpha), az *UBQ* (ubiquitin), az *ACT* (aktin/actin) és a *TUB* (tubulin). Habár ezeket a konvencionálisnak mondott referenciagéneket rendkívül nagyszámú tanulmány említi, mégis nagymértékű expressziós variabilitást mutatnak eltérő növényfajok esetében (Song et al. 2021).

#### 3.6.1. Konvencionálisan referenciagénként használt növényi háztartási gének

A vírusmentesítési folyamat sikerességének ellenőrzésére széles körben alkalmazzák az RT-PCR módszert. Számos referenciagént elterjedten alkalmaznak belső kontrollként, hogy az izolált nukleinsav minőségéről és a cDNS szintézis sikerességéről megbizonyosodjanak. A nemzetközi publikációkban már sok ilyen génre specifikus primert írtak le, amelyek megbízhatóan működtek különböző kísérleti körülmények között.

A szőlő esetében ilyen konvencionális referenciagének pl. a Gambino & Gribaudo (2006) által használt *18S rRNS*, a Jelly et al. (2012) által használt *aktin* vagy a Reid et al. (2006) által használt *EF1α*, *GAPDH* és *tubulin* gének.

#### **3.6.1.1. A *18S rRNS*, mint referenciagén**

A 18S riboszómális RNS az eukarióta riboszóma 40S alegységének aktív centrumát adja a fehérjeszintézis során és az eukarióta sejt egyik legalapvetőbb komponense az (Uddin & Cheng 2015).

Du et al. (2006) *Solanum tuberosum* növényekből próbált kimutatni 5 vírust. Az eredmények normalizálásához 2 referenciagént használt. Az egyik a *18S rRNS* gén volt, a másik a *NAD2* mRNS gén. A kísérlet során azt találta, hogy a *18S rRNS* nagyjából ötszörös nagyságrenddel érzékenyebben volt kimutatható az RT-PCR-ek során és hasonló degradációs kinetikát mutatott a vizsgált vírusokkal. A génre specifikus primert sikeresen alkalmazta a vírusok kimutatása során hagyományos és különböző vírus kombinációkkal történő multiplex RT-PCR reakciókban is.

Gambino et al. (2008) eltérő nukleinsav izolálási módszereket alkalmaztak, több különböző szőlő szövettípusból (*in vitro* növény, szabadföldi hánckaparek és szabadföldi levél). A cetil-trimetil-ammonium-bromid (cetyltrimethylammonium bromide - CTAB) alapú protokollok és az RNeasy (Qiagen) protokollok alapján végzett nukleinsav kivonást követően az összes mintából amplifikálni tudták a *18S rRNS* fragmentumot a cDNS szintézist követő PCR-rel.

Osman et al. (2008) különböző szőlő vírusokkal fertőzött növényeken vizsgálták az RT-PCR, a RT-qPCR és az LDA (low density array) módszerek víruskimutatási hatékonyságát. Különböző nukleinsav kivonási protokollokat alkalmaztak. A különböző országokból származó, eltérő fajták hánckaparek és levél mintáiból kinyert nukleinsav tisztaságát a *18S rRNS* génre specifikus primerekkel ellenőrizték. A belső kontrollként alkalmazott *18S rRNS* használatával megállapították, hogy a hánckaparek minták sokkal konzisztensebb eredményt hoznak.

#### **3.6.1.2. Az *EF1α*, mint referenciagén**

Az *EF1α* gén által kódolt fehérjeje minden fejlődő szövettípusban nagy mennyiségben jelen van, ezért alkalmas háztartási gén lehet. Az *EF1α* enzim fontos szerepet játszik a fehérjék bioszintézisének folyamatában. Ez a fehérje katalizálja az aminoacil-tRNS-ek kötődését a riboszómák A- (aminoacil) helyeire egy GTP-függő mechanizmuson keresztül, ezáltal elősegítve a szintetizálódó fehérjeláncok bővülését.

Ezen kívül számos más funkciót is társítanak ennek a fehérjének: szignáltranszdukció, nukleáris fehérjék transzportja, mitokondriális tRNS-ek importja. A fehérje kapcsolatban áll továbbá az aktinnal, tubulinnal, ubiquitinnel és a kalmodulinnal is (Suhandono et al. 2014).

Wei et al. (2021) 9 referenciagént vizsgáltak 7 szőlőfajta 3 szövettípusában (bogyó, levél, kacs) qRT-PCR-rel és azt találták, hogy az *EF1α* kiemelkedő referenciagén volt a levél és kacs eredetű minták tesztelésekor, ám javaslataik alapján legalább két referenciagén alkalmazásával kaphatunk megbízható eredményt.

Monteiro et al. (2013) a peronoszpóra kórokozója, a *Plasmopara viticola* és több szőlő genotípus közti kölcsönhatást vizsgálták qPCR-rel. A kutatók 11 referenciagén segítségével végezték el a rezisztenciagének expressziójának vizsgálatát a fertőzést követő 6-24 órában. A kísérlet végén az találták, hogy az ő kísérleti körülményeik között az *EF1α* kiemelkedő referenciagén.

Han et al. (2012) 11 referenciagént vizsgáltak 4 tungfa fajta különböző szöveteiben és eltérő fejlettségi stádiumban lévő tungfa magokon RT-qPCR segítségével. Három különböző elemzőprogram eredményeit összevetve azt találták, hogy az *EF1α* volt a legstabilabb háztartási gén.

### **3.6.1.3. Az aktin, mint referenciagén**

Az aktin termeléséért a növényekben nem egyetlen gén, hanem egy gén család felelős. A növényi *aktin* gének vizsgálatából kiderült, hogy valószínűleg mind egy ősi génből származnak még jóval azelőttől, hogy az egyszikű és kétszikű növények evolúciósan elkülönültek volna (Hightower & Meagher 1986). Alapvetően a növényi citoszkeleton felépítésében vesznek részt. A magasabb rendű növényekben 6-11 aktin gén található, de lehetnek pszeudogének is, amelyekről nem képződik funkcionális fehérje. Szőlő esetében 6 *aktin* gén van. (Šljachčerová et al. 2012).

Mivel az *aktin* gének expressziója folyamatos, így jól működnek referenciagénként is, amit a következő publikációk is alátámasztanak: Reid et al. (2006) 15 különböző potenciális referenciagén jelöltet vizsgáltak szőlőbogyó eredetű mintákon. Azt találták, hogy az ő kísérleti körülményeik között az *aktin* gén volt az egyik legmegbízhatóbb referenciagén. Jelly et al. (2012) az *aktin* génre specifikus primerek segítségével ellenőrizték a szomatikus embrió eredetű szövetekből kivont RNS alapján szintetizált cDNS meglétét.

Egyes kutatók referenciagénként használták az *aktin* gént különböző kórokozókkal fertőzött szőlőnövényekkel végzett kísérletek során is: Selim et al. (2012) üvegházi ‘Olasz rizling’ szőlőnövényeket fertőztek a *Plasmopara viticola*

kórokozóval és vizsgálták a kórokozó ellen különböző védelmi mechanizmust indukáló szereiket. Azt találták, hogy az *aktin* gén a négy legstabilabban működő referenciagén között volt. Katoh et al. (2009) egy a GVA fertőzés hatására indukálódó fehérje expresszióját vizsgálták szabadföldi ‘Koshu’ szőlőfajta különböző szöveteiben (levél, virág, bogyó, héj) és merisztéma eredetű növényeikben. A kísérletben az *aktin* megfelelő referenciagénnek bizonyult a vírusfertőzött és a vizsgált vírusoktól mentes növények esetében is. Song et al. (2021) GLRaV-3 fertőzött szabadföldi ‘Cabernet franc’ fajta levél-, és bogyómintái esetében szintén sikerrel alkalmazták az *aktint* referenciagénként.

#### 3.6.1.4. *A tubulin*, mint referenciagén

A *tubulin* gének által kódolt tubulin fehérje egy  $\alpha/\beta$  heterodimer. Ezek az erősen konzervált heterodimerek mikrotubulusokká állnak össze és számos sejtfunciót látnak el, például a sejtintegritás fenntartása, transzport útvonalak létrehozása és a sejtosztódás során bekövetkező mozgások elősegítése (Binarová & Tuszyński 2019.).

Gu et al. (2011) üvegházi 6-8 leveles fejlettségi stádiumban lévő krizantém növényeket fertőztek levéltetvekkkel, majd ezt követően több referenciagén expressziós mintázatát vizsgálták RT-qPCR alkalmazásával a kezelés után 0, 1, 3, 5 és 7 nappal a növények hajtáscsúcsában. Azt találták, hogy az ilyen kísérleti körülmények között a *tubulin* volt a legstabilabban expresszálo referenciagén-jelölt. A kísérlet során választott egyéb, abiotikus stresszhatások (hő és szárazság) során azonban ez a gén kevésbé jól teljesített, mivel változatos expressziós mintázatot mutatott.

Coker & Davies (2003) 27 burgonya cDNS könyvtárban vizsgálták több háztartási gén expresszióját. Azt találták, hogy az  $\alpha$ -*tubulin* gén stabil expressziós mintázatot mutatott ugyanazon növény leveléből, gyökeréből, gyümölcséből és virágzatából is. Később más kutatók kimutatták, hogy különböző fejlettségi stádiumban lévő szövetekben viszont instabilan működik (Expósito-Rodríguez et al. 2008).

Reid et al. (2006) ‘Cabernet sauvignon’ szőlőfajtán vizsgálták 15 referencia gén expressziós szintjét a különböző fejlettségi stádiumban lévő szőlőbogyókban. A géneket három eltérő vizsgálati módszerrel rangsorolták. Azt találták, hogy az  $\alpha$ -*tubulin* stabilabban expresszált mindkét évben, mint a  $\beta$ -*tubulin*, amely a második évben a legkevesbé hatékony referenciagénnek bizonyult ebben a szövettípusban.

### 3.6.1.5. A *GAPDH*, mint referenciagén

A glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*GAPDH*) fehérjének kiemelt szerepe van a citoplazmában folyó anaerob glikolízis során, ahol segíti az adenosin trifoszfát (adenosine triphosphate - ATP) és a piruvát előállítását, de újabb kutatások szerint a sejtosztódásban, a sejtek túlélésében és az apoptózisban is részt vesz. A glikolízis során a *GAPDH* egy kulcsenzim, amely katalizálja a glicerinaldehid-3-foszfát (G3P) 1,3-bifoszfogliceráttá történő átalakulását nikotinamid-adenin-dinukleotid (nicotinamide adenine dinucleotide - NAD<sup>+</sup>) és szervetlen foszfátok jelenlétében. Mindemelett a *GAPDH*-t számos génexpressziós és fehérje tanulmányban használták már belső kontrollként (Nicholls et al. 2012).

Pacifico et al. (2011) különböző vírusokkal (GFkV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GVA) fertőzött szabadföldi szőlőnövényekben határozták meg a vírusok mennyiségét RT-qPCR segítségével. A vírusok mennyiségét a *GAPDH* háztartási gén koncentrációjához viszonyították. Három 'Nebbiolo' klónnal dolgoztak két kísérleti ültetvényből. A *GAPDH* génre használt primerek minden klón esetében amplifikálták a kívánt génszakaszt és segítségével sikeresen számszerűsíteni tudták a vizsgált vírusok mennyiségét is.

Jiao et al. (2017) a *VqMAPKKK38* gén sztilbén akkumulációban betöltött szerepét vizsgálták szőlőben különböző szöveti eredetű (fiatal levél, idős levél, fás szár, virágzat, éretlen és érett bogyó) mintákon. Az vizsgálathoz belső kontrollként a *GAPDH* gént használták, amely minden vizsgált szövettípusban helyt állt és segítségével lehetővé vált a vizsgált gén relatív expressziós szintjének meghatározása is.

Banilas et al. (2011) hő- és szárazságstressznek kitett szőlőnövények különböző szöveteiből (apikális merisztéma, fiatal és öreg levél, gyökér, kacs) származó mintákban is sikeresen alkalmazták a *GAPDH* gént belső kontrollként.

Habár ezek a primerek hatékonyan amplifikálják a célszekvenciákat számos szőlő genotípusból, a cDNS szintézis sikerét csak akkor bizonyítják, amennyiben a kivont nukleinsav gDNS mentes volt, mivel ugyanakkora fragmentumot produkálnak a genomi DNS-ből és a cDNS-ből is. Ez a probléma DNázok alkalmazásával kiküszöbölhető lehet, de a folyamat igen költséges (Oláh et al. 2017). A gyors víruseszteszteléshez nem szükséges tiszta (gDNS-mentes) RNS izolálása, viszont ilyenkor a cDNS szintézis ellenőrzése során a gDNS és cDNS eredetű PCR termékeknek eltérő hosszúságúnak kell lenniük.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. Felhasznált növényanyagok

#### 4.1.1. A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyészetekkel kapcsolatos kísérletek növényanyaga

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

#### 4.1.2. Kemoterápiás kísérletekhez felhasznált növényanyag

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

#### 4.1.3. Referenciagénekkel kapcsolatos kísérletek növényanyaga

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

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

#### **4.1.4. Az *in vitro* kultúrák létrehozása**

A folyamatot a begyűjtött fajták fás vesszőinek melegvizes kezelésével kezdtem, amely 51 °C-on 30 percig tartott. Ezt követően a vesszőket feldaraboltam és egyrügyes dugványokat készítettem belőlük. Ezeket gyökeresedés céljából perlittel töltött műanyag poharakba dugványoztam és csapvízzel öntöztem őket. A rügyekből fejlődő zöld hajtásokat leválasztottam és 70%-os etil-alkohol oldatban történő 30 másodperces öblítést követően 8 percig nátrium-hippoklorit tartalmú vizes oldatban (1% NaOCl és 0,1% Tween 20) fürdetttem, majd háromszor steril desztillált vízben lemostam azokat. Ezek után a hajtásokról szabad szemmel nagyjából 0,5 cm nagyságú hajtáscsúcsokat preparáltam és növényi növekedésszabályozók (metatopolin - mT vagy BA) segítségével szárnövekedést indukáltam fél-MS mennyiségű makroelemet tartalmazó MS táptalajon (Murashige & Skoog 1962). A hajtásokat növekedésüket követően hormonmentes MS táptalajra helyeztem gyökeresedés céljából. A növekvő, immáron gyökeres növények hajtáscsúcsát felhasználva gyarapítottam az egyedszámot. Az *in vitro* növények fenntartása fényszobai körülmények között 25 °C-on történt folyamatos, havi rendszerességű mikroszaporítás kíséretében.

#### **4.2. Kísérletek intront tartalmazó génszakaszra specifikus referenciagén primerekkel**

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

Ezután 4 további, intront tartalmazó referenciagénszakaszra specifikus primer párt (*aktin*, *EF1α*, *GAPDH*, *tubulin*) teszteltem ugyanezen 24 szőlőfajtán. Ezt követően a jó eredményt produkáló primer párokat különböző szőlő szövettípusokon (*in vitro* levél, szabadföldi levél és levélnyél, hánckaparak) teszteltem 12 mintát felhasználva.

Végezetül a 3 legígéretesebb primer párt vírusokra (GFkV, GLRaV-1, GRSPaV) specifikus primer párokkal teszteltem multiplex PCR reakciók során.

### 4.3. Alkalmazott vírusmentesítési módszerek

#### 4.3.1. Merisztéma kultúrák

Merisztéma kultúrák létrehozásához az *in vitro* növények 2-3 cm-es hajtáscsúcsát választottam le és felhasználásukig folyékony Gamborg B5 táptalajba helyeztem azokat. Ezt követően mikroszkóp használatával sebészi csipesz, tű és penge segítségével 0,1-0,5 mm-es mérettartományba eső merisztémákat preparáltam ki. A merisztémákat Petri-csészében lévő 30 g/l szacharózt és 1 mg/l mT-t tartalmazó fél mennyiségű makroelemet tartalmazó MS (fél-MS) táptalajra helyeztem. A Petri-csészéket alufóliába csomagoltam és a merisztémákat 3 napig sötétben tartottam, amely a szárnövekedést segítette elő a levélnövekedéssel szemben (Suzuki & Kerbauy 2006). A növekvő, de még gyökérrel nem rendelkező hajtásokat ugyanolyan összetételű, de már csak 0,2 mg/l mT-t tartalmazó fél-MS táptalajra helyeztem át, hogy a gyökeresedés megindulhasson. Ezt követően a gyökeresedő, független növényvonalakat hormonmentes 10 g/l szacharózt tartalmazó fél-MS táptalajra helyeztem és szaporítottam. Az elégtelen növekedést vagy klorózist produkáló hajtásokat kondíciójuk javításának érdekében 1 g/l aktív szén tartalmazó MSAc táptalajra helyeztem (Oláh 2017).

#### 4.3.2. Szomatikus embriogenezis

A szomatikus embriogenezis kivitelezése az Oláh et al. (2009) által leírt módon történt. A kísérletben részt vevő négy szabadföldi anyanövény virágzatait a virágnylást megelőzően, lehetőség szerint a Gribaudo et al. (2004) által leírt ötödik portokfejlettségi stádiumban gyűjtöttük be. Ezután a virágzatokat felületileg sterilizáltuk a korábban már az *in vitro* kultúrák létrehozásánál leírt módon. A virágzatokat ezt követően felnyitottuk és a portokszállal kapcsolt portokokat szilárd, kalluszindukciós MST táptalajra helyeztük, amely 0,05 mg/l thidiazuront (TDZ), 1,1 mg/l 2,4-D-t, 20 g/l szacharózt és szilárdító ágensként 5 g/l agart tartalmazott. A portok kultúrákat ezek után 24 °C-on, sötétben inkubáltuk. Később, az embriogén jelleget mutató kalluszokat átraktuk 1 g/l aktív szén tartalmazó MSAc táptalajra, amely már csak 10 g/l szacharózt és 3 g/l gelritet tartalmazott. Végül a képződő embriókból regenerálódó független hajtásokat egyenként, ugyanezen MS táptalajra helyeztük és szaporítottuk.

#### 4.3.3. Növényi kemoterápia

Az antivirális szerekkel történő kemoterápiás kezelésekhez kb. 2 cm nagyságú *in vitro* hajtáscsúcsokat (gyökér nélküli vagy előgyökereztetett) helyeztem az egyes

vegyszereket (ribavirin, zidovudin, 2-thiouracil) meghatározott koncentrációban tartalmazó, szilárd fél-MS táptalajra (1. táblázat). Fajtától függően 4-16 hét után a kezeléseket túlélő növényekről 2 mm-es hajtáscsúcsokat választottam le és 0,02 mg/l benzil-adenint (BA) és 0,01 mg/l naftil-ecetsavat (NAA) tartalmazó fél-MS táptalajra (30 g/l szacharóz) helyeztem őket. A gyökeresedő hajtásokat végül hormonmentes fél-MS táptalajon neveltem tovább. A növekvő, de önállóan nem gyökeresedő hajtásokat két hét hormonmentes fenntartást követően 0,8 mg/l IBA-t (indol-3-butyric acid/indol-3-vajsav - IVS) tartalmazó fél-MS (10 g/l szacharóz) táptalajra helyeztem a gyökeresedés elősegítése végett.

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

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

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

A ribavirinnel történő szülő vírusmentesítéssel kapcsolatos publikációk feldolgozásának eredményeként a 25 mg/l koncentrációt választottam az első kísérlethez. Itt GRSPaV és GPGV fertőzött ‘Sárfehér’ növények hajtásait kezeltem és vizsgáltam a kiindulási növények 2 mm-es hajtáscsúcsának, a kezelt növények 2 mm-es és 5 mm-es hajtáscsúcsának, majd a 2 mm-es hajtáscsúcsokból regenerált növények levelének vírusfertőzöttségét.

A ‘Sárfehér’ fajtával végzett kísérlet eredményeit kielemezve négy további, különböző vírusokkal fertőzött genotípuson végeztem ribavirin kezeléseket. Ezek a ‘Furmint’ P51 A1, a ‘Furmint’ P51 ÜH2, a ‘Kadarka’ P131 A1 és a ‘Sárfehér’ A1

voltak. Ezekben a kísérletekben már nagyobb egyedszámmal dolgoztam, hogy az eredmények reprezentatívabbak legyenek, valamint vizsgáltam a kezelt hajtások túlélési arányát és a leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerálódási arányát is.

Mivel a zidovudin szőlő vírusmentesítésére való használatáról korábban nem publikáltak, így egy tágabb koncentrációs intervallumban kezdtem meg a kísérleteket, először a 'Sárféher' A1 genotípuson. A szert 10, 20, 30, 40, 80 és 120 mg/l-es koncentrációban alkalmaztam ezen a fajtán. Ezt követően a 'Kadarka' P131 A1 genotípuson is végeztem egy kísérletet 50 mg/l zidovudin koncentrációval. A zidovudin vírusmentesítési hatását minden kísérletben a kezelt növényekről 1, 2 és 3 hónap után leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsokból növekvő 3-4 cm-es növénykékké levélmintáit felhasználva vizsgáltam RT-PCR-rel.

A 'Furmint' P51 A1 és a 'Furmint' P51 ÜH2 genotípuson vizsgáltam a 25 mg/l ribavirin és az 50 mg/l zidovudin kombinációjának vírusmentesítési hatását, amellyel párhuzamosan kizárólag 25 mg/l ribavirinnel is kezeltem ugyanakkora mennyiségű hajtást. Ennek köszönhetően vizsgálhattam, hogy a zidovudin hozzáadása befolyásolja-e a regenerált vírusmentes egyedek mennyiségét.

A 2-thiouracillal történő szőlő vírus eliminálásról szintén nem találtam korábbi publikációt, de más növényeken végzett kísérletek jó kiindulási alapot nyújtottak. Más kutatók leírása alapján a vegyszer erős toxicitást mutatott alacsonyabb koncentrációkban alkalmazva is, ezért a 'Sárféher' A1 genotípuson végzett kísérleteket 5, 10, 15 és 20 mg/l-es koncentrációval kezdtem meg. Itt előgyökereztetési folyamaton át nem esett hajtásokkal dolgoztam és azt vizsgáltam, hogy a hajtások mekkora arányban élik túl a vegyszerrel történő kezelést és növekednek-e annyit, hogy 2 mm-es hajtáscsúcs leválasztása már indokolt legyen.

A következő kísérletben 10 mg/l 2-TU-lal kezeltem 0,8 mg/l IBA-t tartalmazó táptalajon előgyökereztetett 'Sárféher' A1 és 'Kadarka' P131 A1 hajtásokat. Az első gyökérnyúlványok megjelenésekor áthelyeztem a hajtásokat a 2-TU-t tartalmazó táptalajokra. Ezzel párhuzamosan ugyanezt tettem előgyökereztetésen át nem esett hajtásokkal is.

A következő kísérletben a 'Sárféher' A1 hajtásokat kezeltem 20 mg/l 2-TU-lal. A hajtások egyik felét a kezelést megelőzően 0,8 mg/l IBA tartalmú táptalajon előgyökereztettem, másik felén nem alkalmaztam előgyökereztetést.

A 'Furmint' P51 ÜH2 genotípuson is végeztem kísérleteket 20 mg/l 2-TU-t tartalmazó táptalajon. A kezelni kívánt hajtásokat 0,8 mg/l IBA-t tartalmazó táptalajon előgyökereztettem, majd helyeztem a kísérleti táptalajra.

A 2-TU vírusmentesítési hatását minden kísérletben a kezelt növényekről 1 és 2 hónap után leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsokból növekvő 2-4 cm-es növénykéek levélmintáit felhasználva vizsgáltam RT-PCR-rel.

#### **4.4. Nukleinsav-izolálás**

##### **4.4.1. Nukleinsav izolálás növényi mintákból**

Nukleinsav izoláláshoz a Xu et al. (2004) által leírt CTAB alapú módszert használtuk. Ennek a módszernek az egyik kulcs eleme, hogy a kloroformos kicsapás savas K-acetát jelenlétében zajlik, melynek következtében további szennyeződések eltávolítására vagyunk képesek.

A növényi nukleinsav kivonáshoz használt oldatok:

1. Lízis puffer:

- 100 mM Tris-bázis (pH 8.0)
- 50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav)
- 1,5 M NaCl
- 2% vízzoldható PVP (polivinil-pirrolidon)
- 4% β-merkaptóetanol
- 3% CTAB

A PVP-t a felhasználás előtti nap végén, a β-merkaptóetanol pedig közvetlenül a felhasználás előtt mértem az elkészített és sterilizált oldathoz.

2. Kloroform:izoamil-alkohol oldat (24:1)

3. 5M K-acetát oldat (pH 4,8)

4. 3M Na-acetát oldat

5. Izopropanol

6. 70%-os etanol oldat

7. Steril desztillált víz

Első lépésként a szabadföldi növények leveléből vagy levélnyeléből, illetve az *in vitro* növények leveléből 50-50 mg tömegű szövetmintát vettem, melyeket 2 ml végtérfogató centrifugacsövekbe helyeztem. A szabadföldi növények hánckaparek mintáinak elkészítését a vessző külső, fás kérgének eltávolításával kezdtem. A felhasználni kívánt kambium rész eléréséhez a külső réteget folyamatosan, pengék segítségével távolítottam el a vesszők felszínéről. Ezt követően a penge élét merőlegesen tartva a vesszőhöz, annak folyamatos dörzsölésével jutottam hozzá a

szükséges háncskaparékhhoz, amit szintén 2 ml végtérfogatú centrifugacsövekbe helyeztem.

A mintákat ezt követően folyékony nitrogénbe helyeztem. Ezután gázlámban sterilizált üvegbotok segítségével a fagyott szöveteket apró szemcséjűvé zúztam. A feldolgozott mintákra 1 ml térfogatú lízis puffert mértem, majd alapos forgatás után a centrifugacsöveket 65 °C-os vízfürdőbe helyeztem 30 percre, ahol többszöri keverés mellett inkubáltam azokat.

A mintákhoz ezután 100 µl K-acetátot, majd 800 µl kloroform:izoamil-alkohol oldatot mértem és intenzív rázással tejfehér színűvé ráztam azokat a centrifugacsövekben és 5 percig, 8000 rpm-en (round per minute/percenkénti fordulatszám) centrifugáltam őket. A centrifugálás után a minták két fázisra különültek el. Az alsó fázisban a fehérjék, lipidek és egyéb sejtalkotók helyezkedtek el, míg a nukleinsav a felső, vizes fázisban volt, így azt óvatosan egy új 2 ml-es centrifugacsőbe mértem át. Ezt a folyamatot egyszer megismétltem, hogy az esetlegesen hátra maradt szennyeződésektől megszabaduljak, majd a keletkező felülúszót ismét egy új, immáron 1,5 ml végtérfogatú centrifugacsőbe mértem át.

A mintákra ezután 80 µl Na-acetát oldatot és 1 térfogatnyi (nagyjából 750 µl) izopropanolt mértem a nukleinsav kicsapása érdekében. A csövekben lévő oldatot finom mozdítással összekevertem, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubálódtak. Az idő letelte után a mintákat 13.000 rpm-en 10 percig centrifugáltam. A nagy fordulatszám következtében a nukleinsav pellet formájában a cső aljára csapódott ki, míg a többi komponens a folyadékfázisban maradt. A folyékony fázis óvatos leöntése után, a nukleinsavat kétszer teljes térfogatú (nagyjából 1,5 ml) 70%-os etanollal mostam át, a hátramaradt szennyeződések eltávolítása végett.

A mosás után a maradék etanolt centrifugálás segítségével a cső aljára gyűjtöttem és óvatos pipetázással eltávolítottam. A megmaradó, tiszta nukleinsavat végül 100 µl steril desztillált vízben feloldottam, majd felhasználásig -80 °C-on tároltam.

#### **4.4.2. Nukleinsav-izolálás baktérium mintákból**

A fiatal baktériumtenyészetekből (1-2 napos) történő nukleinsav kivonáshoz platinakacsral 0,2-0,5 mg baktériumot szuszpendáltam 200 µl steril desztillált vízben 1,5 ml-es centrifugacsövekben. Ezt követően 200 µl 2X (kétszeres töménységű) Tritonos puffert pipetáztam a mintákra, ami 4,0% Triton X-100-at és 0,5% nátrium-azid-ot tartalmazott 0,1 M Tris HCl (pH 8,0) oldatban, majd enyhén megkevertem

azokat. A keverés után a baktérium mintákat 10 percre 95 °C-os vízfürdőbe helyeztem lizálás céljából. Végezetül a lizátumot centrifugáltam és a felülúszót felhasználásig - 20 °C-on tároltam (Abolmaaty et al. 2000). A PCR-hez 1 µl felülúszót használtam templátként.

#### 4.5. cDNS szintézis

A cDNS szintézist a RevertAid First cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K1622) segítségével kiviteleztem. A reakcióelegyet a mellékelt protokoll alapján mértem össze (2. táblázat).

*2. táblázat: A cDNS szintézishez felhasznált oldatok és mennyiségük*

| Komponens                                                  | Térfogat (µl)/minta |
|------------------------------------------------------------|---------------------|
| Nukleáz-mentes víz                                         | 4,5                 |
| 5X reakció puffer                                          | 2                   |
| dNTP (10 mM)                                               | 1                   |
| Random hexamer / oligo(dT) <sub>18</sub> primer (100 µmol) | 0,5                 |
| RNáz inhibitor (20 unit/µl)                                | 0,5                 |
| RevertAid RT (200 unit/µl)                                 | 0,5                 |
| Templát nukleinsav                                         | 1                   |
| Végtérfogat                                                | 10                  |

A templát nukleinsavat még nem tartalmazó oldatot összemértem egy 500 µl végtérfogatú centrifugacsőbe, majd abból mintaszámnak megfelelően 9-9 µl-t mértem ki 200 µl-es reakciócsövekbe. Az oldathoz hozzáadtam 1-1 µl nukleinsavat, majd a mintákat a PCR készülékbe helyeztem, ahol a megfelelő hőmérsékleteken, megfelelő időtartamig inkubálódtak (3. táblázat).

*3. táblázat: A cDNS szintézis programja*

| Folyamat          | Hőmérséklet | Időtartam (perc) |
|-------------------|-------------|------------------|
| Primer kötődés    | 25 °C       | 5:00             |
| cDNS szintézis    | 42 °C       | 60:00            |
| Enzim inaktiváció | 70 °C       | 5:00             |

A reakció első, 25 °C-os lépése csak a random hexamer primerrel történő cDNS szintézis esetén volt szükséges, hogy a kisméretű (6 bázispár nagyságú) primerek kötődni tudjanak a templáthoz, majd kismértékben megkezdődhessen a

láncosszabbítás. Az oligo(dT) primerrel történő szintézis során ez a lépés kihagyható, mivel ott hosszabb (18 bázispár) primereket alkalmaztam.

## 4.6. Felhasznált vírusdiagnosztikai módszerek

### 4.6.1. RT-PCR

A PCR reakciót a DreamTaq DNA Polymerase Kit (Thermo Scientific, #EP0703) felhasználásával végeztem el. A reakcióelegyet a mellékelt leírás alapján mértem össze (4. táblázat).

4. táblázat: Az RT-PCR reakció mix összetevői és térfogatuk

| Komponens                  | Térfogat (μl/minta) |
|----------------------------|---------------------|
| Nukleáz-mentes víz         | 6,4                 |
| 10X DreamTaq puffer        | 1                   |
| dNTP mix (2,5 mM)          | 0,8                 |
| DMSO                       | 0,5                 |
| Forward primer (25 μM)     | 0,1                 |
| Reverse primer (25 μM)     | 0,1                 |
| DreamTaq polimeráz (5U/μl) | 0,1                 |
| cDNS templát               | 1                   |
| Végtérfogat                | 10                  |

Először a reakcióelegyet mértem össze, majd alapos keverés után mintaszámnak megfelelően szétmértem belőle 9-9 μl-t a 200 μl végtérfogatú PCR csövekbe és minden csőbe 1-1 μl cDNS templátot pipettáztam. A vírusmentesítéssel kapcsolatos kísérletekhez már bizonyítottan vírushozott növények cDNS-ét használtam pozitív kontrollnak, míg nullkontrollként steril desztillált vizet adtam a reakcióhoz. Ezután a mintákat a PCR készülékbe helyeztem, ahol a reakció az 5. táblázatban leírt ciklusokon ment végig.

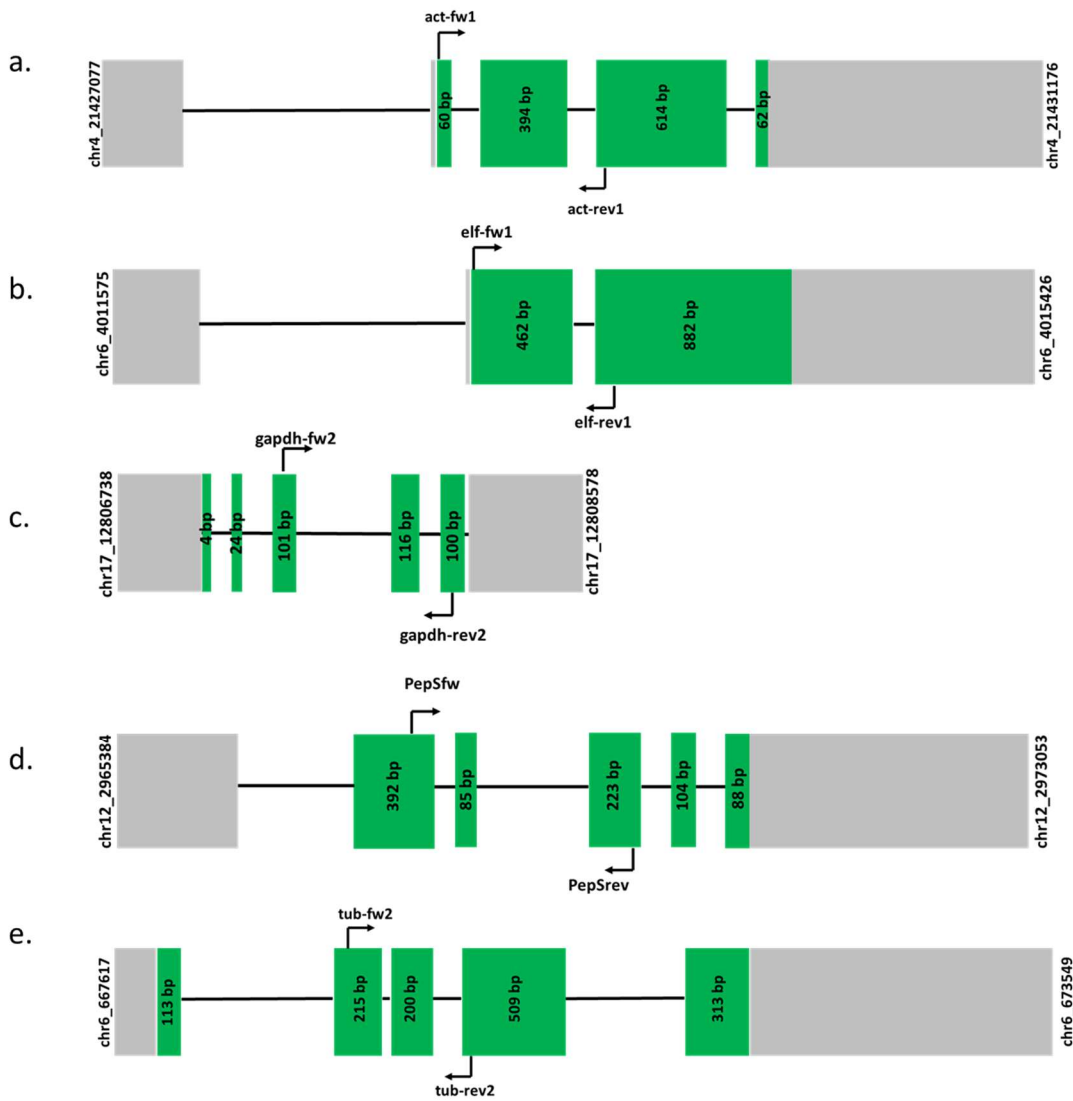
5. táblázat: Az RT-PCR programok lépései és időtartamuk

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

A denaturációtól a lánchosszabításig tartó szakasz 34-szer ismétlődött a folyamat során, így összesen 35 cikluson keresztül történt az amplifikáció. A kísérletek során számos referenciagénre és patogénre specifikus primer párt használtam, amelyek felsorolása a 6. és 7. táblázatban található. Az *aktin*, *EF1 $\alpha$* , a *GAPDH* és a *tubulin* génekre olyan primereket használtunk, amelyek egy vagy két intront tartalmazó génszakaszra specifikusak (1. ábra): Az *aktin* esetében a 4-es kromoszóma kettő intront tartalmazó, az *EF1 $\alpha$*  esetében a 6-os kromoszóma egy intront tartalmazó, a *GAPDH* esetében a 17-es kromoszóma kettő intront tartalmazó, valamint a *tubulin* esetében a 6-os kromoszóma kettő intront tartalmazó régióira.

**6. táblázat:** A kísérletek során felhasznált referenciagén primerek

| Gén                                  | Primer neve  | Szekvencia (5'-3')      | Referencia              |
|--------------------------------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| <b><i>18S rRNS</i></b>               | 18S rRNA_Fw  | CGCATCATTCAAATTTCTGC    | Gambino & Gribaudo 2006 |
|                                      | 18S rRNA_Rev | TTCAGCCTTGCGACCATACT    |                         |
| <b><i>aktin</i></b>                  | act-fw1      | GGCCGATACTGAAGATATCCAG  | Jelen munka             |
|                                      | act-rev1     | ACCAGAATCCAGCACAAATACC  |                         |
| <b><i>EF1<math>\alpha</math></i></b> | elf-fw1      | GGGTAAGGAGAAGGTTTCACATC | Jelen munka             |
|                                      | elf-rev1     | TGCCTTGGAGTACTTTGGTG    |                         |
| <b><i>GAPDH</i></b>                  | gapdh-fw2    | GCAGTCAACGATCCATTCATC   | Jelen munka             |
|                                      | gapdh-rev2   | AGCCTTGTCTTGTCAGTG      |                         |
| <b><i>PEP</i></b>                    | PepS2fw      | GTCCTTACAGCACATCCTACTC  | Jelen munka             |
|                                      | PepS2rev     | CCCACCCATCCAAGAAGAAA    |                         |
| <b><i>tubulin</i></b>                | tub-fw2      | CACGATGCTTTCAACACCTTC   | Jelen munka             |
|                                      | tub-rev2     | CTTCATTGTCCAAGAGCACAG   |                         |



**1. ábra:** Az intront tartalmazó referenciagén-szakaszokra tervezett primerek elhelyezkedése az érintett *Vitis vinifera* kromoszómákon.

Az *aktin* génre specifikus (a.), az *EF1a* génre specifikus (b.), a *GAPDH* génre specifikus (c.), a *PEP* génre (d.) és a *tubulin* génre specifikus (e.) primer párok helyei az érintett kromoszómákon. A zöld mezők a génen belüli exonokat, a fekete vonalak az intronokat jelölik. A szürke mezők a 5' upstream és a 3' downstream szekvenciák, amelyek az érintett szekvenciákon kívül esnek.

7. táblázat: A kísérletek során felhasznált vírus és viroid specifikus primerek

| Név            | Primer neve   | Szekvencia (5'-3')       | Referencia                  |
|----------------|---------------|--------------------------|-----------------------------|
| <b>GFkV</b>    | GFk V1/F      | GGTCCTCGGCCCAGTGAAAAAGTA | Osman et al.<br>2008        |
|                | GFk C1/R      | GGCCAGGTTGTAGTCGGTGTGTC  |                             |
| <b>GFLV</b>    | GFLV CP 433V  | GAAGTGGCAAGCTGTCGTAGAAC  | Osman &<br>Rowhani 2006     |
|                | GFLV CP 912C  | GCTCATGTCTCTCTGACTTTGACC |                             |
| <b>GLRaV-1</b> | LR1CPF1       | CTAGCGTTATATCTCAAAATGA   | Engel et al. 2010           |
|                | LR1CPR1       | CCCATCACTTCAGCACATAAA    |                             |
| <b>GPGV</b>    | GPG-6609F     | GAGATCAACAGTCAGGAGAG     | Glasa et al. 2014           |
|                | GPG-7020R     | GACTTCTGGTGCCTTATCAC     |                             |
| <b>GRSPaV</b>  | 48V           | AGCTGGGATTATAAGGGAGGT    | Lima et al. 2006            |
|                | 49C           | CCAGCCGTTCCACCACTAAT     |                             |
|                | RSPaVFw       | GGGTGGGATGTAGTAACTTTTGA  | Gambino &<br>Gribaudo 2006  |
|                | RSPaVRev      | GCAAGTGAAATGAAAGCATCACT  |                             |
| <b>GRVfV</b>   | GRGVfV-F/3501 | CCTGCTGATCGCTGGAGACTCG   | Czotter et al.<br>2018      |
|                | GRGVfV-R/4914 | CGAAGATTCGCTGGTACTTCTT   |                             |
| <b>GSyV-1</b>  | GVQ-CPF       | TCCCAGCTTCAGGGTGAATT     | Sabanadzovic et<br>al. 2009 |
|                | GVQ-CPR       | GCATTGCTGCGCATTGGAGG     |                             |
| <b>GVA</b>     | GVA 6540U     | TTTGGGTACATCGCGTTGGT     | Nakaune &<br>Nakano 2006    |
|                | GVA 6880D     | TCTAAGCCCGACGCGAAGT      |                             |
| <b>GVT</b>     | GVT 7630F     | GTGTGGTCCTCGTTAGGTGC     | Jelen munka                 |
|                | GTV 8534R     | CGGCAAGAGTTCCAAC TAGC    |                             |
| <b>GYSVd-1</b> | GYSVd-1-F     | TCACCTCGGAAGGCCGCCGCGG   | Czotter et al.<br>2018      |
|                | GYSVd-1-R     | GTGAAACCACAGGAACCACAGG   |                             |
| <b>HSVd</b>    | HSVd-F        | CTGGGGAATTCTCGAGTTGCC    | Farkas et al.<br>2014       |
|                | HSVd-R        | AGGGGCTCAAGAGAGGATCCG    |                             |

#### 4.6.2. kis RNS-ek nagy áteresztőképességű szekvenálása

Ehhez a szekvenálási módszerhez először kis RNS könyvtárakat kellett készítenem. Négy üvegházi anyanövényről ('Furmint' P51 A1, 'Furmint' P51 ÜH2, 'Kadarka' P131 A1, 'Sárfehér' A1), a szabadföldi 'Ottonel muskotály H.7-3' és H.14-1, valamint a 'Szirén' és 'Trilla' növényekről fiatalabb és idősebb leveleket, kacsokat és hajtáscsúcsokat szedtem le, majd nukleinsav kivonást végeztem a Gambino & Gribaudo (2008) által leírt módon. A nukleinsav kivonást követően RNS mintakeverékeket (poolokat) hoztam létre, amelyek minden növény esetében a különböző szöveti eredetű minták keverékét tartalmazták egyforma koncentrációban.

Az RNS poolokat urea tartalmú (8%) poliakrilamid gélen megfuttattam és a kis RNS frakciókat UV-fényben kivágtam. A kivágott frakciókat kitisztítottam: a mintákhoz 6 µl 4 M Na-acetát oldatot, 200 µl abszolút etanolt és 1 µl glikogént (Glycoblue) adtam. A mintákat éjszakára -20 °C-ra helyeztem, majd másnap 60 percig maximális fordulaton 4 °C-on centrifugáltam azokat. A keletkezett (kék) csapadékról leöntöttem az oldatot, majd kétszer átmostam 70%-os etanollal. Ezt követően 5 percig, szintén 4 °C-on centrifugáltam, hogy a maradék alkoholt pipettázással el tudjam távolítani a csövek aljáról. A csapadékot végül szobahőmérsékleten szárítottam és 80 µl ultratiszta Milli-Q (MQ) vízben oldottam.

Az így kapott kis RNS-ekre 3' és 5' adaptereket ligáltam (8. táblázat) A 3' adapter mix összeállításához a kis RNS mintákból 2,5 µl-t és a 3' adapterből 0,5 µl-t egy csőbe mértem, majd 70 °C-on 2 percig PCR gépben denaturáltam és jégre helyeztem. Ezekhez 1 µl ligálási puffert, 0,5 µl RNáz inhibitort és 0,5 µl T4 RNS ligázt mértem. A kapott oldatot 1 órára PCR gépbe helyeztem 28 °C-ra, majd 0,5 µl stop solution-t mértem a mintákhoz és további 15 percre a PCR gépbe helyeztem. Következő lépésben 0,5 µl 5' adaptert 2 percig 70 °C PCR gépben denaturáltam és jégre helyeztem. Ezek után 0,5 µl 10 mM ATP-t és 0,5 µl T4 RNS ligázt mértem hozzá. Szuszpendálás után ezt az oldatot hozzámértem a 3' adapter reakcióhoz és 1 órán keresztül 28 °C-on inkubáltam a ligálás befejezéséhez.

8. táblázat A kis RNS könyvtár készítés során felhasznált oligonukleotidok

| Név                                | 5'-3' szekvencia                                                   |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>RNA 5' Adapter (RA5)</b>        | GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC                                         |
| <b>RNA 3' Adapter (RA3)</b>        | TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG                                              |
| <b>RNA RT Primer (RTP)</b>         | GCCTTGGCACCCGAGAATTCCA                                             |
| <b>RNA PCR Primer (RP1)</b>        | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTC<br>TACAGTCCGA            |
| <b>RNA PCR Index Primers (RPI)</b> | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATNNNNNNGTGACTGGA<br>GTTCTTGGCACCCGAGAATTCCA |

Ezután az RTP primer (8. táblázat) felhasználásával reverz transzkripciót végeztem a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K1652) leírása alapján. Ennek eredményeképpen az adapterek szekvenciáját is tartalmazó duplaszálú DNS-eket kaptam.

Ezután a Phusion High-Fidelity PCR Kit (Thermo Scientific, #KF553) leírása alapján PCR reakciót mértem össze, amely során az adapterek szekvenciájára specifikus primerekkel (8. táblázat) dolgoztam. Fajtánként különböző index szekvenciákat tartalmazó primereket használtam, hogy az egyes fajták kis RNS-eit a későbbiekben el tudjam különíteni. Az így szintetizált PCR termékekhez 5 µl xylén-cianol tartalmú festéket (Orange DNA-loading dye) mértem, majd ureamentes poliakrilamid gélen futattam és UV fényben kivágtam a megfelelő fragmentumokat. Azután a kisRNS könyvtárakat tartalmazó gélsezmensekből kioldottam a nukleinsavat. Első lépésként a kivágott gélarabokat egy steril tűvel átlyukasztott alsórészrel rendelkező 500 µl-es csövön átpréseltem 2 ml-es csövekbe 4 perc, 13.000 rpm fordulátú centrifugálással, majd a mintákhoz 350 µl 0,3 M NaCl oldatot adagoltam és a centrifugálást megismételtem. A mintákat egy éjszakán keresztül 4 °C-on ráztam, majd új, acetátos filtercsőbe pipettáztam át és 2 percig 6000 rpm fordulaton centrifugáltam. A leszűrt folyadékot ezután újra a szűrőre pipettáztam és a centrifugálást megismételtem. A mintákhoz ezután 900 µl etanolt és 1 µl glikogént mértem és -70 °C-ra helyeztem. Másnap 60 percig 13.000 rpm-en centrifugáltam a mintákat, a felülúszót leöntöttem és a csapadékot kétszer 1 ml 70%-os etanollal mostam át. A pelletet végül vákumos szárítógépben 5 percig szárítottam és 12 µl TE pufferben feloldottam. Az így kinyert nukleinsavat szekvenálásra küldtük.

A szekvenálást követően kapott FASTQ kiterjesztésű fájlokat a CLC Genomics Workbench (Qiagen) program segítségével értékeltem ki. A bioinformatikai elemzés

első lépésként a kapott szekvenciákról levágtam az adapter szekvenciákat (trimming) és minőségellenőrzést végeztem. Ezek részletes beállításait a MATE Növényvédelmi Intézet Növénykórtani Tanszékének Genomikai Kutatócsoportja végezte. Ezek után a nem-redundáns readokat nagyobb contigok összeépítésére használtam fel (*de novo* assembly). Az NCBI oldalán a növényi vírus/viroid referenciagenomok között blastn kereséssel olyan vírusokat azonosítottam, amelyek hasonlóságot mutattak az egyes contigokkal. Ha egy fajta esetében legalább 1 contig találat volt egy vírusra/viroidra, akkor ezután az összes szekvencia olvasatot illesztettem az adott vírus genomjára és a találatokat számszerűsítettem redundanciával és anélkül is. Ennek köszönhetően meg tudtam határozni a normalizált olvasatok számát (read/1 million read -RPM) is. Következő lépésként a szekvencia olvasatokból konszenzus szekvenciákat építettem, amely alapján meg lehetett határozni az egyes vírus/viroid genomok százalékos lefedettségét is.

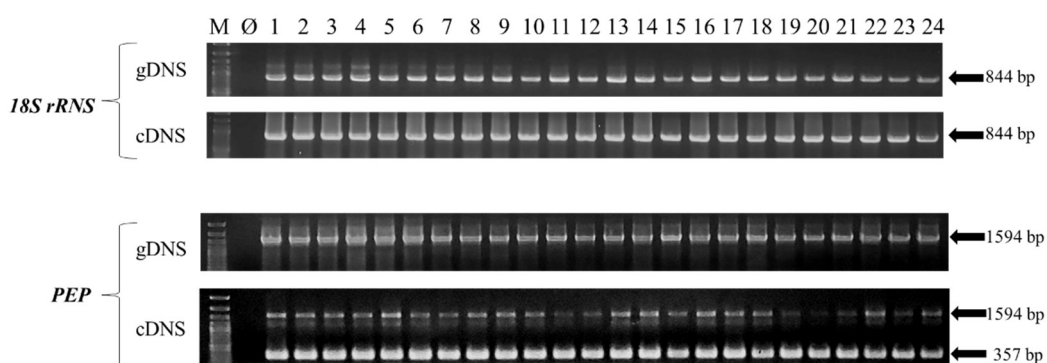
A bioinformatikai elemzés során a CLC-ben találattal rendelkező vírusok és viroidok jelenlétét RT-PCR-rel is ellenőriztük abban az esetben, ha az adatok következő kritériumok közül legalább kettőnek megfelelték: 1. Volt legalább egy olyan contig, amely a vírusra/viroidra találatot adott; 2. az egymillió readre eső redundáns readok száma meghaladta a 200-at; 3. a vírus/viroid genomját a readok által összeállított konszenzus szekvencia legalább 60%-ban, viroidok esetében 80%-ban lefedte.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 5.1.A referenciagénekkel kapcsolatos kísérletek

#### 5.1.1. Konvencionális és intront tartalmazó referenciagén-szakaszra specifikus primer párok

Először a széleskörűen használt *18S rRNS* referenciagénre specifikus primer párral végeztem RT-PCR-t 24 szabadföldi levélminta nukleinsavát és a belőlük szintetizált cDNS-t felhasználva, majd ugyanezt megismételtem a *PEP* referenciagénre specifikus primerekkel is.



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

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

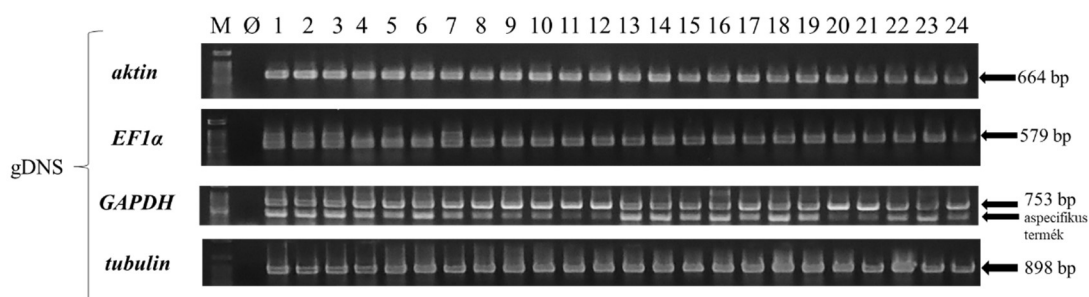
Az ábrán látható, hogy míg a Gambino & Gribaudo (2006) által leírt *18S rRNS*-re specifikus primer pár mindkét esetben egyetlen fragmentumot amplifikál, addig a *PEP* génre specifikus primer pár a gDNA-ból egy, a cDNA-ból pedig kettő fragmentumot (2. ábra). A különbségre az a magyarázat, hogy utóbbi olyan génszakaszra specifikus, amely intronokat is tartalmaz, amelyek az mRNA érése során kivágódnak, így a cDNA már nem tartalmazza azokat. A PCR reakció során a cDNA szintézishez felhasznált genomi DNS-ről továbbra is történik átírás, így a hosszabb fragmentum (1594 bp) szintén megjelenik a gélen, de gyengébb intenzitással. A cDNA eredetű, intronokat már nem tartalmazó, rövidebb génszakasz (357 bp) viszont erősebb jelet ad a gélen, mivel mennyisége is jóval nagyobb, valamint általános jelenség, hogy a rövidebb termékek szintézise előnyben részesül a PCR reakciók során (Børsting et al. 2004). Ez a kísérlet megerősíti az elképzelést, miszerint az intront tartalmazó génszakaszra specifikus primerekkel a cDNA szintézis sikeressége a plusz költséget jelentő DNáz enzimek használata nélkül is igazolható, szemben a már széleskörűen

elterjedt, konvencionális referenciagén primerek használatával, hiszen a rövidebb fragmentum csakis cDNS eredetű lehet.

### 5.1.2. Intront tartalmazó génszakaszra specifikus referenciagén primerek tesztelése különböző eredetű szöveteken

Az előbb leírt megállapítás megerősítése végett a következő kísérletben további 4 intront tartalmazó génszakaszra (*aktin*, *EF1α*, *GAPDH*, *tubulin*) specifikus primer párt szintetizáltattunk és különböző eredetű szőlő szöveteken teszteltük azokat. Ezen felül vizsgáltam, hogy a cDNS szintézishez felhasznált primerek milyensége (random hexamer, oligo(dT)) befolyásolja-e a referencia génszakaszok detektálhatóságát az RT-PCR-t követő gélelektroforézis során.

Elsőként a 4 referenciagén primer pár működését teszteltem a 24 szőlőfajta levelének nukleinsav kivonatát használva templátként. A gélképeken látható, hogy mindegyik amplifikálta a megfelelő gDNS eredetű fragmentumot (3. ábra).

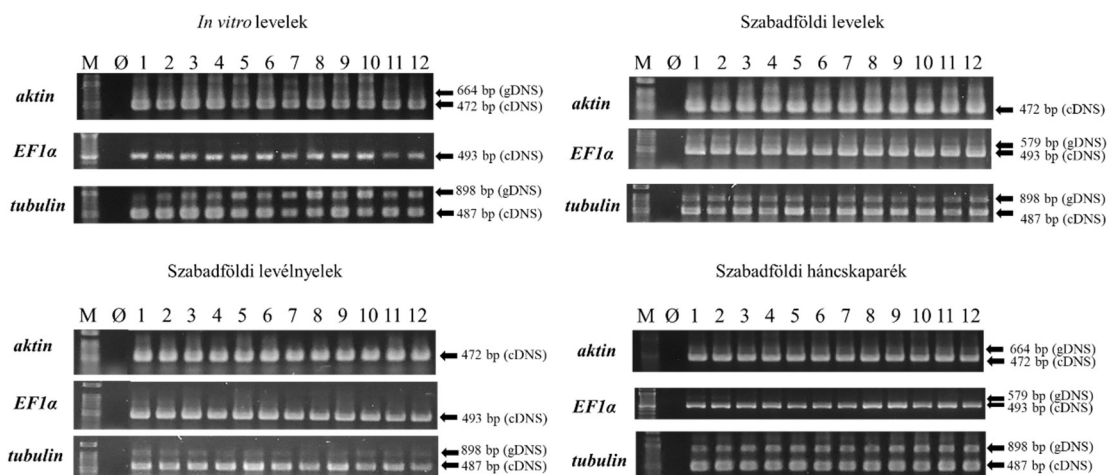


3. ábra: Az *aktin*, *EF1α*, *GAPDH* és a *tubulin* specifikus primerek RT-PCR tesztje a 24 szőlőfajta leveléből kinyert nukleinsavat használva templátként

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

A *GAPDH* primer használatakor a várt gDNS eredetű fragmentum mellett megjelent egy rövidebb, aspecifikus fragmentum, így a további kísérletekből kizártam.

A következő RT-PCR-ek során *in vitro* növények leveléből, szabadföldi növények leveléből és levélnyeléből, valamint a téli nyugalmi időszakban megszedett fás vesszők hancskaparékából kinyert nukleinsavból szintetizáltattam cDNS-t random hexamer és oligo(dT) primerek használatával és teszteltem a potenciális referenciagén primerekkel. Ellentétben azonban korábbi publikációkkal (Reid et al 2006; Song et al. 2021; Han et al. 2012), ezt nem csupán néhány, de 12 fajta mintáit felhasználva tettem meg az átfogóbb eredmények érdekében.



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

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

A 4. ábra alapján kijelenthető, hogy a 3 tesztelt referenciagén primer pár a 12 fajta 4 szövettypusából származó minták esetében is működőképes volt, valamint a primer párok által célzott génszakaszok nagyfokú konzerváltságot mutattak.

A cDNS eredetű fragmentumok átíródtak, de a gDNS eredetű fragmentumok tekintetében akadtak különbségek. A *tubulin* primer pár az összes mintából fel tudta amplifikálni a gDNS eredetű szakaszt is, míg az *aktin* primer pár néhány *in vitro* levélminta és a hancskaparék eredetű minták kivételével nem igazán. Az *EF1α*-ra specifikus primer pár a szabadszőlő levél és a hancskaparék eredetű minták esetében átírta a gDNS eredetű szakaszokat is, de mivel csak 1 rövid (86 bp) intront tartalmazó génszakaszra specifikus, így a futtatás ideje alatt nem vált el megfelelően a cDNS eredetű fragmentumtól. Ez a futtatás idejének növelésével kiküszöbölhető lehetne, de időigényessége miatt nem praktikus. A levélnyel eredetű minták esetében látszik, hogy a gDNS eredetű fragmentum csak a *tubulin* primerekkel történő PCR során jelent meg a gélen, de ott is kevésbé látszik. Ez magyarázható azzal, hogy a nukleinsav izolálási protokollunk alapvetően levélmintákra lett optimalizálva, így a kinyert nukleinsav mennyisége és minősége is eltérő lehetett, ami ugyan a cDNS szintézishez elegendőnek bizonyult, de a PCR során már nem tudott belőle gDNS eredetű fragmentum átírni, mert a primerek túlnyomó része a cDNS templáthoz kapcsolódott. Megemlítendő az is, hogy a gDNS eredetű fragmentum megjelenése nem esszenciális a cDNS szintézis sikerességének igazolásához, hiszen a rövidebb fragmentum hosszának ismerete elégséges információ annak beazonosításához. Különböző nukleinsav izolálási protokollok alapján feldolgozott minták esetében is

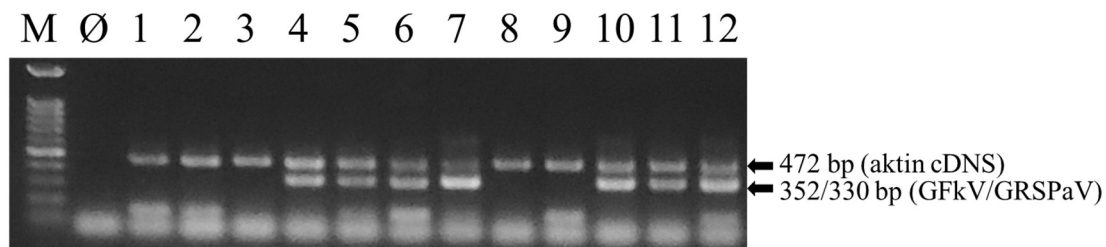
előfordulhat azonban, hogy a PCR során a maradék gDNS-ről átírt fragmentumok is megjelennek a gélen, amely a konvencionális primer párok esetében probléma, de ezen primerek alkalmazásával csak egyértelműbbé teszi a sikeres cDNS szintézist.

Az oligo(dT) primerekkel szintetizált cDNS-eket használva templátként ugyanezeket az eredményeket kaptam, amelyek az M2-es melléklet ábráján tekinthetők meg.

### 5.1.3. Referenciagén és vírus specifikus primerek egyidejű használata

A következő kísérletekben azt teszteltük, hogy az eddig önmagukban tesztelt referencia gén primerek működőképesek-e vírusokra specifikus primerekkel végzett duplex/multiplex PCR reakciókban.

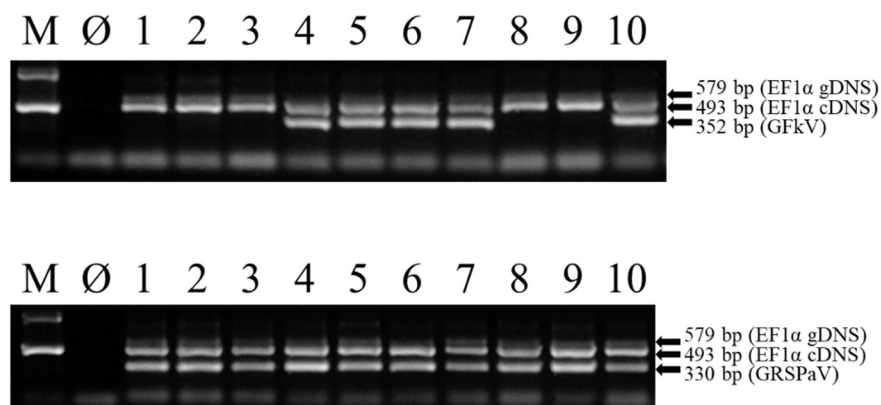
Elsőként az *aktin* specifikus primer párt kombináltam a vírusmentesítés során leggyakrabban detektált GFkV és GRSPaV vírusokra specifikus primerekkel. A 12 tesztelt minta közül az első három, valamint a 8. és 9. minta mindkét vírustól mentes, a 4-től a 7-ig, valamint a 10-től a 12-ig pedig GFkV és GRSPaV által fertőzött volt. A gélképen látható, hogy az *aktin* eredetű fragmentum amplifikálódik, ahogy a GRSPaV és a GFkV fragmentumok is, ám azokat méretbeli hasonlóságuk miatt még hosszabb futtatási idő után sem lehet egyértelműen elkülöníteni, így ezek kombinálása nem célszerű, de alapvetően működőképes (5. ábra).



**5. ábra:** Az *aktin*, *GFkV* és *GRSPaV* specifikus primerekkel végzett multiplex PCR eredménye

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

Ezt követően az *EF1a* primer párt GFkV és GRSPaV primer párokkal kombináltam külön-külön duplex PCR-ben (6. ábra).

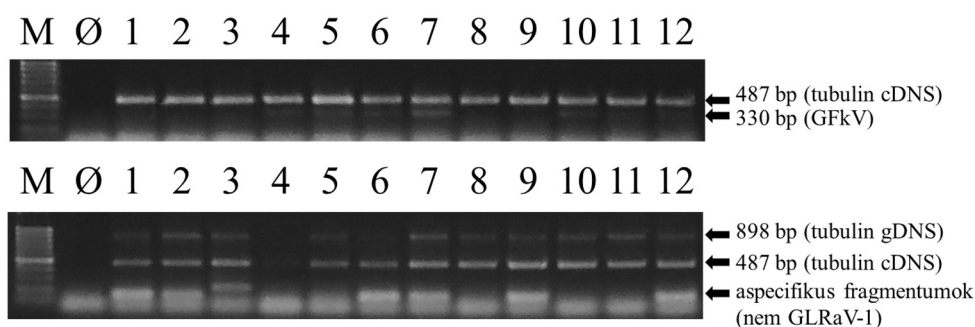


**6. ábra:** Az *EF1α*, a *GFkV* és *GRSPaV* specifikus primerekkel végzett duplex PCR eredmények

Mintasor: M: mólsúly marker, Ø: null kontroll, 1.-10.: 'Kék bakator', 'Kék bakator', 'Juhfark', 'Neoplanta', 'Zefír', 'Zervin', 'Zervin', 'Pintes', 'Pintes', 'Furmint'.

A PCR reakció mindkét esetben működött és a gélképen jól elkülönülten láthatók az *EF1α*, valamint a *GFkV* vagy *GRSPaV* fragmentumok is.

Végül a *tubulin* génre specifikus primer párt is kombináltam különböző vírusokra (*GFkV*, *GLRaV-1*) specifikus primerekkel (7. ábra). A *tubulin* és a *GFkV* primerek együttes alkalmazása sikerrel járt, míg a *GLRaV-1* nem tudta átírni az 502 bp-os fragmentumot. Ennek oka lehet, hogy a különböző primerek előnytelen módon alakítottak ki dimereket, amelynek következtében a *GLRaV-1* primerek nem tudtak megfelelően kötődni a templát DNS-hez, így aspecifikus fragmentumok képződtek, míg specifikus termék nem.



**7. ábra:** A *tubulin*, a *GFkV* és a *GLRaV-1* specifikus primerekkel végzett duplex PCR eredmények

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

Összességében elmondható, hogy a tesztelt referenciagén primer párok és a vírus specifikus primer párok működőképesek voltak duplex PCR-ban. A vírusmentes mintákban a referenciagén primer párok működését nem befolyásolta az oldatban

szabadon maradt vírus specifikus primerek jelenléte sem, hiszen a várt fragmentumok ezekben az esetekben is azonosíthatóak voltak az agaróz gélen.

## 5.2. A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyészetek

### hatékonyságának vizsgálata érzékeny diagnosztikai módszerrel

#### 5.2.1. A kiválasztott anyanövények vírusdiagnosztikai vizsgálata

A kísérletre kijelölt négy szabadföldi anyanövény ('Ottonel muskotály' H.7-3, 'Ottonel muskotály' H.14-1, 'Szirén', 'Trilla') vírus- és viroidtesztelését először kis RNS HTS-sel végeztük el. A szekvenálás során kapott részletes adatok a mellékletben tekinthetők meg (M3 ábra).

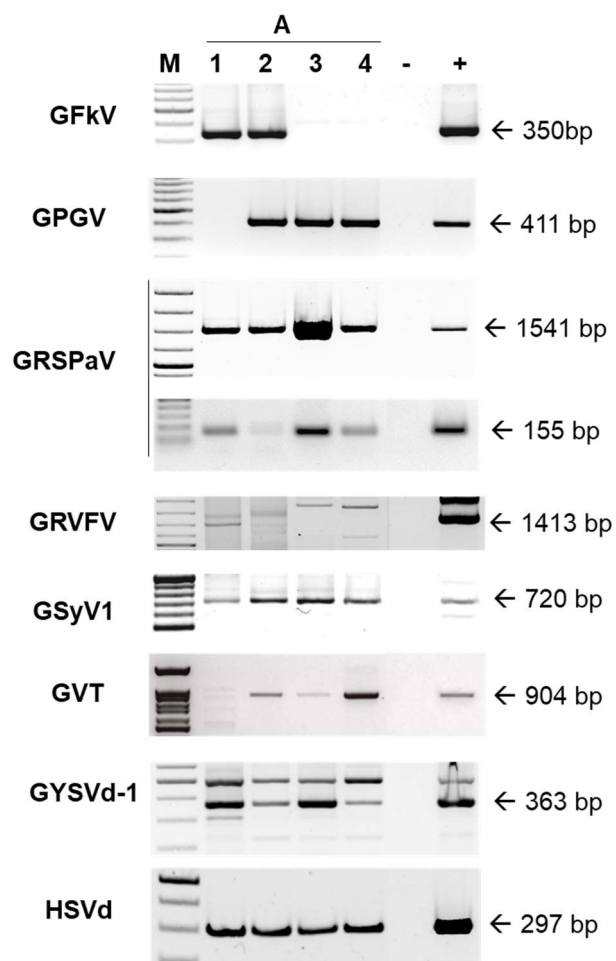
A kis RNS szekvenciákból összeépített contigokat a szőlő vírus és viroid referenciagenomok adatbázisával hasonlítottam össze. Az egyes vírusokra és viroidokra találatot adó contigok számát a lenti táblázatban tüntettem fel (9. táblázat).

**9. táblázat:** A vírus és viroid referenciagenomokra találatot adó kis RNS contigok száma anyanövényenként

|          | GFKV                  | GPGV                       | GRSPaV                                            | GRVfV                                     | GSyV-1                  | GVT               | GYSVd                             | HSVd             |
|----------|-----------------------|----------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------------------|------------------|
|          | Grapevine fleck vírus | Grapevine Pinot gris vírus | Grapevine rupestris stem pitting-associated virus | Grapevine rupestris vein feathering virus | Grapevine Syrah virus-1 | Grapevine virus T | Grapevine yellow speckle viroid-1 | Hop stunt viroid |
| 1_MO7_A  | 118                   | 1                          | 0                                                 | 36                                        | 3                       | 0                 | 6                                 | 21               |
| 2_MO14_A | 68                    | 35                         | 0                                                 | 14                                        | 9                       | 0                 | 9                                 | 14               |
| 3_T_A    | 0                     | 21                         | 0                                                 | 0                                         | 1                       | 0                 | 4                                 | 4                |
| 4_SZ_A   | 0                     | 42                         | 0                                                 | 0                                         | 5                       | 0                 | 6                                 | 7                |

MO7\_A: Ottonel muskotály H.7-3 anyanövény; MO14\_A: Ottonel muskotály H.14-1 anyanövény; T\_A: Trilla anyanövény; SZ\_A: Szirén anyanövény

Ezt követően az anyanövények vírustesztelését RT-PCR-rel is elvégeztem. Az eredmények a 8. ábrán láthatók.



**8. ábra:** Az anyanövények RT-PCR tesztelése során kimutatott vírusok

*M: mólsúly marker; 1: Ottonel muskotály H.7-3 anyanövény; 2: Ottonel muskotály H.14-1 anyanövény; 3: Trilla anyanövény; 4: Szirén anyanövény; -: negatív kontroll; +: pozitív kontroll; A: anyanövények*

Miután a két vírusdiagnosztikai módszerrel megvizsgáltam az anyanövények vírus- és viroidfertőzöttségét, készítettem egy összegző táblázatot, amelyben látható, hogy melyik vírus/viroid jelenlétét tudtam kimutatni a tesztelések során (10. táblázat).

**10. táblázat:** Az anyanövények vírus- és viroidfertőzöttsége a két vírusdiagnosztikai módszer alapján

| Fajta:                      | 1_MO7_A    |        | 2_MO14_A   |        | 3_T_A      |        | 4_SZ_A     |        |
|-----------------------------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|
| Vírusdiagnosztikai módszer: | kisRNS HTS | RT-PCR | kisRNS HTS | RT-PCR | kisRNS HTS | RT-PCR | kisRNS HTS | RT-PCR |
| GFkV                        | +          | +      | +          | +      | -          | -      | -          | -      |
| GPGV                        | -          | -      | +          | +      | +          | +      | +          | +      |
| GRSPaV                      | -          | +      | -          | +      | -          | +      | -          | +      |
| GRVfV                       | +          | +      | +          | +      | -          | -      | -          | -      |
| GSyV-1                      | +          | +      | +          | +      | +          | +      | +          | +      |
| GVT                         | -          | -      | -          | +      | -          | +      | -          | +      |
| GYSVd-1                     | +          | +      | +          | +      | +          | +      | +          | +      |
| HSVd                        | +          | +      | +          | +      | +          | +      | +          | +      |

1\_MO7\_A: Ottonel muskotály H.7-3 anyanövény; 2\_MO14\_A: Ottonel muskotály H.14-1 anyanövény; 3\_T\_A: Trilla anyanövény; 4\_SZ\_A: Szirén anyanövény

Az anyanövények vírusdiagnosztikai vizsgálata után megállapítható volt, hogy több vírussal és viroiddal is fertőzöttek voltak. Kimutattam a GFkV, GPGV, GRSPaV, GRVfV, GSyV-1, GVT vírusok, valamint a GYSVd-1 és a HSVd viroidok jelenlétét is.

A két diagnosztikai módszer a GRSPaV és GVT vírusok kivételével ugyanazt az eredményt hozta. A GRSPaV kis RNS HTS-el történő kimutatásának nehézsége már korábbi publikációkban is megfigyelhető volt (Czotter et al. 2018; Demian et al. 2020) és mivel a GVT közeli rokona a GRSPaV-nek, így valószínűleg ugyanazon okok miatt mutatható ki nehezen ezzel a módszerrel. A mi hipotézisünk szerint ennek egyik oka az lehet, hogy nagy a genetikai variabilitásuk, másfelől elképzelhető, hogy az anyanövényekben nem termelődött a kimutatásukhoz szükséges mennyiségű kis RNS.

### 5.2.2. Szomatikus embriogenezis indukálása és embriókból történő növényregeneráció

A portokokból létesített embriogén kalluszkultúra indítás mind a négy genotípus esetében sikeresnek bizonyult. A módszer hatékonysága változó volt, de minden genotípus esetében történt embriófejlődés és hajtásregeneráció is. A folyamat főbb lépései a következő táblázatban láthatók (11. táblázat).

11. táblázat: A szomatikus embriogenezis főbb lépéseinek számadatai

| Fajta/klón               | Kipreparált portokok száma | Kalluszok száma | Embriogén kalluszok száma | Regenerált növényvonalak száma | Tesztelt <i>in vitro</i> növényvonalak száma |
|--------------------------|----------------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|
| Ottonel muskotály H.7-3  | 243                        | 17              | 5                         | 18                             | 7                                            |
| Ottonel muskotály H.14-1 | 273                        | 15              | 2                         | 19                             | 8                                            |
| Trilla                   | 280                        | 15              | 9                         | 55                             | 12                                           |
| Szirén                   | 251                        | 34              | 9                         | 32                             | 11                                           |

### 5.2.3. Merisztéma kultúrák létesítése és növényregeneráció

A merisztéma tenyészetek létesítése során a két ‘Ottonel muskotály’ klón esetében nem jártam sikerrel. Már az *in vitro* állomány létesítése során problémába ütköztem, ugyanis a hajtások rendkívül gyengén növekedtek és lassan gyökeresedtek. A kísérlet megkezdésének idején éppen ezért a kipreparálható merisztémák száma is nagyon alacsony volt, illetve nem mutattak növekedést, így növényt sem tudtam belőlük regenerálni. Hozzánk hasonlóan Miljanić et al. (2022) szintén sikertelenül próbáltak merisztémákból növényeket regenerálni 4 klón esetében is, azonban az ő esetükben a kipreparált merisztémák száma nagyobb (18-28 db) volt, így míg náluk a genetípusfüggőség lehetett az ok, addig nálunk a merisztémák csekély számában keresendő a probléma. A ‘Trilla’ és a ‘Szirén’ esetében viszont sikeres növényregeneráció is történt (12. táblázat).

12. táblázat: A merisztéma tenyésztés főbb lépéseinek számadatai

| Fajta/klón               | Kipreparált merisztémák száma | Növekvő hajtások száma | Gyökér nélküli növénykék száma | Gyökeres <i>in vitro</i> növények száma | Tesztelt <i>in vitro</i> növények száma |
|--------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| Ottonel muskotály H.7-3  | 5                             | 0                      | 0                              | 0                                       | 0                                       |
| Ottonel muskotály H.14-1 | 7                             | 0                      | 0                              | 0                                       | 0                                       |
| Trilla                   | 42                            | 15                     | 11                             | 5                                       | 5                                       |
| Szirén                   | 25                            | 10                     | 9                              | 4                                       | 4                                       |

### 5.2.4. A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyészetek vírusmentesítési hatékonyságának összehasonlítása

A vírusmentesítési hatékonyság megállapítására elsődlegesen a kis RNS HTS módszerét használtam. Az ugyanazon mentesítési módszerrel regenerált növényvonalak nukleinsavát fajtánként egyetlen mintába (pool) kevertem és kis RNS HTS-sel, majd később RT-PCR-rel is teszteltem. A pozitív eredményt adó poolok egyedeit később egyenként is teszteltem RT-PCR-rel, hogy megvizsgáljam van-e köztük vírustól/viroidtól mentes növény.

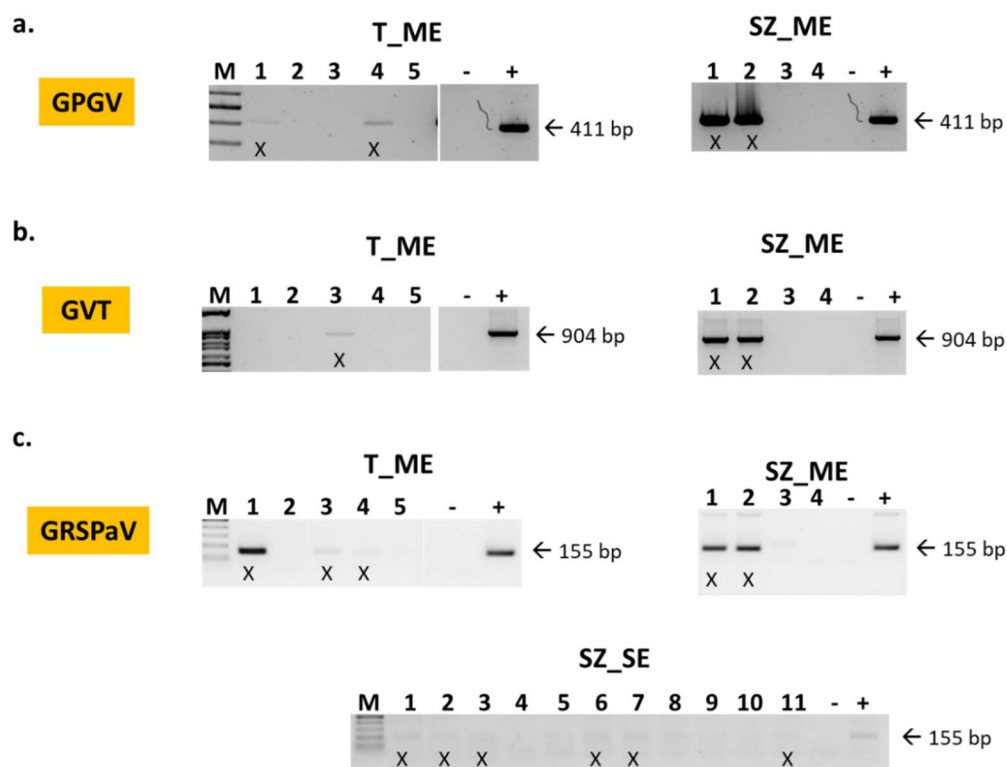
**13. táblázat:** A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyészetek vírusmentesítési hatékonyságának összegzése

| FAJTA_MÓDSZER | DIAGNOSZTIKAI MÓDSZER |         | VÍRUSOK |       |        |       |        |      |         |      |       |      | VIROIDOK |      |       |      |
|---------------|-----------------------|---------|---------|-------|--------|-------|--------|------|---------|------|-------|------|----------|------|-------|------|
|               |                       |         | GFKV    | GPGV  | GRSPaV | GRVfV | G5yV-1 | GVT  | GYSVd-1 | HSVd |       |      |          |      |       |      |
| MO7_SE        | kis RNS HTS (pool)    |         | -       | n.t.  | -      | -     | -      | n.t. | +       | -    |       |      |          |      |       |      |
|               | RT-PCR                | pool    | -       | n.t.  | -      | -     | -      | n.t. | -       | -    |       |      |          |      |       |      |
|               |                       | egyedek | 7/7     | 100%  | n.t.   | 7/7   | 100%   | 7/7  | 100%    | 7/7  | 100%  | n.t. | 6/7      | 86%  | 7/7   | 100% |
| MO14_SE       | kis RNS HTS (pool)    |         | -       | -     | -      | -     | -      | -    | +       | -    |       |      |          |      |       |      |
|               | RT-PCR                | pool    | -       | -     | -      | -     | -      | -    | +       | -    |       |      |          |      |       |      |
|               |                       | egyedek | 8/8     | 100%  | 8/8    | 100%  | 8/8    | 100% | 8/8     | 100% | 8/8   | 100% | 6/8      | 75%  | 8/8   | 100% |
| T_SE          | kis RNS HTS (pool)    |         | n.t.    | -     | -      | n.t.  | -      | -    | +       | +    |       |      |          |      |       |      |
|               | RT-PCR                | pool    | n.t.    | -     | -      | n.t.  | -      | -    | +       | +    |       |      |          |      |       |      |
|               |                       | egyedek | n.t.    | 12/12 | 100%   | 12/12 | 100%   | n.t. | 12/12   | 100% | 12/12 | 100% | 1/12     | 8%   | 10/12 | 83%  |
| T_ME          | kis RNS HTS (pool)    |         | n.t.    | -     | +      | n.t.  | -      | -    | +       | +    |       |      |          |      |       |      |
|               | RT-PCR                | pool    | n.t.    | -     | +      | n.t.  | -      | -    | +       | +    |       |      |          |      |       |      |
|               |                       | egyedek | n.t.    | 3/5   | 60%    | 2/5   | 40%    | n.t. | 5/5     | 100% | 4/5   | 80%  | 0/5      | 0%   | 0/5   | 0%   |
| SZ_SE         | kis RNS HTS (pool)    |         | n.t.    | -     | +      | n.t.  | -      | -    | +       | +    |       |      |          |      |       |      |
|               | RT-PCR                | pool    | n.t.    | -     | +      | n.t.  | -      | -    | +       | +    |       |      |          |      |       |      |
|               |                       | egyedek | n.t.    | 11/11 | 100%   | 5/11  | 45%    | n.t. | 11/11   | 100% | 11/11 | 100% | 9/11     | 82%  | 9/11  | 82%  |
| SZ_ME         | kis RNS HTS (pool)    |         | n.t.    | +     | +      | n.t.  | -      | +    | -       | +    |       |      |          |      |       |      |
|               | RT-PCR                | pool    | n.t.    | +     | +      | n.t.  | -      | +    | -       | +    |       |      |          |      |       |      |
|               |                       | egyedek | n.t.    | 2/4   | 50%    | 2/4   | 50%    | n.t. | 4/4     | 100% | 2/4   | 50%  | 4/4      | 100% | 2/4   | 50%  |

MO7\_SE: Ottonel muskotály H.7-3 szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; MO14\_SE: Ottonel muskotály H.14-1 szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; T\_SE: Trilla szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; T\_ME: Trilla merisztéma eredetű vonalak; SZ\_SE: Szirén szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; SZ\_ME: Szirén merisztéma eredetű vonalak; n.t.: nem teszteltem, mert az anyanövény nem volt fertőzött; az egyedek esetében a számok a mentes/összes tesztelt egyedet jelölik

A GFKV és a GRVfV csak a két ‘Ottonel muskotály’ klón anyanövényeiben volt jelen. Itt kizárólag a szomatikus embriogenezis módszerével jártam sikerrel, viszont ez esetben az összes regenerált növényvonal mentesnek bizonyult ezektől a vírusoktól. Ezt a kis RNS HTS és később az RT-PCR tesztek is alátámasztották (13. táblázat).

A GPGV három anyanövényből (‘Ottonel muskotály’ H.14-1, ‘Trilla’, ‘Szirén’) is kimutatható volt. A szomatikus embriogenezis eredetű vonalak mindegyike GPGV-mentesnek bizonyult mindkét diagnosztikai módszer alapján, de a merisztéma eredetű vonalak között már akadtak fertőzöttek. Habár a ‘Trilla’ merisztéma eredetű egyedek nukleinsav keverékéből sem a kis RNS HTS, sem az RT-PCR nem jelezte a GPGV jelenlétét, ennek ellenére a későbbiekben 5-ből 2 egyed mégis fertőzöttnek bizonyult. Ennek oka lehet, hogy a vírus koncentrációja nem volt elegendő a nukleinsav keverékben és kis RNS alapú válasz kiváltását sem okozta az érintett *in vitro* egyedekben. A ‘Szirén’ esetében 4-ből 2 egyed bizonyult GPGV fertőzöttnek (9/a ábra).



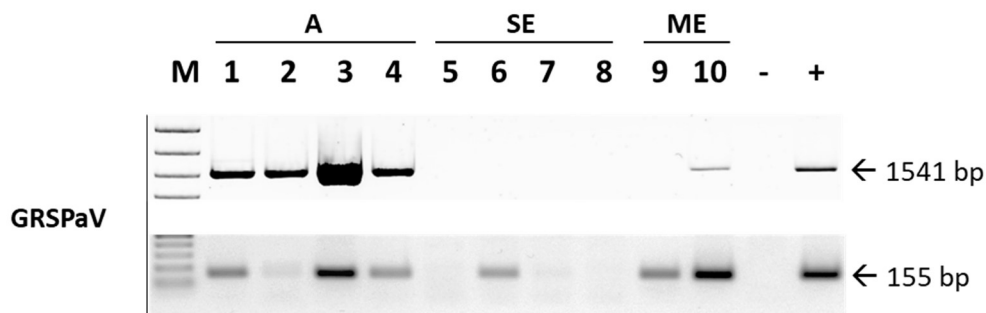
**9. ábra:** A vírusmentesítés után regenerált növényegyekek vírusesztelése RT-PCR-rel

*SZ\_SE: Szirén szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; T\_ME: Trilla merisztéma eredetű vonalak; SZ\_ME: Szirén merisztéma eredetű vonalak; M: mólsúly marker; X: a pozitív RT-PCR eredményt adó minták; bp: bázispár*

A GRSPaV fertőzést szintén mind a négy anyanövény hordozta. A kis RNS HTS és az RT-PCR vizsgálatok eredményei nem fedték egymást, mivel előbbivel nem tudtam kimutatni a vírus jelenlétét. Az RT-PCR során két primer párt is használtam, hogy biztosabb eredményt kapjak. Végül a Gambino & Gribaudo (2006) által közölt 155 bp nagyságú fragmentumot amplifikáló primer pár bizonyult megbízhatóbbnak, mert az több egyed esetében amplifikálta a vírus szekvenciáját (10. ábra).

A szomatikus embriogenezissel vírusmentesített egyedek RT-PCR tesztjét követően azt találtam, hogy három fajta esetében, más kutatókhoz hasonlóan (Gambino & Gribaudo 2006; Bouamama-Gzara et al. 2017) 100%-os hatékonysággal tudtam megszabadítani a növényt a GRSPaV vírustól. A 'Szirén' esetében 11-ből 6 egyed továbbra is fertőzött maradt (habár az amplifikált fragmentumok jóval halványabban jelentek meg), ami nagyjából 45%-os hatékonyságot jelent (9/c ábra). Ez az arány azonban messze elmarad a korábban más kutatók által leírt, gyakran 100%-os hatékonyságtól is (Bouamama-Gzara et al. 2017; Gribaudo et al. 2006). Ez A merisztéma eredetű 'Trilla' növényvonalakat illetően 5-ből 3 egyed fertőzött maradt, valamint a 'Szirén' esetében 4-ből 2. A GRSPaV eltávolítását tekintve tehát,

a szomatikus embriogenezis nemcsak, hogy mind a négy fajta esetében sikeres módszer volt, de a hatékonysága is felülmúlta a merisztéma tenyészetekét, amely két fajta esetében nem is volt kivitelezhető.



**10. ábra:** A GRSPaV fragmentumot amplifikáló primer párok RT-PCR eredménye

*A: anyanövények; SE: szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; ME: merisztéma eredetű vonalak; 1.: Ottonel muskotály H.7-1 anyanövény; 2: Ottonel muskotály H.14-1 anyanövény; 3: Trilla anyanövény; 4: Szirén anyanövény; 5: Ottonel muskotály H.7-3 szomatikus embriogenezis egyedek poolja; 6: Ottonel muskotály H.14-1 szomatikus embriogenezis egyedek poolja; 7: Trilla szomatikus embriogenezis egyedek poolja; 8: Szirén szomatikus embriogenezis egyedek poolja; 9: Trilla merisztéma egyedek poolja; 10: Szirén merisztéma egyedek poolja; M: mólsúly marker; -: negatív kontroll; +: pozitív kontroll*

A GSyV-1 minden anyanövényben kimutatható volt, de a kísérlet végeztével mindkét vírusdiagnosztikai módszer eredménye alapján az összes tesztelt növényvonal vírusmentes lett, függetlenül attól, hogy szomatikus embriogenezis vagy merisztéma tenyésztés során regeneráltam.

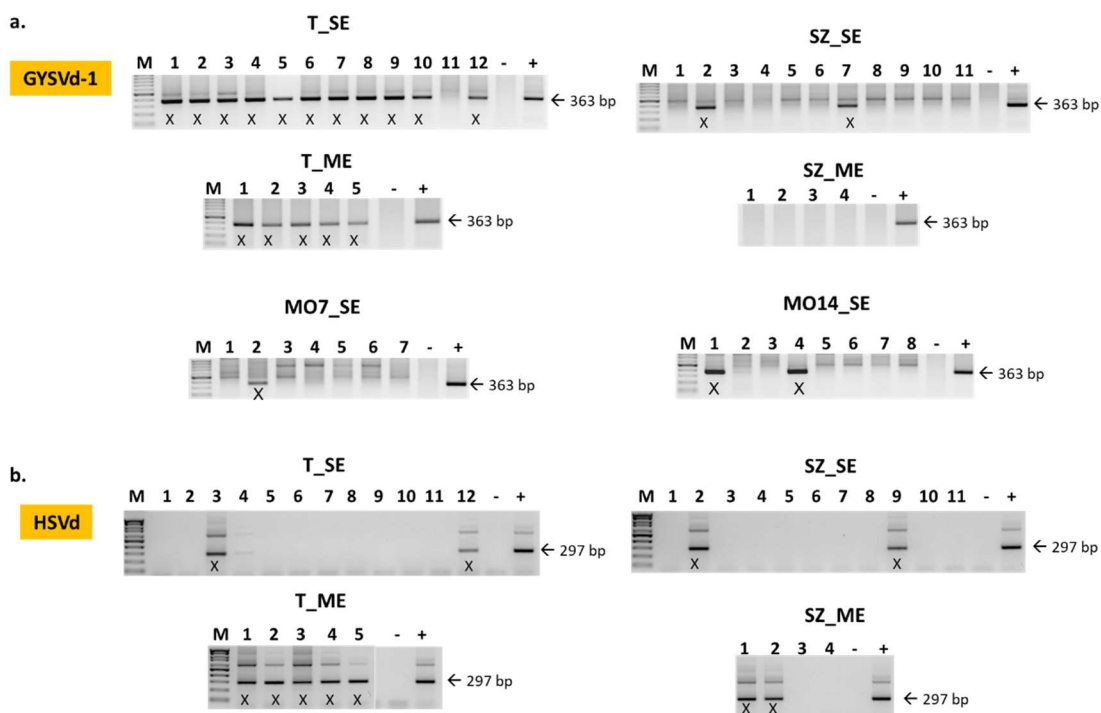
A GVT-t az RT-PCR három anyanövényben mutatta ki. A szomatikus embriogenezissel előállított növényvonalak 100%-ban mentesek voltak ettől a kórokozótól. Később Nuzzo et al. (2022) szintén 100%-os arányban mentesítettek ‘Chardonnay’ fajtát, amely tovább erősítette a mi eredményünket. A merisztéma eredetű növények között ugyanakkor akadtak fertőzöttek. A ‘Trilla’ merisztéma eredetű egyedek pool-jából az RT-PCR és a kis RNS HTS sem mutatott ki GVT fertőzést, de az egyedeket külön tesztelve RT-PCR-rel 5-ből 1 növény mégis pozitív eredményt adott (9/b ábra). Ennek oka ugyanaz lehetett, mint a GPGV fertőzés esetében leírtak. A ‘Szirén’ esetében 4-ből 2 egyed maradt fertőzött a GVT-vel.

Leírható tehát, hogy a merisztéma tenyésztéssel regenerált 5 ‘Trilla’ egyed közül 2, míg a ‘Szirén’ esetében 4-ből 2 bizonyult mentesnek az összes anyanövényekben kimutatott vírustól (GPGV, GRSPaV, GSyV-1, GVT). A szomatikus embriogenezis útján regenerált ‘Ottonel muskotály’ H.7-3, ‘Ottonel muskotály’ H.14-1 és ‘Trilla’ egyedek mindegyike vírusmentes volt, ám a 11 ‘Szirén’ SE egyed esetében 6 GRSPaV fertőzött maradt, így csak az egyedek 45%-a bizonyult teljesen vírusmentesnek.

A két, szőlőben leggyakrabban előforduló viroid, a HSVd és a GYSVd-1 az összes anyanövényben jelent volt. A GYSVd-1 kimutatása során a kis RNS HTS és az RT-PCR eltérő eredményt adott az ‘Ottonel muskotály’ H.7-3 SE vonalak tekintetében. Előbbi pozitív, utóbbi negatív eredményt mutatott. Később az egyed szintű RT-PCR teszt azonban kimutatta, hogy a 7-ből 1 egyed továbbra is fertőzött volt a viroiddal (11/a ábra). Ennek oka jelen esetben is az lehetett (mint korábban a ‘Trilla’ merisztéma vonalak GVT tesztjénél), hogy a fertőzést mutató egyedből származó nukleinsav nagyon kis koncentrációban volt jelen a keverékben, így nem tudott felsokszorozódni. Míg az ‘Ottonel muskotály’ H.14-1 és a Szirén SE vonalak közül csak 2-2 volt GYSVd-1 fertőzött, addig a ‘Trilla’ SE vonalak 92%-a, amely kiemelkedően magas arány és korábban egyetlen publikációban sem fordult elő. A ‘Trilla’ ME vonalak mindegyike fertőzött maradt a viroiddal, de a ‘Szirén’ ME vonalak kivétel nélkül mentesnek bizonyultak, ami jól mutatja a módszer genotípusfüggőségét.

Az ‘Ottonel muskotály’ H.7-3 és H.14-1 klónok SE vonalai 100%-ban mentesek voltak a HSVd-től, de a ‘Trilla’ és ‘Szirén’ fajták esetében 2-2 fertőzött egyedet is azonosítani tudtam. Ennek ellenére ezen fajták esetében is 80% feletti mentesítési hatékonyságot állapítottam meg, amely még mindig kiemelkedő, ugyanis később Nuzzo et al. (2022) *Vitis rupestris* esetében teljesen sikertelenül is próbálkoznak ezen viroid eltávolításával, valamint ‘Richter 110’ alanyfajta esetében is csak 60%-ban jártak sikerrel.

A merisztéma eredetű vonalak között magasabb volt a fertőzött növények aránya. A ‘Trilla’ esetében minden regenerált egyed fertőzött maradt, a ‘Szirén’ esetében 4-ből 2 (11/b ábra).



**11. ábra:** A vírusmentesítés után regenerált növényegyek viroidtesztelése RT-PCR-rel

*T\_SE*: Trilla szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; *SZ\_SE*: Szirén szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; *T\_ME*: Trilla merisztéma eredetű vonalak; *SZ\_ME*: Szirén merisztéma eredetű vonalak; *MO7\_SE*: Ottonel muskotály H.7-3 szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; *MO14\_SE*: Ottonel muskotály H.14-1 szomatikus embriogenezis eredetű vonalak; *M*: mólsúly marker; *X*: a pozitív RT-PCR eredményt adó minták; *bp*: bázispár

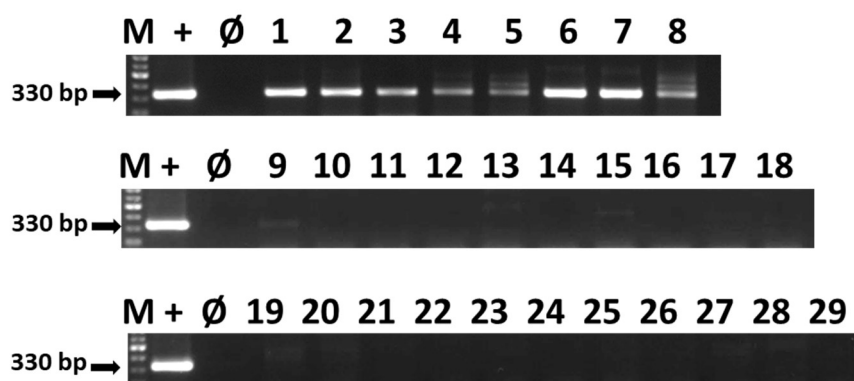
Összeségében elmondható tehát, hogy az ‘Ottonel muskotály’ H.7-3 klón 7 tesztelt SE egyedéből 6, valamint az ‘Ottonel muskotály’ H.14-1 esetében 8 SE egyedből szintén 6 mentes volt mindkét vizsgált viroidtól és vírustól is. A ‘Trilla’ esetében mindössze 1 db SE egyedet regeneráltunk, amely az összes korábban kimutatott vírustól és viroidtól mentesnek bizonyult. Ez a HSVd fertőzés nagy arányú előfordulásának volt köszönhető a ‘Trilla’ SE vonalakban. A ‘Trilla’ ME vonalak közül egy sem volt, amely minden tesztelt vírustól és viroidtól mentes lett volna, amely a regenerált egyedek 100%-os viroidfertőzöttségének volt köszönhető. A 11 db ‘Szirén’ SE egyedből 3 mentesnek bizonyult az összes anyanövényekben kimutatott vírustól és viroidtól is, amíg a 4 db ME egyed közül 2.

### 5.3. Kemoterápiás kísérletek

#### 5.3.1. Ribavirin előkísérletek Sárfehér fajtán

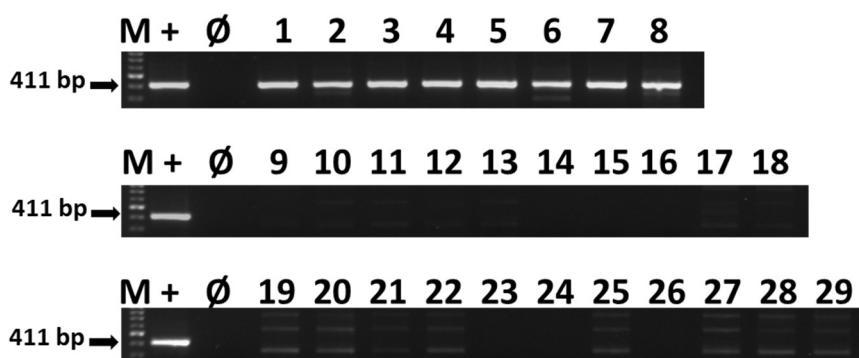
A szakirodalomban fellelhető publikációk tapasztalatai alapján először 25 mg/l ribavirinnel kezeltem GRSPaV és GPGV fertőzött ‘Sárfehér’ *in vitro* növényeket, hogy a vegyszer antivirális hatásáról az általam alkalmazott kísérleti körülmények között is megbizonyosodjak.

A kísérletet követő RT-PCR vizsgálat során megállapítottam, hogy a kezeletlen *in vitro* növények 2 mm-es hajtáscsúcsában a GRSPaV, valamint a GPGV vírusok maradéktalanul jelen voltak (12. ábra és 13. ábra). Ez azt is jelenti, hogy az ebben a mérettartományban leválasztott hajtáscsúcsok növényé nevelése önmagában még nem elégséges a hatékony vírusmentesítéshez. A kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsában a GRSPaV-t már csak egy esetben tudtam kimutatni (9. minta) és a vírus specifikus fragmentuma halványabban jelent meg a gélképen, ami azt feltételezi, hogy a vírus titer alacsonyabb is volt, habár az RT-PCR módszer csak szemi-kvantitatív eredményt ad és fenntartásokkal kezelendő. A GPGV-t a kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsából már nem tudtam kimutatni. A kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsából felnevelt *in vitro* növények levelét is vizsgáltam. Ez esetben nem találtam egyetlen vírusfertőzött növényt sem, ami azt jelenti, hogy a vírusok a növények további fejlődése során sem jelentek meg, vagy a vírus titer nem növekedett számottevően.



**12. ábra:** A kezeletlen és ribavirin kezelésen átesett *in vitro* Sárfehér növények GRSPaV fertőzöttségének kimutatása RT-PCR-rel

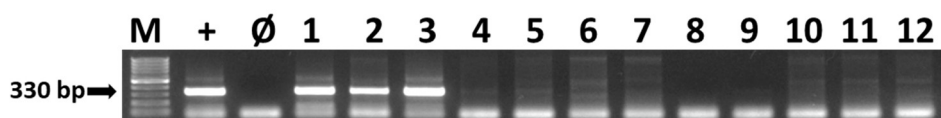
Mintaszor: M: mólsúly marker; +: pozitív kontroll; Ø: null-kontroll; 1.-8.: kontroll növények 2 mm-es hajtáscsúcsa; 9.-18.: kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsa; 19.-29.: kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsaiból nevelt növények levele



**13. ábra:** A kezeletlen és ribavirin kezelésen átesett *in vitro* Sárfehér növények GPGV fertőzőittségének kimutatása RT-PCR-rel

Mintasor: M: mólsúlymarker; +: pozitív kontroll; Ø: null-kontroll; 1.-8.: kontroll növények 2 mm-es hajtáscsúcsa; 9.-18.: kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsa; 19.-29.: kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsaiból nevelt növények levele

A kísérlet eredményét látva felmerült a kérdés, hogy a kezelt *in vitro* növényekről 2 mm-nél nagyobb méretű hajtáscsúcs leválasztásával is vírusmentes növényeket kaphatok-e. Ebből a célból újabb kísérletet indítottam, ahol vizsgáltam az 5 mm-es hajtáscsúcsok vírusfertőzőittségét is. Azt találtam, hogy ugyan a ribavirin kezelés hatására a vírusok mennyisége már az 5 mm-es hajtáscsúcsokban is csökkenhet, de használatuk nem biztonságos, mert a 2 mm-es hajtáscsúcsokkal összevetve a gélekpeken látható, hogy a GRSPaV specifikus fragmentuma néhol halványan megjelent (14. ábra: 4. és 5. minta). A 2 mm-es hajtáscsúcsok és az azokból felnevelt növények levele mentes volt a vírustól.



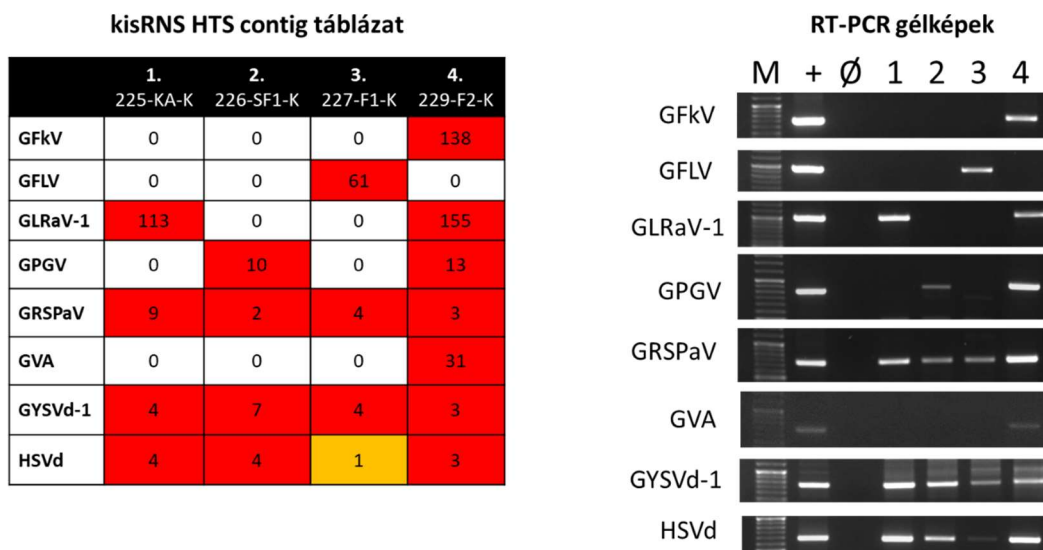
**14. ábra:** A ribavirin kezelésen átesett *in vitro* Sárfehér növények 2 és 5 mm-es hajtáscsúcsának GRSPaV fertőzőittsége RT-PCR-rel tesztelve

Mintasor: M: mólsúlymarker; +: pozitív kontroll; Ø: null-kontroll; 1.-3.: kiindulási növények levele; 4.-6.: kezelt növények 5 mm-es hajtáscsúcsa; 7.-9.: kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsa; 10.-12.: a kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsaiból felnevelt növények levele

Ezen kísérlet során világossá vált, hogy a ribavirin kezelést követően az 5 mm-es hajtáscsúcsok használata vírusmentesítési szempontból nem biztonságos, ugyanis a vírusok azokban továbbra is jelen lehetnek és értékes növényanyagtól eshetünk el. Ezen felül a 2 mm-es hajtáscsúcsok növekedésszabályozók alkalmazásával történő regenerációs aránya is megközelíti a 100%-ot, valamint szabad szemmel könnyedén kipreparálhatók, ezért az annál nagyobb méretű szövetek használata nem indokolt.

### 5.3.2. A kemoterápiás kísérletek növényanyagának vírus- és viroiddiagnosztikai elemzése

Az előkísérletek tapasztalatait felhasználva további kísérleteket indítottam 4 szőlő klón bevonásával. A kiindulási növények vírus- és viroidprofilját kis RNS HTS segítségével készítettem el, majd RT-PCR segítségével validáltam (15. ábra). Az összesített eredmények az 14. táblázatban láthatók.



**15. ábra:** A kemoterápiás kísérletek anyanövényeinek kis RNS HTS és RT-PCR vizsgálata

A vírusokra találatot adó contigok táblázata (bal oldalt) és az ugyanazon vírusokra elvégzett RT-PCR eredmények (jobb oldalt). M: mólsúly marker; +: pozitív kontroll, Ø: null kontroll, 1: Kadarka P131 A1, 2: Sárféher A1, 3: Furmint P51 ÜH2, 4: Furmint P51 A1

A diagnosztika során kimutattam a GFkV, GFLV, GLRaV-1, GPGV, GRSPaV és GVA vírusokat, valamint a GYSVd-1 és HSVd viroidokat is. Látható, hogy a kis RNS HTS és az RT-PCR eredmények jól fedik egymást, így egy stabil profilt felállítva láthattam neki a fajták mikroszaporításának. A szekvenálás során kapott részletes adatok a mellékletben tekinthetők meg (M4 ábra).

**14. táblázat:** A ribavirin kísérlethez felhasznált kiindulási növények vírus- és viroidprofilja kis RNS HTS és RT-PCR alapján.

| Fajta:                      | 1.<br>225-KA-K |        | 2.<br>226-SF1-K |        | 3.<br>227-F1-K |        | 4.<br>229-F2-K |        |
|-----------------------------|----------------|--------|-----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
| Vírusdiagnosztikai módszer: | kisRNS HTS     | RT-PCR | kisRNS HTS      | RT-PCR | kisRNS HTS     | RT-PCR | kisRNS HTS     | RT-PCR |
| GFKV                        | -              | -      | -               | -      | -              | -      | +              | +      |
| GFLV                        | -              | -      | -               | -      | +              | +      | -              | -      |
| GLRaV-1                     | +              | +      | -               | -      | -              | -      | +              | +      |
| GPGV                        | -              | -      | +               | +      | -              | -      | +              | +      |
| GRSPaV                      | +              | +      | +               | +      | +              | +      | +              | +      |
| GVA                         | -              | -      | -               | -      | -              | -      | +              | +      |
| GYSVd-1                     | +              | +      | +               | +      | +              | +      | +              | +      |
| HSVd                        | +              | +      | +               | +      | +              | +      | +              | +      |

1: Kadarka P131 A1, 2: Sárféher A1, 3: Furmint P51 ÜH2, 4: Furmint P51 A

Miután megfelelő mennyiségű *in vitro* egyeddel rendelkeztem minden fajta esetében, azok fertőzöttségi állapotát is leellenőriztem RT-PCR-rel. A teszt eredményei azt mutatták, hogy az *in vitro* egyedek is fertőzöttek voltak azokkal a vírusokkal és viroidokkal, amelyekkel az üvegházi anyanövények (15. táblázat). A ‘Furmint’ P51 ÜH2 klón esetében a HSVd fertőzést a 10 tesztelt *in vitro* növényből mindössze egyből tudtam kimutatni, így ezt a klónt a további kísérletek során nem teszteltem erre a viroidra. Ugyanakkor megemlítendő, hogy ezen klón esetében az anyanövényben is mindössze 1 contig találat született a HSVd viroidra, valamint az RT-PCR során is halványabb volt a HSVd fragmentum, amely összefüggésben lehet az *in vitro* növények fertőzöttségének egyenetlenségével is.

15. táblázat: A kemoterápiás kísérletekhez felhasznált in vitro növényanyag diagnosztikai vizsgálata.

| Fajta:             | 1.<br>225-KA-K |                  | 2.<br>226-SF1-K |                  | 3.<br>227-F1-K |                  | 4.<br>229-F2-K |                  |
|--------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| Növény származása: | Anyanövény     | In vitro egyedek | Anyanövény      | In vitro egyedek | Anyanövény     | In vitro egyedek | Anyanövény     | In vitro egyedek |
| GfKV               | -              | -                | -               | -                | -              | -                | +              | 10/10            |
| GFLV               | -              | -                | -               | -                | +              | 10/10            | -              | -                |
| GLRaV-1            | +              | 10/10            | -               | -                | -              | -                | +              | 10/10            |
| GPGV               | -              | -                | +               | 10/10            | -              | -                | +              | 10/10            |
| GRSPaV             | +              | 10/10            | +               | 10/10            | +              | 10/10            | +              | 10/10            |
| GVA                | -              | -                | -               | -                | -              | -                | +              | 10/10            |
| GYSVd-1            | +              | 10/10            | +               | 10/10            | +              | 10/10            | +              | 10/10            |
| HSVd               | +              | 10/10            | +               | 10/10            | +              | 1/10             | +              | 10/10            |

1: Kadarka P131 A1, 2: Sárféher A1, 3: Furmint P51 ÜH2, 4: Furmint P51 A1; In vitro egyedek: fertőzött/ tesztelt egyed

### 5.3.3. A ribavirin kezelés hatásainak vizsgálata a kijelölt fajtákon

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

A diagnosztikai vizsgálatokat követően megkezdtem a fajták ribavirinnel történő kezelését. A kísérlet során nyomon követtem az egyes kezelések hosszát és a kezelt növényekről leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs arányát, valamint vizsgáltam, hogy az egyes vírusoktól milyen hatékonysággal tudtam megszabadulni. A ribavirinnel kezelt hajtások túlélési aránya és a 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs aránya a 16. táblázatban látható.

16. táblázat: A ribavirinnel kezelt hajtások túlélési aránya és a leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs aránya

| Fajta/klón      | R25 kezelést túlélő hajtások aránya |       | A 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs aránya |       |
|-----------------|-------------------------------------|-------|---------------------------------------------|-------|
| Kadarka P131 A1 | 30/104                              | 28,8% | 18/50                                       | 36%   |
| Sárféher A1     | 36/76                               | 47,4% | 69/81                                       | 85,2% |
| Furmint P51 ÜH2 | 34/69                               | 49,3% | 47/84                                       | 56%   |
| Furmint P51 A1  | 27/66                               | 40,9% | 47/75                                       | 62,7% |

R25: 25 mg/l ribavirin

A kezeletlen hajtások mindegyike életben maradt, ezzel szemben a ribavirinnel kezelt hajtások túlélési aránya 28,8 és 49,3% között változott, amely várható volt, tekintve, hogy a kezelés nem csupán a virális RNS-eket, de a növény saját, akár háztartási géneinek RNS-t is érintheti, amelyek erősen befolyásolhatták a hajtások

növekedését és gyökeresedését. A legrosszabb eredményt a ‘Kadarka’ P131 A1 klón adta, ahol is a kezelt hajtások csaknem háromnegyede elpusztult.

A kezeletlen hajtásokból felnevelt növényekről leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációja 50 és 90% között alakult. A ribavirinnel kezelt növények esetében ez 36 és 85,2% között volt, de fajtánként igen változó. A legkedvezőtlenebb arány itt is a ‘Kadarka’ P131 A1 klón esetében volt megfigyelhető, ezért olyan hajtások kezelését is megkezdtem, amelyeket előzetesen IBA hormonnal gyökereztettem, majd a gyökérnyúlványok megjelenésekor helyeztem azokat a ribavirint tartalmazó táptalajra. Ebben a kísérletben összehasonlítottam a hajtások túlélési arányát, majd a 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs arányát is (17. táblázat).

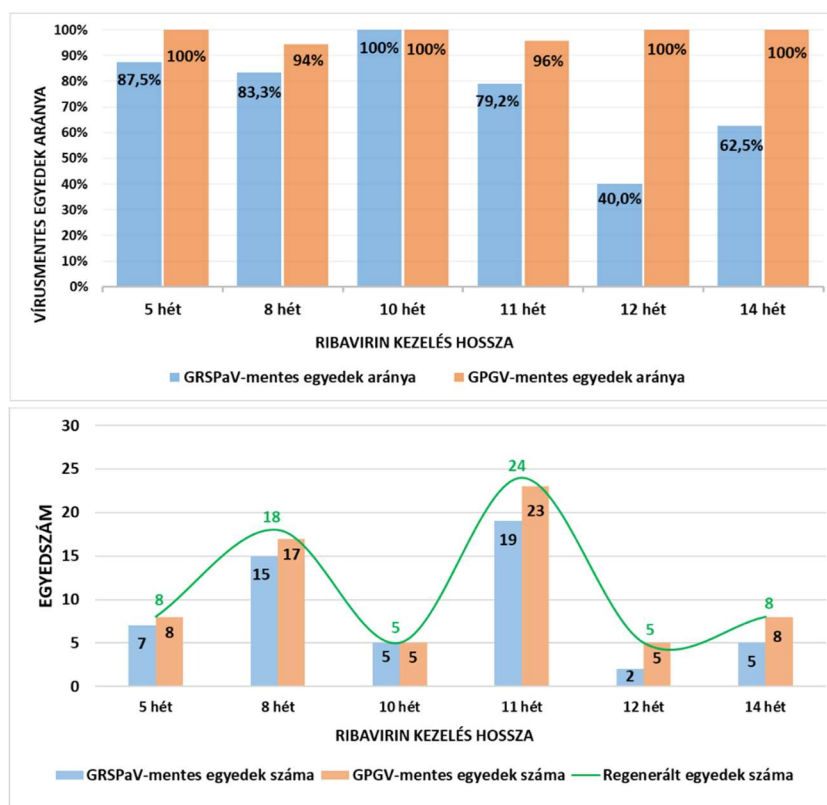
**17. táblázat:** A ribavirinnel (25mg/l) kezelt Kadarka P131 A1 hajtások túlélési aránya és a 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs aránya

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

Látható, hogy az előgyökereztetésen átesett hajtások lényegesen nagyobb arányban éltek túl a ribavirin kezelést (28,8% < 80%), valamint a kezelést követően leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs aránya is kedvezőbb volt. A hajtások életképessége jobb volt és könnyebben ellenálltak a ribavirin negatív hatásainak. A gyökéren keresztül valószínűleg lassabban vették fel a ribavirint, így a stresszre adott válasz sem olyan koncentráltan és gyorsan jelentkezett. Ezt követően már csak az a kérdés merült fel, hogy az ilyen előgyökereztetett hajtások kezelése során a vírusmentesítési mechanizmusok továbbra is végbemennek-e. Erre a kezelést követően regenerált egyedek vírusdiagnosztikai vizsgálata adott választ.

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

A ribavirin vírusmentesítési hatásának vizsgálata céljából a kezelés után regenerált *in vitro* egyedek RT-PCR tesztelését végeztem el. A ribavirin kezelés hossza alapvetően változó volt, mivel az eltérő genotípusokhoz tartozó növények nem egyforma ütemben növekedtek a kezelés során és így a 2 mm-es hajtáscsúcsok leválasztása is eltérő időpontokban valósult meg. Voltak olyan növények, amelyek kezelése 4 hétig tartott, de bizonyos esetekben 16 hét is lehetett. Megfigyeléseim alapján azonban a 4-5 hetes időintervallumnál hosszabb kezelések nem eredményezték egyértelműen a regenerálható vírusmentes növények arányának növekedését, sőt a Sárfehér A1 GRSPaV fertőzés esetében például a 10 hetet meghaladó kezelést követően még csökkent is. Ugyanezen növények esetében a GPGV-mentes növények aránya 5 hét kezelést követően tetőzött, de 12 és 14 hét kezelés után is 100% volt (16. ábra).



16. ábra: A vírusmentes Sárfehér A1 egyedek aránya a különböző hosszúságú ribavirin kezeléseket követően

Mivel a különböző genotípusok eltérő víruskombinációkkal voltak fertőzve, így az eredmények kiértékelését a vírusok és kevésbé a genotípusok szemszögéből végeztem el. Az eredményeket a 18. táblázat mutatja.

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

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

Az egyetlen GFkV fertőzést hordozó klón a ‘Furmint’ P51 A1 volt. A kezeletlen növényekről leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsokból felnevelt növényekből még kivétel nélkül ki tudtam mutatni RT-PCR-rel, viszont a ribavirin kezeléseket követően regenerált növények 78,3%-a mentes volt ettől vírustól.

A GFLV, ellentétben a floémre korlátozott GFkV-val, egy sejtről sejtre is igen hatékonyan terjedő vírus. A kísérletek során egyetlen esetben sem tudtam eltávolítani a ‘Furmint’ P51 ÜH2 klónból. Ez ellenmondásban van azzal, hogy korábban más kutatók már sikeresen eliminálták ezt a vírust ribavirin alkalmazásával. Weiland et al. (2003) például 63-88%-os arányban regeneráltak GFLV-mentes egyedeket ugyanekkora (25 mg/l) ribavirin koncentráció alkalmazásával, majd később Aiter et al. (2020) már 94%-ban jártak sikerrel. Megemlítendő azonban, hogy Guta et al. (2015) ribavirin és oseltamivir kombinált alkalmazása mellett is csak 7%-os arányban regeneráltak GFLV-mentes egyedeket. A nagy eltéréseket eredményezhette az is, hogy a kezeléseket eltérő genotípusokon végezték.

Korábbi GLRaV-1 eltávolítására irányuló kísérletek között akadt olyan, amely teljesen sikertelenül zárult, de volt olyan is, amely 100%-os hatékonyságot írt le (Guta et al. 2010; Eichmeier et al. 2019). Ezeket az eltéréseket jelen esetben is okozhatta az eltérő genotípus vagy a kezelési idő hosszának különbsége is. A GLRaV-1 fertőzés eltávolítása ebben a kísérletben 3,9 és 4,3% közötti hatékonysággal zárult. A

‘Kadarka’ P131 A1 esetében, ahol gyökereztetés nélküli és előgyökereztetéssel átesett hajtásokat is kezeltem, nem volt nagymértékű eltérés az eredmények között (19. táblázat). Ez tovább erősíti azt a megfigyelést, miszerint a ribavirin kezelésre érzékenyebben reagáló fajták esetében a hajtások túlélése és a leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációja előgyökereztetéssel optimalizálható anélkül, hogy a ribavirin vírusmentesítési hatását elveszítenénk.

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

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

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

Az újabban leírt GPGV (Giampetruzzi et al. 2012) szőlőből való eltávolítását ribavirin használatával korábban Kominek et al. (2016) 91,6%-os hatékonysággal tudták kivitelezni. Esetünkben a kezelést követően nem történt hajtáscsúcstenyésztés, hanem kizárólag néhány centiméteres hajtásokkal való mikroszaporítás. Ebben a kísérletben két genotípusból is nagyobb, 97 és 100%-os hatékonysággal tudtam eltávolítani a vírust. Ennek oka valószínűleg a 2 mm-es hajtáscsúcsok használata, amely még tovább csökkentette a vírus előfordulásának valószínűségét.

A ribavirin kezelést követő RT-PCR vizsgálatok alapján elmondható, hogy a GRSPaV-t az összes fertőzött genotípusból legalább 50%-os hatékonysággal tudtam eltávolítani. A ‘Kadarka’ P131 A1 esetében a vírustól mentes egyedek aránya egyaránt 50% volt függetlenül attól, hogy a kezelt hajtásokat előgyökereztettem-e (17. táblázat). Ez azt jelenti, hogy a ribavirin antivirális hatásai az előgyökereztetett hajtások kezelése során is megmaradnak, így növelhető a kezelt hajtások túlélésnek aránya és a 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációjának sikeressége is.

A GVA eltávolítása 6,4%-os sikerrel zárult, amely igen alacsony arány. Korábbi kutatások alapján, más kutatók már 100%-os sikerrel is eltávolították, ugyanakkor Guta et al. (2014) 40 mg/l ribavirin és 40 mg/l oseltamivir együttes

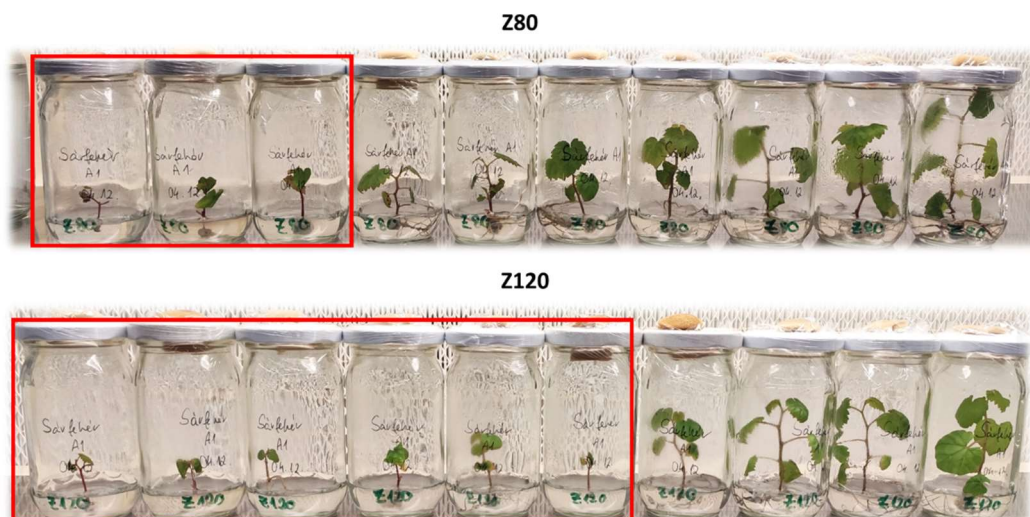
alkalmazásával is csak 9%-ban tudták mentesíteni a fajtáikat, de a növények túlélési aránya igen alacsony volt és két különböző szer negatív hatásaival is számolniuk kellett.

#### **5.3.3.3. A ribavirin viroidmentesítési hatásának vizsgálata a kezelt fajtákon**

A viroidok ribavirinnel történő eltávolítására irányuló kísérletekből írott publikációk száma igen alacsony. Szőlő esetében Eichmeier et al. (2019) azt a megállapítást tették, hogy a módszer az ő kísérleti körülményeik között nem alkalmas viroidfertőzések ellen, hiszen az összes regenerált növényvonaluk fertőzött maradt a két vizsgált viroiddal (GYSVd-1 és HSVd). Ez a megfigyelés a saját kutatásunk tapasztalatai alapján megerősítést nyert, hiszen a GYSVd-1 és a HSVd viroidok eltávolítása kizárólag ribavirin alkalmazásával jelen kísérletben is sikertelenül zárult az összes fajta esetében.

#### **5.3.4. A kijelölt fajták zidovudinnal történő kemoterápiás kezelése**

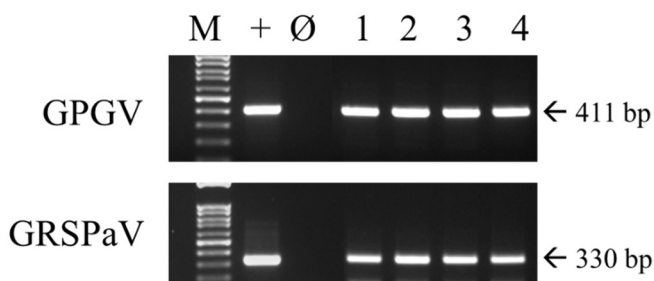
A zidovudint korábban nem alkalmazták szőlő vírusok eliminálására, így a kísérleteket egy megfelelő, a hajtásokra nézve nem fitotoxikus koncentráció keresésével kezdtem. Erre a célra 10, 20, 30, 40, 80 és 120 mg/l zidovudint tartalmazó táptalajra helyeztem 7-10 darab GRSPaV és GPGV vírusokkal fertőzött ‘Sárfehér’ A1 hajtást. A kontroll hajtásokhoz hasonlóan az összes kezelt hajtás túlélte a 3 hónapos kezelést. A 10, 20, 30 és 40 mg/l-es koncentrációt alkalmazva a zidovudin nem fejtett ki negatív hatást a növények vigorjára, sőt a 10 mg/l-es koncentrációval kezelt hajtások gyorsabban is növekedtek és hamarabb is gyökereszkedtek a kezeletlen hajtásoknál, amit más kutatók is megfigyeltek már pl. fokhagyma vagy őszibarack esetében (Kudelková et. al 2013; Pavelkova et. al 2015). A 10 db 80 mg/l-rel kezelt hajtás közül 1 hónap elteltével 3 már lényegesen lassabb növekedést és gyökeresedési sebességet mutatott, így nem is voltak megfelelő méretűek a 2 mm-es hajtáscsúcsok leválasztásához. Ez az arány a 120 mg/l-el kezelt hajtások esetében a duplájára növekedett, tehát az ennél magasabb koncentrációkkal való kezelés már nem javasolt (17. ábra).



**17. ábra:** A zidovudinnal kezelt Sárféher A1 hajtások állapota 1 hónap elteltével

Z80: 80 mg/l zidovudinnal kezelt hajtások; Z120: 120 mg/l zidovudinnal kezelt hajtások; pirossal bekeretezve az elégtelen növekedést és gyökeresedést mutató hajtások.

A zidovudin vírusmentesítési hatásának vizsgálata érdekében RT-PCR tesztek végeztem. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy még a 3 hónapos 120 mg/l-es koncentrációval történő kezelés hatására sem tudtam mentesíteni a ‘Sárféher’ A1 klónt a GRSPaV és a GPGV vírusoktól (18. ábra).



**18. ábra:** A 3 hónapos 120 mg/l-es zidovudin kezelésen átesett Sárféher A1 növények RT-PCR eredménye

M: mólsúly marker, +: pozitív kontroll, Ø: null kontroll, 1.-4.: 3 hónap 120 mg/l-es zidovudin kezelésen átesett Sárféher A1 növényvonalak

A következő kísérletben GRSPaV és GLRaV-1 vírusokkal fertőzött ‘Kadarka’ P131 A1 hajtáscsúcsokat kezeltem, hogy egy másik genotípuson is vizsgálni tudjam a szer hatásait. A kezelési koncentráció jelen esetben az előző kísérlet tapasztalatai alapján került kiválasztásra, mivel ott a 80 mg/l-es koncentráció már növekedésgátlást okozott, de a 40 mg/l még nem, így végül 50 mg/l-t alkalmaztam, amit korábban mandarin esetében már szintén alkalmaztak (Ohta et al. 2011). A növények növekedésére és gyökeresedésére ez a zidovudin koncentráció látszólag nem volt negatív hatással, azonban a kísérlet végén azt találtam, hogy a zidovudin a ‘Kadarka’

P131 A1 esetében sem tudta eliminálni a GRSPaV és GLRaV-1 fertőzéseket 3 hónap kezelést követően. Ezt látva a kizárólag zidovudinnal történő kezeléseket felfüggesztettem.

### 5.3.5. A kijelölt fajták ribavirinnel és zidovudinnal történő kombinált kezelése

A zidovudinnal történő kezelés önmagában sikertelennek bizonyult, így következő lépésben a ribavirinnel történő kombinált alkalmazásának vírusmentesítési hatását vizsgáltam. Ehhez a kísérlethez olyan vírusokkal fertőzött fajtákat választottam, amelyeket korábban kizárólag ribavirin használatával nem, vagy csak nagyon ritkán tudtam eliminálni. Ennek érdekében a 'Furmint' P51 A1 és a 'Furmint' P51 ÜH2 fajtákat kezeltem 25 mg/l ribavirinnel és 50 mg/l zidovudinnal.

Megfigyeléseim alapján a két vegyszer kombinált alkalmazásával kezelt növények ugyanolyan ütemben növekedtek, mint a kizárólag ribavirinnel kezelt növények és életképességük is hasonló volt. (19. ábra).



**19. ábra:** A ribavirin és a zidovudin kombinált kezelésében résztvevő Furmint P51 A1 növények

Egy hónap elteltével a 2 mm-es hajtáscsúcsok már leválaszthatóak voltak, két hónap elteltével pedig az összes kezelt növény életképes maradt. Az RT-PCR tesztek alapján elmondható, hogy a GLRaV-1 és a GVA vírusok mentesítése 2 hónap kezelés után is sikertelen volt, valamint a GFkV, GPGV és GRSPaV vírusok tekintetében nem regeneráltam több vírusmentes egyedet a ribavirin és a zidovudin kombinált használatával, mint a ribavirin kezelés során. A GFLV-t a ribavirin és a zidovudin kombinált kezelésével viszont egyetlen esetben sikeresen eltávolítottam a 'Furmint'

P51 ÜH2 klónból, amit kizárólag ribavirinnel használatával korábban nem tudtam elérni (20. táblázat).

A viroidok tekintetében a GYSVd-1 és a HSVd eltávolítása nem járt sikerrel a ‘Furmint’ P51 A1 klón esetében, ugyanakkor előbbi a ‘Furmint’ P51 ÜH2 klónból 1 esetben sikeresen eltávolítottam, amit korábban csak a ribavirin alkalmazásával nem tudtam megtenni.

**20. táblázat:** A ribavirin és a zidovudin kombinált kezelés után regenerált vírusmentes Furmint egyedek aránya

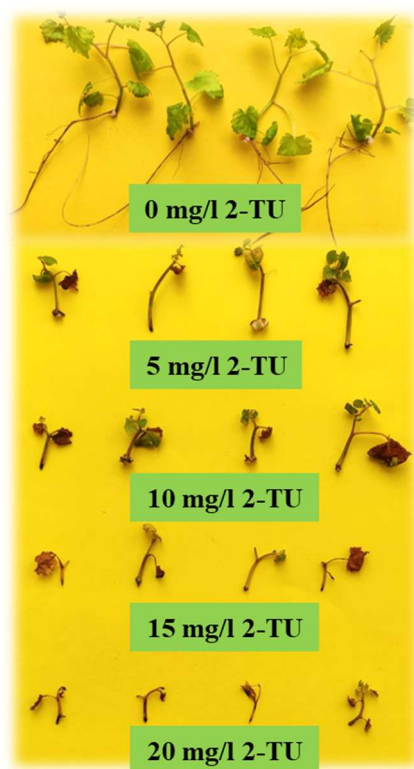
| Fajta/klón      | Kezelés | GFkV       | GFLV       | GLRaV-1   | GPGV       | GRSPaV     | GVA       | GYSVd-1    | HSVd      |
|-----------------|---------|------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|------------|-----------|
| Furmint P51 A1  | RZ0     | 0/8 (0 %)  | n.t        | 0/8 (0 %) | 0/8 (0 %)  | 0/8 (0 %)  | 0/8 (0 %) | 0/8 (0 %)  | 0/8 (0 %) |
|                 | R25     | 4/8 (50 %) | n.t        | 0/8 (0 %) | 6/8 (75 %) | 2/8 (25 %) | 0/8 (0 %) | 0/8 (0 %)  | 0/8 (0 %) |
|                 | R25+Z50 | 5/8 (63 %) | n.t        | 0/8 (0 %) | 5/8 (63 %) | 0/8 (0 %)  | 0/8 (0 %) | 1/8 (13 %) | 0/8 (0 %) |
| Furmint P51 ÜH2 | RZ0     | n.t        | 0/8 (0 %)  | n.t       | n.t        | 0/8 (0 %)  | n.t       | 0/8 (0 %)  | n.t       |
|                 | R25     | n.t        | 0/8 (0 %)  | n.t       | n.t        | 7/8 (88 %) | n.t       | 0/8 (0 %)  | n.t       |
|                 | R25+Z50 | n.t        | 1/8 (13 %) | n.t       | n.t        | 2/8 (25 %) | n.t       | 0/8 (0 %)  | n.t       |

RZ0: kezeletlen; R25: 25 mg/l ribavirin; R25 + Z50: 25 mg/l ribavirin és 50 mg/l zidovudin; n.t.: nem tesztelt;

### 5.3.6. A kijelölt fajták 2-thiouracillal történő kemoterápiás kezelése

A 2-TU-lal történő kezeléseket is ‘Sárfehér’ A1 fajtán kezdtem el. Szakirodalmi adatok alapján a 2-TU erős fitotoxicitást mutatott több növényfaj esetében is pl. begónia, mandarin, burgonya (Verma et al. 2005; Asghar et al. 2007; Singh 2015), valamint 25 mg/l felett a kezelt hajtások jelentős része el is pusztult. A hajtásokat éppen ezért 5, 10, 15 és 20 mg/l-el kezeltem és vizsgáltam, hogy melyik az a koncentráció, amelyik még a szőlő hajtások pusztulása nélkül alkalmazható *in vitro* körülmények között.

A hajtáscsúcsok 1 hónap elteltével nem mutattak számottevő növekedést, ezért a kísérlet kiértékelésével 2 hónapot vártam (20. ábra).

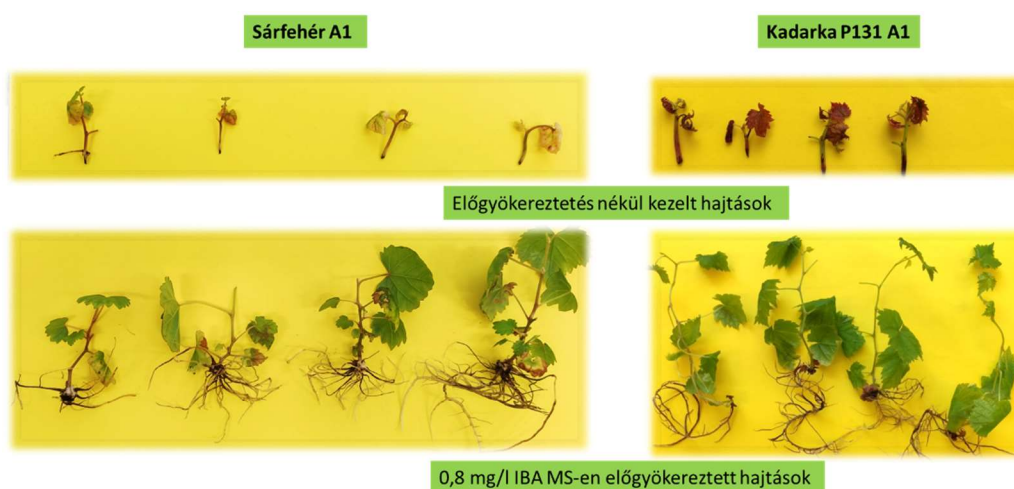


**20. ábra:** A 2-TU-lal kezelt Sárféher A1 hajtáscsúcsok állapota 2 hónap kezelést követően

Azt találtam, hogy már az 5 mg/l-es koncentráció is 100%-os fitotoxicitást okozott, amely a nagyobb koncentrációk felé haladva egyre hamarabb jelentkezett. Az 5 és 10 mg/l-es kezelés esetében a hajtások egy minimális növekedést mutattak, valamint a szárak alsó részén néhol megindult a gyökeresedési folyamat, ám később ez teljesen mértékben megállt. A hajtások nagy részén volt még élő levél, de erőteljes elhalás kezdődött. A 15 és 20 mg/l-es kezelések esetében már egyáltalán nem volt érzékelhető növekedés, a gyökeresedés nem indult meg és a levelek is szinte teljes mértékben elhaltak. Összességében kijelenthető, hogy a kezelt hajtások egyetlen esetben sem voltak alkalmasak a 2 mm-es hajtáscsúcsok leválasztására, mivel 2 hónap elteltével gyakorlatilag 100%-ban elpusztultak.

A következő kísérletben 10 mg/l 2-TU-lal kezeltem 'Sárféher' A1 és 'Kadarka' P131 A1 hajtásokat. Ebben az esetben egyforma mennyiségű előgyökereztetésen átesett és át nem esett hajtást is kezeltem. A kísérlet célja az volt, hogy megvizsgáljam, hogy a ribavirinhez hasonlóan a 2-TU kezelés hajtásokra gyakorolt negatív hatásai enyhíthetők-e azok előgyökereztetésével. Az eredmények a 21. ábrán láthatók. Szembetűnő, hogy már 1 hónap elteltével is lényegesen erőteljesebb növekedés figyelhető meg az előgyökereztetett hajtásokon, amely a 2. hónapra fokozódott (M5 ábra).

A gyökeresedés tekintetében azt találtam, hogy az előgyökereztetésen át nem esett hajtások közül a kezelés során mindössze 1 db ‘Sárfehér’ hajtás tudott önállóan gyökérnyúlványt képezni, míg az előgyökereztetésen átesett hajtások mindegyike teljesen kifejlett gyökérzetet tudott kialakítani (21. ábra). Az előgyökereztetésen átesett hajtások megfelelő ütemben növekedtek és már egy hónap kezelés után leválasztottam a 2 mm-es hajtáscsúcsokat és növényregenerációt kezdeményeztem. Mindezek alapján arra következtettem, hogy a 2-TU káros hatásai a hajtások előgyökereztetésével enyhíthetőek.



**21. ábra:** A 10mg/l 2-TU-lal kezelt Sárfehér A1 és Kadarka P131 A1 hajtások/növények állapota 2 hónap elteltével

Később a 2 mm-es hajtáscsúcsokból regenerált egyedek RT-PCR tesztelése kimutatta, hogy a GLRaV-1, GPGV és GRSPaV vírusok továbbra is kivétel nélkül jelen voltak (M6 ábra; 21. táblázat).

A következő kísérletben a 2-TU koncentrációját 20 mg/l-re emeltem és előgyökereztetett ‘Sárfehér’ A1 hajtásokat kezeltem vele. A kezelt hajtások 1 hónap elteltével nagyjából harmad akkora növekedést produkáltak, mint a kezeletlenek, de mindegyik életképes maradt. A 2. hónap végére azonban 10-ből 2 hajtás elpusztult. A 2 mm-es hajtáscsúcsok leválasztása mindkét hónapban megtörtént és a regenerált egyedeket RT-PCR-rel teszteltem (M7 ábra). A vírusok eliminálása ezúttal is sikertelennek bizonyult (21. táblázat).

Az utolsó kísérletben 20 mg/l-es 2-TU koncentrációval kezeltem a ‘Furmint’ P51 ÜH2 előgyökereztetett hajtásait is. A növekedésben és gyökérképzésben ugyanazt a képet mutatta, mint a ‘Sárfehér’ A1 fajta. Az RT-PCR eredmények (M8 ábra) ebben az esetben is rámutattak, hogy a 2-TU jelen kísérleti körülmények között a GRSPaV,

GPGV és a GLRaV-1 vírusokhoz hasonlóan a GFLV-t sem képes eltávolítani a kezelt növényekből.

**21. táblázat:** A 2-thiouracillal végzett kísérletek során regenerált növények RT-PCR eredményei

| Fajta/klón      | Kezelés hossza: | 1 hónap   |           | 2 hónap   |           |
|-----------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                 | Kezelés         | GRSPaV    | GPGV      | GRSPaV    | GPGV      |
| Sárfehér A1     | TU0             | n.t       | n.t       | n.t       | n.t       |
|                 | TU5             | n.t       | n.t       | n.t       | n.t       |
|                 | TU10            | n.t       | n.t       | n.t       | n.t       |
|                 | TU15            | n.t       | n.t       | n.t       | n.t       |
|                 | TU20            | n.t       | n.t       | n.t       | n.t       |
|                 | TU0             | 0/8 (0 %) | 0/8 (0 %) | 0/8 (0 %) | 0/8 (0 %) |
|                 | TU10            | n.t       | n.t       | n.t       | n.t       |
|                 | GYTU10          | 0/8 (0 %) | 0/8 (0 %) | 0/8 (0 %) | 0/8 (0 %) |
|                 | TU0             | n.t.      | n.t.      | 0/8 (0 %) | 0/8 (0 %) |
| GYTU20          | n.t.            | n.t.      | 0/8 (0 %) | 0/8 (0 %) |           |
|                 |                 | GRSPaV    | GLRaV-1   | GRSPaV    | GLRaV-1   |
| Kadarka P131    | TU0             | 0/3 (0 %) | 0/3 (0 %) | 0/3 (0 %) | 0/3 (0 %) |
|                 | TU10            | n.t.      | n.t.      | 0/1 (0 %) | 0/1 (0 %) |
|                 | GYTU10          | 0/3 (0 %) | 0/3 (0 %) | 0/7 (0 %) | 0/7 (0 %) |
|                 |                 | GRSPaV    | GFLV      | GRSPaV    | GFLV      |
| Furmint P51 ÜH2 | TU0             | n.t.      | n.t.      | 0/6 (0 %) | 0/6 (0 %) |
|                 | GYTU20          | n.t.      | n.t.      | 0/6 (0 %) | 0/6 (0 %) |

TU0: 0 mg/l 2-thiouracil; TU5: 5 mg/l 2-thiouracil; TU10: 10 mg/l 2-thiouracil; TU20: 20 mg/l 2-thiouracil; GYTU10: előgyökereztetés (0,8 mg/l IBA), majd 10 mg/l 2-thiouracil; GYTU20: előgyökereztetés (0,8 mg/l IBA), majd 20 mg/l 2-thiouracil; n.t.: nem tesztelt

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

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

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

A ribavirinnel folytatott kezelések során a GFLV eliminálása sikertelen volt, amire magyarázatot adhat, hogy ez nem egy floémre korlátozott vírus. A kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsa ennek megfelelően nagyobb eséllyel maradhatott fertőzött. Ez azonban ellentmondásban van Aiter et al. (2020), valamint Weiland et al. (2003) publikációival, ahol is 75 és 94%-os hatékonysággal szabadultak meg a GFLV-től. A 'Kadarka' P131 klón esetében beiktatott előgyökereztető lépés jelentős

mértékben javította a ribavirin kezelés alatt álló hajtások túlélési arányát, amit később a 2-thiouracil kezelések során is alkalmazni tudtunk. Ez új lehetőségeket nyithat az erős fitotoxicitást mutató potenciális antivirális szerek alkalmazásában. Ennek oka lehet, hogy az így előgyökereztetett hajtások, már gyökéren keresztül, lassabban tudták felvenni a ribavirint, mint a szárukon friss vágást viselő hajtások, így vegyszer negatív hatásai sem olyan intenzitással érték azokat. Elképzelhető, hogy egyéb, védelmi funkciót is ellátó metabolitok (pl. szalicilsav, jazmonátok, antioxidánsok) is nagyobb mennyiségben halmozódtak fel ezen hajtásokban, de ennek kimutatására további, növényélettani vizsgálatok elvégzése lenne szükséges.

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

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

A RNS genommal rendelkező kórokozók kimutatását megelőző cDNS szintézis sikeressége kulcsfontosságú a nukleinsav alapú diagnosztikai módszereknél. Több nukleinsav kivonási protokoll esetében is előfordulhat azonban, hogy a minták maradék genomi DNS-t tartalmaznak, így a konvencionális referenciagén primerek fals-pozitív eredményt adhatnak az RT-PCR-t követően. Az intronokat tartalmazó génszakaszra specifikus primerek jó alternatívát kínálnak erre. Költséges RNS izoláló Kit-ek és DNáz kezelés nélkül is igazolják sikeres cDNS szintézist. Amennyiben azonban a gDNS és cDNS eredetű fragmentumok egyértelmű szeparálódását szeretnénk látni a gélelektroforézist követően, úgy a több és/vagy hosszabb intront tartalmazó génszakaszokra specifikus primer párok alkalmazása célszerű. A jövőben a doktori dolgozat keretén belül vizsgált háztartási géneken kívül a szintén széleskörűen célzott *UBQ*, a *PP2A* (*Protein Phosphatase 2A*) vagy akár a *CYP* (*Cyclophilin*) gének intront tartalmazó régióira tervezett primerek tesztelése hasonló

körülmények között jó kutatási alapot nyújthat, de a már tesztelt primer párok kipróbálása stresszhatásnak kitett szőlőnövényből származó mintákon is jó kutatási irány lehet, mivel pl. a *tubulin* gén hő- és szárazságstressz alatt instabilabb eredményt adhat (Gu et al. 2011). Mindezek figyelembevételével az efféle, új primerek számának növelése hasznos eszköztárat biztosíthat a változatos körülmények között végzett diagnosztikai vizsgálatokhoz, legyen szó akár a vegetatív, akár a nyugalmi időszakban megszedett minták teszteléséről.

## 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A szomatikus embriogenezis szőlő vírus-, és viroidmentesítési hatékonyságát elsőként vizsgáltuk meg kis RNS-ek nagyátersztőképességű szekvenálásával. A szomatikus mebrriogenezis ‘Ottonel muskotály’ klónok, valamint a ‘Trilla’ és ‘Szirén’ fajták esetében is kiemelkedő vírusmentesítési hatékonysággal bírt, míg a viroidok eltávolításában kevésbé volt hatékony. Elsőként publikáltuk továbbá az eredményt, miszerint a szomatikus embriogenezis hatékony a GPGV, GSyV-1, GRVfV és a GVT vírusok eltávolítására is.
2. Az antivirális kezelések során azt találtuk, hogy a kezelni kívánt hajtások 0,8 mg/l IBA-val történő 1-2 hetes előgyökereztetésével lényegesen növelhető a ribavirin (és 2-thiouracil) kezelést túlélő hajtások száma, illetve a kezelést követően leválasztott 2 mm-es hajtáscsúcsok regenerációs aránya is. Mindemellett a ribavirin hatása továbbra is megmaradt.
3. Az általunk elsőként alkalmazott intron(oka)t tartalmazó génszakaszra specifikus *aktin*, *EF1α*, *PEP* és *tubulin* primerek használatával sikeresen el tudtuk különíteni a genomi DNS-ről és a cDNS-ről amplifikált fragmentumokat 24 szőlőfajta (alany, nemes, fehér és kék fajták) levélmintájának esetében. Ezt követően az *aktin*, *EF1α* és *tubulin* primer párokkal 12 szőlőfajta eltérő szöveteiből (levél, levélnyél, hánckaparéék) származó minták esetében is megtettük ugyanezt, amely eredmény ezen primerek megbízhatóságát mutatja és alkalmazásukkal egyértelműen igazolható a sikeres cDNS szintézis.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A szőlő Magyarországon is kiemelkedő jelentőségű gazdasági növény, amelyet számos patogén képes fertőzni, köztük a viroidok, vírusok, fitoplazmák, baktériumok és gombák. Vegetatívan szaporított növény, így esetében a kórokozók szaporítóanyaggal történő terjedése komoly problémát jelent. Mivel a szőlőültetvényekben nem rendelkezünk hatékony védekezési módszerrel a viroidok és vírusok ellen, ezért sokszor bonyolult szövettenyésztési eljárásokat kell alkalmaznunk az egészséges szaporítóanyag létrehozásának érdekében. A merisztéma tenyészetek, a szomatikus embriogenezis és a növényi kemoterápia is hatékonyan alkalmazható vírusmentesítési módszerek.

A vírusmentesítési módszerek különböző szőlőfajtákon való hatékonyságának folyamatos vizsgálata és összehasonlítása fontos feladat. Számos publikáció született a merisztéma tenyészetek és a szomatikus embriogenezis vírusmentesítési hatékonyságáról, de ezek túlnyomó részt ELISA vagy RT-PCR alapú módszerek használatával történtek. A kis RNS HTS megjelenésével lehetőség nyílt a fajtákban jelen lévő kis RNS alapú választ kiváltó kórokozók egyidejű vizsgálatára. Munkám másik célja volt a merisztéma tenyészetek és a szomatikus embriogenezis vírus- és virodimentesítési hatékonyságának összehasonlítása a kis RNS HTS segítségével. Ennek érdekében két ‘Ottonel muskotály’ klónon, valamint a ‘Trilla’ és a ‘Szirén’ fajtákon végeztem el a két vizsgált mentesítési módszert. Az eredmények azt mutatták, hogy mindkettő alkalmas a GPGV, GRSPaV, GSYV-1 és GVT vírusok eliminálására, ezen felül a HSVd és GYSVd-1 viroidok ellen is alkalmazhatóak. A szomatikus embriogenezis ezen felül hatékony volt GFkV és GRVfV eltávolításában is. Vírusmentesítési hatékonysága legtöbbször 100 %-os volt és rendszerint felülmúlta a merisztéma tenyészetekét. A viroidok esetében az eredmény nem volt ilyen egyértelmű, ugyanis a szomatikus embriogenezissel regenerált ‘Trilla’ egyedek túlnyomó része fertőzött maradt a GYSVd-1-gyel.

A növényi kemoterápiára használt antivirális szerek palettája folyamatosan bővül. A legelterjedtebben használt ilyen szer a ribavirin, amelyről már számos publikáció született. A kutatók a zidovudin és a 2-thiouracil használatával is értek el jó eredményeket, de szőlő esetében még nem próbálták ki. A zidovudin alkalmasnak bizonyult fokhagyma, őszibarack, burgonya és mandarint fertőző vírusok eliminálására, a 2-TU pedig hatékony volt begónia, burgonya és mandarin esetében.

Átfogóbb képet szerettem volna kapni arról, hogy a ribavirin milyen hatékonysággal tudja eltávolítani a szőlő vírusokat és viroidokat, így kezelést végeztem több, különböző vírussal fertőzött szőlő fajta/klón nagyszámú *in vitro* hajtását felhasználva. Ezen felül zidovudin és a 2-TU kezeléseket terveztem beállítani ugyanezen fajtákon, hogy a szőlővírusok elleni hatékonyságukat vizsgáljam.

A ribavirin kezeléseket után azt találtam, hogy a kezelt genotípusokból nagy hatékonysággal képes eltávolítani a GFkV, GPGV és GRSPaV vírusokat, míg a GVA és a GLRaV-1 eliminálásában jóval gyengébben teljesített. A GFLV eltávolítása a kísérlet végeztével teljesen sikertelennek bizonyult. A 'Kadarka' P131 A1 hajtások nagy része elpusztult a kezeléseket hatására, de egy előgyökereztetési lépés beiktatásával lényegesen javítani tudtam a túlélési arányukon.

A zidovudin egyik vizsgált koncentrációban sem volt képes a tesztelt vírusok eliminálására. A 2-TU a kísérletek során rendkívül fitotoxikusnak bizonyult. Habár a hajtások túlélését a ribavirinnel is alkalmazott előgyökereztetéssel lényegesen javítani tudtam, de az RT-PCR vizsgálatokat követően nem volt kimutatható vírusmentesítési hatása.

A különböző mentesítési módszerekkel előállított egyedek vírusmentességét vizsgálni kell, amelyre az RT-PCR alkalmas módszer. A vírusdiagnosztika előtt egy megfelelő referencia gént kell választanunk. Erre a célra konvencionálisan használt referenciagén primerek vannak használatban, amelyek azonban kizárólag exont tartalmazó génszakaszra specifikusak. Munkám következő célja volt olyan referenciagén primerek tesztelése, amelyek egy vagy több intront tartalmazó génszakaszra specifikusak, így használatukkal elméletben elkülöníthetők a gDNS és cDNS eredetű fragmentumok. Első lépésben az *aktin*, *EF1α*, *GAPDH*, *PEP* és *tubulin* génekre specifikus primerek expresszióját teszteltem 24 szőlőfajta levélmintáin. Ezt követően az *aktin*, *EF1α* és *tubulin* primerekkel további kísérleteket végeztem 12 fajta *in vitro* levelének, szabadföldi levelének és levéllyelének, valamint hánckaparákának tesztelésével. A primerek célszekvenciái nagyfokú konzerváltságot mutattak az összes fajta és szövettípus esetében és alkalmazásukkal egyértelműen elkülöníthetők voltak a rövidebb cDNS eredetű fragmentumok és a nagyobb gDNS eredetű fragmentumok. Ennek oka, hogy az mRNS érése során az intronok kivágódtak, így a cDNS már nem tartalmazza azokat. Ezekkel a primerekkel tehát a DNS-t és RNS-t is tartalmazó mintákból történő cDNS szintézis sikeressége is igazolható költséges DN-áz enzimikus kezeléseket nélkül.

## 9. SUMMARY

Grapevine is a prominent horticultural plant also in Hungary and can be infected by numerous pathogens like viroids, viruses, phytoplasmas, bacteria and fungi. It is a vegetatively propagated plant, thus spread of the pathogens by the propagation material poses a serious problem. As we don't have any useful methods to protect against the viroids and viruses in the vineyards we often have to apply complicated tissue culture techniques in order to produce healthy propagation materials. Meristem culture, somatic embryogenesis and plant chemotherapy are also effectively applicable virus elimination methods.

The continuous monitoring and comparison of different virus elimination methods is an important task. Several publications were born about the virus elimination efficiency of meristem cultures and somatic embryogenesis, but most of them were performed with ELISA or RT-PCR. By the appearance of the small RNA HTS there is an opportunity to simultaneously examine all the pathogens giving small RNA based response presented in the cultivars. The next aim of my work was to compare the virus and viroid elimination efficiency of meristem culture and somatic embryogenesis using small RNA HTS. For this purpose I have performed experiments with the two examined sanitation methods on two 'Muscat Ottonel' clones and on 'Trilla' and 'Szirén' cultivars. The results have shown that both methods were successful in the elimination of GPGV, GRSPaV, GSyV-1 and GVT viruses and are also applicable against HSVd and GYSVd-1 viroids. On top of that SE was effective in the elimination of GFkV and GRVFV. Its virus elimination efficiency was most frequently 100% and consistently outperformed that of meristem cultures. In the case of viroids the result wasn't that obvious, because most of the 'Trilla' individuals regenerated by somatic embryogenesis remained GYSVd-1 infected.

The palette of the antiviral drugs used for plant chemotherapy is constantly expanding. The most common one of these drugs is ribavirin about which numerous publications were born. Scientists have also achieved good results using zidovudine and 2-thiouracil, but nobody has ever tried them out on grapevine. Zidovudine proved to be suitable for the elimination of garlic, peach, potato and mandarin infecting viruses and 2-TU was effective in the case of begonia, potato and mandarin.

I wanted to obtain a more comprehensive picture of how effectively can the ribavirin eliminate the grapevine viruses and viroids, so I have performed treatments on high number of *in vitro* shoots of grapevine species/clones infected with different

viruses. On top of that I was planning to set up experiments with zidovudin and 2-TU on the same cultivars with the aim of examining their effects against grapevine viruses.

After the ribavirin treatments I have found that it can eliminate the GFkV, GPGV and GRSPaV viruses very effectively from the treated genotypes while it has performed poorly in the case of GVA and GLRaV-1 elimination. The elimination of GFLV was totally unsuccessful at the end of the experiments. A big portion of the treated 'Kadarka' P131 A1 shoots have died as a result of the treatments, but by the installation of a pre-rooting step I was able to improve their survival rate.

Zidovudine was unable to eliminate the tested viruses at any concentrations examined. 2-TU proved to be very phytotoxic during the experiments. Although I was able to improve the survival rate of the shoots with the pre-rooting step as seen in the case of ribavirin but after the RT-PCR tests it had no detectable virus elimination effect.

The virus-free status of the individuals produced by different sanitation methods have to be monitored and for this purpose RT-PCR is a suitable method. Prior to virus diagnostics we have to choose a proper reference gene. For this purpose conventionally used reference gene primers are employed, however are exclusively specific to exon-containing gene segments. The next aim of my work was to test primers that are specific to gene segments containing one or two introns so in theory, with their use it is possible to separate the fragments derived from gDNA and cDNA. In the first step I have tested the operation of the primers specific to *actin*, *EF1 $\alpha$* , *GAPDH*, *PEP* and *tubulin* on the leaves of 24 fieldgrown grapevine cultivars. Then with the *actin*, *EF1 $\alpha$* , and *tubulin* primers I have performed additional experiments testing the *in vitro* leaves, fieldgrown leaves, petioles and wooden scrappings of 12 cultivars. The target sequences of the primers have shown high degree of conservation among the tested cultivars and tissues and the shorter cDNA derived fragments were clearly distinguishable from the bigger ones derived from gDNA. The reason of this is that the introns are excised from the mRNAs during its maturing, thus the cDNA doesn't contain them anymore. So with these primers the success of the cDNA synthesis from samples containing both RNA and DNA can be verified without expensive DNase treatment.

## 10. MELLÉKLETEK

### M1. Irodalomjegyzék

- Abolmaaty, A., Vu, C., Oliver, J. & Levin, R. E. (2000): Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. *Microbios*, 101(400):181-189.
- Acanda, Y., Martínez, Ó., González, M. V., Prado, M. J., & Rey, M. (2015). Highly efficient in vitro tetraploid plant production via colchicine treatment using embryogenic suspension cultures in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Mencía). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123, 547-555.
- Acanda, Y., Prado, M. J., González, M. V., & Rey, M. (2013). Somatic embryogenesis from stamen filaments in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Mencía): changes in ploidy level and nuclear DNA content. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49, 276-284.
- Adiputra, J., Jarugula, S., & Naidu, R. A. (2019). Intra-species recombination among strains of the ampelovirus Grapevine leafroll-associated virus 4. *Virology journal*, 16(1), 1-13.
- Adkar-Purushothama, C. R., Kanchepalli, P. R., Yanjarappa, S. M., Zhang, Z., & Sano, T. (2014). Detection, distribution, and genetic diversity of Australian grapevine viroid in grapevines in India. *Virus genes*, 49(2), 304-311.
- Adkar-Purushothama, C. R., & Perreault, J. P. (2020). Current overview on viroid–host interactions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 11(2), e1570.
- Aiter, N., Lehad, A., Haddad, B., Taibi, A., Meziani, S., Rabhi, M. L., ... & Chaouia, C. (2020). Sanitation of autochthonous grapevine varieties from Algeria by chemotherapy. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 55(1), 43-50.
- Alcolea Palafox, M., Franklin Benial, A. M., & K. Rastogi, V. (2019). Biomolecules of 2-Thiouracil, 4-Thiouracil and 2, 4-Dithiouracil: A DFT Study of the Hydration, Molecular Docking and Effect in DNA: RNAMicrohelixes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3477.
- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., ... & Fuchs, M. (2004). Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 183-195.
- Asghar, A., & Singh, G. (2007). Production of Indian citrus ringspot virus free plants of Kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. *Journal of Central European Agriculture*.
- Banilas, G., Korkas, E., Englezos, V., Nisiotou, A. A., & Hatzopoulos, P. (2012). Genome-wide analysis of the heat shock protein 90 gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(1), 29-38.
- Barker, J. (2024) State of the vine and wine sector, International Organisation Of Vine And Wine (OIV) Press Conference, 25 April 2024

- Barta, A., Sum, I., & Föglein, F. J. (1981). 2-Thiouracil does not inhibit TMV replication in tobacco protoplasts. *Journal of General Virology*, 56(1), 219-222.
- Basso, M. F., Fajadro, T. V., and Saldarelli, P. (2017). Grapevine virus diseases: economic impact and current advances in viral prospection and management. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(1).
- Bayati, S., Shams-Bakhsh, M., & Moini, A. (2011). Elimination of Grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(3), 442-450.
- Bell, V. A., Lester, P. J., Pietersen, G., & Hall, A. J. (2021). The management and financial implications of variable responses to grapevine leafroll disease. *Journal of Plant Pathology*, 103(1), 5-15.
- Bettoni, J. C., Costa, M. D., Gardin, J. P. P., Kretzschmar, A. A., & Pathirana, R. (2016). Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38.
- Bi, W. L., Hao, X. Y., Cui, Z. H., Pathirana, R., Volk, G. M., & Wang, Q. C. (2018). Shoot tip cryotherapy for efficient eradication of grapevine leafroll-associated virus-3 from diseased grapevine in vitro plants. *Annals of Applied Biology*, 173(3), 261-270.
- Binarová, P., & Tuszynski, J. (2019). Tubulin: structure, functions and roles in disease. *Cells*, 8(10), 1294.
- Bisztray, G. D., Civerolo, E. L., Dula, T., Kölber, M., Lázár, J., Mugnai, L., ... and Savka, M. A. (2012). Grapevine pathogens spreading with propagating plant stock: Detection and methods for elimination. *Grapevines: Varieties, cultivation, and management. Nova Science Pub., Hauppauge, NY*, 1-86.
- Borrito-Fernandez, E. G., Sommerbauer, T., Popowich, E., Scharl, A., and Laimer, M. (2009). Somatic embryogenesis from anthers of the autochthonous *Vitis vinifera* cv. Domina leads to Arabis mosaic virus-free plants. *European journal of plant pathology*, 124(1): 171-174.
- Børsting, C., Sanchez, J. J., & Morling, N. (2004). Multiplex PCR, amplicon size and hybridization efficiency on the NanoChip electronic microarray. *International Journal of Legal Medicine*, 118, 75-82.
- Bouamama-Gzara, B., Selmi, I., Chebil, S., Melki, I., Mliki, A., Ghorbel, A., ... & Mahfoudhi, N. (2017). Elimination of Grapevine leafroll associated virus-3, Grapevine rupestris stem pitting associated virus and Grapevine virus A from a Tunisian cultivar by somatic embryogenesis and characterization of the somaclones using ampelographic descriptors. *The Plant Pathology Journal*, 33(6), 561.
- Butiuc-Keul, A., & Coste, A. (2023). Biotechnologies and Strategies for Grapevine Improvement. *Horticulturae*, 9(1), 62.

- Butte, A. J., Dzau, V. J. & Glueck, S. B. (2001): Further defining housekeeping, or “maintenance,” genes Focus on “A compendium of gene expression in normal human tissues”. *Physiological genomics*, 7(2):95-96.
- Catalano, C., Abbate, L., Motisi, A., Crucitti, D., Cangelosi, V., Pisciotta, A., ... & Carra, A. (2021). Autotetraploid emergence via somatic embryogenesis in *Vitis vinifera* induces marked morphological changes in shoots, mature leaves, and stomata. *Cells*, 10(6), 1336.
- Chauhan, P., Singla, K., Rajbhar, M., Singh, A., Das, N., and Kumar, K. (2019). A systematic review of conventional and advanced approaches for the control of plant viruses. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* Vol, 7(04), 89-98.
- Chinestra, S. C., Curvetto, N. R., and Marinangeli, P. A. (2015). Production of virus-free plants of *Lilium* spp. from bulbs obtained in vitro and ex vitro. *Scientia Horticulturae*, 194, 304-312.
- Cielinksa, M. (2007). Application of thermo-and chemotherapy in vitro for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. Fruit trees. *J Ornament Plant Res*, 15, 117-124.
- Cihlar, T., & Ray, A. S. (2010). Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antiviral research*, 85(1), 39-58.
- Coker, J. S., & Davies, E. (2003). Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data. *Biotechniques*, 35(4), 740-748.
- Commoner, B., & Mercer, F. L. (1952). The effect of thiouracil on the rate of tobacco mosaic virus biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 35(2), 278-289.
- Constable, F. & Rodoni, B. (2011) Grapevine fleck and associated viruses. Wine Australia for Australian Wine, FactSheet 1-3.
- Crotty, S., Cameron, C., and Andino, R. (2002). Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?. *Journal of molecular medicine*, 80(2), 86-95.
- Czotter, N., Molnar, J., Szabó, E., Demian, E., Kontra, L., Baksa, I., ... & Varallyay, E. (2018). NGS of virus-derived small RNAs as a diagnostic method used to determine viromes of Hungarian vineyards. *Frontiers in Microbiology*, 9, 122.
- De Clercq, E. (2005). Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. *Antiviral research*, 67(2), 56-75.
- Demian, E.; Jaksa-Czotter, N.; Molnar, J.; Tusnady, G.E.; Kocsis, L.; Varallyay, E. (2020). Grapevine rootstocks can be a source of infection with non-regulated viruses. *Eur. J. Plant Pathol.* 156, 897–912.
- Diaz-Lara, A., Golino, D., Preece, J. E., & Al Rwahnih, M. (2020). Development of RT-PCR degenerate primers to overcome the high genetic diversity of grapevine virus T. *Journal of Virological Methods*, 282, 113883.
- Di Serio, F., Owens, R. A., Li, S. F., Matoušek, J., Pallás, V., Randles, J. W., ... & ICTV Report Consortium. (2021). ICTV virus taxonomy profile: Pospiviroidae. *Journal of General Virology*, 102(2), 001543.

- Doroshenko, N., Puzirnova, V., & Troshin, L. (2021). Optimization of grapevine clonal micropropagation. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 937, No. 2, p. 022109). IOP Publishing.
- Du Preez, J., Stephan, D., Mawassi, M., & Burger, J. T. (2011). The grapevine-infecting vitiviruses, with particular reference to grapevine virus A. *Archives of Virology*, 156(9), 1495-1503.
- Du, Z., Chen, J., & Hiruki, C. (2006). Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. *Plant Disease*, 90(2), 185-189.
- Eichmeier, A., Kominkova, M., Pecenka, J., and Kominek, P. (2019). High-throughput small RNA sequencing for evaluation of grapevine sanitation efficacy. *Journal of virological methods*, 267, 66-70.
- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *TRENDS in Genetics*, 29(10), 569-574.
- Engel, E. A., Escobar, P. F., Rojas, L. A., Rivera, P. A., Fiore, N. & Valenzuela, P. D. (2010): A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 163(2):445-451.
- Expósito-Rodríguez, M., Borges, A. A., Borges-Pérez, A., & Pérez, J. A. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC plant biology*, 8(1), 1-12.
- Fajardo, T. V. M., Eiras, M., & Nickel, O. (2018). First report of Hop stunt viroid infecting *Vitis gigas*, *V. flexuosa* and *Ampelopsis heterophylla*. *Australasian plant disease notes*, 13(1), 1-4.
- Farkas, E. M., Czotter, N., Lózsa, R., Dula, T., Ember, I., Várallyay, E., & Szegedi, E. (2014). Conventional PCR primers for the detection of grapevine pathogens disseminated by propagating material. *International Journal of Horticultural Science*, 20(3-4), 69-80.
- Fayek, M. A., Jomaa, A. H., & Shalaby, A. B. A. (2009). Meristem tip culture for in vitro eradication of grapevine leaf roll-associated virus-1 (GLRaV-1) and grapevine fan leaf virus (GFLV) from infected flame seedless grapevine plantlets. *Iniciación a la Investigación*, (4).
- Francki, R. I. B. (1962). The inhibition of plant virus multiplication in two host species by 2-thiouracil. *Virology*, 17(1), 1-8.
- Francki, R. I., & Matthews, R. (1959). Effect of 2-thiouracil on the infectivity of tobacco mosaic virus. *Biochimica et biophysica acta*, 34, 570-571.
- Fuchs, M. (2020). Grapevine viruses: A multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *Journal of Plant Pathology*, 102(3), 643-653.
- Fuchs, M. (2024). Grapevine viruses: Did you say more than a hundred?. *Journal of Plant Pathology*, 1-11.

- Gambino, G. & Gribaudo, I. (2006): Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology*, 96(11):1223-1229.
- Gambino, G., Bondaz, J., and Gribaudo, I. (2006). Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), 397-404.
- Gambino, G., Di Matteo, D., and Gribaudo, I. (2009). Elimination of Grapevine fanleaf virus from three *Vitis vinifera* cultivars by somatic embryogenesis. *European journal of plant pathology*, 123(1), 57-60.
- Gambino, G., Perrone, I. & Gribaudo, I. (2008): A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6):520-525.
- Gergerich, R. C., & Dolja, V. V. (2006). Introduction to plant viruses, the invisible foe. *The plant health instructor*, 478.
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., ... & Saldarelli, P. (2012). A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus-and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus research*, 163(1), 262-268.
- Glasa, M., Predajňa, L., Komínek, P., Nagyová, A., Candresse, T., & Olmos, A. (2014). Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Archives of virology*, 159(8), 2103-2107.
- Glasa, M., Predajňa, L., Sihelská, N., Šoltys, K., Ruiz-García, A. B., Olmos, A., ... & Sabanadzovic, S. (2018). Grapevine virus T is relatively widespread in Slovakia and Czech Republic and genetically diverse. *Virus Genes*, 54(5), 737-741.
- Glasa, M., Predajňa, L., Wetzel, T., Šoltys, K., & Sabanadzovic, S. (2019). First report of grapevine rupestris vein feathering virus in grapevine in Slovakia. *Plant Disease*, 103(1), 170-170.
- Gribaudo, I., Gambino, G., Cuozzo, D., & Mannini, F. (2006). Attempts to eliminate Grapevine rupestris stem pitting-associated virus from grapevine clones. *Journal of Plant Pathology*, 293-298.
- Gribaudo, I.; Gambino, G.; Vallania, R. (2004). Somatic embryogenesis from grapevine anthers: The optimal developmental stage for collecting explants. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 427–430.
- Gu, C., Chen, S., Liu, Z., Shan, H., Luo, H., Guan, Z., & Chen, F. (2011). Reference gene selection for quantitative real-time PCR in Chrysanthemum subjected to biotic and abiotic stress. *Molecular Biotechnology*, 49(2), 192-197.
- Guta, I. C., and Buciumeanu, E. C., Gheorghe, R. N., and Teodorescu, A. (2010). Solutions to eliminate grapevine leafroll associated virus serotype 1+ 3 from

- V. vinifera L. cv. Ranâi Magaraci. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(1): 73.
- Guta, I. C., and Buciumeanu, E. C., and Visoiu, E. (2014). Elimination of Grapevine fleck virus by in vitro Chemotherapy. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42(1), 115-118
- Guta, I. C., Buciumeanu, E. C., Topală, C. M., & Tătaru, L. D. (2015, April). The use of in vitro chemotherapy in grapevine virus elimination. In VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1155 (pp. 425-430).
- Guta, I. C., & Buciumeanu, E. C. (2021). Quality improvement of the grapevine planting stock through virus elimination by in vitro chemotherapy. *Romanian Journal of Horticulture*, 2, 17.
- Han, X., Lu, M., Chen, Y., Zhan, Z., Cui, Q., Wang, Y., & Schönbach, C. (2012). Selection of Reliable Reference Genes for Gene Expression Studies Using Real-Time PCR in Tung Tree during Seed Development. *PLoS ONE*, 7(8).
- Hao, J., Ma, J., & Wang, Y. (2024). Understanding viroids, endogenous circular RNAs, and viroid-like RNAs in the context of biogenesis. *PLoS Pathogens*, 20(6), e1012299.
- Hardy, S., Donovan, N., & Barkley, P. B. (2008). Citrus exocortis. *Primefact*, 772, 1-3.
- Haydu, Z. (2002). A szőlő (*Vitis* ssp.) mikroszaporítás kutatásának és gyakorlati alkalmazásának hazai tapasztalatai. *International Journal of Horticultural Science*. 8.
- Hightower, R. C., & Meagher, R. B. (1986). The molecular evolution of actin. *Genetics*, 114(1), 315-332.
- Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F., Li, Z., and Zhang, S. (2018). Elimination of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus from *Vitis vinifera* 'Kyoho' by an antiviral agent combined with shoot tip culture. *Scientia Horticulturae*, 229, 99-106.
- Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., & Ren, F. (2020). Efficiency of chemotherapy combined with thermotherapy for eliminating grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3). *Scientia Horticulturae*, 271, 109462.
- Hu, G. J., Dong, Y. F., Zhang, Z. P., Fan, X. D., & Fang, R. E. N. (2021). Elimination of grapevine fleck virus and grapevine rupestris stem pitting-associated virus from *Vitis vinifera* 87-1 by ribavirin combined with thermotherapy. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9), 2463-2470.
- Jakab-Ilyefalvi, Z., Pamfil, D., Clapa, D., & Fira, A. (2012). The effect of heat treatment and in vitro chemotherapy mediated by 2-thiouracil on plum pox virus (PPV) content in meristem regenerated plum plants. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 17(1).

- Jeener, R. (1957). Biological effects of the incorporation of thiouracil into the ribonucleic acid of tobacco mosaic virus. *Biochimica et biophysica acta*, 23, 351-361.
- Jelly, N. S., Schellenbaum, P., Walter, B. & Maillot, P. (2012): Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic Research*, 21(6):1319-1327.
- Jenner, R., & Rosseels, J. (1953). Incorporation of 2-thiouracil-S35 in the ribose nucleic acid of tobacco mosaic virus. *Biochimica et biophysica acta*, 11(3), 438.
- Jiang, D.M., Zhang, Z. X., Wu, Z. J., Guo, R., Wang, H. Q., Fan, P. G. & Li, S. F. (2009): Molecular characterization of grapevine yellow speckle viroid-2 (GYSVd-2). *Virus Genes*, 38:515–520.
- Jiao, Y., Wang, D., Wang, L., Jiang, C., & Wang, Y. (2017). VqMAPKKK38 is essential for stilbene accumulation in grapevine. *Horticulture research*, 4.
- Kappagantu, M., Nelson, M. E., Bullock, J. M., Kenny, S. T., & Eastwell, K. C. (2017). Hop Stunt Viroid: effects on vegetative growth and yield of hop cultivars, and its distribution in Central Washington State. *Plant disease*, 101(4), 607-612.
- Katoh, H., Suzuki, S., Saitoh, T., & Takayanagi, T. (2009). Cloning and characterization of VIGG, a novel virus-induced grapevine protein, correlated with fruit quality. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(4), 291-299.
- Kocsis, L. (2018). Magyarországon használt szőlőalanyfajták, *Agrofórum online* 2018. december 10.
- Kofalvi, S. A., Marcos, J. F., Cañizares, M. C., Pallas, V., & Candresse, T. (1997). Hop stunt viroid (HSVd) sequence variants from Prunus species: evidence for recombination between HSVd isolates. *Journal of General Virology*, 78(12), 3177-3186.
- Komínek, P., Komínková, M., and Jandová, B. (2016). Effect of repeated Ribavirin treatment on grapevine viruses. *Acta virologica*, 60(4): 400-403.
- Kudelková, M., Cechová, J., Ondrusíková, E., & Baránek, M. (2013). Use of antivirals for Carlavirus elimination in Allium sativum L. In: *VIII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding* 1083 (pp. 589-594).
- Lal, A. N. K. I. T. A., Pant, M. A. N. U., and Rani, A. N. J. U. (2015). The who's who of plant viruses: A cognitive approach. *Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research*, 8(1): 60-68.
- Lázár, J. (2011). Szaporítóanyaggal terjedő patogének. In: *Hajdu, E. (szerk.): Szőlőfajták, szaporítóanyaguk és betegségeik. Agroiinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest, 247pp. (pp. 179-210)*
- Lázár, J., & Bisztray, G. D. (2011). Virus and virus-like diseases of grapevine in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 17(3), 25-36.

- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic acids research*, 46(D1), D708-D717.
- Lerch, B. (1977). Inhibition of the biosynthesis of potato virus X by ribavirin. *Phytopathology*, 89, 44-49.
- Lima, M. F., Alkowni, R., Uyemoto, J. K., Golino, D., Osman, F. & Rowhani, A. (2006): Molecular analysis of a California strain of Rupestris stem pitting-associated virus isolated from declining Syrah grapevines. *Archives of virology*, 151(9):1889-1894.
- Liu, Y., Jia, Y., Yang, K., Li, R., Xiao, X., & Wang, Z. (2020). Anti-HIV agent azidothymidine decreases Tet (X)-mediated bacterial resistance to tigecycline in *Escherichia coli*. *Communications biology*, 3(1), 162.
- Loustaud-Ratti, V., Debette-Gratien, M., Jacques, J., Alain, S., Marquet, P., Sautereau, D., ... & Carrier, P. (2016). Ribavirin: Past, present and future. *World journal of hepatology*, 8(2), 123.
- Magyar-Tábori, K., Mandler-Drienyovszki, N., Hanász, A., Zsombik, L., & Dobránszki, J. (2021). Phytotoxicity and other adverse effects on the in vitro shoot cultures caused by virus elimination treatments: Reasons and solutions. *Plants*, 10(4), 670.
- Mahfouze, S. A., El-DougDoug, K. A., & Allam, E. K. (2010). Production of Potato spindle tuber viroid-free potato plant materials in vitro. *Journal of American Science*, 6, 1570-1577.
- Malenica, N., Jagić, M., Pavletić, B., Bauer, N., Vončina, D., Zdunić, G., & Leljak Levanić, D. (2020). Somatic embryogenesis as a tool for virus elimination in croatian indigenous grapevine cultivars. *Acta Botanica Croatica*, 79(1), 0-0.
- Maliogka, V. I., Skiada, F. G., Eleftheriou, E. P., and Katis, N. I. (2009). Elimination of a new ampelovirus (GLRaV-Pr) and Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars combining in vitro thermotherapy with shoot tip culture. *Scientia Horticulturae*, 123(2): 280-282.
- Maliogka, V. I., Martelli, G. P., Fuchs, M., and Katis, N. I. (2015). Control of viruses infecting grapevine. In: *Advances in Virus Research* (Vol. 91, pp. 175-227). Academic Press.
- Maree, H. J., Almeida, R. P., Bester, R., Chooi, K. M., Cohen, D., Dolja, V. V., ... and Naidu, R. A. (2013). Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in microbiology*, 4, 82.
- Marković, Z., Zrilić, A., Šikuten, I., Štambuk, P., Tomaz, I., Vončina, D., ... & Preiner, D. (2021). Cultivar and Phenological Stage Effects on the Success of In Vitro Meristem Culture and GLRaV-3 Elimination of Croatian Autochthonous Grapevine Cultivars. *Agronomy*, 11(7), 1395.

- Marquez-Molins, J., Gomez, G., & Pallas, V. (2021). Hop stunt viroid: A polyphagous pathogenic RNA that has shed light on viroid–host interactions. *Molecular Plant Pathology*, 22(2), 153-162.
- Martelli, G. P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96(1sup), 1-136.
- Martelli, G. P. (2017). An overview on grapevine viruses, viroids, and the diseases they cause. *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*, 31-46.
- Martelli, G. P., Adams, M. J., Kreuze, J. F., and Dolja, V. V. (2007). Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45: 73-100.
- Martelli, J.P. (2018). Where grapevine virology is heading to. In: *Proceedings of the 19th Congress of ICVG (April 2018, Santiago, Chile)*.
- Martin, M. E., Grao-Cruces, E., Millan-Linares, M. C., & Montserrat-De la Paz, S. (2020). Grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil: A functional food from the winemaking industry. *Foods*, 9(10), 1360.
- Mathew, L., Tiffin, H., Erridge, Z., McLachlan, A., Hunter, D., & Pathirana, R. (2021). Efficiency of eradication of Raspberry bushy dwarf virus from infected raspberry (*Rubus idaeus*) by in vitro chemotherapy, thermotherapy and cryotherapy and their combinations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144(1), 133-141.
- Meng, B., & Rowhani, A. (2017). Grapevine rupestris stem pitting-associated virus. In *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management* (pp. 257-287). Springer, Cham.
- Miljanić, V., Rusjan, D., Škvarč, A., Chatelet, P., & Štajner, N. (2022). Elimination of Eight Viruses and Two Viroids from Preclonal Candidates of Six Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.) through In Vivo Thermotherapy and In Vitro Meristem Tip Micrografting. *Plants*, 11(8), 1064.
- Monteiro, F., Sebastiana, M., Pais, M. S. & Figueiredo, A. (2013): Reference gene selection and validation for the early responses to downy mildew infection in susceptible and resistant *Vitis vinifera* cultivars. *PloS one*, 8(9):e72998.
- Morgan, S. W., Read, D. A., Burger, J. T., & Pietersen, G. (2023). Diversity of viroids infecting grapevines in the South African *Vitis* germplasm collection. *Virus Genes*, 59(2), 244-253.A
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- 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(9): 1172-1185.
- Naidu, R. A. (2017). Grapevine leafroll-associated virus 1. *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*, 127-139.

- Nakaune, R., & Nakano, M. (2006). Efficient methods for sample processing and cDNA synthesis by RT-PCR for the detection of grapevine viruses and viroids. *Journal of Virological Methods*, 134(1-2), 244-249.
- Nicholls, C., Li, H., & Liu, J. P. (2012). GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39(8), 674-679.
- Nuzzo, F., Moine, A., Nerva, L., Pagliarani, C., Perrone, I., Boccacci, P., ... & Gambino, G. (2022). Grapevine virome and production of healthy plants by somatic embryogenesis. *Microbial Biotechnology*, 15(5), 1357-1373.
- Ohta, S., Kuniga, T., Nishikawa, F., Yamasaki, A., Endo, T., Iwanami, T., & Yoshioka, T. (2011). Evaluation of Novel Antiviral Agents in the Elimination of Satsuma dwarf virus (SDV) by Semi-micrografting in Citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 80(2), 145-149.
- OIV (International Organisation of Vine and Wine) (2024) State of the World Vine and Wine Sector in 2023. *OIV Statistics Publications*
- OIV (International Organisation of Vine and Wine) (2025) State of the World Vine and Wine Sector in 2024. *OIV Statistics Publications*
- Oláh R. and Bordé Á. (2017). Módszertani fejlesztések a szőlő vírusmentesítésében. *Kertgazdaság*, 49(4): 39-41.
- Oláh, R. (2017) The use of activated charcoal in grapevine tissue culture. *Grapevine Res.*, 56, 161–171.
- Oláh, R., Deák, T., Turcsán, M., Szénási, M., Bordé, Á., and Szegedi, E. (2017). Use of an intron containing grapevine gene as internal control for validation of cDNA synthesis in virus detection by RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 149(3): 765-770.
- Oláh, R., Turcsán, M., Szénási, M., Oláh, K., Szegedi, E. and Lázár, J. (2019). A szőlő patogénmentesítése szövettenyésztési eljárások alkalmazásával. In: *Szabó Péter (Ed.): Innováció a Szőlőszaporításban. Doktoranduszok Országos Szövetsége*, Budapest. 54-59.
- Oláh, R.; Zok, A.; Pedryc, A.; Howard, S.; Kovacs, L. (2009). Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Sci. Hortic.* 120, 134–137.
- Osman, F., & Rowhani, A. (2006). Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of virological methods*, 133(2), 130-136.
- Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D., & Rowhani, A. (2008). Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. *Journal of virological methods*, 149(2), 292-299.
- Pacifico, D., Caciagli, P., Palmano, S., Mannini, F., & Marzachi, C. (2011). Quantitation of Grapevine leafroll associated virus-1 and-3, Grapevine virus A, Grapevine fanleaf virus and Grapevine fleck virus in field-collected Vitis

vinifera L. 'Nebbiolo' by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of virological methods*, 172(1-2), 1-7.

- Panattoni, A., & Triolo, E. (2010). Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. *Scientia Horticulturae*, 125(1), 63-67.
- Panattoni, A., D'Anna, F., Cristani, C., and Triolo, E. (2007). Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy. *Journal of virological methods*, 146(1-2): 129-135.
- Panattoni, A., Luvisi, A., and Triolo, E. (2013). Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, (1): 173-188.
- Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Carra, A., Carimi, F., & Panis, B. (2015). Removal of leafroll viruses from infected grapevine plants by droplet vitrification. *Acta horticulturae*.
- Pavelkova, R., Kudelkova, M., Ondrusikova, E., & Eichmeier, A. (2015). Virus Elimination in Peach cv. 'Red Haven' by Chemotherapy. *Agricultural Communications*, 3(2), 16-20.
- Prado, M. J., Rodriguez, E., Rey, L., González, M. V., Santos, C., & Rey, M. (2010). Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103, 49-59.
- Pocsai, E. (2018). A szőlő fontosabb vírusos és fitoplazmás betegségei. *Növényvédelem* 2018 január 17.
- Ralph, R. K., Matthews, R. E. F., & Matus, A. I. (1965). Effects of 2-thiouracil on the formation of double-stranded plant viral ribonucleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 108(1), 53-66.
- Ram, R., Verma, N., Singh, A. K., Singh, L., Hallan, V., & Zaidi, A. A. (2005). Indexing and production of virus-free chrysanthemums. *Biologia Plantarum*, 49(1), 149-152.
- Ramgareeb, S., Snyman, S. J., Van Antwerpen, T., & Rutherford, R. S. (2010). Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100(2), 175-181.
- Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F. & Lund, S. T. (2006): An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6(1):27.
- Roossinck, M. J. (2010). Lifestyles of plant viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1548), 1899-1905.
- Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., & 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), 1-7.

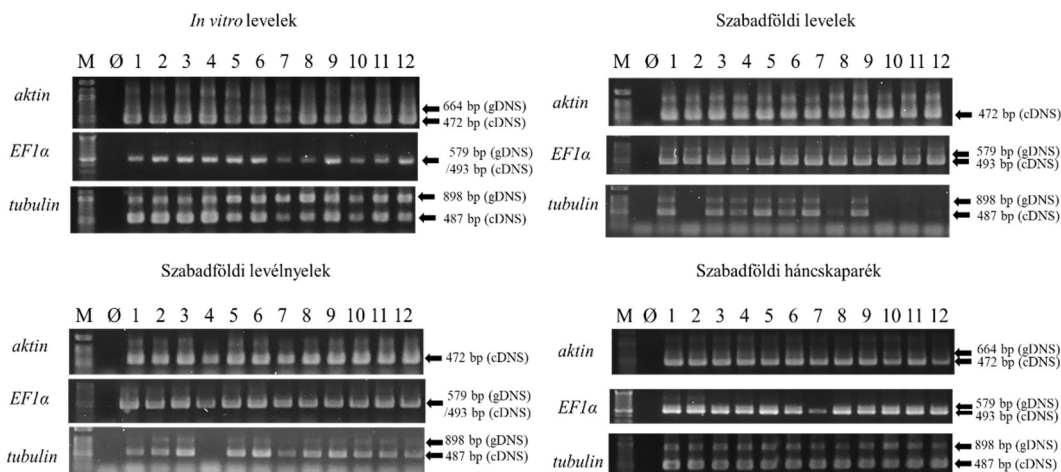
- Sabanadzovic, S., Aboughanem-Sabanadzovic, N., & Martelli, G. P. (2017). Grapevine fleck and similar viruses. In *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (pp. 331-349). Springer, Cham.
- Salami, S. A., Ebadi, A., Zamani, Z., & Habibi, M. K. (2009). Incidence of Grapevine Fanleaf Virus in Iran: A Survey Study and Production of Virus-Free Material Using Meristem Culture and Thermotherapy.
- Saldarelli, P., Gualandri, V., Malossini, U., & Glasa, M. (2017). Grapevine Pinot gris virus. In *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management* (pp. 351-363). Springer, Cham.
- San Pedro, T., Gammoudi, N., Peiró, R., Olmos, A., and Gisbert, C. (2017). Somatic embryogenesis from seeds in a broad range of *Vitis vinifera* L. varieties: rescue of true-to-type virus-free plants. *BMC plant biology*, 17(1): 226.
- Schellenbaum, P., Mohler, V., Wenzel, G., & Walter, B. (2008). Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology*, 8, 1-10.
- Selim, M., Legay, S., Berkelmann-Löhnertz, B., Langen, G., Kogel, K. H., & Evers, D. (2012). Identification of suitable reference genes for real-time RT-PCR normalization in the grapevine-downy mildew pathosystem. *Plant cell reports*, 31(1), 205-216.
- Shatnawi, M., Anfoka, G., Shibli, R., Al-Mazra'awi, M., Shahrour, W., and Arebiat, A. (2011). Clonal propagation and cryogenic storage of virus-free grapevine (*Vitis vinifera* L.) via meristem culture. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(2): 173-184.
- Singh, B. (2015). Effect of antiviral chemicals on in vitro regeneration response and production of PLRV-free plants of potato. *Journal of crop science and biotechnology*, 18(5), 341-348.
- Singh, G., Kaushal, N., Tokusoglu, O., & Singh, A. (2022). Optimization of process parameters for drying of red Grapes (*Vitis vinifera*) to raisin: A design expert laden approach. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(5), e15248.
- Singhal, P., Kumar, S., Rai, R., Singh, S. K., & Baranwal, V. K. (2019). Characterization of viroids infecting grapevine in India. *Indian Phytopathology*, 72(2), 333-341.
- Skiada, F. G., Grigoriadou, K., Maliogka, V. I., Katis, N. I., & Eleftheriou, E. P. (2009). Elimination of Grapevine leafroll-associated virus 1 and Grapevine rupestris stem pitting-associated virus from grapevine cv. Agiorgitiko, and a micropropagation protocol for mass production of virus-free plantlets. *Journal of Plant Pathology*, 177-184.
- Skiada, F. G., Maliogka, V. I., Katis, N. I., and Eleftheriou, E. P. (2013). Elimination of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars by in vitro chemotherapy. *European journal of plant pathology*, 135(2): 407-414.

- Šljajcheroová, K., Fišerová, J., Fischer, L., & Schwarzerová, K. (2012). Multiple actin isoforms in plants: diverse genes for diverse roles?. *Frontiers in plant science*, 3, 226.
- Song, Y., Hanner, R. H., & Meng, B. (2021). Genome-wide screening of novel RT-qPCR reference genes for study of GLRaV-3 infection in wine grapes and refinement of an RNA isolation protocol for grape berries. *Plant methods*, 17(1), 1-20.
- Suhandono, S., Apriyanto, A., & Ihsani, N. (2014). Isolation and characterization of three cassava elongation factor 1 alpha (MeEF1A) promoters. *PLoS One*, 9(1), e84692.
- Suzuki, R.M. & Kerbauy, G.B. (2006) Effects of light and ethylene on endogenous hormones and development of *Catasetum fimbriatum* (orchidaceae). *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 359–365.
- Szegedi, E. & Bottka, S. (2002): Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *Vitis*, 41(1):37-42.
- Szegedi E., Manduláné Farkas E., Szűcsné Varga G., Lázár J. (2014): Egészséges szaporítóanyaggal a biztonságos szőlőtermesztésért. *Agrofórum* 4: 85–89
- Szegedi, E., Deák, T., Turcsán, M., Szénási, M., Bordé, Á., and Oláh, R. (2018). Evaluation of intron containing potential reference gene-specific primers to validate grapevine nucleic acid samples prepared for conventional PCR and RT-PCR. *Vitis*, 57: 69-73.
- Teleki, B. Z., & Csipkés, M. (2017). Magyarország Szőlő-És Bor-Ágazatának Áttekintése Az Elmúlt 5 Évben. *Journal of Central European Green Innovation*, 5(1063-2018-080), 41-65.
- This, P., Lacombe, T., & Marchal, C. (2024). Grapevine Domestication and Selection. *Genetics of Domestications*, 185.
- Thompson, J. R., Dasgupta, I., Fuchs, M., Iwanami, T., Karasev, A. V., Petrzik, K., ... & Consortium, I. R. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Secoviridae. *The Journal of general virology*, 98(4), 529.
- Tomlinson, J. A. (2013). Chemotherapy of plant viruses. In: *Pathogens, vectors, and plant diseases: approaches to control*, 23.
- Tsai, C. W., Chau, J., Fernandez, L., Bosco, D., Daane, K. M., & Almeida, R. P. P. (2008). Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the vine mealybug (*Planococcus ficus*). *Phytopathology*, 98(10), 1093-1098.
- Uddin, M. S., & Cheng, Q. (2015). Recent application of biotechniques for the improvement of mango research. In: *Applied Plant Genomics and Biotechnology* (pp. 195-212). Woodhead Publishing.
- Verma, N., Ram, R., & Zaidi, A. A. (2005). In vitro production of *Prunus* necrotic ringspot virus-free begonias through chemo-and thermotherapy. *Scientia Horticulturae*, 103(2), 239-247.

- Vivek, M., & Modgil, M. (2018). Elimination of viruses through thermotherapy and meristem culture in apple cultivar 'Oregon Spur-II'. *VirusDisease*, 29(1), 75-82.
- Wang, L., Lv, X., Zhai, Y., Fu, S., Wang, D., Rayner, S., ... & Liang, G. (2012). Genomic characterization of a novel virus of the family Tymoviridae isolated from mosquitoes. *PLoS ONE* 7(7): e39845.
- Wang, M. R., Cui, Z. H., Li, J. W., Hao, X. Y., Zhao, L., & Wang, Q. C. (2018). In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant methods*, 14(1), 1-18.
- Wang, Q., Mawassi, M., Li, P., Gafny, R., Sela, I., and Tanne, E. (2003). Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science*, 165(2): 321-327.
- Wang, Q., and Valkonen, J. P. (2009). Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in plant science*, 14(3): 119-122.
- Wei, T. L., Wang, H., Pei, M. S., Liu, H. N., Yu, Y. H., Jiang, J. F., & Guo, D. L. (2021). Identification of optimal and novel reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis in grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 27(3), 325-333.
- Weiland, C. M., Cantos, M., Troncoso, A., and Perez-Camacho, F. (2003). Regeneration of Virus-Free Plants by In Vitro Chemotherapy of Gflv (Grapevine Fanleaf Virus) Infected Explants of *Vitis vinifera* L. Cv'Zalema'. In: *International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research* 652 (pp. 463-466).
- Wetzel, T., Beck, A., Wegener, U., & Krczal, G. (2004). Complete nucleotide sequence of the RNA 1 of a grapevine isolate of Arabis mosaic virus. *Archives of virology*, 149(5), 989-995.
- Woo, J. H., Nam, H. H., Lee, H. S., Choi, K. B., Yoon, J. T., & Kim, K. W. (2004). Effect of Antivirals on the Elimination of Lily Symptomless Virus in *Lilium Oriental Hybrid Casa Blanca*'. *HortScience*, 39(4), 822E-823.
- Xu, P. S., & Niimi, Y. (1999). Evaluation of virus-free bulblet production by antiviral and/or heat treatment in in vitro scale cultures of *Lilium longiflorum*'Georgia'and L. X'Casablanca'. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)*.
- Xu, Q., Wen, X. & Deng, X. (2004): A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) for RFLP and PCR analyses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(3):301-302.
- Yang, X. M., An, L. Z., Xiong, Y. C., Zhang, J. P., Li, Y., & Xu, S. J. (2008). Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos and monitoring the genetic fidelity of regenerated plants in grapevine. *Biologia Plantarum*, 52, 209-214.
- Yoshikawa, N., & Yaegashi, H. (2021). Betaflexiviruses (*Betaflexiviridae*). In: Bamford, D.H., Zuckerman, M. (Ed.): *Encyclopedia of Virology* (Fourth Edition). Academic Press, Volume 3, 2021, 229-238

- Youssef, S. A., Al-Dhaher, M. M. A., & Shalaby, A. A. (2009). Elimination of grapevine fanleaf virus (GFLV) and grapevine leaf roll-associated virus-1 (GLRaV-1) from infected grapevine plants using meristem tip culture. *International Journal of Virology*, 5(2), 89-99.
- Zhang, Z., Qi, S., Tang, N., Zhang, X., Chen, S., Zhu, P., ... & Wu, Q. (2014). Discovery of replicating circular RNAs by RNA-seq and computational algorithms. *PLoS pathogens*, 10(12), e1004553.
- Zherdev, A. V., Vinogradova, S. V., Byzova, N. A., Porotikova, E. V., Kamionskaya, A. M., & Dzantiev, B. B. (2018). Methods for the diagnosis of grapevine viral infections: A review. *Agriculture*, 8(12), 195.

## M2. A különböző szöveti eredetű mintákon végzett RT-PCR tesztek eredménye az oligo(dT) primerrel szintetizált cDNS-ekből



Mintásor: M: mólsúly marker, Ø: null kontroll, 1.-12.: '5C', 'SO4', 'G28', 'Börner', 'Kövidinka', 'Sárféher', 'Kadarka', 'Zefir', 'Furmint', 'Esther', 'Ottonek muskotály', 'Olasz rizling'

## M3. A szomatikus embriogenezis és a merisztéma tenyésztet kísérleti növényanyagának szekvenálási eredményei

| Fajta                    | Vírus/Viroid | Referencia genom | Redundáns readek száma | Nem redundáns readek száma | RPM  | Találatot adó contigok száma | Virális genom lefedettsége |
|--------------------------|--------------|------------------|------------------------|----------------------------|------|------------------------------|----------------------------|
| Ottonek muskotály H.7-3  | GfKV         | NC_003347        | 56110                  | 11424                      | 1241 | 146                          | 93,70%                     |
|                          | GPGV         | NC_015782        | 2037                   | 951                        | 45   | 0                            | 86,30%                     |
|                          | GRSPaV       | NC_001948        | 3091                   | 1010                       | 68   | 0                            | 76,53%                     |
|                          | GRVfV        | NC_034205        | 91300                  | 5489                       | 2019 | 85                           | 76,99%                     |
|                          | GSyV-1       | NC_012484        | 13357                  | 2096                       | 295  | 36                           | 69,91%                     |
|                          | GYSVd-1      | NC_001920        | 67315                  | 2612                       | 1488 | 6                            | 98,13%                     |
| Ottonek muskotály H.14-1 | HSVd         | NC_001351        | 109371                 | 3647                       | 2418 | 1                            | 100,00%                    |
|                          | GfKV         | NC_003347        | 75260                  | 17010                      | 1600 | 184                          | 98,14%                     |
|                          | GPGV         | NC_015782        | 119694                 | 15426                      | 2545 | 134                          | 99,89%                     |
|                          | GRSPaV       | NC_001948        | 4352                   | 938                        | 93   | 0                            | 74,50%                     |
|                          | GRVfV        | NC_034205        | 92005                  | 8533                       | 1956 | 143                          | 83,44%                     |
|                          | GSyV-1       | NC_012484        | 52835                  | 7048                       | 1123 | 145                          | 98,08%                     |
| Szirén                   | GVT          | NC_035203        | 2482                   | 1029                       | 53   | 0                            | 69,96%                     |
|                          | GYSVd-1      | NC_001920        | 41871                  | 2193                       | 890  | 11                           | 91,35%                     |
|                          | HSVd         | NC_001351        | 118113                 | 4677                       | 2511 | 5                            | 100%                       |
|                          | GPGV         | NC_015782        | 124737                 | 14225                      | 1371 | 115                          | 99,35%                     |
|                          | GRSPaV       | NC_001948        | 4069                   | 1137                       | 45   | 0                            | 79,74%                     |
|                          | GSyV-1       | NC_012484        | 53170                  | 4968                       | 584  | 74                           | 97,14%                     |
| Trilla                   | GVT          | NC_035203        | 2013                   | 901                        | 22   | 0                            | 68,77%                     |
|                          | GYSVd-1      | NC_001920        | 8177                   | 928                        | 90   | 3                            | 92,92%                     |
|                          | HSVd         | NC_001351        | 44198                  | 2373                       | 486  | 2                            | 100%                       |
|                          | GPGV         | NC_015782        | 55198                  | 9165                       | 1532 | 79                           | 99,09%                     |
|                          | GRSPaV       | NC_001948        | 4037                   | 1684                       | 112  | 0                            | 88,15%                     |
|                          | GSyV-1       | NC_012484        | 18149                  | 3295                       | 504  | 25                           | 96,46%                     |
| Trilla                   | GVT          | NC_035203        | 1193                   | 630                        | 33   | 0                            | 60,01%                     |
|                          | GYSVd-1      | NC_001920        | 95156                  | 3687                       | 2640 | 3                            | 95,21%                     |
|                          | HSVd         | NC_001351        | 47580                  | 2249                       | 1320 | 2                            | 100%                       |

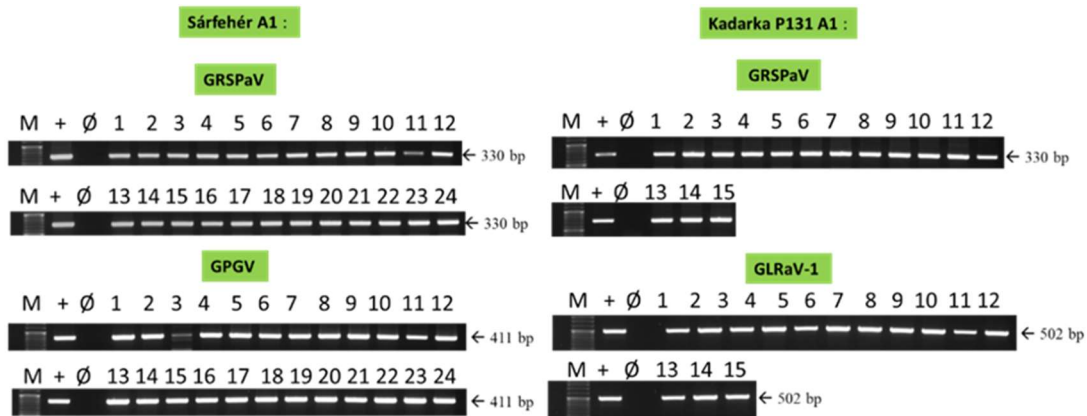
#### M4. A kemoterápiás kísérletek növényanyagának szekvenálási eredményei

| Fajta              | Vírus/Viroid | Referencia genom | Redundáns readek száma | Nem redundáns readek száma | RPM  | Találatot adó contigok száma | Virális genom lefedettsége |
|--------------------|--------------|------------------|------------------------|----------------------------|------|------------------------------|----------------------------|
| Sárfehér A1        | GPGV         | NC_015782        | 23995                  | 3028                       | 940  | 10                           | 89,45 %                    |
|                    | GRSPaV       | NC_001948        | 2054                   | 458                        | 80   | 2                            | 29,39 %                    |
|                    | GYSVd-1      | NC_001920        | 35851                  | 1638                       | 1405 | 7                            | 81,74 %                    |
|                    | HSVd         | NC_001351        | 48754                  | 1939                       | 1910 | 4                            | 100 %                      |
| Furmint P51<br>ÜH2 | GFLV         | NC_003623        | 20510                  | 1229                       | 1149 | 61                           | 49,23 %                    |
|                    | GRSPaV       | NC_001948        | 1694                   | 411                        | 95   | 4                            | 24,14 %                    |
|                    | GYSVd-1      | NC_001920        | 3016                   | 341                        | 169  | 4                            | 77,66 %                    |
|                    | HSVd         | NC_001351        | 32                     | 21                         | 1,8  | 1                            | 59,47 %                    |
| Kadarka P131<br>A1 | GLRaV-1      | NC_016509        | 54480                  | 9321                       | 3486 | 113                          | 72,63 %                    |
|                    | GRSPaV       | NC_001948        | 6312                   | 2984                       | 412  | 9                            | 87,45 %                    |
|                    | GYSVd-1      | NC_001920        | 6883                   | 811                        | 440  | 4                            | 83,06 %                    |
|                    | GYSVd-2      | NC_003612        | 1784                   | 221                        | 114  | 2                            | 60,33 %                    |
|                    | HSVd         | NC_001351        | 26975                  | 2692                       | 1726 | 4                            | 100 %                      |
| Furmint P51<br>A1  | GfKv         | NC_003347        | 101298                 | 12805                      | 5813 | 138                          | 90,04 %                    |
|                    | GLRaV-1      | NC_016509        | 131922                 | 15820                      | 7571 | 155                          | 74,30 %                    |
|                    | GPGV         | NC_015782        | 16126                  | 3665                       | 925  | 13                           | 87,53 %                    |
|                    | GRSPaV       | NC_001948        | 5427                   | 2033                       | 311  | 3                            | 83,25 %                    |
|                    | GVA          | NC_003604        | 12262                  | 1215                       | 704  | 31                           | 28,24 %                    |
|                    | GYSVd-1      | NC_001920        | 6084                   | 599                        | 369  | 3                            | 79,56 %                    |
|                    | GYSVd-2      | NC_003612        | 1124                   | 158                        | 65   | 1                            | 63,64 %                    |
|                    | HSVd         | NC_001351        | 18334                  | 1147                       | 1110 | 4                            | 43,81 %                    |

**M5. A 10 mg/l 2-TU-lal kezelt Sárfehér A1 hajtások állapota a kísérlet különböző időpontjaiban**



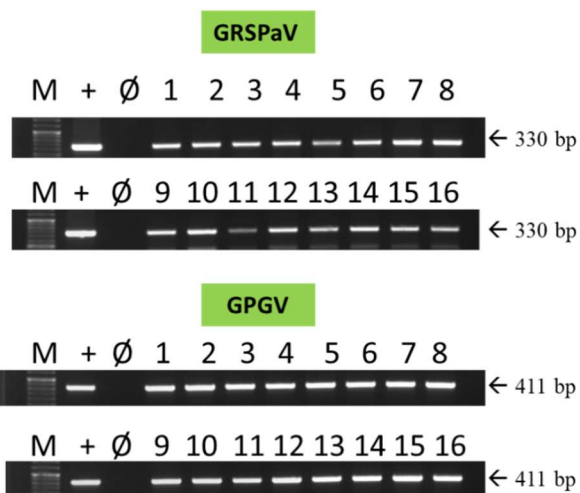
**M6. A 10 mg/l-es 2-TU kezelésen átesett Sárfehér A1 és Kadarka P131 A1 növények RT-PCR eredményei**



Sárfehér A1 mintasor: M: mólsúlymarker; Ø: null kontroll; 1.-8.: kezeletlen kontroll; 9.-16.: előgyökereztetve kezelt növények (1 hónap után); 17.-24.: előgyökereztetve kezelt hajtások (2 hónap után).

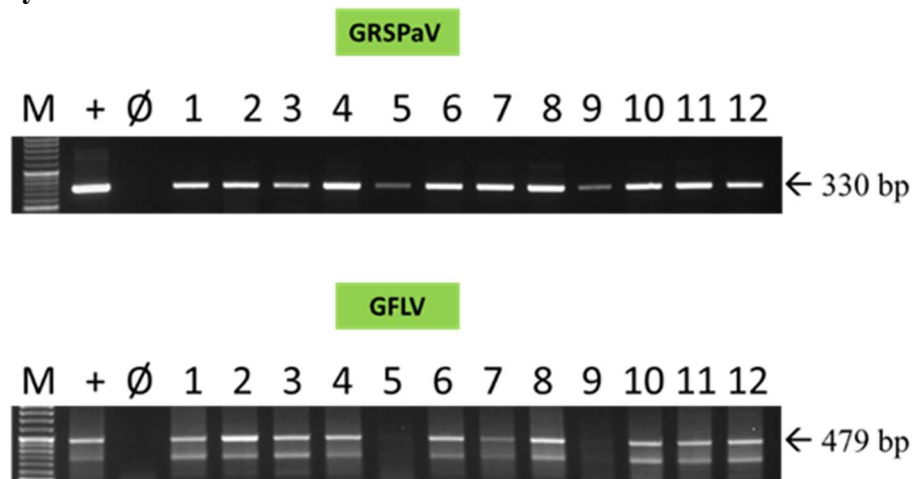
Kadarka P131 A1 mintasor: M: mólsúlymarker; Ø: null kontroll; 1.-3.: kezeletlen kontroll; 4.: előgyökereztetés nélkül kezelt hajtás (2 hónap után); 5.-8.: előgyökereztetve kezelt hajtások (1 hónap után); 9.-15.: előgyökereztetve kezelt hajtások (2 hónap után).

**M7. A 20 mg/l-es 2-TU kezelésén átesett Sárfehér A1 növények RT-PCR eredményei**



*Mintasor: M: mólsúlymarker; +: pozitív kontroll; Ø: null kontroll; 1.-8.: kezeletlen növények, 9.-16.: előgyökereztetve kezelt növények (2 hónap után)*

**M8. A 20 mg/l-es 2-TU kezelésén átesett Furmint P51 ÜH2 növények RT-PCR eredményei**



*Mintasor: M: mólsúlymarker; +: pozitív kontroll; Ø: null kontroll; 1.-6.: kezeletlen növények, 7.-12.: előgyökereztetve kezelt növények (2 hónap után)*

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Szegedi Ernőnek, aki 2015-ben lehetőséget adott nekem, hogy a katonatelepi Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet laboratóriumában megkezdhessem munkámat a szőlő patogénmentesítés területén. Az irányítása alatt töltött idő alatt rengeteget tanultam erről a tématerületről, amiért hálás vagyok.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Oláh Róbertnek, aki nélkül nem tartanék itt. Támogatása és szakmai tanácsai segítettek MSc dolgozatom elkészítésében, amely munkát a doktori képzés során is folytatni tudtam. E két ember mentorálásának köszönhetően válhattam olyan kutatóvá, aki tudja, hogy az elvégzett munka igenis kifizetődik. Ennek eredményeként nyolc év alatt számos publikációnk született, amelyek közül több nemzetközi elismerésnek örvendő lapokban jelent meg.

Köszönet illeti Dr. Deák Tamást, aki készséggel vállalta el témavezetésemet és hasznos tanácsokkal látott el doktori dolgozatom megírásában.

Köszönöm a MATE Növényvédelmi Intézet Növénykórtani Tanszékén dolgozó Genomikai Kutatócsoport dolgozóinak, különösképpen Prof. Dr. Várallyay Évának, Dr. Jaksa-Czotter Nikolettának és Nagyné Dr. Galbács Zsuzsannának és Demián Emesének, akik együttműködésünk alatt nemcsak kollégaként, hanem barátként is fogadtak és segítségemre voltak.

Köszönöm a MATE Szőlészeti és Borászati intézet (korábban NAIK SZBKI) valamennyi volt és jelenlegi dolgozójának, akik bármilyen formában hozzájárultak ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészüljön. Köszönöm a MATE Kertészettudományi Doktori Iskolának, hogy ösztöndíjas hallgatója lehettem és oktatóinak, hogy bővíthettem tudásomat.

Végezetül, ami a legfontosabb, köszönöm családomnak, akik támogatása és szeretete a legnehezebb időszakokon is átsegített, amikor egyedül kevésnek éreztem magamat. Köszönöm édesapámnak és édesanyámnak, hogy szeretetben neveltek, hogy irányt mutattak és bíztak bennem. Köszönöm feleségemnek, hogy a legmélyebb pontokon is ott volt velem és mindeközben egy gyermekkel is megajándékozott. Ennek megfelelően, ahogy az eddig megtett út, úgy ez az állomás is közös érdemünk.