

## A MATE Szőlészeti és Borászati Intézet vírusgyűjteményének megőrzése a Kecskeméti Kutatóállomáson

OLÁH ANNA<sup>1</sup>, OLÁH KRISZTINA<sup>2</sup>, TURCSÁN MIHÁLY<sup>2</sup>, LÁZÁR JÁNOS<sup>2</sup>,  
OLÁH RÓBERT<sup>2</sup>, NYITRAINÉ SÁRDY DIÁNA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kecskeméti Református Gimnázium, Kecskemét

<sup>2</sup>MATE Szőlészeti és Borászati Intézete, Kecskemét

<sup>3</sup>MATE Szőlészeti és Borászati Intézete, Budapest

### Összefoglalás

A vírusgyűjtemények fenntartása alapvető fontosságú a különböző vírusok, az általuk okozott tünetek és élettani változások kutatásához (Gugerli és tsai 2009). Különösen hangsúlyos ez, amikor a kórokozók működését nem izoláltan, hanem a szőlő virom kölcsönhatásainak függvényében kívánjuk vizsgálni. A vírusgyűjtemények elengedhetetlenek a diagnosztikai módszerek megbízható alkalmazásához is. Kecskemét infrastruktúrájának fejlesztése miatt a Lehoczky János és munkatársai által a 70-es években létrehozott vírusfertőzött szőlő növények szabadföldi gyűjteménye veszélybe került, ezért az abban található növényanyagot vegetatívan leszaporítottuk, és üvegházban helyeztük el. A korábbi, főleg tüneteken és ELISA technikán alapú eredmények kiegészítésére megkezdtük a gyűjtemény RT-PCR alapú vírusdiagnosztikáját.

**Kulcsszavak:** vegetatív szaporítás, RT-PCR, vírus diagnosztika

### Bevezetés és irodalmi áttekintés

A MATE Szőlészeti és Borászati Intézet jogelőd intézményeiben a 70-es évek közepétől indult meg a vírusgyűjtemény létrehozása a Magyarországon begyűjtött tünetes anyagokból Lehoczky János vezetésével Miklóstelephez közel eső területeken. Ehhez a munkához csatlakozott Lázár János 1981-ben, akinek az irányítása alatt a gyűjtemény a 90-es évek közepén Kisfáiba, majd a 2000-es évek elején Katonatelepre költözött. Ez a gyűjtemény lehetővé tette többek között az Arabis mozaik vírus (ArMV), szőlő krómmozaiik vírus (GCMV), szőlő levélsodródás vírus (GLRaV) és a paradicsom fekete gyűrűs vírus (TBRV) izolátumok vizsgálatát is (Lázár és tsai 2008, 2009). A gyűjteményben végzett munka hozzájárult a szőlő vonalas mintázottság vírus (GLPV) magátvitelének bizonyításához (Lehoczky és tsai 1992), majd 30 évvel később az itt található GLPV fertőzött 'Baco' tőkék segítségével történt meg a vírus létezésének molekuláris eszközökkel történő bizonyítása (Elbeaino

és tsai 2020). A gyűjtemény jelenleg is folyamatosan szolgálja a vírusdiagnosztikai munkát, és az üvegházi állomány minden évben új vírusfertőzött egyedekkel bővül.

### Anyag és módszer

A gyűjteményben 26 független tételt sikerült azonosítanunk, ezekről 2021 februárban fás vesszőket gyűjtöttünk be. A vesszőket márciusig 4 °C-on tároltuk, majd kétrügyes dugványokat készítettünk, és az alsó rügy kivakítása után perlitben hajtattuk és gyökerezettük őket. A gyökeres szőlőnövényekből tételenként egyet RT-PCR alapú diagnosztikának vetettük alá. A diagnosztika során vizsgált vírusokat az [1. táblázat](#) tartalmazza.

*1. táblázat.* Az RT-PCR módszerrel tesztelt vírusok, az általuk okozott betegség, és a teszteléshez használt primereket közlő publikációk

betegség	tesztelt vírus	virus angol neve	virus magyar neve	primer
korai vírusos leromlás	GFLV	Grapevine fanleaf virus	Szőlő fertőző leromlás vírus	Osman és Rowhani 2006
látens foltosság	GFkV	Grapevine fleck virus	Szőlő foltosodás vírus	Osman és tsai 2008
levél-sodródás	GLRaV-1	Grapevine leafroll-associated virus-1	Szőlő levélsodródás vírus-1	Engel és tsai 2010
	GLRaV-2	Grapevine leafroll-associated virus-2	Szőlő levélsodródás vírus-2	Gambino és Gribaudo 2006
	GLRaV-3	Grapevine leafroll-associated virus-3	Szőlő levélsodródás vírus-3	Osman és Rowhani 2006
faszöveti barázdáltság	GRSPaV	Grapevine rupestris stem pitting-associated virus	Szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus	Lima és tsai 2006
	GVA	Grapevine virus A	Szőlő A vírus	Nakaune és Nakano 2006
	GVB	Grapevine virus B	Szőlő B vírus	Minafra és Hadidi 1994
levél-foltosodás és deformáció	GPGV	Grapevine Pinot gris virus	Szőlő Pinot gris vírus	Glasa és tsai 2014

*Table 1.* Viruses tested by RT-PCR diagnostics, diseases caused by them, and the citations of the used primers

(1. disease 2. tested virus 3. English name of the virus 4. Hungarian name of the virus)

A nukleinsav izoláláshoz a CTAB módszert (Xu és tsai 2004) használtuk, azzal a módosítással, hogy az első mosási lépést elhagytuk. Kb. 50 mg növényanyagot lizáltunk 1 ml lízis pufferben és a

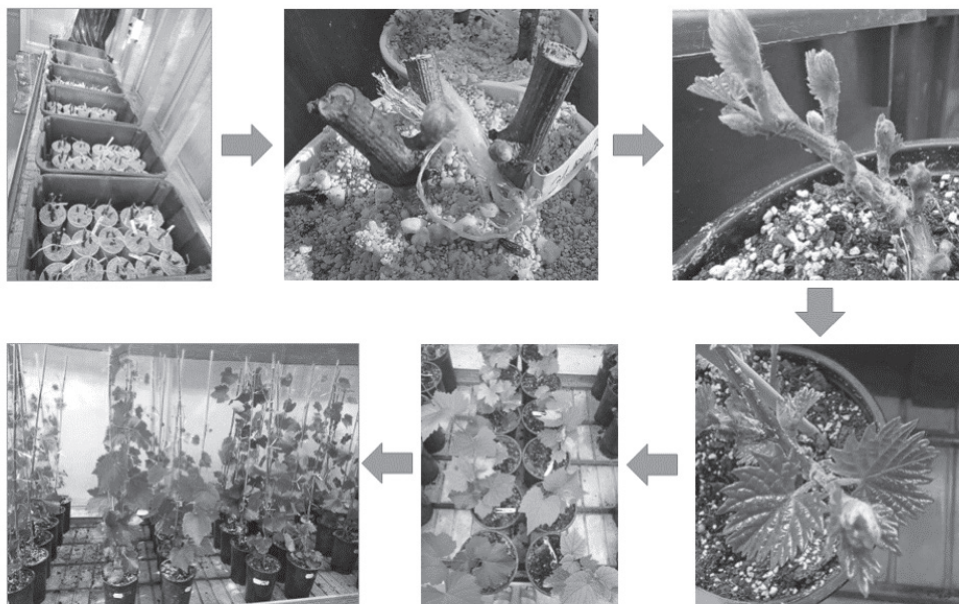
kicsapott nukleinsavakat 30  $\mu$ l steril vízben oldottuk vissza. A kivonás után az RNS koncentrációt mikrotérfogatú spektrofotométerrel ellenőriztük (NanoPhotometer® N60). A cDNS szintézishez Revert Aid First Strand cDNS kítet (Thermo Scientific, #K1622) használtuk random hexamer primerekkel, követve a gyártó által megadott protokollt. A polimeráz láncreakcióhoz DreamTaq™ polimeráz enzimet alkalmaztuk a gyártó által megadott protokoll szerint, az alábbi paraméterekkel: 94 °C 30 mp, 50-58 °C 30 mp, 72 °C 1:00 perc. A PCR termékeket 1,5 (w/v) %-os agaróz gélen választottuk el, majd etídium-bromid festést követően vizsgáltuk. A cDNS amplifikációjának sikerességét a tub-fw2/tub-rev2 (Szegedi és tsai 2018) primer párral ellenőriztük.

A PCR reakcióban vizsgált vírusokat és az alkalmazott PCR primerek forrásait az 1. táblázat tartalmazza.

### Eredmények és következtetések

A márciusban indított fás dugványok nagy többségben kihajtottak, 24 tétel esetében a jól gyökeresedett dugványokból 3-3 egyedet ültettünk el tőzeg és perlit 4:1 arányú keverékébe. A növények szépen fejlődtek, és nyárra csaknem 1 m magas hajtásokat hoztak (1. ábra).

*1. ábra.* A vírusfertőzött tőkék leszaporítása fás dugványokkal a fás dugványok perlitbe helyezésétől a kb. 80 cm-es hajtások kifejlődéséig



*Figure 1.* The propagation of virus infected grapes by woody cuttings: from placing woody cuttings in perlite to the development of ca. 80 cm long shoots

A hajtások fiatal, 1-5 cm-es leveleiből sikeresen vontunk ki nukleinsavat, a cDNS szintézis sikerességét a szőlő tubulin génjére (TUA5, VIT\_206s0004g00480.3) specifikus primerekkel (tub-fw2/tub-rev2) bizonyítottuk. Kilenc vírus esetében indítottunk specifikus PCR reakciókat a 24 tételre, ezek közül a GLRaV-2 és GVB vírusokra nem kaptunk méretspecifikus fragmenseket, a többi 7 vírus jelenlétét sikeresen kimutattuk a gyűjteményben (2. ábra). A szőlő rupestris faszöveti barázdáltság (GRSPaV) és szőlő Pinot gris (GPGV) vírusok minden mintából kimutathatóak voltak, valamint a szőlő foltosodás (GFKV) és a GLRaV-1 vírusok is nagy számú mintában voltak jelen. A szőlő A vírus (GVA) 5 mintában, míg a GLRaV-3 vírus mindössze 1 mintában sikerült kimutatni. Az eredmények viszonylag nagy hasonlóságot mutatnak ezen vírusok hazai előfordulásának gyakoriságával (Czotter és tsai 2018). Egy egyedben minden esetben több vírus került kimutatásra, jellemzően 3-5 vírussal voltak fertőzöttek a gyűjteményből kiemelt egyedek a vizsgálatba bevont vírusok esetében.

A vírusgyűjtemény megőrzése és bővítése jelentős kutatási lehetőségeket rejt magában. Nem célunk a ma ismert, több mint 80 vírus begyűjtése, hiszen a gyűjteményben kizárólag Magyarországon begyűjtött szőlő növények és vírustörzsek kapnak/kaphatnak helyet. A vírusdiagnosztika eddigi eredményei összhangban vannak a gyűjtemény korábbi leírásaival, de jellemzően több vírus fertőzi a tőkét a korábban feltételezettnél. Célunk, hogy gyűjteményünk továbbra is szolgálja a magyarországi szőlészeti és virológiai kutatásokat.

2. ábra. A tesztelt vírusok amplifikált szakaszai a vírusokra specifikus primerekkel. Az amplifikált fragmensek hossza jobb oldalon látható. A: minták 1-12-ig. B: minták 13-24-ig (szürke). M: méret marker. +: pozitív kontroll. -: null kontroll.

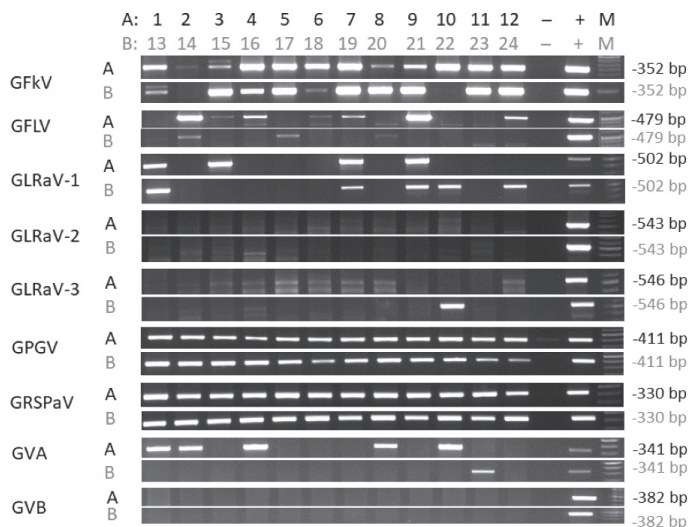


Figure 2. Amplified fragments of the tested viruses with specific primers. The sizes of the PCR products are on the right. A: samples 1-12. B: samples 13-24 (grey). M: DNA ladder. +: positive control. -: negative control without cDNA.

### Köszönetnyilvánítás

Munkánkhoz az NKFIH nyújtott anyagi támogatást (K131679). TM a MATE Kertészettudományi Doktori Iskolájának PhD hallgatója. OA 11. osztályos, biológia-kémia szakos hallgató a Kecskeméti Református Gimnáziumban, munkáját a Tudományos Diákkörök Országos Konferenciája (TUDOK) támogatta.

### Irodalomjegyzék

1. Czotter, N., Molnar, J., Szabó, E., Demian, E., Kontra, L., Baksa, I., Szittyá, G., Kocsis, L., Deak, T., Bisztray, G. and Tusnady, G.E. 2018. NGS of virus-derived small RNAs as a diagnostic method used to determine viromes of Hungarian vineyards. *Frontiers in Microbiology*, 9: 122.
2. Elbeaino, T., Kontra, L., Demian, E., Jaksá-Czotter, N., Slimen, A.B., Fabian, R., Lazar, J., Tamisier, L., Digiario, M., Massart, S. and Varallyay, E. 2020. Complete sequence, genome organization and molecular detection of grapevine line pattern virus, a new putative anulavirus infecting grapevine. *Viruses*, 12(6): 602.
3. Engel, E.A., Escobar, P.F., Rojas, L.A., Rivera, P.A., Fiore, N. and Valenzuela, P.D. 2010. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 163(2): 445-451.
4. Gambino, G. and 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.
5. Glasa, M., Predajňa, L., Komínek, P., Nagyová, A., Candresse, T. and 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.
6. Gugerli, P., Brugger, J.J., Ramel, M.E. and Besse, S. 2009. Grapevine virus collection at Nyon: A contribution to a putative network of a worldwide grapevine virus reference collection. In *Extended abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, France*. 31: 15-23.
7. Lázár J., Ország M., Sebestyén D. és Kölber M. 2009. GLRaV izolátumok a BCE SZBKI Kecskemét vírusgénbankjában. *Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2009. febr. 23-24.* p. 77.
8. Lázár J., Ország M. és Simon A. 2008. GCMV, ArMV és TBRV izolátumok az FVM SZBKI Kecskemét vírusgénbankjában. *Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2008. febr. 27-28.* p. 72.
9. Lehoczky, J., Martelli, G.P. and Lázár, J. 1992. Seed transmission of Grapevine line pattern virus. *Phytopath. mediterr.* 31: 115 - 116.
10. Lima, M.F., Alkowni, R., Uyemoto, J.K., Golino, D., Osman, F. and 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.
11. Minafra, A. and Hadidi, A. 1994. Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods*, 47(1-2): 175-187.
12. Nakaune, R. and 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: 244-249.
13. Osman, F. and 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.
14. Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D. and 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.

15. Szegedi, E., Deák, T., Turcsán, M., Szénási, M., Bordé, Á. és 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.
16. Xu, Q., Wen, X. and Deng, X. 2004. A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (*Rosa roxburgii* Tratt) for RFLP and PCR analyses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(3): 301a–301g.

## **Preservation of the virus collection at Kecskemét Research Station of Institute for Viticulture and Oenology of MATE**

OLÁH, A.<sup>1</sup>, OLÁH, K.<sup>2</sup>, TURCSÁN, M.<sup>2</sup>, LÁZÁR, J.<sup>2</sup>, OLÁH, R.<sup>2</sup>,  
NYITRAINÉ SÁRDY, D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kecskemét Calvinist Secondary Grammar School, Kecskemét

<sup>2</sup> Hungarian University of Agriculture and Life Sciences,  
Institute for Viticulture and Oenology, Kecskemét

<sup>3</sup> Hungarian University of Agriculture and Life Sciences,  
Institute for Viticulture and Oenology, Budapest

E-mail: olah.robert@uni-mate.hu

### **Summary**

Maintenance of virus collections is the instrumental basis to research different viruses, symptoms and physiological changes caused by them (Gugerli et al. 2009). This is especially important when we want to examine the pathogens in interactions with the grape virome. Virus collections are also essential for the reliable use of different diagnostic methods. Field collection of virus infected grapes, established by János Lehoczky and his co-workers in the 70s, was endangered, due to the infrastructural development of Kecskemét. Therefore, the plant material of the collection was vegetatively propagated and maintained in a greenhouse. The RT-PCR based virus diagnostics of the collection has begun to complete the previous results of symptomatology and ELISA tests.

**Keywords:** vegetative propagation, RT-PCR, virus diagnostics

### **Szerzők**

Oláh Anna – 11. osztályos, biológia-kémia szakos hallgató, TUDOK résztvevő, Kecskeméti Református Gimnázium, Kecskemét, 6000 Kecskemét, Szabadság tér 7.

Oláh Krisztina – kutató mérnök, MATE Szőlészeti és Borászati Intézet, Kecskeméti Kutatóállomás, 6000 Kecskemét, Katona Zsigmond út 5.

Turcsán Mihály – tudományos segédmunkatárs, MATE Szőlészeti és Borászati Intézet, Kecskeméti Kutatóállomás, 6000 Kecskemét, Katona Zsigmond út 5.

Lázár János – tudományos munkatárs, MATE Szőlészeti és Borászati Intézet, Kecskeméti Kutatóállomás, 6000 Kecskemét, Katona Zsigmond út 5.

Oláh Róbert – PhD, tudományos tanácsadó, MATE Szőlészeti és Borászati Intézet, Kecskeméti Kutatóállomás, 6000 Kecskemét, Katona Zsigmond út 5.

Nyitrai Diána – PhD, intézetigazgató, egyetemi docens, MATE Szőlészeti és Borászati Intézet, 1118 Budapest, Ménesi út 45.