

## Referenciagénekre tervezett új primerek alkalmazhatósága rutinszerű szőlő vírusdiagnosztikai vizsgálatokhoz

TURCSÁN MIHÁLY, SZEGEDI ERNŐ, OLÁH KRISZTINA, OLÁH RÓBERT,  
JAHNKE GIZELLA, VARGA ZSUZSANNA, DEÁK TAMÁS, NYITRAINÉ SÁRDY DIÁNA

MATE Szőlészeti és Borászati Intézet, Budapest

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

### Összefoglalás

A patogénmentes szőlő szaporítóanyagelőállítás kiindulási alapját ma már a különböző szövettenyésztési eljárások biztosítják. Az anyanövények mellett a szövettenyésztéssel előállított növények egészségügyi állapotát is szükséges ellenőrizni, amelyhez az ELISA és a RT-PCR a rutinszerűen alkalmazott költséghatékony módszerek. A RT-PCR módszer használata során többek között szükség van a cDNS szintézis sikerességének ellenőrzésére is. A RT-PCR módszer esetében a kinyert genomi DNS-t (gDNS) általában emésztik DN-áz aktivitású enzimmel, ezért a PCR során biztosak lehetünk benne, hogy a reakcióhoz a cDNS szolgált alapul, nem pedig a genomi DNS. Ugyanakkor a szőlő vírusokra történő rutinszerű tesztelés esetében gyakran felesleges a gDNS teljes eltávolítása, mivel a tesztelendő vírus diagnosztikában használt genetikai kódja nem található meg a szőlő genomban, ezáltal nem áll fenn a veszélye a hamis pozitív eredménynek. Ebben az esetben viszont a megbízható kiértékelés érdekében olyan primerek tervezése szükséges, amelyek képesek a gDNS és cDNS eredetű fragmentumok között különbséget tenni. Ennek a problémának a megoldására terveztünk olyan primereket, amelyek az egyes referenciagének intront határoló régióira specifikusak, így eltérő méretű fragmentumokat amplifikálnak az intront tartalmazó gDNS-ről és az intront nem tartalmazó cDNS-ről.

Kísérleteink alapján bebizonyosodott, hogy ezek a primerpárok működőképesek több szőlőfajta eltérő szövetéből (*in vitro* levél, szabadföldi levél és levélnyel, hancskaparék) származó minta tesztelésekor is. Használatuk során a gélelektroforézist követően egyértelműen elkülöníthetők voltak a gDNS és az intronokat nem tartalmazó cDNS eredetű fragmentumok. Ezen felül ezekkel a primerekkel vírusokra, valamint *Agrobacterium vitis* különböző törzseire specifikus primerekkel sikeres duplex és triplex PCR reakciókat is végeztünk, amely során az egyes fragmentumok jól elkülönültek. Ilyen módon amellet, hogy a cDNS szintézis sikeressége is bizonyítható, a diagnosztikára szánt időt is rövidíthetjük.

**Kulcsszavak:** referenciagén, RT-PCR, intron, patogén

## Bevezetés és irodalmi áttekintés

A szőlőnövényeket számos patogén fertőzése veszélyezteti, amelyek közül az ültetvényekben a viroidok, vírusok és fitoplazmák ellen jelenleg nem ismerünk hatékony védekezési módszert. A vírusok és viroidok emellett sokszor látens formában is képesek fertőzni, amely elősegíti a szőlő szaporítóanyaggal történő hatékony terjedésüket. Az elmúlt évtizedekben *in vitro* szövettenyésztési módszereket dolgoztak ki annak érdekében, hogy ezektől a legfontosabb patogénektől mentes, egészséges növényeket tudjanak előállítani. A merisztématenyésztés, a szomatikus embriogenezis, a kemoterápia, a hőterápia vagy a krioterápia során regenerált növényegedek egészségügyi állapotának ellenőrzésére a RT-PCR rutinszerűen alkalmazott módszer. A tesztelés első lépése a nukleinsav izolálása a különböző mentesítési módszerekkel regenerált egyedekből. A szőlő fertőző vírusok túlnyomó része RNS örökítőanyaggal rendelkezik, ezért a kivonást követően reverz transzkripcióval cDNS-t (copy DNS) szintetizálunk a PCR tesztek elvégzéséhez. Ezt követően fontos lépés a cDNS szintézis sikerességének ellenőrzése, amelyet különböző belső kontrollként használatos referenciagénre tervezett primerek használatával tudunk elvégezni. Ezek a gének lehetnek a különböző biotechnológiai és genomikai vizsgálatok során fontos kalibrációs szerepet betöltő háztartási gének (Eisenberg és Levanon 2013). Ilyen gyakran használt referenciagének például a *18S rRNS*, az *elongációs faktor 1- $\alpha$*  (*elf1- $\alpha$* ), az *aktin* és *tubulin* gének vagy a *glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz* (*GAPDH*) is. A felsorolt gének a legtöbb szövetben, eltérő körülmények között is állandó expressziót mutatnak, ami alkalmassá teszi őket a RT-PCR vizsgálatok belső kontrolljaként való használatra is. Ugyanakkor ezek a gének is nagymértékű expressziós variabilitást mutathatnak eltérő növényfajok, de akár változatos kísérleti körülmények esetében is, ezért kiválasztásuknál körültekintően kell eljárni (Song és tsai 2021).

Számos publikáció született már az egyes referenciagén primerek használatáról és összehasonlításáról. Gambino és tsai (2008) a *18S rRNS* expressziós stabilitását vizsgálták a szőlő növények különféle szerveiből (*in vitro* és szabadföldi levél, hánccsaparék), eltérő módszerekkel izolált nukleinsav felhasználásával. Azt találták, hogy a RT-PCR során a *18S rRNS* specifikus fragmentuma minden esetben egyértelműen kimutatható volt. Nem sokkal később Osman és tsai (2008) vírusfertőzött szőlő növények hánccsaparék és levélmintáin kísérletezve szintén jó eredményeket kaptak különböző fajtákon. Monteiro és tsai (2013) peronoszpóra-fertőzött szőlőnövényeken vizsgálták a rezisztenciagén expresszióját, amely kísérletben számos referenciagén jelöltet használtak belső kontrollként, azonban az *elf1- $\alpha$*  bizonyult a legstabilabban működőnek, de a *GAPDH* is jó eredményeket mutatott. Az *aktin* gén Reid és tsai (2006) vizsgálatai alapján 14 másik referenciagénnel összehasonlítva is kiemelkedő teljesítményt mutatott a különböző fejlettségi stádiumban gyűjtött szőlőbogyó mintákban, valamint Jelly és tsai (2012) vizsgálatai alapján a szomatikus embrió eredetű növények esetében is stabilan működött. Ugyanebben a kísérletben az általánosságban szintén stabilan működő heterodimer tubulin molekula  $\alpha$  alegysége is kiemelkedő volt, míg a  $\beta$ -tubulin kevésbé. Történtek vizsgálatok különböző kórokozókkal fertőzött szőlőnövények esetében is. Katoh és tsai (2009) GVA fertőzött növények levél, bogyó, bogyóhéj és merisztéma eredetű növények levél mintáin, Selim és tsai (2012) szőlőperonoszpóra-fertőzött növények levél mintáin, Song és tsai (2021) pedig GLRaV-3 vírussal fertőzött, különböző fejlettségi stádiumban lévő növények bogyó és levélmintáin végzett az *aktin* gén expresszióját vizsgáló

kísérleteket. Pacifico és tsai (2011) öt különböző vírussal fertőzött szabadföldi szőlőnövényeket tesztelve megállapította, hogy a *GAPDH* gén alkalmas belső kontroll a kísérletükhöz, amelyben a vírusok koncentrációját szerették volna számszerűsíteni. Ugyanezen évben Banilas és tsai (2011) különböző stresszfactoroknak (hő, szárazság) kitett szőlőnövényekben vizsgálták egy hősokkfehérje expressziós mintázatát. A változatos szövetekből származó mintákból (levél, kacs, merisztéma, gyökér) kivétel nélkül amplifikálható volt a *GAPDH* gén fragmentuma, ami így megfelelő belső kontrollként működött.

Az előbb említett publikációkban szereplő referenciagén primerek jól működtek a különböző szövetekből izolált mintákból, változatos kísérleti körülmények között, ám a korábban megfogalmazott célok alapján hiányosságuk, hogy a gDNS-ből és a cDNS-ből ugyanakkora méretű fragmentumot amplifikálnak. Ennek kiemelt jelentősége van abban az esetben, ha a nukleinsav izolálás során nem csupán RNS-t nyerünk ki. Ilyenkor a cDNS-ből történő referenciagén primerekkel végzett PCR során a termékünk származhat a cDNS szintézishez használt mintában lévő maradék gDNS-ből is, így nem különíthető el egyértelműen a cDNS eredetű terméktől. Ez a minták DN-áz kezelésével kiküszöbölhető lehet, de ez a lépés extra költséget és időráfordítást jelent a nagy mintaszámú, rutinszerű víruskimutatások során. Ennek a problémának a megoldása lehet olyan primerek használata, amelyek a referenciagén intronokat tartalmazó szakaszára specifikusak, így a cDNS-ből jóval rövidebb fragmentum amplifikálására képesek (1. ábra), ami a gélelektroforézis során egyértelműen elkülönül a gDNS eredetű fragmentumoktól.

1. ábra. Az intronokat tartalmazó referenciagén szakaszokra specifikus primer párok eltérő méretű terméket amplifikálnak gDNS-ről és cDNS-ről

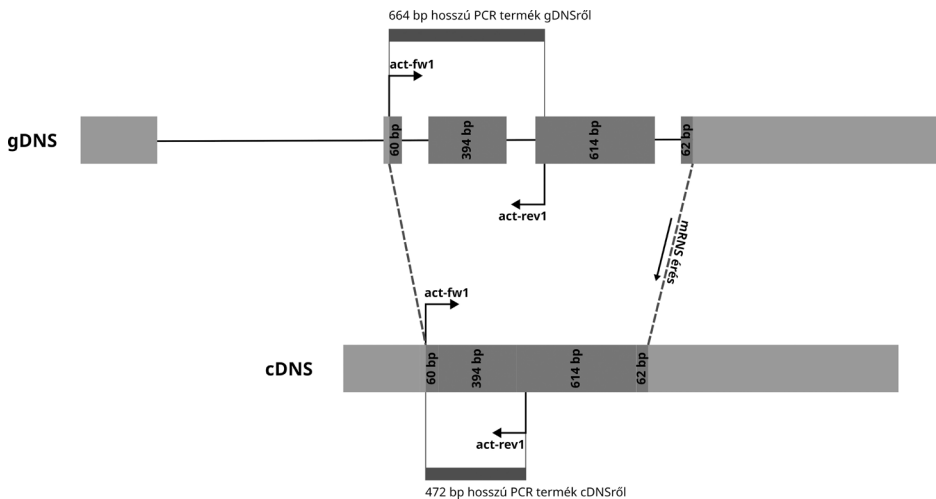


Figure 1. Primer pairs specific for intron-containing reference gene sequences amplify products of different sizes from gDNA and cDNA

## Anyag és módszer

Első lépésben olyan primereket terveztünk a Primer3 program (Untergasser és tsai 2012) segítségével, amelyek a különböző referenciagének intront tartalmazó régióit szaporítják fel. A 4-es kromoszómán található *aktin* gén (VIT\_204s0044g00580.1) esetében két intront, a 6-os kromoszómán található *elf1- $\alpha$*  (VIT\_206s0004g03240.1) esetében egy intront, a 17-es kromoszómán található *GAPDH* (VIT\_217s0000g10430.1) esetében kettő intront, a 12-es kromoszómán található a *foszfoenol-piruvát-karboxiláz* (*PEP*; VIT\_212s0028g02180, AF236126.1) esetében két intront tartalmazó, valamint a 6-os kromoszómán található *tubulin* (VIT\_206s0004g00480.3) esetében a kettő intront tartalmazó régiók felszaporítására specifikus primereket terveztünk (2. ábra, 1. táblázat) és szintetizáltattunk (Biocenter Kft.).

### 2. ábra. Az intronokat tartalmazó referenciagén szakaszokra specifikus primer párok elhelyezkedése a szőlő genomban.

Az exonok sötét négyzettel, az intronok fekete vonalakkal vannak jelölve. Világos árnyalattal az 5' upstream és 3' downstream szekvenciák láthatók.

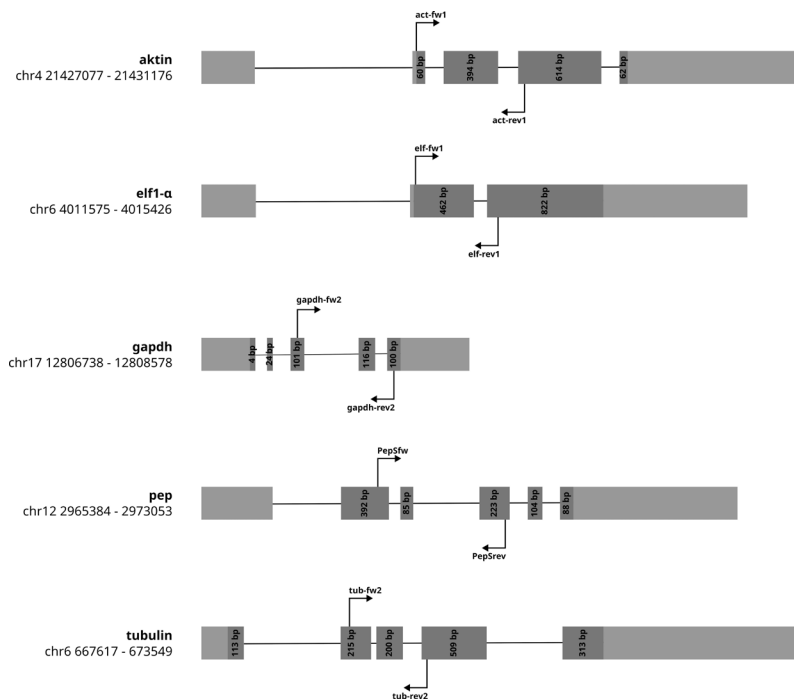


Figure 2. Location of primer pairs specific for intron-containing reference gene sequences in the grapevine genome. Exons are indicated by dark squares, introns by black lines. Light shading indicates 5' upstream and 3' downstream sequences.

## 1. táblázat. A kísérletek során felhasznált referenciagén primerek

CÉLZOTT GÉN	PRIMER NEVE	MAGYAR MEGNEVEZÉS	SZEKVENCIA (5'-3')	AMPLIFIKÁLT FRAGMENT MÉRLETE gDNS/cDNS (bp)	REFERENCIA
<b>18S rRNS</b>	18S rRNA_Fw	18S kis riboszómális alegység	CGCATCATTCAAATTTCTG C	844/844	Gambino & Gribaudo 2006
	18S rRNA-Rev		TTCAGCCTTGCACCATAC T		
<b>aktin</b>	act-fw1	aktin	GGCCGATACTGAAGATATC CAG	664/472	Jelen munka
	act-rev1		ACCAGAATCCAGACAAT ACC		
<b>elf1-<math>\alpha</math></b>	elf-fw1	elongációs faktor 1- $\alpha$	GGGTAAGGAGAAGGTTT ACATC	579/493	Jelen munka
	elf-rev1		TGCCTTGGAGTACTTTGG TG		
<b>GAPDH</b>	gapdh-fw2	glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz	GCACTCAACGATCCATTCA TC	753/237	Jelen munka
	gapdh-rev2		AGCCTTGTCTTGTCACTG		
<b>PEP</b>	PepS2fw	foszfoenolpiruvát karboxiláz	GTCCTTACAGCACATCCTA CTC	1594/357	Jelen munka
	PepS2rev		CCCACCCATCCAAGAAGA AA		
<b>tubulin</b>	tub-fw2	tubulin	CACGATGCTTTCAACACCT TC	898/487	Jelen munka
	tub-rev2		CTTCATTGTCCAAGAGCAC AG		

Table 1. Reference gene primers used in the experiments (1. Gene 2. Name of the primer 3. sequences 4. Amplified fragment size 5. References)

Az első kísérletben a hagyományosan használt *18S rRNS* génre specifikus primerpárokkal végeztünk RT-PCR-t 24 szőlőfajta (7 alany és 17 nemes) levélmintáit felhasználva, majd ugyanezt megismételtük az általunk *PEP* génre tervezett primerekkel is, amelyek intronokat tartalmazó régiót fognak közre. Ezt követően 4 további általunk tervezett primerpár működését (*aktin*, *elf1- $\alpha$* , *GAPDH*, *tubulin*) is teszteltük ugyanezen fajtákon. Üvegházban tartottuk fenn a *V. berlandieri*  $\times$  *V. riparia* '5C', *V. berlandieri*  $\times$  *V. riparia* 'SO4', *V. berlandieri*  $\times$  *V. riparia* '5BB', (*V. berlandieri*  $\times$  *V. riparia*)  $\times$  *V. vinifera* 'Georgikon 28', *V. riparia*  $\times$  *V. cinerea* 'Börner', *V. berlandieri*  $\times$  *V. rupestris* 'Ruggieri 140' növényeket. A *V. berlandieri*  $\times$  *V. rupestris* '110 Richter' alanyt, valamint a *V. vinifera* 'Kövidinka', 'Sárfehér', 'Kunleány', 'Miklóstelep 7', 'Kadarka', 'Kék bakator', 'Juhfark', 'Neoplanta', 'Pintes', 'Zefír', 'Furmint', 'Esther', 'Muscat Ottonel', 'Olasz rizling', 'Vulcanus', 'Zervin' és 'Piros bakator' fajtákat *in vitro* tartottuk fenn. Az *in vitro* (nem vírusmentesített) növényeket fél mennyiségű makroelemeket tartalmazó Murashige és Skoog (MS) táptalajon szaporítottuk.

A következő kísérletben az *aktin*, az *elf1- $\alpha$*  és a *tubulin* primerpárok kifejeződését igazoltuk 12 fajta ('5C', 'SO4', 'G28', 'Börner', 'Kövidinka', 'Sárfehér', 'Kadarka', 'Zefír', 'Furmint', 'Esther', 'Muscat Ottonel', 'Olasz rizling') eltérő szöveti eredetű mintáin. Ennek megfelelően *in vitro* növények leveléből és szabadföldi növények (MATE SZBI Kecskeméti Kutatóállomás) nyáron megszedett leveléből, levélnyélből, valamint télen begyűjtött nyugalmi állapotban lévő vesszők hánckaparekából származó mintákat dolgoztunk fel.

Az *aktin* és *tubulin* primerpárok működését duplex/multiplex PCR reakcióban is megvizsgáltuk korábban igazoltan GFkV és GRSPaV fertőzött *in vitro* növények mintáit felhasználva ('5C',

‘SO4’, ‘G28’, ‘Börner’, ‘Kövidinka’, ‘Sárfehér’, ‘Kadarka’, ‘Zefír’, ‘Furmint’, ‘Esther’, ‘Muscat Ottonel’, ‘Olasz rizling’). Az *elf1- $\alpha$*  primerpár működését duplex PCR reakcióban végeztük a GfKV és GRSPaV fertőzött *in vitro* növényeken (‘Kék bakator’, ‘Juhfark’, ‘Neoplanta’, ‘Zefír’, ‘Zervin’, ‘Pintes’, ‘Furmint’).

Ezen felül *Agrobacterium vitis poligalakturonáz (PG)* génjére specifikus primerekkel kombinálva is vizsgáltuk működésüket agrobaktériumtól mentes szabadföldi ‘Muscat Ottonel’ anyanövény (MATE SZBI Kecskeméti Kutatóállomás) és agrobaktérium eredetű nukleinsavak keverékében.

A növényi minták feldolgozását a Xu és tsai. (2004) által leírt CTAB alapú protokoll szerint végeztük el. A kinyert nukleinsavból történő cDNS szintézist a RevertAid First cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K1622) leírása alapján, random hexamer primerek felhasználásával kiviteleztük. A RT-PCR-hez a DreamTaq DNA Polymerase Kit-et (Thermo Scientific, #EP0703) használtuk. A reakcióelegyeket a Turcsán és tsai (2020) által leírtak alapján állítottuk össze. A gélelektroforézis során a mintákat 1,5 %-os agaróz tartalmú Tris-acetát-EDTA (TAE) gélen futtattuk 90 V feszültségen.

### Eredmények

Elsőként a széleskörűen alkalmazott *18S rRNS* referenciagén primerpár és az általunk tervezett *PEP* primerpár működését hasonlítottuk össze 24 szőlőfajta levélmintát felhasználva. Ezt megtettük a nukleinsav izolálás során kinyert gDNS-t tartalmazó minták és az azokból szintetizált cDNS felhasználásával is (3. ábra).

3. ábra. A 18S rRNS és a PEP referencia génre specifikus primerekkel végzett RT-PCR reakció gélképei 24 szőlő levélminta gDNS-ét és cDNS-ét használva templátként. Mintasor: M: méretmarker, Ø: null kontroll, 1.-24.: ‘5C’, ‘SO4’, ‘5BB’, ‘Georgikon 28’, ‘Börner’, ‘Ruggieri 140’, ‘110 Richter’, ‘Kövidinka’, ‘Sárfehér’, ‘Kunleány’, ‘Miklóstelep 7’, ‘Kadarka’, ‘Kék bakator’, ‘Juhfark’, ‘Neoplanta’, ‘Pintes’, ‘Zefír’, ‘Furmint’, ‘Esther’, ‘Muscat Ottonel’, ‘Olasz rizling’, ‘Vulcanus’, ‘Zervin’, ‘Piros bakator’

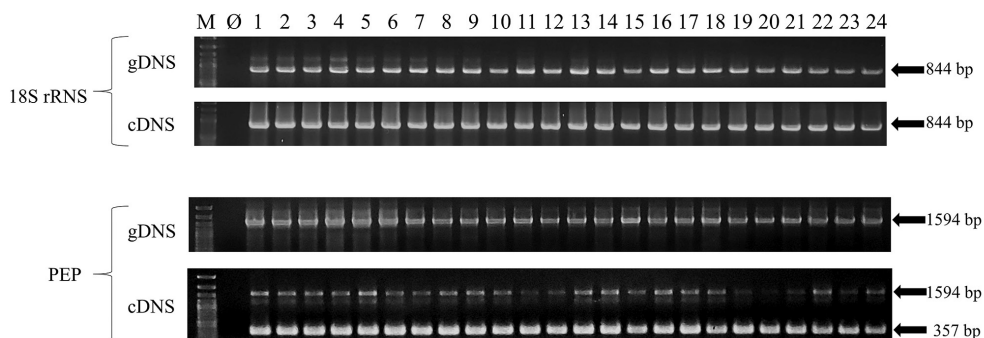


Figure 3. RT-PCR reaction with *18S rRNA* and primers specific for the reference gene *PEP* using gDNA and cDNA from 24 grape leaf samples as template. Sample sequence: M: size marker, Ø: null control, 1-24: ‘5C’, ‘SO4’, ‘5BB’, ‘Georgikon 28’, ‘Börner’, ‘Ruggieri 140’, ‘110 Richter’, ‘Kövidinka’, ‘Sárfehér’, ‘Kunleány’, ‘Miklóstelep 7’, ‘Kadarka’, ‘Kék bakator’, ‘Juhfark’, ‘Neoplanta’, ‘Pintes’, ‘Zefír’, ‘Furmint’, ‘Esther’, ‘Muscat Ottonel’, ‘Olasz rizling’, ‘Vulcanus’, ‘Zervin’, ‘Piros bakator’

Az eredmények alapján látható, hogy amennyiben cDNS-t használtunk templátként, abban az esetben a *PEP* primerpár esetében megjelent egy rövidebb PCR termék is, míg a *18S RNS* primerpár esetében nem (a nem specifikus termékek eredetét nem vizsgáltuk). Ez azért lehetséges, mert a cDNS már nem tartalmaz intronokat, ugyanis azok az RNS érési folyamatok során kivágódnak. Mivel a *PEP* primerpár intronokat tartalmazó régióra lett tervezve, így az intronok hosszával rövidebb fragmentumot tudunk amplifikálni. Mindentől függetlenül a gDNS eredetű nagyobb fragmentum ugyancsak megjelenik a gélen, de méretbeli eltérése miatt könnyen elkülöníthető. Ezek után további négy primerpárt (*aktin*, *elf1- $\alpha$* , *GAPDH*, *tubulin*) terveztünk és teszteltünk ugyanezen mintákon, amelyek közül három megfelelően működött. A *GAPDH* primerpár esetében előfordultak aspecifikus fragmentumok, így azt a további kísérletekből kizártuk.

A következő kísérletben különböző szöveti eredetű mintákon teszteltük az *aktin*, *elf1- $\alpha$*  és *tubulin* primerpárjaink működését. A négy szövettypusból származó minták tesztelése során mind a három primerpár stabilan működött (4. ábra).

4. ábra. A különböző szöveti eredetű mintákon végzett RT-PCR tesztek eredménye cDNS-ek felhasználásával. Mintasor: M: méretmarker, Ø: null kontroll, 1.-12.: '5C', 'SO4', 'G28', 'Börner', 'Kövödinka', 'Sárfehér', 'Kadarka', 'Zefir', 'Furmint', 'Esther', 'Muscat Ottonel', 'Olasz rizling'

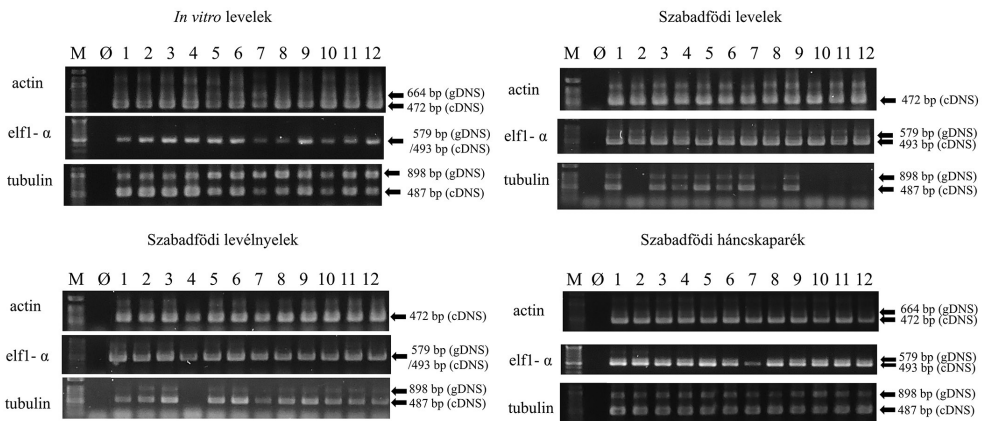


Figure 4. Results of RT-PCR tests using cDNAs of different tissue samples. Sample sequence: M: size marker, Ø: null control, 1.-12: '5C', 'SO4', 'G28', 'Börner', 'Kövödinka', 'Sárfehér', 'Kadarka', 'Zefir', 'Furmint', 'Esther', 'Muscat Ottonel', 'Olasz rizling'

A cDNS eredetű fragmentumok minden esetben megjelentek az agaróz gélen, ám a gDNS eredetű fragmentumok esetében voltak eltérések. A levélgyél eredetű mintákra tekintve látható, hogy a gDNS-ből származó fragmentumok nem, vagy csak gyengén jelentek meg. A *tubulin* primerpár

ennek ellenére szinte minden esetben sikeresen amplifikálta a gDNS eredetű fragmentumokat is, míg az *aktin* primerpár csak a hánckaparéék eredetű mintákból és néhány *in vitro* levélmintából tudta kimutatni. Az *elf1- $\alpha$*  primerpár a szabadföldi levél és hánckaparéék mintákból ugyancsak amplifikálta a gDNS eredetű fragmentumokat, de az méretben nem különült el számottevően a gélelektroforézis során, mivel csak egy 86 bp-os intront tartalmaz. A két eltérő fragmentum így hosszabb futtatási idővel szeparálható.

A következőkben az *aktin* primerpárt GFkV és GRSPaV fertőzött növények levélmintáin a vírusokra specifikus primerpárokkal triplex PCR reakcióban is kipróbáltuk. Hasonlóképpen az *elf1- $\alpha$*  primerpárt először GFkV, majd GRSPaV vírusra specifikus primerpárokkal, a *tubulin* primerpárt pedig a GFkV-ra specifikus primerpárokkal duplex PCR-ek során teszteltük (5. és 6. ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy a három referenciagén primerünk stabilan működött ilyen körülmények között is, ám az *aktin*/GFkV/GRSPaV triplex PCR során a két vírus specifikus fragmentuma nem volt elkülöníthető az adott futtatási idő alatt. Az elektroforézis időtartamának növelésével a különböző hosszúságú termékek valószínűleg egyértelműen elváltak volna, azonban a rutinszerű diagnosztikában ezt a megoldást nem akartuk alkalmazni.

5. ábra. Az aktin, a GFkV és a GRSPaV, valamint a tubulin és a GFkV specifikus primerek duplex/triplex PCR eredményei. Mintasor: M: méretmarker, Ø: null kontroll, 1.-12.: '5C', 'SO4', 'G28', 'Börner', 'Kövidinka', 'Sárfehér', 'Kadarka', 'Zefir', 'Furmint', 'Esther', 'Muscat Ottonel', 'Olasz rizling'

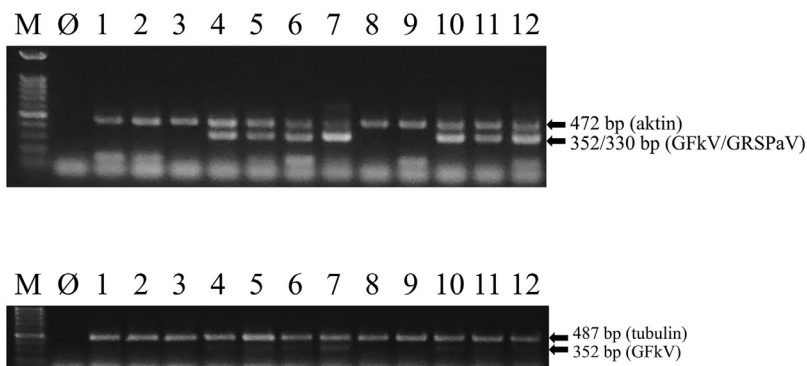


Figure 5. Duplex/triplex PCR results using *aktin* with GFkV and GRSPaV specific primers, or *tubulin* with GFkV specific primers. Sample sequence: M: size marker, Ø: null control, 1.-12: '5C', 'SO4', 'G28', 'Börner', 'Kövidinka', 'Sárfehér', 'Kadarka', 'Zefir', 'Furmint', 'Esther', 'Muscat Ottonel', 'Olasz rizling'



6. ábra. Az *elf1- $\alpha$* , a GFkV és a GRSPaV vírus specifikus primerek duplex PCR eredményei  
Mintason: M: méretmarker, Ø: null kontroll, 1.-10.: 'Kék bakator', 'Kék bakator', 'Juhfark',  
'Neoplanta', 'Zefír', 'Zervin', 'Zervin', 'Pintes', 'Pintes', 'Furmint'

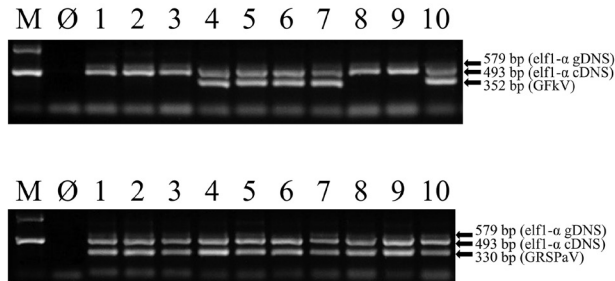


Figure 6. Duplex PCR results of *elf1- $\alpha$*  with GFkV or GRSPaV virus specific primers.  
Sample sequence: M: size marker, Ø: null control, 1.-10: 'Kék bakator', 'Kék bakator',  
'Juhfark', 'Neoplanta', 'Zefír', 'Zervin', 'Zervin', 'Pintes', 'Pintes', 'Furmint'

Az *A. vitis* törzsek és a 'Muscat Ottonel' mintákkal végzett duplex PCR eredmények a 7. ábrán láthatók. Az első három, csak az *A. vitis* három különböző törzsének nukleinsavát tartalmazó mintákból csak a *PG* génre specifikus primerpár amplifikálta a megfelelő fragmentumot, míg a negyedik, 'Muscat Ottonel' nukleinsavat tartalmazó mintában, kizárólag az *aktin* és *tubulin* primerpárok működtek. Az utolsó három mintából, amelyek a különböző agrobaktérium törzsek és a szőlő nukleinsavak keverékét tartalmazta, mindkét fragmentum megjelent.

7. ábra. A referenciagénekre specifikus primerpárok használata az *Agrobacterium vitis* *PG* génre specifikus primerekkel duplex PCR-ban. Mintason: M: méretmarker, Ø: null kontroll, 1.-7.:  
*Agrobacterium vitis* Tm4, *A. vitis* AT1, *A. vitis* S4, 'Muscat Ottonel', 'Muscat Ottonel' és *A. vitis* Tm4, 'Muscat Ottonel' és *A. vitis* AT1, 'Muscat Ottonel' és *A. vitis* S4

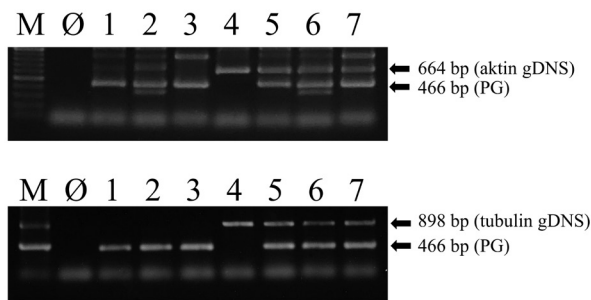


Figure 7. Use of reference gene-specific primer pairs with *Agrobacterium vitis* *PG* gene-specific primers in duplex PCR. Samples: M: size marker, Ø: null control, 1-7: *Agrobacterium vitis* Tm4, *A. vitis* AT1, *A. vitis* S4, 'Muscat Ottonel', 'Muscat Ottonel' and *A. vitis* Tm4, 'Muscat Ottonel' and *A. vitis* AT1, 'Muscat Ottonel' and *A. vitis* S4

## Megvitatás

A szőlő vírusmentesítése során regenerált növényegyedek egészségügyi állapotát ellenőrizni kell, amire a RT-PCR rutinszerűen alkalmazott eljárás. A folyamat részeként megfelelő referenciagénnel végzett ellenőrző lépéseket kell beiktatnunk a negatív PCR eredmények kiértékeléséhez. Munkánk során négy olyan primerpárt terveztünk, amelyek különböző referenciagének intront tartalmazó régióira specifikusak és így képesek a gDNS és cDNS eredetű fragmentumok elkülönítésére. A kísérletek során bebizonyosodott, hogy a primerpárok működőképesek változatos szöveti eredetű mintákon is. A gDNS eredetű fragmentumok detektálhatóságában akadtak különbségek, amelyek az eltérő szövetek változó hatékonyságú feldolgozásából is adódhattak, ugyanakkor a gDNS kimutatásának nincs jelentősége a víruseszteselés szempontjából.

A multiplex PCR alkalmazása gyorsíthatja az egyes patogének detektálásának idejét, hiszen egyetlen reakcióban több primerpárt is alkalmazhatunk. Ennek megfelelően alkalmaztuk egyidejűleg az *aktin*, *elf1- $\alpha$*  és a *tubulin* specifikus primerpárjainkat a vírusdiagnosztikák során gyakran detektált GFkV és GRSPaV vírusokra specifikus primerpárokkal. A folyamat során a fertőzött mintákból 2-2 fragmentum amplifikálódott (egy referencia gén és egy vírus eredetű), míg a nem fertőzöttekből csak a referenciagén eredetű.

Az *A. vitis* fontos kórokozója a szőlőnek. Mivel DNS örökítőanyaggal rendelkezik, ezért nem szükséges cDNS szintézist végeznünk. Az *aktin* és *tubulin* génekre specifikus primerpárjaink működőképesnek bizonyultak az agrobactérium *PG* génjére specifikus primerekkel egyidejűleg is az *A. vitis* három különböző törzsének és a 'Muscat Ottonel' szőlőfajta nukleinsavának keverékét vizsgálva. Ezt igazolta az, hogy a *PG* gén specifikus fragmentuma, és a referenciagének gDNS eredetű fragmentumai is egyértelműen beazonosíthatók voltak a gélképen.

A potenciális referenciagének eddig közzétett primereit (jellemzően qPCR-hez) általában csak egy vagy két szőlőfajtan tesztelték (Reid és tsai 2006; Monteiro és tsai 2013; Shinde és tsai 2016), és ezek többnyire egyetlen exonon helyezkedtek el. Ebben a munkában olyan új primerkészleteket terveztünk, amelyek egy vagy két intront foglalnak magukba és a hagyományos PCR-hez optimális amplikonokat generálnak (kb. 250-1500 bp) az általánosan használt paraméterek mellett. Összességében megállapítható, hogy az intront tartalmazó génszakasz amplifikálására tervezett primerek használata előnyös, működőképesek lehetnek változatos szövetekből származó minták és különböző fajták esetében is, sőt esetenként hatékonyan kombinálhatók más patogénekre specifikus primerekkel is multiplex PCR reakcióban.

## Köszönetnyilvánítás

Munkánkhoz az NKFIH K131685 számú pályázata nyújtott anyagi támogatást (OR). TM a MATE Kertészettudományi Doktori Iskola PhD hallgatója.

## Irodalomjegyzék

1. Banilas, G., Korkas, E., Englezos, V., Nisiotou, A.A. and 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.

2. Eisenberg, E. and Levanon, E.Y. 2013. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*, 29(10): 569-574.
3. Gambino, G., Perrone, I. and 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.
4. Jelly, N.S., Schellenbaum, P., Walter, B. and 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.
5. Katoh, H., Suzuki, S., Saitoh, T. and 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.
6. Monteiro, F., Sebastiana, M., Pais, M.S. and 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.
7. 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.
8. Pacifico, D., Caciagli, P., Palmano, S., Mannini, F. and 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.
9. Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F. and 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.
10. Selim, M., Legay, S., Berkelmann-Löhnertz, B., Langen, G., Kogel, K.H. and 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.
11. Shinde, M.P., Upadhyay, A., Iquebal, M.A. and Upadhyay, A.K. 2017. Identification, characterization and expression analysis of ERF transcription factor VviERF073 and standardization of stable reference genes under salt stress in grape. *Vitis*, 55: 165-171.
12. Song, Y., Hanner, R.H. and 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.
13. Turcsan, M., Demian, E., Varga, T., Jaksza-Czotter, N., Szegedi, E., Olah, R. and Varallyay, E. 2020. Hts-based monitoring of the efficiency of somatic embryogenesis and meristem cultures used for virus elimination in grapevine. *Plants*, 9(12): 1782.
14. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. and Rozen, S.G. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15): e115-e115.
15. Xu, Q., Wen, X. and 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.

## **Applicability of new primers designed on reference genes for routine grape virus diagnostic tests**

TURCSÁN, M., SZEGEDI, E., OLÁH, K., OLÁH, R., JAHNKE, G., VARGA, ZS.,  
DEÁK, T., NYITRAINÉ SÁRDY, D.

Hungarian University of Agriculture and Life Sciences,  
Institute for Viticulture and Oenology, Budapest

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

### **Summary**

The starting point for the production of pathogen-free grapevine propagation material is generally provided by various tissue culture techniques. In addition to the mother plants, the health status of tissue culture originated plants needs to be monitored, for which ELISA and RT-PCR are routinely used as cost-effective methods. When RT-PCR is applied, it is also necessary to check, among others, the success of cDNA synthesis. In RT-PCR, the extracted genomic DNA (gDNA) is usually digested with DNase enzymes and therefore the available reference primers are reliable. However, in the case of routine testing for grapevine viruses, it is often unnecessary to completely remove the gDNA. In this case, however, the design of primers that are able to distinguish between PCR fragments from gDNA and cDNA origin is necessary for reliable evaluation. To solve this problem, we designed primers that are specific to the intron-containing regions of each reference gene, thus amplifying fragments of different sizes from intron-containing gDNA and non-intron-containing cDNA.

Our experiments have shown that these primer pairs are functional when testing samples from different tissues of several grape varieties (*in vitro* leaves, leaf blade and petioles, cambial tissues). The origin of gDNA and cDNA fragments with or without introns could be clearly distinguished after gel electrophoresis. In addition, successful duplex and triplex PCR reactions were performed with these primers for viruses or with primers specific for different strains of *Agrobacterium vitis*, with good separation of the individual fragments. In this way, in addition to demonstrating the success of cDNA synthesis, the time required for diagnostics can be significantly reduced.

**Keywords:** reference gene, RT-PCR, intron, pathogen

**Szerzők:**

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

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

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

**Szegedi Ernő** – DSc, tudományos tanácsadó, MATE Szőlészeti és Borászati Intézet, Kecskeméti Kutatóállomás, 6000 Kecskemét, Katona Zsigmond út 5.

**Jahnke Gizella** – PhD, tudományos tanácsadó, MATE Szőlészeti és Borászati Intézet, Badacsonyi Kutatóállomás, 8261 Badacsonytomaj-Badacsony, Római út 181.

**Varga Zsuzsanna** – PhD, tanszékvezető egyetemi docens, MATE Szőlészeti és Borászati Intézet, 1118 Budapest, Villányi út 29-43.

**Deák Tamás** – PhD, egyetemi docens, MATE Szőlészeti és Borászati Intézet, 1118 Budapest, Villányi út 29-43.

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