Molekuláris biológiai módszerek fejlődése a növényi vírusdiagnosztikában

Szakdolgozat
biológia alapszak
biológus szakirány

készítette:
Czakó Éva Kamilla

témavezető:
Dr. Várallyay Éva
tudományos főmunkatárs,
NAIK-MBK

belső konzulens:
Dr. Preininger Éva
egyetemi adjunktus
Növényszervezettani Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET

Budapest, 2015

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés 3

2. Vírusok általános jellemzése 4

3. A növényi vírusok és vírus- okozta megbetegedések.....6

3.1.Jelentőség 6

3.2.A gazda és a kórokozó.....8

3.2.1. A gazdanövény 8

3.2.2. Vírusmorfológia és felépítés.....9

3.3. Szimptómák..... 10

3.3.1. Lokális szimptómák..... 10

3.3.2. Szisztemikus szimptómák..... 11

3.4.Terjedés..... 12

3.4.1. Rövid- és hosszútávú terjedés 13

3.4.2. Mechanikai átvitel 14

3.4.3. Vektor-mediált transzmisszió 14

4. A növényi vírusfertőzés molekuláris háttere..... 16

4.1. A gazda és a vírus genom szerveződése 16

4.2. Replikáció és transzkripció, vírusfertőzés folyamata..... 17

4.3. Növényi védekező reakció 18

4.3.1. RNS interferencia, géncsendesítés 19

5. Történeti áttekintés. Vírusdiagnosztika a molekuláris eljárások előtt..... 20

5.1. TMV felfedezése, virológia fejlődése 20

5.2. A vírusdiagnosztika alapjai 21

5.3. Elektronmikroszkópia..... 21

5.4. Biotesztek..... 21

6.Növényi mintavétel..... 22

7. Szerológiai módszerek..... 22

7.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 23
7.2. DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzime-Linked Immuno-Sorbent Assay) .. 24
7.3. MIA (Microsphere Immune Assay) 25
8. PCR alapú módszerek 27
8.1. Nukleinsav extrakció 27
8.2. PCR (Polimerase Chain Reaction) 27
8.2.1. Elektroforézis 28
8.2.1. RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) 29
8.3. qPCR (Real-time- vagy kvantitatívPCR) 30
8.5. Multiplex RT-PCR 31
9. Nukleinsav hibridizáción alapuló módszerek 32
9.1. Microarray 33
9.2. LSON (Large-Scale Oligonucleotide Chip) 34
9.3. Polipróbák 35
10. Új generációs szekvenálási módszerek 36
10.1. mRNS szekvenálás 37
10.2. Kis RNS szekvenálás 38
10.3. Teljes virom szekvenálás 39
11. Következtetés 40
12. Összefoglalás 41
13. Summary 42
14. Köszönetnyilvánítás 43
15. Irodalomjegyzék 44

1. Bevezetés

A vírusok nagyon gyakori fertőzői a növényi létformáknak. A természetben, a termőföldeken, de valószínűleg még az üvegházi példányok mindegyikében is megtalálhatjuk a nagyszámú növényvírusok valamelyikét. Egyesek a növényi genomba beépült retrovírusként funkciójukat vesztették. Mások látens módon vannak jelen, és lehetséges, hogy vizsgálat nélkül soha nem is észlelnék jelenlétüket. Valamint vannak a jól és kevésbé jól ismert, betegségeket, ez által pedig súlyos gazdasági károkat okozó patogének. Elsősorban az utóbbiak detektálására, azonosítására, leírására és megfékezésére irányulnak a kutatások.

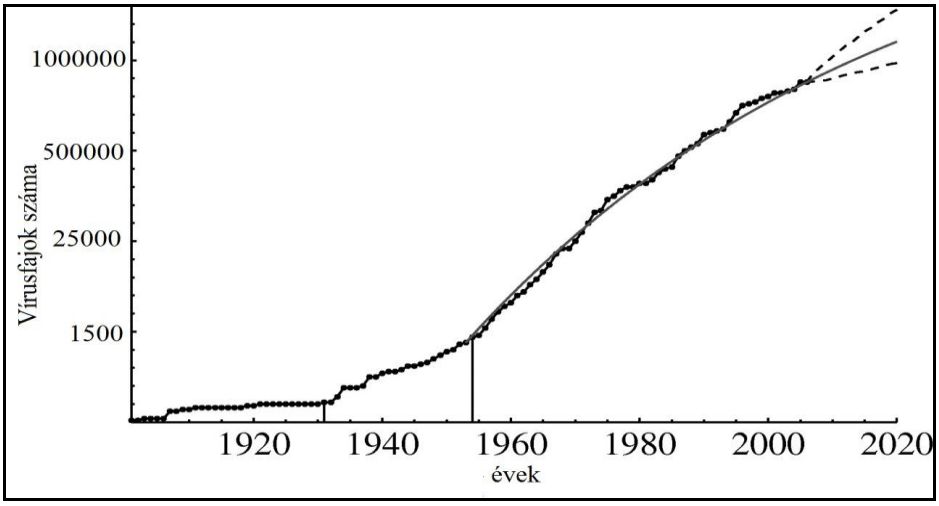
A különböző molekuláris biológiai technikákat felhasználó diagnosztikai fejlesztésének három célja van. Az egyik, hogy olyan módszert hozzanak létre, ami a lehető leggyorsabb-, legpontosabb- és legkönnyebben hozzáférhető eredményt produkálja, elsősorban mezőgazdasági, terepi és növényvédelmi célzattal. A második, hogy egy vizsgálat során, egyidejűleg a lehető legtöbb féle kórokozóra tesztelhetővé tegyenek egy mintát, lehetőleg egyidejűleg, ez által is növelve a sebességet. Harmadikként pedig olyan technológiák alkalmazására fókuszálhatnak, ami az új fajok megismerésére, leírására, genomjuknak feltérképezésére specializálódik. Mindhárom célkitűzésre alkottak és folyamatosan tökéletesítenek diagnosztikai módszereket. Munkám során hasonló szempontok alapján szeretném ismertetni a diagnosztikai eljárások evolúcióját, az időrendűség mellett a korszerűséget is figyelembe véve. Elsőként a vírusokat, majd azokon belül a növényeket fertőző vírusok morfológiáját, terjedését és fertőzésének módját ismertetném, beleértve azokat a kulcsfontosságú molekuláris aspektusokat, amelyek azonosításukra kifejlesztett módszerek alapját képezheti. Ezt követően bemutatom a vírusok diagnosztikájára kifejlesztett módszereket, beleértve a rutin-, és néhány kísérleti alkalmazásukat is. Működésüket és felhasználhatóságukat vizsgálva fel lehet tenni a kérdést, hogy mégis melyik lehet a legjobb módszer, és ezt milyen tényezők alapján lehet megítélni?

2. Vírusok általános jellemzése

A vírusok Földünk legizgalmasabb organizmusai közé tartoznak. Élő és élettelen anyagra jellemző tulajdonságaik is vannak, és annak ellenére, hogy még csak nem is rendelkeznek önállóan működő anyagcserével, és képtelenek az önálló mozgásra, a biológia tudományterületének minden szintjén megmutatkozik a hatásuk. Kezdve az ökológiai szempontból betöltött parazita szerepükkel, egyes állatpatogén vírusok akár évtizedenként jelentős epidémiákat, néha pandémiákat okoznak. A súlyosabb járványok a populációs kölcsönhatások jelentős átalakuláshoz, akár fajok kihalásához is vezethetnek. Az egyedek szinten történő kifejeződésük nem jellemezhető csupán a tünetek leírásával. Fontos megfigyelni azok differenciáltságát, a gazdaállat, vagy –növény reakcióját, életműködésére való hatását, illetve hogy az adott fertőzést milyen más parazita megjelenése követi. Már szinte tényként könyvelhetjük el azt a jelenséget, hogy egy vírusfertőzés soha nem folyik le önmagában, mindig valamilyen más parazita is közrejátszik egy-egy megbetegedés kialakításában. Gondoljunk csak az állati megbetegedések során a gyengülő immunrendszer miatt megjelenő másodlagos fertőzésekre, vagy a növényeknél oly gyakori multiplex infekcióra. Molekuláris szinten vizsgálódva pedig egyre többet tudunk egyes vírusok felépítéséről, fertőzés végbemeneteléről és a hátterében álló biokémiai folyamatokról. Még ha a gazdaszervezet képes is volt önálló védekezésre, és a vírus terjedésének megállítására, annak örökítőanyaga akár generációkkal később is kimutatható a genomjából. Mindent egybevetve ezek a nanométeres nagyságrendű kórokozók igen nagy jelentőséggel bírnak.

Maga az elnevezésük a latin *Virus* szóból származik, melynek angol megfelelője, a poisoneus is arra utal, hogy ezek toxikus, kárt okozó mikroorganizmusok. Legegyszerűbben úgy írhatóak le, hogy olyan fertőző, megbetegedést okozó kórokozók, amelyek magas gazdaspecifitással rendelkeznek és csupán genetikai anyagból és azt körülvevő fehérjeburokból állnak (Lázár, 2011). Önálló reprodukcióra, replikációra, metabolikus folyamatokra nem képes, ezért a gazdasejt mechanizmusait használja, mind a genom, mind a fehérjeburok szintéziséhez és új vírusok termeléséhez. Gazdasejten kívül virion formájában van jelen, amely kitartóképletnek felel meg. Olyan parazita, amelyek

minden élő formát képes megfertőzni, többek között, állati, növényi és bakteriális szervezeteket, de még gombákat és fitoplazmákat is. Apró méretük miatt fénymikroszkóppal nem láthatóak, csupán 30-tól 450 nm-es mérettartományba esnek, amely érték 100-szor kisebb, mint egy átlagos baktériumé. Az 1960-as években közel 1600 vírusfajt ismertek, amelyeket több mint 100 családba soroltak be. Napjainkban csak az ismert vírusok száma, 2013-as adatok alapján közel 1740330-ra tehető (1.ábra), amely még csak nem is tartalmazza az egysejtű organizmusok patogénjeit. Egyes becslések szerint az óceánokban akár több, mint 10^{31} különböző vírus részecskét találhatnánk (http://www.virology.ws).



1. ábra. A Földön előforduló, felfedezett vírusfajok száma, és annak várható jövőbeli alakulása (http://rspb.royalsocietypublishing.org)

A szerveződésüket tekintve kizárólag önállóak, felépítésük is rendkívül egyszerű. Genetikai információt tartalmazó örökítőanyagból, és az azt körülvevő, fehérjeburokból, más szóval kapszidból állnak. Ez a két elem együttesen alkotja a viriont. Egyes vírusoknál előfordul egy harmadik réteg, egy külső, lipoid jellegű, ún. peplon, amely szintén a gazdasejtből származik, és védelmi, illetve terjesét segítő funkciót tölt be (dr. Horváth, 1999). A vírusok morfológiáját a fehérjeburok alakja határozza meg, amely rendszerezésük egyik alapjául is szolgál. A besorolásuk másik meghatározója az örökítőanyag kémiai összetevője, ami alapján csoportosíthatunk egyszálú, vagy kétszálú, RNS, vagy DNS vírusokat A nukleinsav sorrendben kódolt információ alapján lehetnek továbbá szenszek, antiszenszek, a leolvasás irányának megfelelően. Elemeinek szintéziséhez a gazdaszervezet enzimrendszerét használják. Az eredményes infekciót öt szakaszra oszthatjuk, ezt részletesebben a 4. fejezetben tárgyalom (Tvezet, 2014).

Kezdetben a vírusok diagnosztikája a tünetek megfigyelésén alapult, de ez többek között a többszörös, illetve látens fertőzések miatt sem vezetett hiteles eredményekhez. A legmegbízhatóbb adatokhoz objektív diagnosztikai eljárások alkalmazásával jutunk. Ilyenek például a szerológiai, vagy hibridizációs módszerek, vagy a technika fejlődésével az örökítőanyaguk nukleinsav sorrendjének, genomjuknak a meghatározása. A sikeres azonosítást követően a megfelelő védekezési eljárást szükséges végrehajtani a fertőzés megállítása érdekében. Állatpatogén vírusok esetén egyre szélesebb körben alkalmazhatunk terápiás eljárásokat, amelyek az orvostudomány szakterületéhez tartoznak. A növényvírusok elleni védekezés, nagyon nehézkes. A már kialakult betegség megfékezése egyelőre nem lehetséges. Az egyetlen megoldás a megelőzés, amelynek végrehajtása meglehetősen költséges és munkaigényes folyamat. Vegetatív szaporítás során szigorúan ellenőrzött vírusmentes, illetve vírusrezisztens fajták használatát, meglévő ültetvényeken pedig a vektorokat megfékező inszekticidek és fungicidek használatát igényli (Mauck, De Moraes, & Mescher, 2014).

3. A növényi vírusok és vírus- okozta megbetegedések

3.1.Jelentőség

Más vírusokhoz hasonlóan a növényi vírusok is obligát, intracelluláris paraziták, amelyek gazdasejt nélkül nem képesek önálló replikációs és reprodukciós mechanizmusokra. Mivel a gazdanövény génkészletét és enzimrendszerét is felhasználják a szaporodáshoz, előnyösebb számukra, ha ezt fejlettebb szervezetekben teszik, éppen ezért, a növényvírusok általában magasabb rendű, edényes növények patogénjei. Ebbe sajnálatos módon beletartozik szinte az összes, ember által termesztett haszon-, kultúr-, és dísznövény, amelyeket nagyon nagy számban meg is fertőznek ezek a kórokozók. Csupán Európában közel 1000 növényi vírusbetegséget írtak le, világszerte pedig, egyes becslések szerint 40 millió Euró kárt okoznak egyetlen év lefolyása alatt. A termesztett növények körében nagyon nagyszámú és gazdaságilag jelentős vírus és viroid van jelen. Ha egy vírus, vagy viroid megfertőz egy növényt, annak sem a megfékezése, sem az ellene való védekezés nem lehetséges. Ezért a területen történő terjedésének lelassítása érdekében nagyon fontos a korai stádiumban való azonosítása, és a fertőzött növény eltávolítása (Herranz, Sanchez-Navarro, Aparicio, & Pallás, 2005).

Minden mezőgazdasági termelést nagymértékben folytató ország vizsgálata során magas fokú vírusfertőzöttséget tapasztalhatunk.

Példaként említve, Indiában, a mogyoró ültetvényeken, ami ott az egyik legjelentősebb termény, a *Dohány csíkosság vírus* (TSV) Tobacco streak ilarvirus olyan gazdasági károkat okozott, amely számtalan gazda megélhetését veszélybe sodorta. Csupán Anantapur körzetében évi 64 millió rúpia kárt eredményezett (Mehta et al., 2013). Pakisztánban pedig, ahol a burgonya az egyik legfontosabb termény, a növények 83%-a valamilyen vírussal fertőzött. A nagyarányú fertőzöttség mellett aggasztó a kevert infekciók kimagasló aránya (Hameed, Iqbal, Asad, & Mansoor, 2014).

Bizonyos vírusok koinfekciója azért különösen veszélyes a növény számára, mert az RNS interferencián (4.3.1.) alapuló védekező mechanizmusát szupresszáló proteint kódoló vírus jelenlétében a további vírusok a normál szintet meghaladó akkumulációja tapasztalható. Sok helyen nem csak a multiplex fertőzések számos, és szakemberek számára is nehezen azonosítható tünetegyüttesét, de még a legelterjedtebb vírusfertőzéseket sem tudják megfelelően azonosítani a helyi termelők, így tudatosság hiányában a nem tanúsított, fertőzött példányok szaporításával kritikus mértékűvé növekedhet a vírusok jelenléte. Ez sajnos nem egyedi probléma. A világ minden országában, nemcsak önmagukban a vírusos megbetegedések terjednek egyre jobban, hanem a gazdák tájékozatlansága is segíti az azt okozó kórokozók elszaporodását. Ennek megfékezésére szükséges a diagnosztikai módszerek fejlesztése, azok gyorsabbá és elérhetőbbé tétele, valamint a vírusok ellen való védekezés fejlesztése. A vegetatívan szaporított növények esetében ez különösen fontos, mivel megfelelő diagnózis hiányában az anyatőben lévő vírusok továbbszaporítódnak. Ez által pedig egy ültetvénybe bekerülve annak befertőzését és eddig nem megfigyelt betegség megjelenését eredményezhetik (Elena, Fraile, & García-Arenal, 2014). Különösen jelentős ez az oltással szaporított gyümölcsöknél (pl.:szőlő). A fajtafenntartás és fajtanemesítés érdekében létrehozott klónok öreg tőre való ráoltása, azok körültekintő diagnózisának hiányába az esetleg egészséges tövet és az azt körülvevő növényeket is megbetegítik (Hajdu, 2011).

3.2.A gazda és a kórokozó

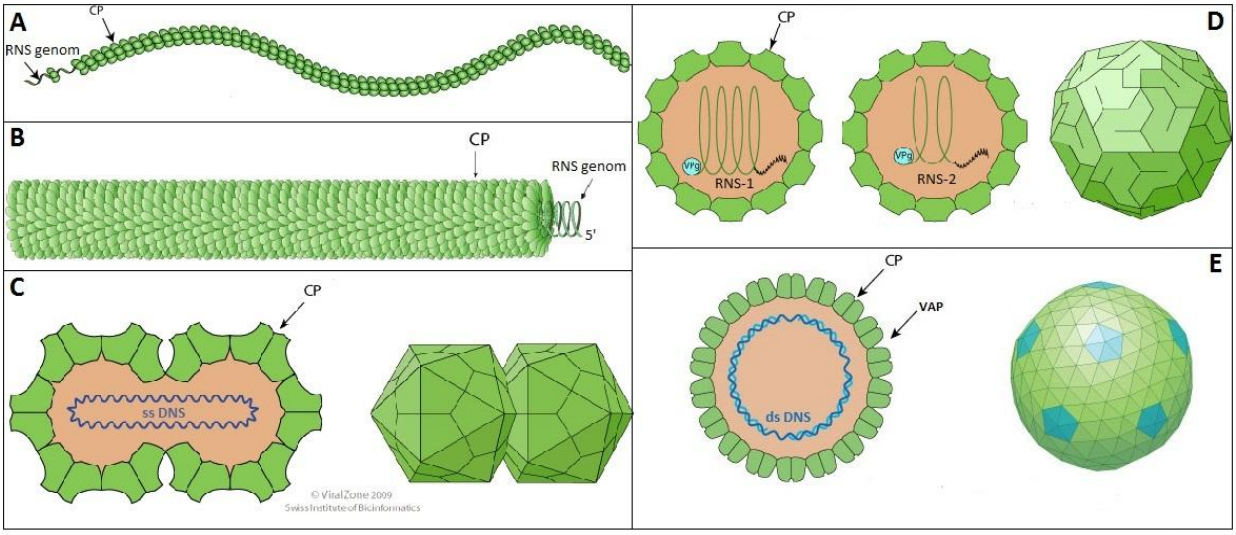
3.2.1. A gazdanövény

Annak érdekében, hogy megértsük a növénypatogén vírusok működését, érdemes szót ejteni a számukra releváns növényi működésről és morfológiáról. A legfontosabb tulajdonság, amely megkülönbözteti a növényi sejtet a többi élőlénytől, hogy a sejtet határoló plazmalemmán kívül egy elsődlegesen cellulóz tartalmú sejtfal is található. Ez fontos barrier a sejt élettana szempontjából, többek között a tápanyag és vízforgalom szabályozásában, a sejt védelmében valamit a turgor fenntartásában van fontos szerepe (Láng F., 2007). A szomszédos sejteket elválasztja egymástól, köztük plazmodezmákon át történik az anyag- és információáramlás. A plazmodezmák általában a szomszédos sejt endoplazmatikus retikulumával kapcsolatot tartó fehérjék által szabályozott pórusok. Átmérőjük 30-60 nm-re tehető. Rajtuk keresztül történik a vírusok rövid távú transzmissziója, amelyre különböző morfológiájú és méretű vírusok eltérő stratégiát alkalmaznak (Hipper, Brault, Ziegler-Graff, & Revers, 2013). A növény, vírusok szempontjából említésre érdemes eleme a szállítószövet, azon belül is a floém. Más szóval a háncs az szövetrendszer, amelyen keresztül a növény a képződés helyéről a felhasználás helyére szállítja az asszimilátumot, amely leggyakrabban szaharóz tartalmú, illetve aminosavak és növekedési hormonok mozgását is biztosítja. Rajta keresztül történik a vírus jellegű kórokozók gazdán belüli hosszú távú transzportja is. Felépítését tekintve 5 különböző funkciójú sejttípusból áll. Közülük a legfontosabb a rostacsőtag, amelyek megnyúlt, perforált végfalú, összefüggő csövet alkotó sejtek. Az őket körülvevő kísérősejtek parenchimatikus jellegűek, az anyagok rostacsőbe történő ki- és bejutását biztosítják. A rostasejtek a nyitvatermők és páfrányfélék esetében látja el a rostacső feladatát. Továbbá jelen vannak még háncsparenchima és háncsrost típusú sejtek, amelyek a floém tápláló és szilárdító működését látják el. A rostacső elemei között kallóz gyűrűnek nevezett, akár 1-14 μm átmérőjű, kiszélesedett plazmodezmák találhatóak, amelyek a rostalemez nevű képletet alkotják (Truernit, 2014).

3.2.2. Vírusmorfológia és felépítés

A növénypatogén vírusok felépítése nem különbözik az eddig tárgyalt alapsémától. Örökítő anyaguk sokféle szerkezetbe rendeződhet. Lehet egyszálú DNS (pl.:*Geminivirus*), kettős RNS (pl.:*Reovirus*), kettős DNS (pl.:*Caulimovirus*), mind közül pedig a leggyakoribb a (+) RNS, ami hozzávetőlegesen a növényvírusok 70%-ban fordul elő. Ez utóbbiak jellegzetes szerveződéshez tartozik az 5'-végen egy ^{7}metil-guanozin sapka, vagy egy kis molekulatömegű, ún. VPg fehérje, a 3'-végen pedig egy farok struktúra található. Genomjuk lehet egykomponensű és szegmentált is. Az utóbbi esetében elemei csak együtt fertőzőképesek. A vírus részecske mérete többnyire a genom méretéhez igazodik. A sejtalakot a genetikai anyagot körülvevő fehérjeburok határozza meg. A morfológiájuk igen sokféle lehet, pálcika alakútól, a szférikusig (2.ábra) (Horváth, 1999). A legelterjedtebb a helikális forma, ami több, mint a növénypatogén vírusok 50%-nál fordul elő. Átlagosan 300-500 nm hosszúságú és 15-20 nm átmérőjű. Ilyen a legismertebb, és elsőként leírt vírus, a TMV. A második legáltalánosabb az izometrikus struktúra, amely általában 40-50 nm átmérőjű. Vannak olyan vírusok, melynek mintha két összetapadt izometrikus alegységből álltak volna össze, ezt ikervirionnak hívjuk (*Geminiviridae*). Az envelope nem jellemző a növényvírusokra, nagyon kevés rendelkezik közülük glikoproteinekkel. Ennek oka az lehet, hogy ez a réteg a gazdasejtből történő kiszabadulás során jön létre, a növényeknél viszont inkább a kész vírusok sejtek közötti transzportja által történik a fertőzés (D'Arcy, 2000).

A vírustörzsek rokonságát a nukleinsav homológia foka határozza meg. Rendszertanuk nem képezi szerves részét a témakörnek, így a továbbiakban csak a családok és genuszok említése szintjén foglalkozok vele.



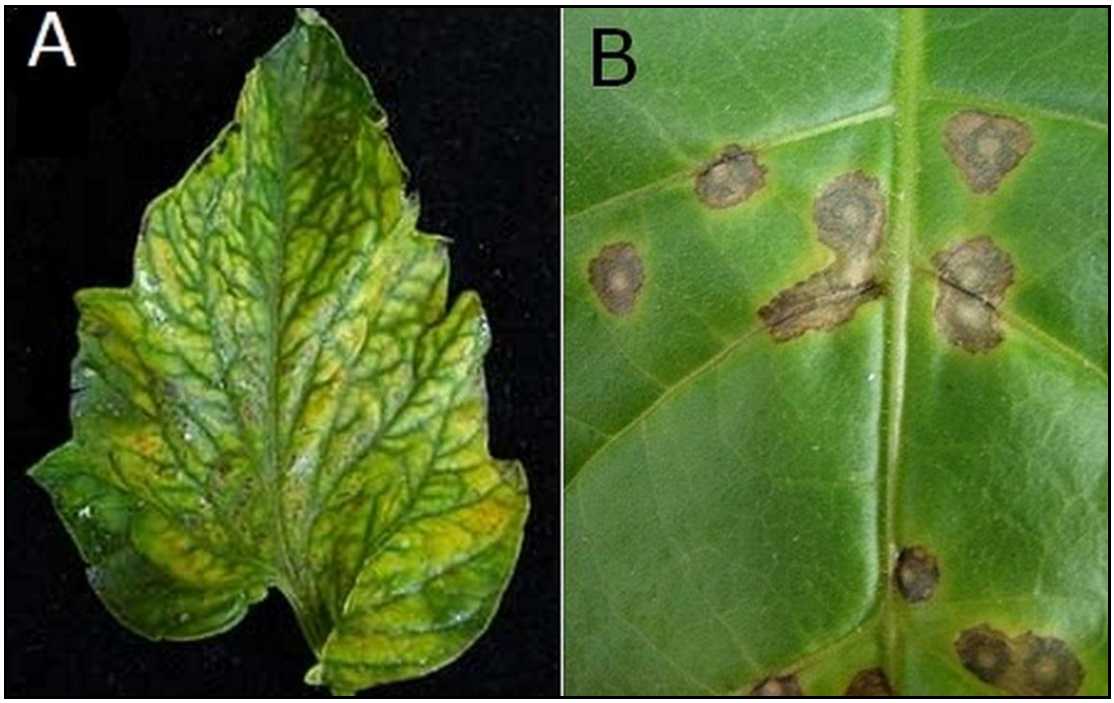
2. ábra. Különböző morfológiával és genom struktúrával rendelkező virionok. CP=Coat Protein (köpenyfehérje), VAP=Virus associated protein (kiegészítő glikoproteinek) **A,** Hosszú (2200nm), csavarodott filamentáris struktúra, farki részén egy minor kaszpid molekulával, egyszálú, lineáris RNS(+)-sel. (*Closteroviridae*) **B,** Merev, helikális fehérjeburok, központi csatornájában egyszálú, lineáris RNS(+). (*Tobamoviridae*) **C,** Ikozahedrális ikervirion, bennük egyetlen, összefüggő, egyszálú, cirkuláris DNS. (*Geminiviridae*) **D,**Ikozahedrális kapsziddal és szegmentált, egyszálú, lineáris RNS(+), 5'-végén VPg sapkával, 3' végén pedig PoliA farokkal.(*Secoviridae*) **E,** Nagyméretű (45-50 nm), ikozahedrális, többrétegű kapszid, glikoproteinekkel, benne cirkuláris, kétszálú DNS genom. (http://viralzone.expasy.org)

3.3. Szimptómák

A vírus-növény interakció következtében megjelenhetnek a növényen morfológiai, fiziológiai, és strukturális elváltozások. Ezeket összefoglalóan tüneteknek vagy szimptómáknak hívjuk. Észlelésük még a laikus szemeknek sem nehéz feladat, mivel legtöbbször a normálistól igen eltérő szín és mintázat, illetve beteges külsőt kölcsönző satnyulás következik be. Két csoportra különíthetjük a tüneteket. Lokális vagy primer és szisztemikus vagy szekunder szimptómákra (Ghoshal & Sanfaçon, 2015).

3.3.1. Lokális szimptómák

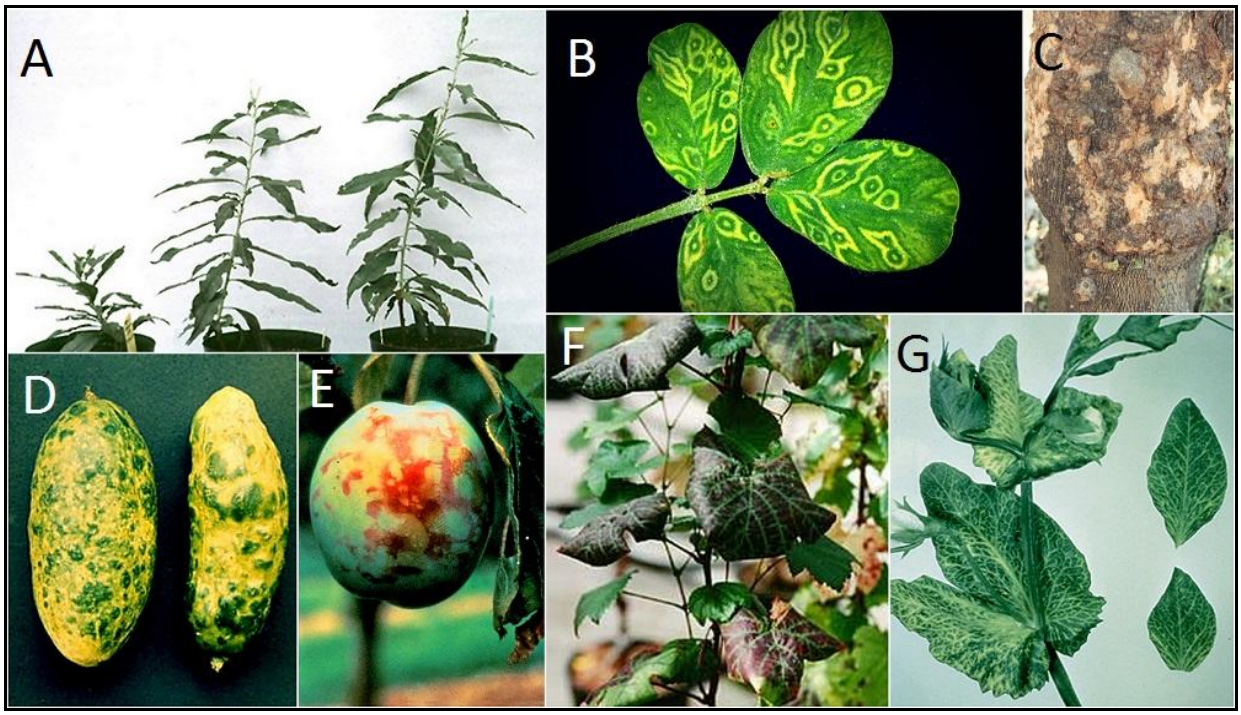
A lokális tünetek az összes közül a leggyorsabban, klorózis, vagy nekrózis formájában jelentkeznek. Néhány nappal, vagy akár órával a vírus bejutását követően már megfigyelhetőek. Különböző méretben, színben és formában jelentkeznek és összefoglalóan lokális lézióknak hívjuk őket (3.ábra). A klorotikus tünetek világoszöld, sárgászöld és sárgásfehér, a nekrotikusak pedig fekete, barna, vagy vöröses foltok megjelenésében és a sejtek elhalásával járnak (Horváth, 1999).



3. ábra. Leveleken megjelenő lokális szimptómák. **A**, klorotikus régiók az erek között. **B**, nekrotikus sejtelhalás. (http://www.agf.gov.bc.ca)

3.3.2. Szisztemikus szimptómák

Ez a tünetcsoport jellemzően az inokulációt követően később jelenik meg, ami jelenthet napokat, heteket, hónapokat, egyes esetekben akár éveket. A megjelenés sebessége függ a növény szervezettanától, korától és a környezeti feltételektől. Sokkal jellegzetesebbek, jobban azonosíthatóak, mint a primer szimptómák. A vírusok klasszifikációja is sok esetben a növényen megjelenő tünet alapján történik (Horváth, 1999). A következőkben leggyakrabban megfigyelt tünetcsoportok közül szemléltetem a legjellegzetesebbek (4.ábra) (http://www.apsnet.org).



4. ábra. Szisztemikus szimptómák. A, Őszibarackcsemeték satnyulása, *Szilva törpülés*-(PDV), *és Prunusz nekrotikus gyűrűfoltosság* (PNRV) vírusok koinfekciója következtében. **B,** Mogyorólevél koncentrikus gyűrűfoltokkal, amit a *Paradicsom bronzfoltosság vírus* okozott. **C.***Citrus psorosis vírus* (CPsV) által előidézett tünetek citromfán. **D,** *Uborka mozaik vírus* (CMV) nyomai uborkatermésen (http://www.cals.ncsu.edu) **E,** Termés elszíneződés őszibarackon, *Szilva himlő vírus* (PPV) fertőzése által **F,** *Szőlő levélsordósás vírus* (GLRaV) tünete szőlőnövényen. **G,** *Vöröshere tarkulás vírus* (RCVMV)-okozta szisztémás érnekrózis, borsónövényen. (http://www.apsnet.org)

3.4.Terjedés

A növényvírusok virion formájában is képtelenek az önálló mozgásra, infekciójuk hatékonysága csak is a terjesztését végző vektoroktól és szaporítóanyagtól függ. Növényről növényre, vagy egyik sejtből a másikba történő transzmissziójuk egészen más stratégián alapul, mint az állati vírusoké. Ennek oka a növényi sejtek, állati- és bakteriális sejtektől eltérő felépítése, és az nyilvánvaló tény, hogy a növények nem képesek aktív mozgásra, így az őket fertőző vírusok számára újabb problémát vetnek fel a nagyobb távolságokra való terjedés során. Az akadályok ellenére mégis igen hatékony módszereket fejlesztettek ki az infekcióra. Ezek a néhány 100 nm-es patogének képesek sejtről sejtre akár 4-80 µm/óra, illetve szállítónyalábban 0,1-0,2 cm/óra sebességgel is terjedni. (Érsek T., 1998)

3.4.1. Rövid- és hosszútávú terjedés

Megkülönböztethetünk rövid távú és hosszú távú transzmissziót. A rövid távú a vírus gazdaegyeden belüli, egyik sejtből a másikba való átjutást jelenti. Ez a növényi sejtek között kialakuló plazmodezmákon, azaz szimplasztikus úton át történik. Ez azt jelenti, hogy vírus nem lép ki az intercelluláris térbe, csak is a sejtek között kialakult csatornákat használja. A vírusok replikációja legtöbbször a fiatal, fotoszintetizáló parenchimatikus szövetekben történik. Az innen való terjedésre, floémbe való eljutásra használják a plazmodezmákat, amelyek a parenchimatikus sejtek között még jóval kisebb pórusméretűek, ez bizonyos esetekben, a precíz regulációt folytató növények esetében gátat is vonhat a vírus terjedésének. A kísérősejt és a rostasejt között viszont jóval nagyobb átmérőjű, pórusos plazmodezmák alakultak ki, jóval nagyobb áteresztőképességgel rendelkeznek, mint a mezofill sejtek közöttiek, így könnyebbé teszik a floémbe való bejutást.

A hosszú távú transzport a floémen keresztül történik. Ezen a területen nem sok az ismeretünk, ami a szállítószövetek nehéz hozzáférhetőségéből, kezelhetőségéből és tanulmányozhatóságából is adódik. Leginkább a gazdanövény aktív szállítószöveteinek elhelyezkedésétől és szerkezetétől függ a szövetnedvhez való hozzájutás nehézsége. Tanulmányok során kimutatták, hogy a vírus a fertőzött levélből a rostacsövön át jut el az egészséges levelekbe. Két formában is szállítódhatnak, nukleinsav komplexként, és virionként, azaz kapsziddal burkolva. ezek közül pedig az utóbbi számít gyakoribbnak. Egyes vírusfajták, eltérő módon folytatják a vaszkuláris transzportot, mások a kapszid alapján különíthetők el (Hipper et al., 2013).

A hosszú távú transzport további formája lehet, amikor a fertőző szaporítóanyag terjedése által következik be egy-egy vírusfaj terjedése. Ez történhet pollen, vagy mag által. A mag esetében vagy a belső endospermiumból, vagy a külső perikarpiumból indul ki a fertőzés, a már csírázó növényben (Jones, 2014).

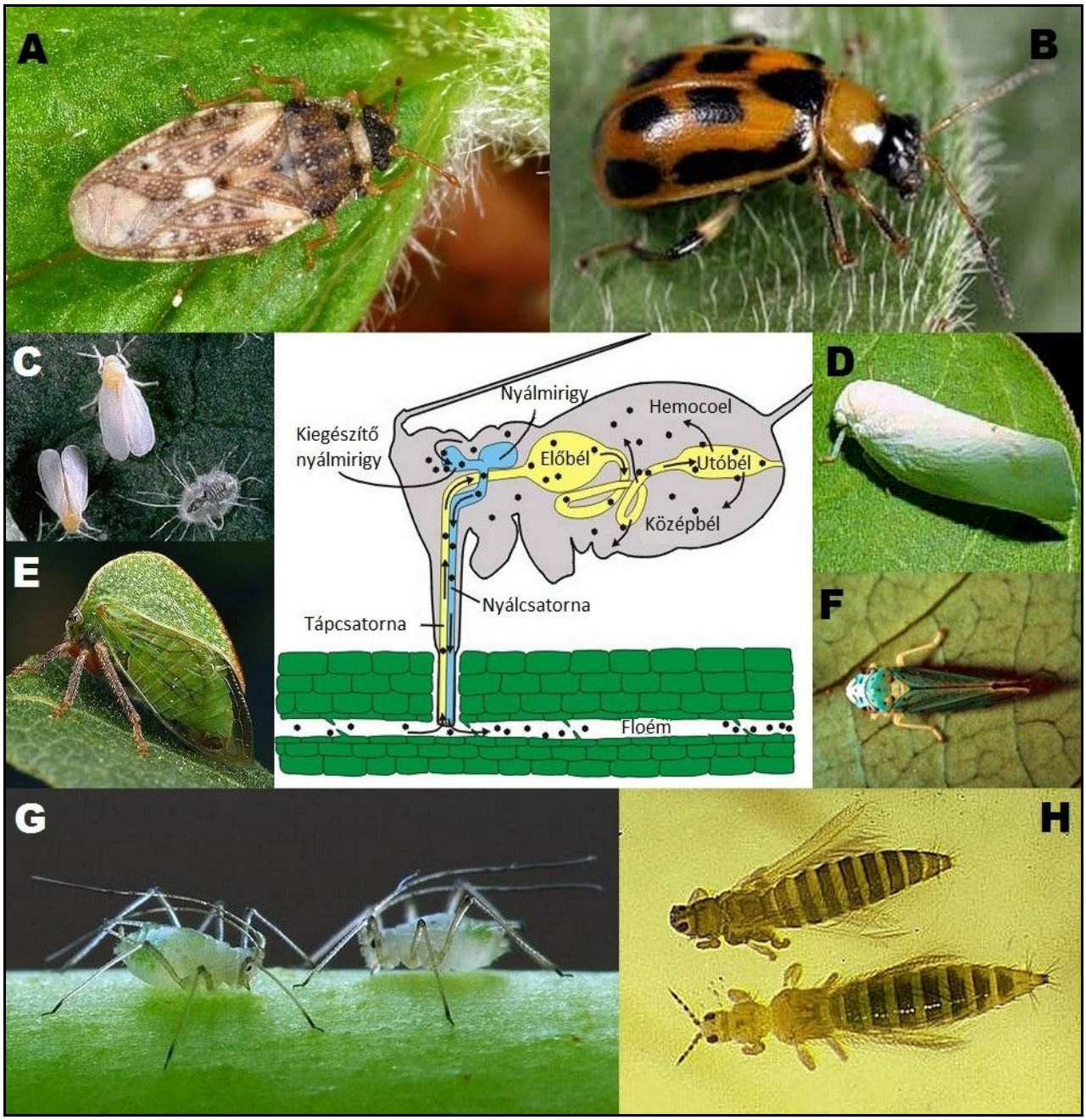
3.4.2. Mechanikai átvitel

Mechanikai átviteli formák közé tartozik az oltás, a szemzés, a sebzés, dugványozás és egyéb vegetatív szaporítószervekkel történő átvitel (5.ábra). Ezek mind olyan vírusfertőzéseknek a kiindulópontjai, amelyek emberi hibából származnak, azaz a nem elég körültekintő, illetve a szakszerű vírusdiagnosztikát mellőző szaporításból erednek.

5. ábra. Különböző oltási mechanizmusok illusztrációja (http://www.dreamstime.com).

3.4.3. Vektor-mediált transzmisszió

A gomba-, vagy állatvektor általi terjedési mód a legdifferenciáltabb. A vektorok lehetnek többek között a tripszek, a levéltetvek, a fátyolkák, a poloskák és a kabócák (6.ábra). Az ízeltlábúak általi terjesztés általában négy dologtól függ. Hogy a növényen táplálkozó állatnak mennyi ideig tart annak nedveiből kinyerni a fertőzőképes vírust, majd ez a fertőzőképesség meddig áll fenn, ehhez kapcsolódva pedig mennyi időbe telik a rovarnak egy másik növényre való átjutása, együttesen mennyi a vírus „életideje”. Végül pedig vannak olyan speciális vírusok, amelyek a vektort köztigazdának használják, egyes elemeik replikációját állati sejtekben hajtják végre (Roossinck, 2015).



6. ábra. A legjellegzetesebb növényvírus vektorok : középen a vírus-vektor interakció egy útjának alapsémája, körülötte**: A,** Poloska. **B,** Levélbogár. 35 ismert vírus vektora **C,** Molytetvek. A mozaikos megbetegedések nagy részének terjesztői. **D,** Lepkekabóca. Akár 20 különböző vírus vektora lehet. **E,** Púpos kabóca. (http://www.cals.ncsu.edu) **F,** Kabóca. 80 különböző fertőzést hordozhat. **G,** Levéltetvek. Több, mint 150 ismert vírus vektoraként a leghatékonyabb terjesztő. **H,** Tripszek. (D'Arcy, 2000).

4. A növényi vírusfertőzés molekuláris háttere

4.1. A gazda és a vírus genom szerveződése

A vírusokat önmagukban is felfoghatjuk fertőzést okozó nukleinsavaknak. Ahogy már korábbi fejezetekben említettem a virális genom felépítése nagyon sokféle lehet, az RNS, vagy DNS molekulák szerkezetét, szerveződését és irányultságát tekintve.

A genom egy organizmus örökítőanyagának teljes információtartalmát jelenti. Tartalmaz kódoló és nem kódoló szekvenciákat is. A növényi nukleáris genom csupán 2%-a tölti be a kódoló, azaz gén funkciót. A genom fennmaradó nem kódoló részének közel 50%-a pedig ismétlődő szekvenciákból áll. Ennek különlegessége, hogy számottevő arányukban retrovírusokat kódol Ezek egyszálú, plusz szensz RNS szekvenciák, amelyek nagyon hasonlóak a növényi vírusokhoz, de már a növényi genomba beépült, mobilis elemeknek jegyezzük őket. Habár egyes saját elemeik replikációjához szükséges szekvenciáit sikeresen beépítették a gazda genomjába, a vírussá épüléshez szükséges esszenciális génjeik valamelyike hiányzik. Korábbi vírusfertőzés maradványinak számíthatnak, de pontos eredetük nem ismert (Horváth, 1999).

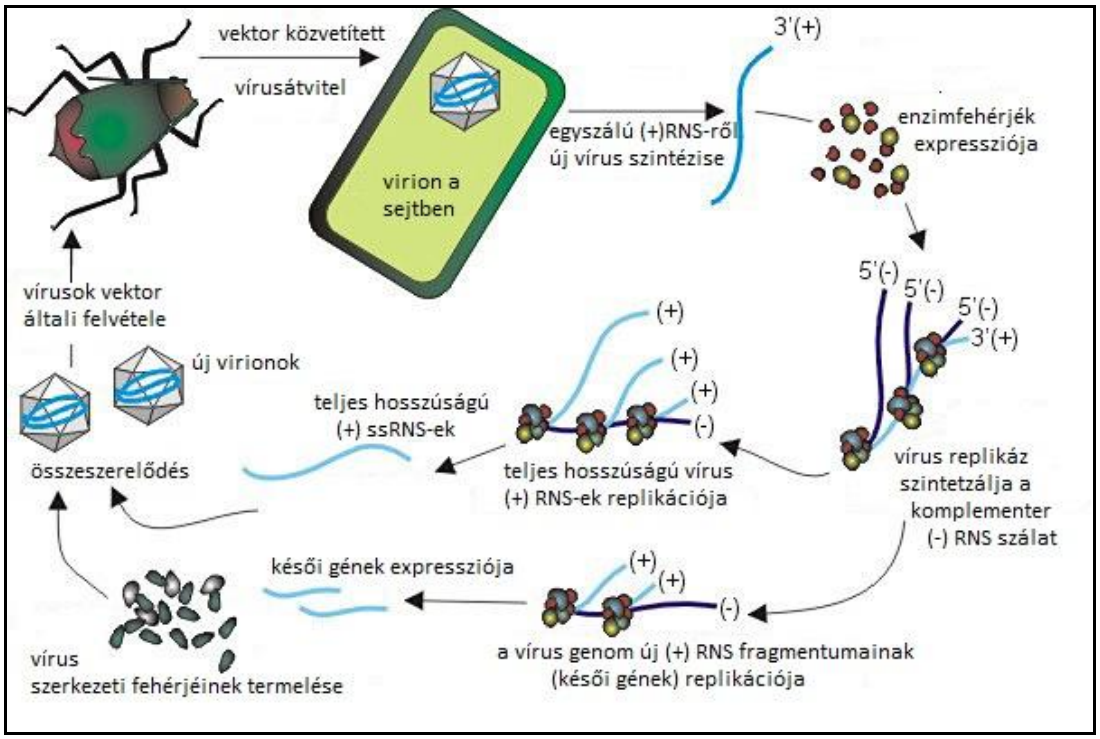
A vírusgenomok az összes élőlény genomjával összehasonlítva a legkisebb méretűnek számítanak. Méretük számszerűen 1500 és 20000 nukleotid hosszúságú közé esik. Ennek az az oka, hogy arányaiban sokkal kevesebb nem kódoló régiót tartalmaz, és a gének száma is meglehetősen alacsony. A növényi vírusok átlagosan 5-10 génnel rendelkeznek, ezek pedig általában 4 különböző funkciójú fehérjét kódolnak. Az első csoportba a replikáz komplex enzimjei tartoznak, amelyek polimeráz és helikáz funkciójukkal biztosítják a vegetatív forma gazdasejten belüli átírását. A második csoport tagjai speciális, plazmodezmákon keresztüli mozgást segítő fehérjéket kódolnak. Harmadikként beszélhetünk a köpenyfehérjéket kódoló génekről, amelyek a kapszidot alkotó polipeptidek termeléséhez szükségesek. Utolsóként említhetőek proteináz típusú enzimfehérjék, amelyek egyes vírusoknál segítik a vírusfehérjék termelését és virionná alakulását. Ez olyan vírusokban van jelen, amelyekben a fehérjék poliproteinként termelődnek (Érsek T., 1998).

4.2. Replikáció és transzkripció, vírusfertőzés folyamata

Replikációnak a DNS molekula megkettőződését hívjuk. Tágabb értelemben a genetikai információ áramlásának folyamata, ami sokféle módon megvalósulhat. A lényege, hogy az információ úgy kerül át egyik molekuláról a másikra, hogy az egyik monomersorrendje alapján alakul ki a másik monomersorrendje.

A vírusok nem rendelkeznek saját nukleinsav-, és fehérjeszintetizáló képességgel. Anyagaik előállításához a gazdasejt enzimkészletét használják fel, olyan módon, hogy átprogramozzák annak működését. A virionok bioszintéziséhez vezető folyamatok összességét produktív infekciónak hívjuk, amely 5 szakaszara osztható: adszorpció, penetráció, dekapszidáció, eklipszis, maturácó, kiszabadulás (Horváth, 1999).

Az első az adszorpciós fázis, melynek során a virion és a gazdasejt között stabil kötődés alakul ki. A növénypatogén vírusok passzív módon, valamilyen vektor közvetítésével jutnak el a még egészséges gazdasejthez. Ezt követő lépés a penetráció a teljes virion, vagy annak genetikai anyagának bejutása a gazdasejtbe. Különféle mechanizmusokkal történhet, a nukleinsav belövellésétől kezdve a fagocitózison át, olyan vektor használatáig, ami egyenesen a sejtbe hatol. Harmadik lépésként dekapszidáció történik, ami egyet jelent a vírus fehérjeburkának elemésztésével, egy speciális kapszidbontó enzim segítségével történik a deproteinizálódás. Erre azért van szükség, hogy az új vírusok keletkezéséhez szükséges nukleinsav teljes egészében hozzáférhető legyen az enzimek számára. A negyedik fázis az eklipszis. Ekkor zajlanak a leglényegesebb szintetikus folyamatok. A vírus nukleinsavban tárolt információja alapján, a gazda polimeráz enzimjeinek segítségével szintetizálódnak az új vírus elemei. Ez különféle módokon történhet. A leggyakoribb, amikor a pozitív szálról először egy negatív szál szintetizálódik, majd arról nagy számú új pozitív szál képződik, így történik a nukleinsav wmegsokszorozódása. Az ötödik szakasz, a maturáció során a szintetizálódott nukleinsav és fehérje virionná épülnek össze. Ez a növényvírusok esetében nem mindig meg végbe, mivel a plazmodezmákon át történő terjedéshez nem feltétlenül szükséges a virion létrehozása. Az utolsó fázis a kiszabadulás, amikor megtörténik a fertőzőképes vírus, vagy virion kijutása a sejtből (7.ábra) (D'Arcy, 2000).



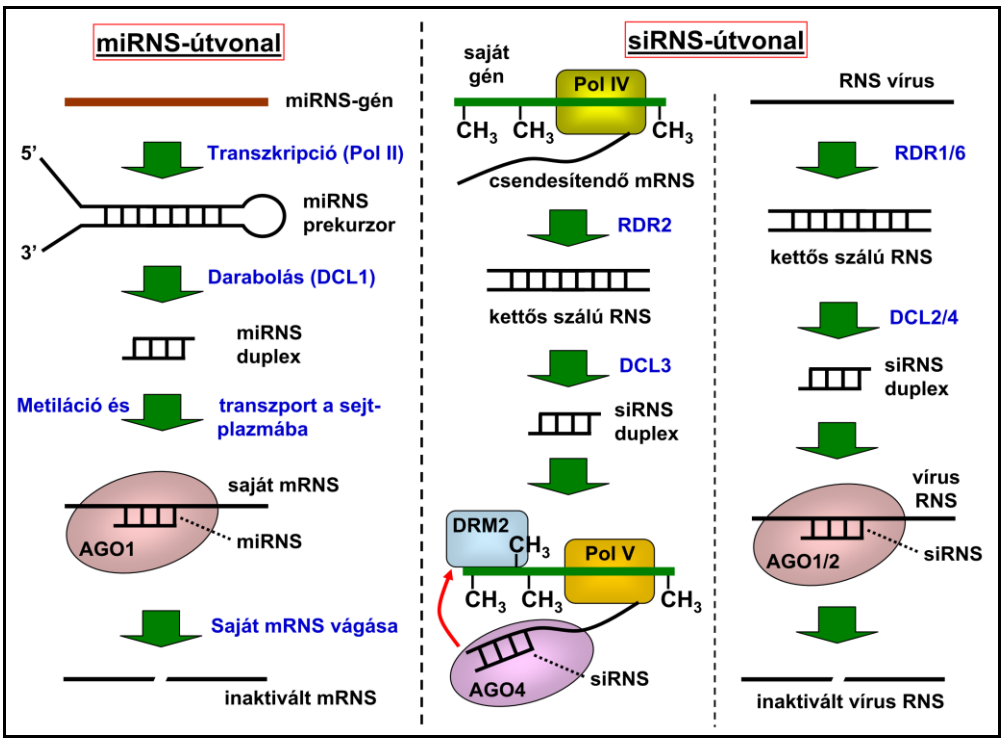
7. ábra. A produktív replikáció folyamata. A (+) RNS vírus vektor közvetített módon bejut sejtbe, majd ott megkezdi replikációját. Elsőként az enzimfehérjéinek expressziója történik, majd azok elvégzik a (-), majd arról a (+) szálak replikációját. Ezt követően a késői gének termékeként előállítódnak a szerkezeti fehérjék is, amelyek a (+) ssRNS-ekkel összeszerelődve fogják alkotni az új virionokat. (D'Arcy, 2000).

4.3. Növényi védekező reakció

A növényi szervezetek életében számos abiotikus és biotikus stresszfaktor van jelen, amelyek szignifikánsan csökkentik a növény produktivitását és életben maradási esélyüket. Az előbbiek közé számos környezeti tényezőt sorolhatunk, mint a szárasság, a magas só tartalom, vagy a túl alacsony- vagy túl magas hőmérséklet. A biotikus stresszek között pedig számos patogén hatása mellett a vírusos fertőzések is előkelő helyet foglalnak el. Mint a legtöbb stresszhatás, a vírusinfekció is molekuláris biológiai folyamatokat indít el a gazda szervezetében. Számos növény hiperszenzitív reakciónak nevezett mechanizmust fejlesztett ki az ellenük való védekezésre. Ennek során sejtfal összetételbeli és fizikai tulajdonságainak megváltoztatásával, valamint szekunder metabolitok termelésével képes a kórokozó terjedését meggátolni. Az infekció során pathogenesis-related proteinek képződnek, amelyek a kórokozó által termelt proteolitikus enzimek inhibitoraként, valamint katalitikus enzimként működnek(Kumar, 2014).

4.3.1. RNS interferencia, géncsendesítés

Az RNS interferencia (RNSi) jelensége magába foglalja a szekvencia-spefikus génregulációt, dsRNS-ek képzését, ez által pedig a transzkripció vagy transzláció gátlását . Ez egy evolúciósan stabil védekező mechanizmus, melynek során rövid kétszálú RNS (dsRNS) darabok a citoplazmában jelen lévő specifikus mRNS-ek szekvencia degradációját eredményezik. A kétszálú RNS-eket a Dicer-like (DCL) és dsRNS-kötő proteinek (DRB) felismerik, majd feldarabolják, és 21-24 nt hosszúságú kisRNSek, mikroRNS vagy siRNS duplexek keletkeznek. Vírusfertőzés során az utóbbiak képződnek a vírus RNS-ről, majd interakcióba lépnek az Argonautával (AGO) és a hozzá kapcsolódó fehérjékkel, amelyek az RNS-indukált csendesítő komplexet (RISC) alkotják. Egyik száluk beépül a komplexbe és specifitást ad annak. A kisRNS-sel „töltött" RISC fel fog ismerni minden a kisRNS-sel komplementer szekvenciájú RNS-t a sejtben és azt elhasítja, vagy transzlációsan gátolja (8.ábra), (Kamthan, Chaudhuri, Kamthan, & Datta, 2015).



8. ábra. A fent részletezett géncsendesítés jelenségét illusztrálja az alábbi folyamatábra. A folyamatot a sejtmagból kijutó dsRNS indítja meg, amely a Dicer enzim közreműködésével darabolódik fel. Az így képződött miRNS és siRNS fragmenteket a RISC-komplexben résztvevő Argonauta fehérje ez által megtörténik a géncsendesítés (http://elte.prompt.hu).

Az RNSi és annak szabályozásban betöltött kulcsszerepének felfedezése óta alapvetővé vált, hogy óriási jelentősége van a vírusdiagnosztika fejlesztésében és a növényvédelem lehetőségeinek kiterjesztésében (Saurabh, Vidyarthi, & Prasad, 2014). A vírus és gazda között koevolúciós folyamat zajlik, a vírusok különböző módokon reagálnak a növény védekező mechanizmusára, próbálják azt gátolni. Ez a fegyverkezési verseny vagy a növény teljes rezisztenciájához, vagy szisztematikus fertőzéshez vezet, és a gazdanövény pusztulását okozza.

5. Történeti áttekintés. Vírusdiagnosztika a molekuláris eljárások előtt.

5.1. TMV felfedezése, virológia fejlődése

A növényi vírusok közel sem olyan ismertek, mint az intenzíven kutatott állati vírusok, az egyik közülük mégis ikonikussá vált, mégpedig az elsőként felfedezett *Dohány mozaik vírus* (TMV). Ennek a kórokozónak sikerült elsőként kimutatni a jelenlétét, és terjedését. 1892-ben, Ivanovsky igazolta, hogy a „mozaik betegségben" szenvedő dohánynövény szövetnedvével meg lehet betegíteni egy attól egyébként elszeparált, egészséges példányt. Ezt követően Beijeric felfedezte, hogy a bakteriális mérettartományra optimalizált porcelán filteren átszűrt szövetnedv továbbra is fertőzőképes maradt, így bebizonyosodott, hogy olyan nanométeres mérettartományba tartozó kórokozót vizsgál, amelyet az eddigi módszerekkel még nem sikerült izolálni (Zaitlin & Mayer, 1998). A kialakult „vírus koncepciót", habár tünetek és a terjedés módja alátámasztotta, a mikroszkópos vizsgálatok nem tudták igazolni. Ennek ellenére tovább folyt a kutatás, és a megbetegedések vizuálisan észlelhető tulajdonságai alapján 1939-ben Holwes publikált egy 129 vírus tartalmazó klasszifikációt, ami a későbbi évek során folyamatosan bővült újabban leírt fajokkal és 1999-re 977 hivatalosan elfogadott vírusra egészült ki. Habár a TMV első tisztítását 1935-ben Stanley végezte, röntgen krisztallográfiával, azt a feltételezését nem sikerült megerősítenie, hogy a fertőzés hátterében a ribonukleinsav molekula áll. Csak később, az 1950-es években fedezék fel, hogy valóban RNS a genetikai információ hordozója. A későbbi kutatások a növényi vírus genomjának és molekuláris biológiai hátterének megértésére fókuszáltak (Burnet, 1959).

5.2. A vírusdiagnosztika alapjai

A 60-as évekre már számos módszert sikeresen használtak a vírusok laboratóriumi kimutatására. A rutinszerűen alkalmazott krisztallográfia és elektronmikroszkópia mellett már az enzimatikus és immunológiai tesztek kidolgozását is megkezdték. A legelterjedtebb módszernek mégis a tesztnövények alkalmazása számított. Ennek oka, hogy a vírusok izolálása még elsősorban centifugálásos szeparációs technikával történt, amivel csupán annak jelenlétét tudták igazolni, azonosítására már alkalmatlan volt (Burnet, 1959).

5.3. Elektronmikroszkópia

Az elektromikroszkópián alapuló diagnosztika a vírusfertőzés következtében megjelenő élettani változások és szöveti elváltozások megfigyelésén alapul. Általában nem önmagában alkalmazzák, hanem összetett vizsgálatok egy részét képezi. A gyanús növényi sejteket különböző festési eljárásokkal kezelik, majd elektronmikroszkópban vizsgálják a kapszid morfológiáját, Faji szintű azonosításra ritkán alkalmas, inkább genuszok pontos meghatározására ad lehetőséget. A szférikus vírusok azonosítása különösen nehézkes. Mind ezek mellett eléggé drága és időigényes (Zechmann, Graggaber, & Zellnig, 2011).

5.4. Biotesztek

A biotesztek lényege, hogy vírusfertőzésre érzékeny tesztnövényeket inokulálják a vizsgálni kívánt kórokozóval. Az egyik legnagyobb előnye, hogy a tesztnövényen megjelenő szimptómák alapján egyértelműen igazolni tudják egy ismert vírus jelenlétét és alkalmas a vírusaktivitás becslésére is. A végrehajtása rendkívül idő-, eszköz-, és munkaigényes. Megfelelően izolált üvegházakban, erre a célra termesztett indikátornövények használatát igényli. A tesztelni kívánt növény szövetnedvéből készített extraktumot az indikátornövényre juttatják. Ezt követően állandó megfigyelés alatt tartják, ügyelve, hogy egyéb fertőzésektől védve maradjon. A vírus jelenlétének megbizonyosodása érdekében heteket, fás szárúak esetében akár éveket kell várni a diagnosztizálható tünet megjelenéséig, amelynek pontos azonosítása nagy hozzáértést igényel. A mechanikus úton terjedő vírusok azonosítására pedig nem alkalmas. A nyilvánvaló hátrányai ellenére a magas megbízhatósága miatt széles körben alkalmazzák (Bunikis & Barbour, 2002).

6.Növényi mintavétel

A hiteles és megbízható eredmény érdekében elengedhetetlen a jól megtervezett, megfelelő helyről-, és időben történő, reprezentatív mintavétel. Annak függvényében kell megválasztani a stratégiát, hogy milyen módszerrel végezzük a diagnosztikát.

Ha szabadföldi mintából, ismert vírus jelenlétét szeretnénk igazolni, figyelembe kell venni annak expressziója szempontjából ideális évszakot, és az akkumuláció jellemző helyét. Például a borszőlőt fertőző vírusok esetében a fertőző leromlásos megbetegedés (és egyéb Nepovírusok) kimutatásához a tavaszi lombfakadási időszak a legalkalmasabb, a hajtáscsúcsból, míg a levélsodródást okozó vírus igazolásához a késő nyári mintavétel ajánlott, a levél szöveteiből (Bunikis & Barbour, 2002).

A szabályszerű mintavételt követően a felhasználásig történő tárolásra is ügyelni kell. A legideálisabb az azonnali porciózás, és -70°C-on, vagy folyékony nitrogénben való tárolás. Ez azért szükséges, mert a vizsgálatok tárgyát képező molekulák rendkívül érzékenyek, könnyen bomlanak, így a minta könnyen alkalmatlanná válik a vírusok kimutatására. Sérülékenységük miatt, maguk a diagnosztikai módszerek alkalmazása során is végig ügyelni kell a megfelelő hőmérsékletre és a szennyeződések elkerülésére.

7. Szerológiai módszerek

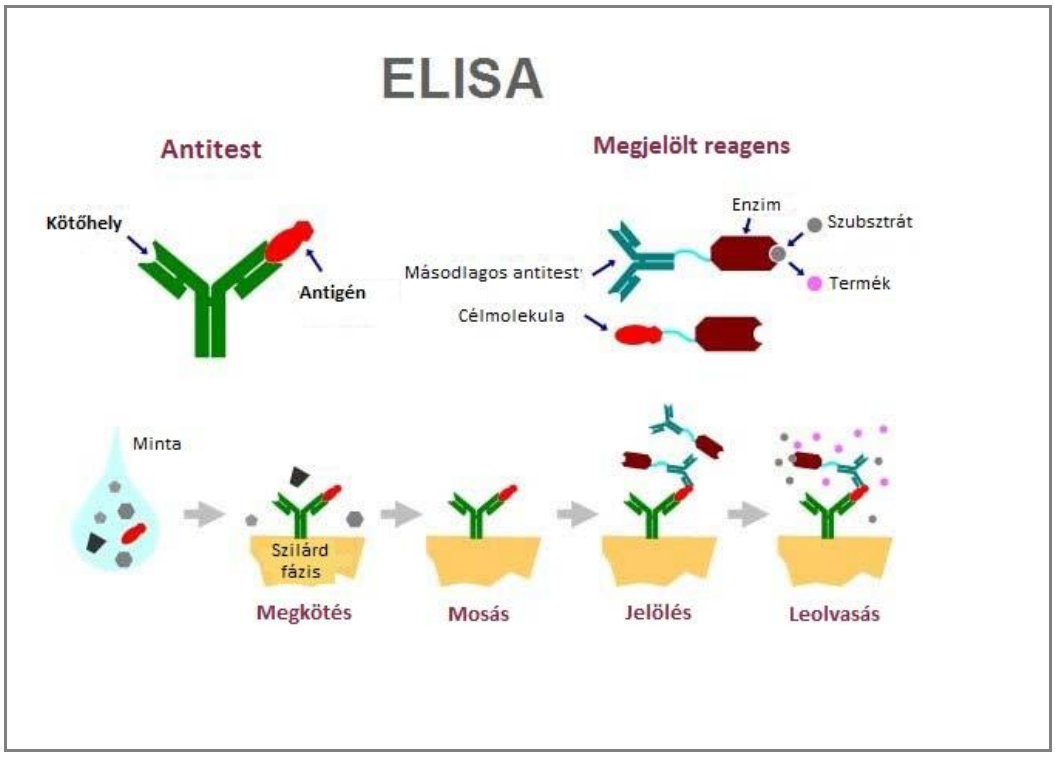
A szerológiai módszerek alapja, hogy az immunológiában ismert antigén-antitest reakciót hasznosítják. A vírus különböző fehérjéi, elsősorban a köpenyfehérje alkalmas antigénként való azonosításra. Állatok vérébe, (legtöbbször nyúlba), tisztított növényi patogént juttatnak, amit annak immunrendszere testidegen anyagnak érzékel, és reakcióba lép vele. Ezt követően vírus proteinjeire specifikus antitestek termelődnek. Az így létrehozott antitestek a vérszérumból kivonva alkalmassá válnak az adott patogén jelenlétének igazolására. Az antigén-antitest kapcsolat reverzibilis, erőssége függ a pH-tól, hőmérséklettől és egyéb környezeti, és oldhatósági viszonyoktól. Ez a szerológiai módszerek egyik hátránya is, hiszen az eltérő körülmények eltérő eredményhez vezetnek.

A vírusdiagnosztikában áttörés Clark és Adams 1977-es publikációja, amelyben a *Szilva himlő vírus* (PPV) és az *Arabis mozaik vírus* (ArMV) ELISA-val történő kimutatását részletezték, ezzel egy új korszak megteremtőivé váltak (Clark & Adams, 1977).

Az általuk használt módszer meghatározza a modern növénydiagnosztikát. Ezt megelőzően a diagnózis sokéves tapasztalattal rendelkező szakértő munkáját igényelte, aki képes felismerni és leírni a vírusfertőzés tüneteit az adott növényen, kiegészítve az indikátornövényekkel történő komplex és nehézkesen végrehajtható biopróbák elvégzésével és egyéb bonyolult technikák alkalmazásával. Az ELISA előtt is használtak különböző szerológiai eljárásokat diagnosztikai célokra, például az immunspecifikus elektronmikroszkópiát, vagy a gél-diffúziós próbákat, de ezek főként a taxonómiai kapcsolatok felkutatására voltak alkalmasak. Ezek a módszerek számos hátránnyal rendelkeztek. Nagy mennyiségű nyers antiszérumot igényelnek, egy adott formátumban pedig nagyon limitált a számuk, így nagyon kisszámú minta tesztelhető általuk. Az ELISA bevezetése, egyszerűbb végrehajthatósága és a hiteles eredmény elérésez szükséges idő lerövidítésének eredményeképp forradalmasította a vírusdiagnosztikát. További fejlesztések a monoklonális antitestek használatának bevezetésével folytatódtak, amelyek a próba érzékenységét és specifitását növelték és a tesztelési formátum sokoldalúságát eredményezték. Az ELISA nagyon gyorsan a laboratóriumi tesztek fő eszközévé vált (Boonham et al., 2014).

7.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Az ELISA, azaz az enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat működésének a lényege, hogy a reagenseket egy műanyag hordozó felületéhez kötik, majd erre juttatják rá az antitesteket tartalmazó szérumot. Ezt egy szigorú mosási lépés követi. Egész éjszakás inkubációs lépéseket követel, ezért relatíve hosszadalmas procedúra. (9.ábra). A mosást a másodlagos antitest-enzim konjugátum betöltése követi. A reakciót az enzimmel kapcsolt antitesteket a szilárd fázison lejátszódó színreakció alapján követhetjük nyomon, abszorbancia értékek leolvasása által (Li, Baysal-Gurel, Abdo, Miller, & Ling, 2015). Megkülönböztetünk indirekt és direkt eljárásokat. Mindkettőn belül többféle változat lehetséges. Az indirekt eljárás során az enzim nem közvetlenül az antitesthez kapcsolódik, hanem egy olyan molekulához, amely felismeri azt. Ez nem annyira specifikus, mint a direkt módszer, ahol közvetlenül létrejön az enzim-antitest (pl.: IgG) kontaktus.



9. ábra. A direkt-ELISA folyamatának- és a részt vevő molekuláinak alapsémája. Az egymást követő lépések, azaz az antitest megkötés, a mosás, jelölés és a leolvasás szerepe jól megfigyelhető az ábrán. Illetve, hogy a leolvasáshoz szükséges enzim terméke megjelenik az utolsó lépésben. (http://www.socmucimm.org)

7.2. DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzime-Linked Immuno-Sorbent Assay)

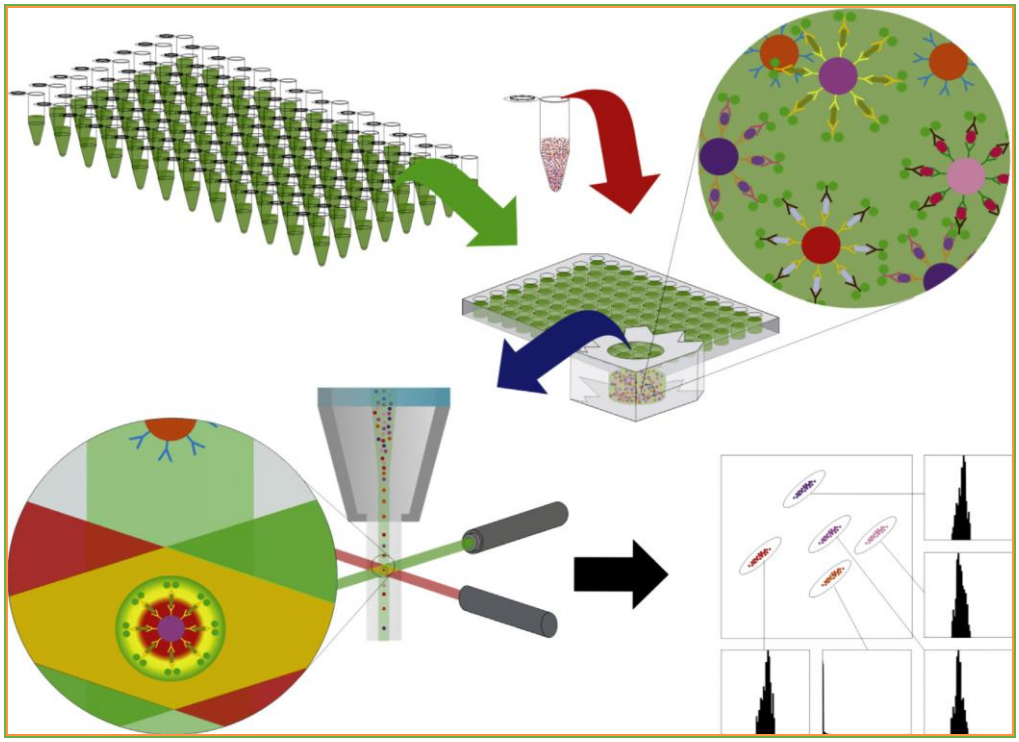
A direkt eljárásokról el lehet mondani, hogy nagyon specifikusak, pontosak és érzékenyek. Egyik változata a növényvirológiával foglalkozó laboratóriumokban a leggyakrabban használt DAS-ELISA, vagy kettősszendvics-módszer. Amiben leginkább különbözik az egyszerű ELISA-tól, hogy a hozzáadott megjelölt antitest többnyire poliklonális. Ha a növényi szövetmintában benne van az antigén-szerepet játszó vírus-fehérje, a rögzített és enzimmel jelölt antigének közrezárják, és létrejön az „immunszendvics”. Ezt újabb mosás követi, majd a rendszerhez juttatják az enzim szubsztrátjának oldatát. A leggyakrabban alkalmazott enzim az alkalikus foszfatáz. Ez a szubsztrátjával reakcióba lépve lehasítja annak foszfátcsoportját és sárga színű para-nitro-fenol keletkezik. A színváltozás erőssége arányos a vírus koncentrációjával (10.ábra), (Gan & Patel, 2013).

10. ábra. Az ELISA végeredménye. A műanyag hordozó pozitív eredményt mutató bemélyedéseiben színreakció játszódott le. Jól látható, hogy egyes cellákban eltérő a színerősség, így a vírusok koncentrációjáról is információt kaphatunk (http://virology-online.com/general/Test5.htm).

7.3. MIA (Microsphere Immune Assay)

A szerológiai módszerek fejlődése nem állt meg az ELISA-nál. A nagyobb hatékonyság érdekében kifejlesztették a multiplex detektálásra képes gyöngy mikroszféra immunpróbát, vagy röviden MIA-t. Ez a gyöngyök használatán alapuló módszer képes volt egyidejűleg több patogén azonosítására, szám-szerint akár több, mint 500, aminek eredményei összehasonlíthatóak az ELISA-ra kifejlesztett módszerekkel. Ezek a sorba rendezett gyöngyök 6,5 µm átmérővel rendelkeznek, és a belsejükben 2 fluorokróm található. Akár 500 különböző színkombinációjú gyöngy elérhető. A gyöngyök paramágnesesek, ami lehetővé teszi a durva mosási eljárások használatát, ezzel szignifikánsan csökkenti a háttérproblémákat a komplex, vagy bonyolult mátrixal rendelkező növényi patogének esetében. A gyöngyökhöz kovalensen kötődni képesek fehérjék, peptidek, antitestek, poliszaharidok, lipidek és oligonukleotidok is. A különböző vírus specifikus antitestek különböző színnel jelölt gyöngyökhöz képesek kötődni, és ezek pedig úgy kombinálhatok, hogy az általuk létrehozott egyéni „gyöngy készlettel” növényvírusok specifikus kombinációjának kimutatására lesznek alkalmasak.

Ez a módszer nagyon hasonló a standardizált DAS-ELISA-hoz, és mint ilyen zökkenőmentesen integrálható a meglévő folyamatokba. Röviden, a növényi mintákat standard ELISA pufferel készítenek el, majd 94-kutas mikrotiter lemezekre juttatnak és antitesttel kombinált gyöngykészletre inkubálnak. Az inkubációs lépés során a vírusokat egyéni gyöngyökhöz kötött antitestek foglyul ejtik. Ezt követi egy gyors mosás, egy újabb inkubációs lépés és még egy mosás, ami után a minták alkalmassá válnak az analízisre. Az analízis során a gyöngyöket a hozzájuk kötött különböző fluorokrómok alapján, lézer-alapú áramlásos citométerrel (lase-based small flow cytometer), vagy LED-alapú képanalizálóval (LED-based image analyser) azonosítják. A vírusrészecske jelenléte pozitív szignált eredményez a vírusspecifikus gyöngy fluorokrómjának köszönhetően. A DAS-ELISA-hoz hasonlóan a fluoreszcencia mértéke korrelációban van a vírusok mennyiségével, így a módszer azonosításra és mennyiségi meghatározásra is alkalmas. Az előnye viszont az ELISA-hoz képest, hogy míg annak egy tipikus protokolljának teljesítése 1-2 napig is eltarthat, a MIA akár 3-4 óra alatt elvégezhető. Mindent egybevetve ez a gyöngy-bázisú technológia gyors és megbízható, multiplex detektálási képességével a diagnosztika számos területén jól alkalmazható (11.ábra),(Boonham et al., 2014).



11. ábra. A MIA technológia áttekintése. A minták rákerülnek a 96 cellás mikrotiter lemezre (zöld nyíl), amihez hozzáadják az antitest konjugázumot (piros nyíl). Az inkubáció során a gyöngyökhöz kapcsolt antitestek megkötik a specifikus antigénjüket (kék nyíl), és detektálható színreakciót eredményeznek (fekete nyíl) (Boonham et al., 2014).

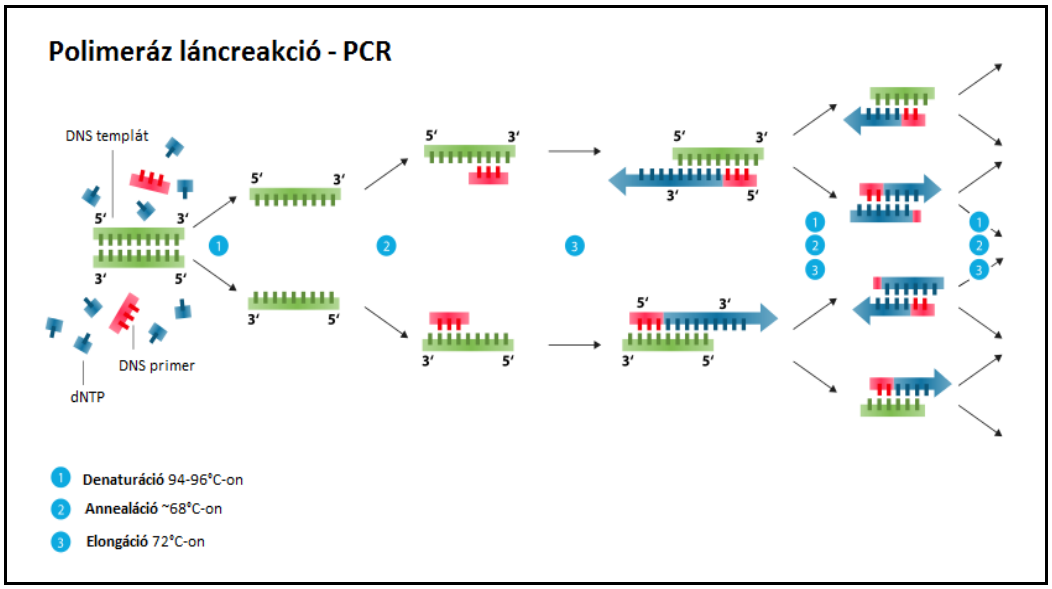
8. PCR alapú módszerek

8.1. Nukleinsav extrakció

A vírus RNS extrakciója többféle módon is történhet. Általában a növényi szövetekből elsőként totál RNS kivonást végeznek. Elterjedt módszer erre a szilikát tartalmú oszlopon történő tisztítás. Ez nagy hozamú, de kevésbé jó minőségű RNS preparátumot eredményez. Az extraktum spektrofotométerrel mért abszorbancia értéke sokszor jelez fehérje szennyeződést és az aromás, illetve poliszacharid komponensek nagyarányú kicsapódását. Az újabban használt RNeasy módszer ezzel szemben sokkal kisebb hozamot eredményez, de az az esetek nagy részében mentes a poliszacharid, fenoloid és fehérje eredetű szennyeződésektől. Fontos még hozzátenni, hogy a növények esetében nem sejtlízis, hanem centrifugával történő fázis-elkülönítés történik(Gambino & Gribaudo, 2006).(http://abe.leeward.hawaii.edu).

8.2. PCR (Polimerase Chain Reaction)

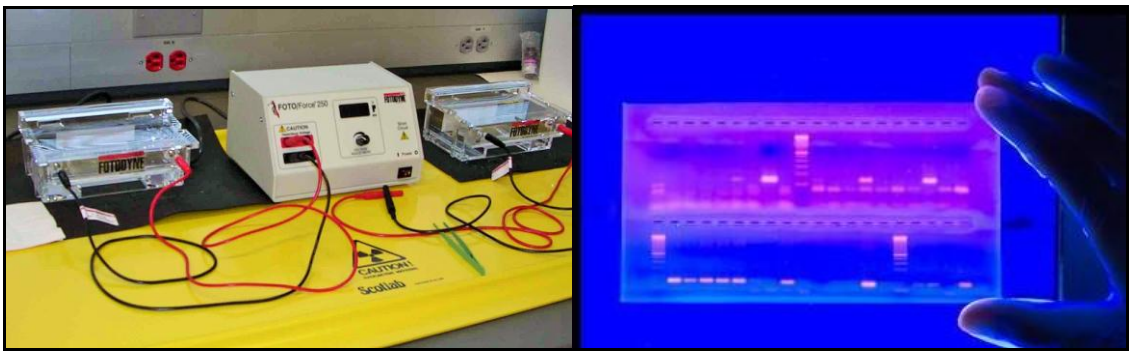
A PCR, azaz a polimeráz láncreakción alapuló technológia jelenleg az egyik legelterjedtebb diagnosztikai módszerek közé tartozik. Közvetlenül a DNS kimutatására alkalmas, annak nukleinsav hibridizációs képességét kihasználva. Működéséhez feltétlenül szükséges egy DNS templát. Az RNS vírusok esetében elsőként a kivont RNS-ről kell cDNS-t készíteni, reverz transzkripciós eljárással. cDNS mellet szükséges még megfelelő mennyiségű dNTP és polimeráz enzim. A laboratóriumoknak széleskörű hőstabil DNS polimeráz enzim választék áll rendelkezésére, amit a vizsgálat tárgyának megfelelően választhatnak meg (pl. Taq, vagy Pfu). Végül szükséges egy oligonukleotid primer pár (forward és reverse), amit többnyire a kimutatni szándékozott vírusgenom konzervált régiójából terveztek. Az így készített elegyet egy három lépéses cirkulációs folyamatban (denaturációra, annellálásra és extenzióra megfelelő hőmérsékleten) inkubálnak, előre megtervezett időtartamig. A folyamat során a patogén genom darabjainak szelektív amplifikációja történik, aminek köszönhetően a kis mennyiségben jelen lévő nukleinsav is kimutatható lesz a mintából. Az így kapott elegyet agaróz gélen méret szerint szeparálják, amelyben a molekulaméret alapján szétvált DNS fragmentek a vírusok vizsgálata során kapott korábbi adatok alapján azonosíthatóak.(12.ábra), (Bunikis & Barbour, 2002).



12. ábra. A PCR reakció alapsémája. Első lépésben megtörténik a DNS templát denaturációja. Ezt követően a primerek hozzákötődnek a megfelelő szekvenciákhoz (annellálás), majd az elongáció során megtörténik a polimeráz enzim általi dNTP összeszerelés. A folyamat ciklusosan ismétlődik.(http://en.wikipedia.org)

8.2.1. Elektroforézis

Az eredmények kiértékeléshez és folyamat végbemenetelének ellenőrzésére többnyire agaróz-, vagy poliakrilamid gélelektroforézist használnak. A gél töménysége kvantitaíven meghatározott, a vizsgálat tárgyának megfelelően, benne méret szerint választódnak el a nukleinsav fragmentumok. A PCR termék hosszából és elrendezéséből tudunk következtetni a kivonás, vagy azonosítás sikerességére (13.ábra).

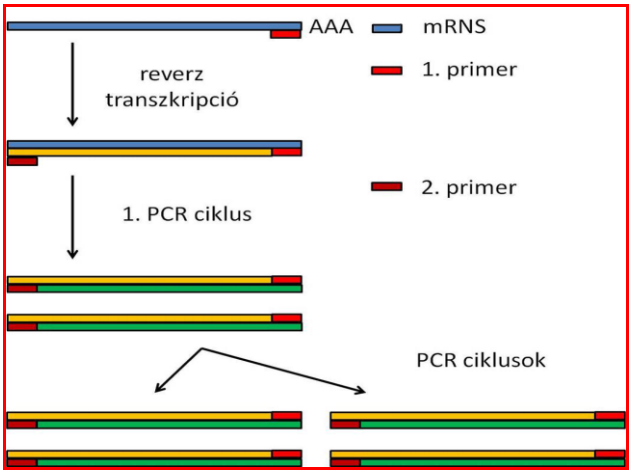


13. ábra. Az elektroforézishez használt berendezés (bal oldalt), és az eredményeként kapott gélkép látható UV fényben. (jobb oldalt) (http://labtutorials.org)

A PCR első sikeres használatáról a vírusdiagnosztikában az 1990-es évek első felében született tanulmány, amelyben már felhívják a figyelmet a rendkívüli specifitása és érzékenysége általi használhatóságra. Ezt követően nagyon sok, a módszerrel foglalkozó cikket publikáltak, de meglepően kevés diagnosztikával foglalkozó laboratóriumban vált rutinszerűvé a hagyományos alkalmazása. Érzékenysége nagyon kecsegtető volt a felhasználók számára, de kezdeti kidolgozatlansága miatt számos fals pozitív eredményt produkált. Ennek oka például, a termikus ciklusok közötti folyamat megszakítása, és a csövek felnyitása, hiszen ekkor még a sterilitásra törekvő laboratóriumi környezetből is könnyen bejuthatott a rendszerbe idegen DNS, valamint, hogy nem lehetett pontosan nyomon követni annak mennyiségi változásait. A problémára megoldást hozott a real-time, vagy kvantitatív (qPCR) kidolgozása (Boonham et al., 2014).

8.2.1. RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)

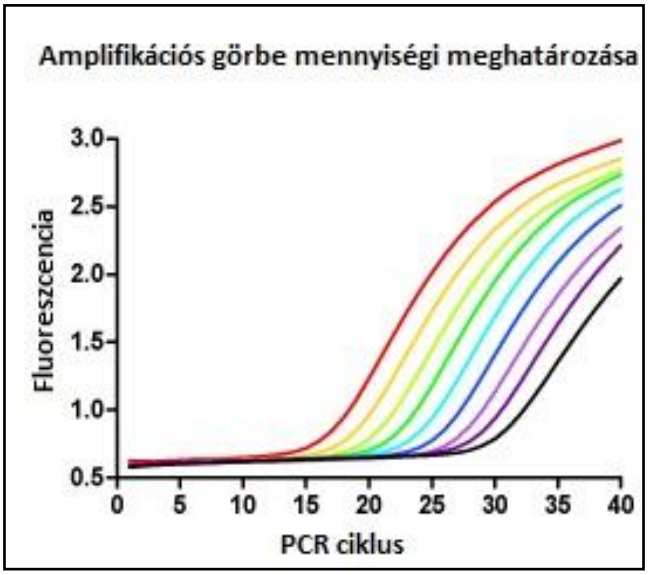
A reverz transzkripciós-polimeráz láncreakción alapuló módszer lényege, hogy reverz transzkriptáz enzimmel az RNS molekuláról cDNS-t készítenek. Így lehetséges a vírus RNS molekuláinak megsokszorozása (14.ábra). A vírus diagnosztika során elengedhetetlen a használata a nagyszámú RNS vírus azonosíthatósága miatt. Magas fokú szenzitivitása és specifitása miatt nagyon elterjedt. Azonban az eredmény megbízhatóságát csökkenthetik a növényi extraktumban jelen lévő reverz transzkriptáz, illetve polimeráz inhibítorok. Az érzékenység fenntartásának érdekében az inhibítorokat jól kidolgozott protokollok alkalmazásával eliminálni kell (Gambino & Gribaudo, 2006).



14. ábra. A reverz transzkripció helye a PCR során. Az 1. primerről reverz-transzkriptáz enzim segítségével megindul a cDNS szintézis. Majd bekerülve a PCR ciklusba amplifikálódik. (http://elte.prompt.hu)**.**

8.3. qPCR (Real-time- vagy kvantitatívPCR)

Az eljárás lényege, hogy a DNS amplifikációját kvantitatívan tudjuk végigkövetni. A kulcs, hogy a fluoreszcens jel a tubuson belül jön létre, és folyamat során is végig nyomon követhető, a csövek kinyitása nélkül. Ezt úgy érték el, hogy a forward és reverse oligonukleotid mellett egy harmadik, primer próbát is hozzáadnak a rendszerhez, amely a másik kettő közötti random helyen kötődik a célszekvenciához. Ez csökkenti a nem-specifikus szignálok megjelenését is, így pontosabb eredményt kaphatunk. Számos verziója létezik a módszernek. Ezek közül a legelterjedtebb a TaqMan™ amely a Taq polimeráz 5'-3' exonukleáz aktivitásán és fluoreszcens rezonancia energiatranszfer aktivitáson alapszik(15. ábra).

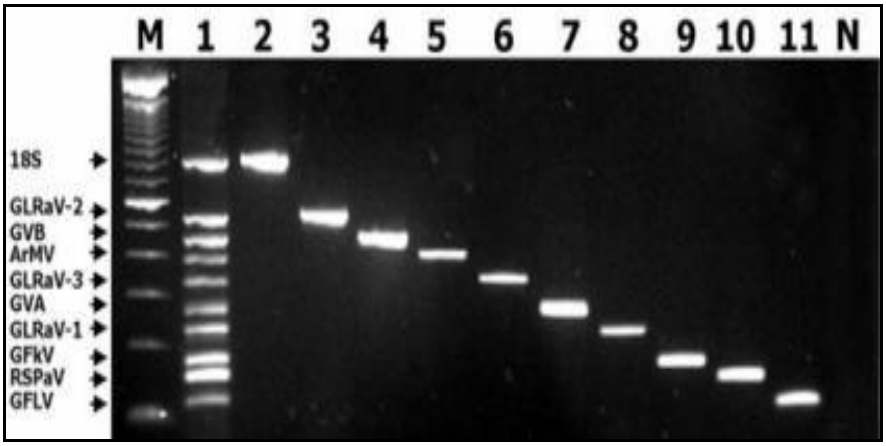


15. ábra. A qPCR eredményeként kapott görbe. Rajta látható, hogy a qPCR reakció mely ciklusában milyen értékű fluoreszcens jelet detektáltak, ez által kvantitatíve nyomon követhető a reakció (http://gerichtsmedizin.at).

Elsősorban az érzékenység növelésére törekedtek az eljárás diagnosztikai területekre való kidolgozása során. E mellett számos egyéb előnye is van, főleg a korábban elterjedt ELISA-val szemben. Az általános alkalmazhatósága rutin eljárásként jobb, és gyorsabb eredményt is kaphatunk általa. Ez az újonnan felfedezett vírusok tesztelése során is lényeges szempont. A PCR-hez szükséges vírus specifikus oligonukleotidok gyártása gyorsabb folyamat, mint az új antitestek gyártása egy szerológiai módszerhez. Valamint még ha az ELISA során használt reagensek tesztenkénti költsége alacsonyabb is, az antitestek gyártása jelentősen megnöveli, így a PCR módszer összességében költségkímélőbb (Boonham et al., 2014).

8.5. Multiplex RT-PCR

Ez a módszer azért különösen nagy előrelépést jelent a diagnosztikában, mert amellett, hogy a PCR minden előnyével rendelkezik, számos vírus egyidejű kimutatására is alkalmas. Gambino és mtsi. egy tanulmány során 9 szőlővírus egyidejű azonosítását végezték, összehasonlítva a különböző RT-PCR procedúrák érzékenységét. Az érintett vírusfajok a következőek voltak: *Arabis mozaik vírus* (ARMV), *Szőlő páfránylevelűség vírus* (GFLV), Szőlő A-vírus (GVA), *Szőlő B-vírus* (GVB), *Rupestris faszöveti barázdáltság vírus* (RSPsV), *Szőlő foltosodás vírus* (GFkV), *Szőlő levélsodródás vírus-1,-2.-és 3* (GLRaV), kombinálva a belső növényi RNS kontrollal, amelyet indikátorként használtak az RNS extrakció és RT-PCR hatékonyságához. A primerek minden egyes vírusok konzervált régióira specifikusan lettek tervezve, az egyediségük pedig PCR termékek szekvenálásával lett alátámasztva. Két növény totál RNS extrakciós eljárást (szilika-leválasztás és módosított RNeasy módszer) értékeltek ki a megbízható mRT-PCR protokol kidolgozásához. Mind a kilenc vírus specifikus fragmentet egyidejűleg amplifikálták fertőzött mintákból és azonosították a specifikus molekuláris méretük szerint agaróz gélelektroforézissel. A kétlépéses mRT-PCRben a vírustól függően 10^{-3} vagy 10^{-4} hígítási határok közt volt az extrakrum. 103 természetesen fertőzött és egészséges szőlőnövények leveléből, szunnyadó hajtások floémjéből, illetve *in vitro* növénykékből végezték az analízist. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az mRT-PCR egy megbízható és gyors módszer a szőlővírusok detektálásához, nagy mintaszám mellett (16.ábra),(Gambino & Gribaudo, 2006).



16. ábra. Az mRT-PCR eredményeként kapott gélkép. A számok az egyes mintákat jelölik, amelyek különböző vírussal fertőzött szőlőből származtak. A bal oldali skálán a megfelelő bázispár méretnél elkülönült DNS-hez tartozó vírusok neve található (Gambino & Gribaudo, 2006)

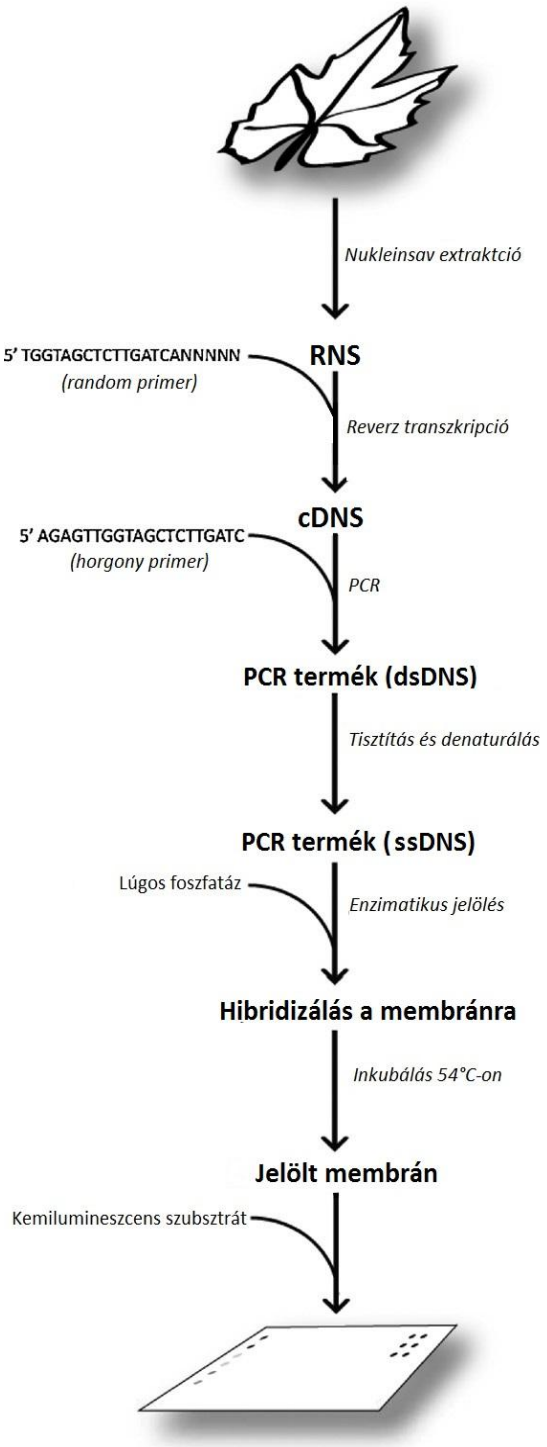
9. Nukleinsav hibridizáción alapuló módszerek

A hibridizációs technikák lényege, hogy valamilyen ismert szekvenciájú RNS vagy DNS szakaszt szeretnénk kimutatni egy ismeretlen biológiai mintából. A vírusdiagnosztika esetében ezáltal azt a feltevést szeretnénk igazolni, hogy a vizsgált szekvenciával rendelkező vírus jelen van a mintánkban, és ha sikerül ezt igazolni, arról is meggyőződhetünk, hogy milyen mennyiségben és minőségben van jelen. A molekuláris hátterét az biztosítja, hogy a nukleinsav molekulák reverzibilisen denaturálhatóak, a H-híd kötések mentén. Így megfelelően magas hőmérsékleten szétválaszthatjuk a kettősszálú DNS-t, vagy RNS-t, és ha az a feltételezett patogénből származik, a vele komplementer oligonukleotid próba (amelyet korábban sokszor fluoreszcensen, vagy egyéb módon jelöltek) a megfelelő szakaszon anellál az eredeti szálhoz. Ezt a jelenséget nevezzük hibridizációnak, amikor a különböző eredetű, de komplementer szekvenciával rendelkező szálak hidrogénkötéssel kettős szálú formát hoznak létre.

A rekombináns DNS technológia fejlődése az 1960-as évek elején indult meg, amikor elkezdték vizsgálni és sikerült is igazolni a DNS renaturációs képességét. Az új felfedezést kihasználva Edwin Southern 1975-ben kidolgozta a Southern-blot (lenyomat) módszert, ami egy speciális DNS szakasz kimutatására alkalmas egy komplex DNS mintában. Ez lehet például egy konkrét gén jelenlétének kimutatása egy faj teljes genomjából, ami abban a korszakban átütő sikernek számított, de még nagyobb jelentőséget tulajdonít a módszernek, az hogy elindította a hibridizációs technológiák nagy ütemű fejlődését, ami egyre pontosabb, gyorsabb, és nagyobb mintaszámmal dolgozó módszerek megjelenéséhez vezetett. Ennek köszönhetően ma már számtalan eljárás közül választhatnak a diagnosztikával foglalkozó laboratóriumok. Ide sorolhatjuk a Southern-blot elvén alapuló, RNS kimutatására alkalmas Northern-blotot, a legkülönbözőbb *in situ* hibridizációs módszereket, a macro-, és microarray technikákat (Southern, 2006).

9.1. Microarray

A microarray, vagy DNS-chip az egyik legújabb változata a hibridizációs technikáknak. Alkalmazása során elméletileg akár 10000 DNS mintát rögzítenek kovalensen egy kisméretű hordozó membrán felületére, szabályos elrendezésben. Az RNS vírusok esetében cDNS mintát használnak, amelyet reverz transzkriptázzal szintetizálnak. Mivel ez rendkívül kis mennyiségben készül, a DNS-chip használata előtt szükséges a PCR reakcióval történő sokszorosításuk. Az így kapott oldatot inkubálják a chipen, majd a nem kötött DNS darabok lemosását követően chip readerrel vizsgálják, a pontok által kibocsátott fénypontok színe és intenzitása alapján. A próba és a minta viszonya is megváltozik. Itt a próbát, az előző módszereknél pedig a mintát immobilizálják (Horváth, 1999).



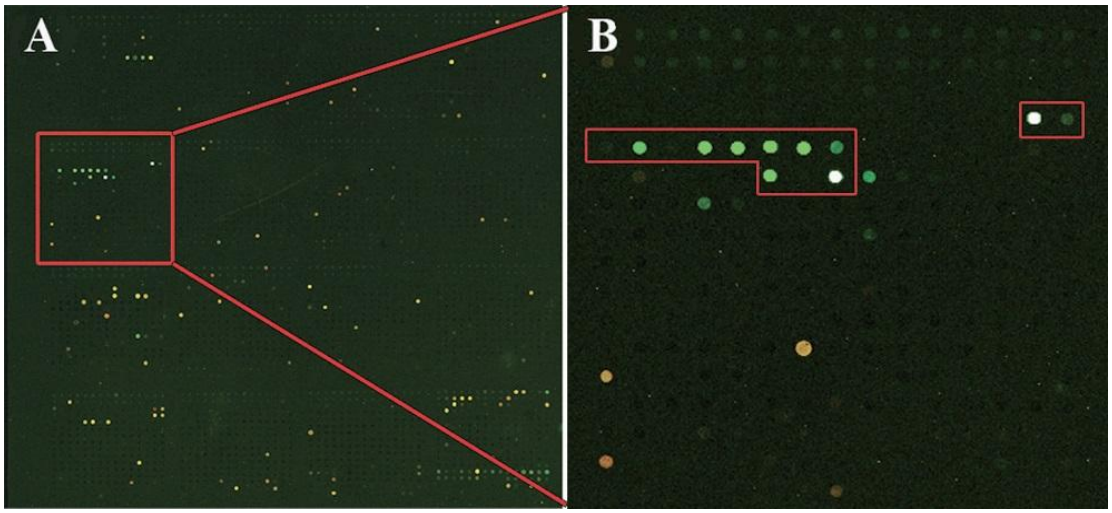
17. ábra. A microarray módszer folyamatábrája.(Nicolaisen, 2011)

Az ismertetett diagnosztika módszerekkel, a legnagyobb probléma az, hogy egyszeri próba során csupán egyetlen, vagy néhány ismert vírusfaj tesztelésére alkalmas. Ezzel szemben a DNS-chip technológia legnagyobb előnye, hogy egyetlen növényből vett mintát az összes olyan vírusra képes tesztelni egyszerre, melynek szekvencia adata elérhető. Ennek megvalósítását Nicolaisen és msti. dolgozták ki (17.ábra). Tanulmányukban egy 150 próbából felépülő chipet használtak, amellyel 52 fajt teszteltek, genuszok széles köréből válogatva. A mesterségesen fertőzött növényekből történő mintavételt követően elvégezték a cDNS hibridizációt és amplifikációt, majd felvitték a mintákat a hordozóra.

Hogy maximalizálják a detektálható vírusok tartományát, változó hosszúságú próbákat alkalmaztak, az ismert genomszekvenciájú vírusok konzervált régióiból. A rövidebb oligonukleotid szakaszok (20-35-mer próbák) jobb elkülöníthetőséget biztosítottak a közel rokon szekvenciák között, míg a hosszabb, 70-mer próbák a közel rokon, akár még azonosítatlan szekvenciákat is felismerték, ezzel fokozva a microarray érzékenységét. Végeredményben 49 fajt sikerült sikeresen elkülöníteniük (Nicolaisen, 2011).

9.2. LSON (Large-Scale Oligonucleotide Chip)

A hibridizációs technológiák továbbfejlődését mutatja ennek a technológiának a megjelenése. A nagymennyiségű oligonukleotid próbát a többi microarray-hez hasonlóan olyan növényvírusok azonosítására tervezték, amelyeknek ismert a genetikai információtartalma. Amiben fejlettebb, hogy nagyobb számú vírus detektálására alkalmas, mint bármelyik eddigi microarray. 3978 próbát tartalmaz két példányban, amely egyetlen eljárás során több, mint 500 növényeket fertőző vírust képes azonosítani, a szatellit RNS-eket és viroidokat is beleértve. Összesen 20000 független vírus nukleotid szekvenciája áll rendelkezésre a használatához, beleértve az izolált-, faj- és genusz specifikus próbákat is. Standard és szabadföldi mintákat tesztelésére is alkalmas, amit RT-PCR-rel készítettek elő, és teszteltek. A nagy mintaszám mellett van egy másik előnye. A próba specifikus, és nem-specifikus reakciósablonok alapján az LSON chip lehetővé teszi számunkra az azonosítatlan vírusok diagnosztikáját, így a módszer különösen hasznos olyan vírusok észlelésére, amelyekre nem számítanánk a mintából. Például a dél-koreai szójaültetvényeket vizsgálva, elsősorban olyan vírusok előfordulását várták, amelyek országszerte előfordulnak, de az LSON teszt során számos egyéb, zöldségeket fertőző vírusra specifikus primereket is alkalmaztak. Azt a meglepő eredményt kapták, hogy a *Földimogyoró klorotikus foltosság vírus* (PSV) nagy gyakorisággal van jelen az ültetvényen (18.ábra). Arra is használható ez által, hogy nyomonkövessük egyes növényekben a víruspopulációk ingadozását, és a nem fajspecifikus vírusok feltörekvését (Nam et al., 2014).



18. ábra. LSON chip használatával történt vírusazonosítás. A piros négyzetben lévő fluoreszcens pontok jelölik a PSV specifikus próbák helyeit, ezzel mutatják a vírus jelenlétét (Nam et al., 2014).

9.3. Polipróbák

Ez nem egy rutinszerűen alkalmazott eljárás, de érdekes kísérlete az egyidejűleg több vírus tesztelésére fejlesztett molekuláris hibridizáción alapuló módszereknek. Az új stratégia a nem-izotóp felhasználású molekuláris hibridizáción alapul. A vizsgálat során csonthéjasokból, konkrétan cseresznyéből, mandulából és szilvából vettek mintát. A próba elvégzéséhez a négy nukleinsav szekvencia részletet tandem klónozták, így lehetővé téve az egyedi ribopróbák szintézisét, amit polipróbának neveztek el. Ehhez linearizált plazmidot használnak fel. Blottolással juttatják fel a próbákat egy félig áteresztő nejlon membránra, amelyre előzetesen felvitték a fertőzött szövetekből kinyert vírusszekvenciákat. A nukleinsav szekvenciák négy ilarvírusból, *Alma mozaik vírusból* (ApMV), *Prunus nekrotikus gyűrűfoltosság vírusból* (PNRSV), *Szilva törpülés vírusból* (PDV) és *Amerikai szilva vonalas mintázottság vírusból* (APLPV) származtak. A specifikus egyedülálló és a polipróbákat külön membránra hibridizálják. A detektálás érdekében kemilumineszcenciás jelöléssel látják el őket. Minden vírusra egy specifikus mono- és három különböző polipróbát készítettek. Ez által a módszer érzékenységét és multiplex elemzéshez való használhatóságát is vizsgálták. Arra jutottak, hogy a próbák növelése mellett nem vesztett az érzékenységéből, mint az a multiplex PCR, de a szignál erőssége nagyban függött a hígítás mértékétől. További nagy előnye, hogy egyidejűleg DNS és RNS vírusok tesztelésére is alkalmas. Számos előnye mellett a bonyolultsága és költségigénye miatt rutin laboratóriumi tesztekhez való használhatósága vitatott (Herranz et al., 2005).

10. Új generációs szekvenálási módszerek

Az új generációs szekvenálásnak (Next-Generation Sequencing) köszönhetően az elmúlt években félelmetes fejlődésen ment keresztül a virológia tudományterülete. Nagy hatékonyságú, gyors és költségkímélő módszert dolgoztak ki, amely a nukleinsav szekvenálásán, azaz monomersorrendjének meghatározásán és azok bioinformatikai analízisén alapul. Az eddigi módszerek legnagyobb hátránya és korlátozó tényezője abból eredt, hogy csak a megfelelően karakterizált, vírusrészecskék kimutatására alkalmasak. Ehhez szükséges a köpenyfehérjét felismerő szerológiai reagens, és/vagy a keresett szekvencia pontos ismerete. Ezzel szemben a mélyszekvenálás során akár egyetlen mintából egy élőlény, vagy vírus teljes genomjának lehetséges a meghatározása (Massart, Olmos, Jijakli, & Candresse, 2014).

A hagyományos nukleotidsorrend meghatároásra 1977-ben két eljárást is kidolgoztak párhuzamosan. Az egyik a Sanger-féle enzimatikus láncterminación alapuló módszer, a másik pedig a Maxam-Gilbert-féle kémia degradációval történő DNS szekvenálás. A kettő közül az előbbi vált egyeduralkodóvá, nagyobb teljesítménye, automatizáltsága, és fluoreszcens detektálhatósága révén. Első generációs szekvenálás néven is emlegetik. A 2000-es években megjelenő, teljesen más mechanizmuson alapuló, még nagyobb hatékonyságú és költségkímélőbb új-generációs szekvenálási módszerek kiszorították a Sanger-féle eljárást. Ezeket más néven nagy áteresztőképességű (high-throughput) technológiának is hívjuk, mert egy adott mintából több millió szekvenciát (read-et) olvasnak le. Ide tartoznak többek között a Roche 454, az Illumina, a SOLiD, a Helicos, és még számos metódus. A növényvírus diagnosztika során az első kettőt alkalmazzák a leggyakrabban (Barba, Czosnek, & Hadidi, 2014).

A módszerek diverzitásának kulcsa az eltérő nukleinsav tisztítási technikák alkalmazása. A legalapvetőbb megközelítés, amikor a többlépéses cirkulációs amplifikáció eredményeként a teljes mRNS mennyiséget kinyerték a mintából. Ennek hátránya, hogy a tetemes mennyiségű szekvencia adat között nagyon alacsony a vírus szekvenciák mennyisége. A legnagyobb része a gazdanövény genomjából származik, ami a vírusdiagnosztika szempontjából gyakorlatilag kárba veszett információ.

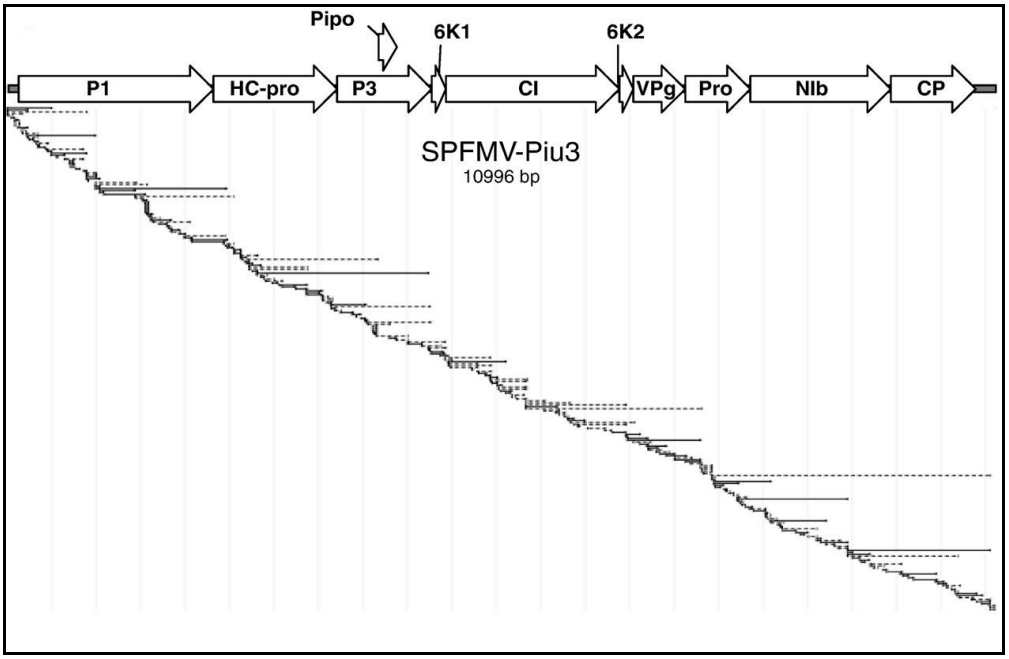
Ennek megoldására Adams és mtsai. előzetesen kivonó hibridizációt végeztek, egészséges növényből, ezzel gyarapítva a nem-növényi RNS mennyiséget és határt szabva a szekvenálás mennyiségi igényének (Adams et al., 2009). Az erőfeszítések ellenére megbizonyosodott, hogy a totál mRNS szekvenálás nem optimális a vírusok befogására, mivel a felszaporításukhoz szükséges poliA szekvencia sok esetben hiányzik a mintából (Boonham et al., 2014).

10.1. mRNS szekvenálás

A virológiai vizsgálatok során elterjedt módszerré vált a random cDNS szintézist követő dsRNS izoláció. A növényi endogén RNS-ek jellemzően nem szerveződnek kétszálú stuktúrába, szemben a duplikációra képes vírus RNS-sel. Ez a megközelítés már jelentősen alkalmasabb a virális nukleinsav gazdagítására. Előfordul, hogy a totál mRNS hibridizációval párhuzamosan végzik, majd eredményeit összehasonlítják. Egy tanulmány során borszőlő, konkrétan Syrah ültetvényen figyeltek meg vírusos fertőzésre utaló tüneteket, de az RT-PCR teszt eredménye nem mutatott a szimptómákkal azonosítható vírust. A hibridizációhoz Life Sciences 454 mélyszekvenálási technológiát használtak. Tünetmentes növényből vett minta totál RNS hibridizációját követően a szekvencia adatok elemzéséből megállapították, hogy azok túlnyomó többsége a növényi nukleinsav volt, de tartalmazott még két jól definiált szőlőt fertőző vírusból az RSPaV-ból és a GRVFV-ból származó RNS-t. Azonban az összes fragment, csupán 1%-a volt virális eredetű. A tüneteket mutató növény totál nulkeinsav kivonását követően 65.587 cDNS fragmentet kaptak, ezek nagy részét be tudták azonosítani, de 1527 fennmaradó fragmentum ismeretlen vírusból származott. A fragmentumokat sorba rendezve bioinformatikai módszerekkel összeállítpttak egy potenciális vírust, melyre a prediktált szekvencia alapján primereket terveztek és PCR reakcióban amplifikálták. A PCR termék nukleotid sorrendjét hagyományos (Sanger) szekvenálással állapították meg. Kiderült, hogy eddig ismeretlen, de a területen széleskörben elterjedt mafravivirust találtak, amely GSyV-1 nevet kapta, az általa okozott betegséget pedig Syrah leromlásnak nevezték el (Al Rwahnih, Daubert, Golino, & Rowhani, 2009).

10.2. Kis RNS szekvenálás

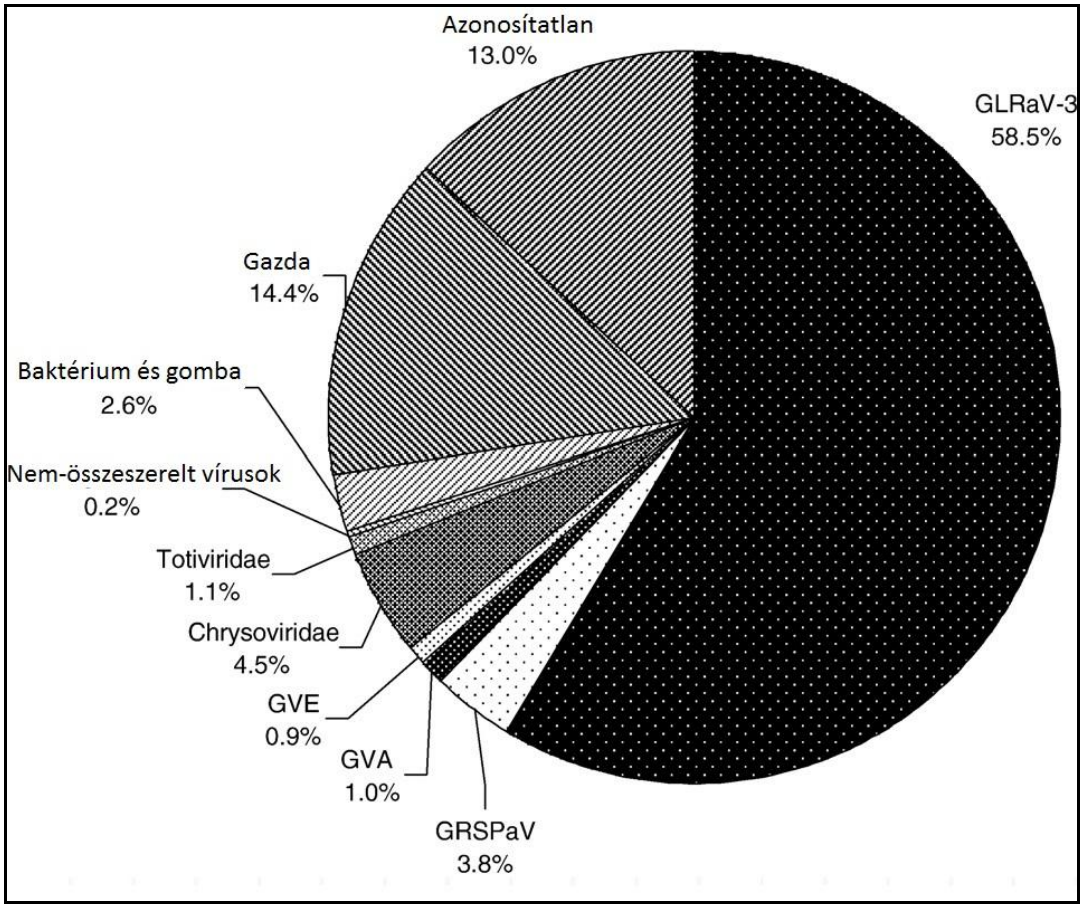
A vírusok diagnosztikájára a legtöbb taktika a növényi kis RNS-ek szekvenálásán és összeszerelésén alapul. A vírusok mind célpontjai, mind gerjesztői a géncsendesítés mechanizmusának. Az első beszámoló egy teljesen új vírus azonosításáról és teljes genom összeszereléséről 2009-ben készült, Kreuze és csapatának munkája által. Direkt fertőzött, tünetmentes és betegséget mutató édesburgonya kisRNS-ének nagy áteresztőképességű párhuzamos szekvenálását végezték, Illumina Genome Analyzer-rel. Az infekció a gyakran tünetmentes, *Édesburgonya enyhe foltosság vírus* (SPFMV), és az *Édesburgonya klorotikus törpülés vírus* (SPCSV) által történt. Ezeknek a koinfekciója okozza a súlyos károkat okozó szinergikus édesburgonya vírusbetegséget (SPVD). A totál siRNS szekvenálását követően szekvencia összeszerelő szoftver segítségével több, mint 1000nt hosszúságú kontigokat hoztak létre. Amelyek alapján egyértelműen azonosíthatóvá váltak a várt vírus eredetű RNS, ssDNS és dsDNS darabok. Meglepetésükre azonban számos kontig, egy eddig ismeretlen, badnavírushoz hasonló szekvenciából származott. Ezekből tervezett primerek amplifikációka és Sanger-féle szekvencia analízisét követően megállapították, hogy sikeresen azonosítottak és feltérképeztek egy teljesen új növényvírust (19.ábra) (Kreuze et al., 2009).



19. ábra. Az új vírus-szekvenciája kontigokból történő összeszerelésének eredménye. A teljes genom sematikus képe látható, a kódoló régiók megnevezésével. Alatta pedig a különböző hosszúságú siRNS-ből készült átfedő kontigok sora szerepel.(Kreuze et al., 2009)

10.3. Teljes virom szekvenálás

Új vírusok felfedezése és leírása mellett a módszer akár egy terület teljes szekvencia térképezésére is alkalmas. Lehetséges egyetlen eljárással a teljes virome szekvencia analízise és leírása. Egy súlyosan fertőzött dél-afrikai szőlőültetvényről 44 random kiválasztott növényből izoláltak dsRNS-t, majd mélyszekvenálással összegezték a terület vírus populációját. Erre Illumina Genome Analyzer II-z használtak. 837 megabázispárnyi szekvencia adatot gyűjtöttek össze, amelyből 4 ismert virális patogént sikerült azonosítani. A legelterjedtebbnek a Szőlő levélsodródás vírus-3 (GLRaV-3) bizonyult, közel 53%-os gyakorisággal, ezt sorban követte a *Szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus* (GRSPaV), a Szőlő vírus-A (GVA) és a Szőlő vírus-E (GVE). Az utóbbit korábban még soha nem azonosították Dél-Afrika ültetvényein (20.ábra), (Coetzee et al., 2010).



20. ábra. A szekvencia találatok százalékos összehasonlítása. Látható, hogy a kisRNS-ek analízisét célzó módszerek milyen nagy hatékonysággal mutatják ki a vírusokat, arányaiban jól kiszűrve a gazdához és egyéb organizmusokhoz tartozó szekvenciákat (Coetzee et al., 2010).

11. Következtetés

A legfontosabb szempontokat figyelembe véve, a legelterjedtebb diagnosztikai eljárások előnyeit és hátrányait foglalom össze az alábbi táblázatban.

1. táblázat. Legfontosabb eljárások összefoglalása

	Biotesztek	**ELISA**	**mRT-PCR**	**Microarray**	**NGS**
Diagnosztika tárgya	Indikátornövényen megjelenő szimptómák	Vírus proteinek, elsősorban köpenyfehérje	Ismert vírus nukleinsav szekvenciája	Ismert vírus nukleinsav szekvenciája	Teljes nukleinsav szekvencia
Működés lényege	Szenzitív tesztnövényekre történő vírus-inokuláció	Állati antitestek antigén-felismerő képessége	Reverz transzkripcióval egybekötött polimeráz láncreakció	Nukleinsav hibridizáció	Totál nukleinsav bázissorrend-meghatározás
Azonosítás módja	Külső megfigyelés	Antitesthez kapcsolt enzim által előidézett színreakció	Nukleinsavak szétválasztása gélelektroforézis-sel	Kemilumineszcens színreakció	Bioinformatikai analízis
Előnyök	Megbízható Egyértelmű Vírusaktivitás becslésére alkalmas	Hiteles Érzékeny Specifikus	Érzékeny Specifikus Pontos mennyiség meghatározható Gyors Költségkímélő Egyidejűleg több vírus tesztelésére alkalmas	Pontos Gyors Nagyon nagy mintaszám, ez által költségkímélő is	Minden, a mintában jelen lévő organizmus kimutatására alkalmas Nem szükséges a vírus előzetes ismerete Nagy hatékonyságú Gyors és pontos
Hátrányok	Idő-, eszköz- és munkaigényes Nagyfokú szakértelmet igényel Mechanikusan terjedő vírusok nem mutathatóak ki	Ellenanyag előállítása idő- és költségigényes Vírus pontos mennyisége nem meghatározható CP gén mutációja, vagy a kapszid hiánya eredménytelenné teszi Csak ismert vírus kimutatására alkalmas	Csak ismert vírus kimutatására alkalmas RNS érzékenysége és a növényi bontó enzimek következtében gyakori a fals eredmény	Elemzése nagy szakértelmet igényel Szükséges a vírus-nukleinsav előzetes ismerete	Nagyon nagy mennyiségű adatot eredményez Elemzése bioinformatikai ismereteket igényel

12. Összefoglalás

A növényvírusok olyan apró, szubmikroszkópos fertőző részecskék, amelyek csupán örökítő anyagból és az azt körülvevő fehérjeburokból állnak. A növények nagyon gyakori elszenvedői a vírus okozta megbetegedéseknek. A korai azonosításuk nagyon fontos a betegségek megállításához, és az általuk okozott veszteségek minimalizálásához.

A vírusok morfológiájának-, genomjának- és replikációs folyamatainak ismerete elengedhetetlen a megfelelő stratégiák kidolgozásához. Nanométeres nagyságuk miatt a fénymikroszkóppal nem azonosíthatóak, de van néhány eljárás, amivel már évtizedek óta lehetséges a kimutatásuk. A hatékony ellenőrzésükhöz elengedhetetlen, mind a tünetekkel rendelkező növények, mind a szaporítóanyag helyes diagnózisa és az összes jelen lévő vírus felderítése Manapság számos módszert alkalmaznak a növényvírus diagnosztika területén. Többek között ELISA, és különböző PCR-alapú megközelítések, indikátor növények segítségével végrehajtott biotesztek, és elektronmikroszkópia. Az ELISA és a PCR rutin analízisként alkalmazható, azonban mindkét módszer csupán egy, vagy néhány faj egyidejű kimutatására alkalmas, nem lehetséges velük új vírus leírása, illetve a széles-spektrumú szűrésük. A biológiai tesztek és az elektronmikroszkópia egyaránt általános vizsgálatok; azonban nem biztosítanak azonosítás faj szintű diagnosztizálhatóságot, továbbá időigényesek és nagyfokú szakértelmet igényelnek. A biopróbák nem alkalmasak mechanikusan terjedő vírusok azonosítására, elektronmikroszkópban pedig igen nehézkes a szférikus szerkezetű vírusok felismerése.

A fejlődés következő szintjén, a nukleinsav hibridizáción alapuló módszerek állnak. A microarray vírus-specifikus próbáinak használata során már minden olyan kórokozó kimutatható a mintából, melynek a nukleinsav szekvenciája rendelkezésre áll, és egyszerre akár próbák ezreire tesztelhető. A diagnosztikai módszerek fejlődésének a csúcsán pedig az új-generációs szekvenálás áll. Ez nem csupán megbízható, gyors és pontos, de egyértelműen alkalmas új vírusok felfedezésére. Mindent egybe vetve, a növényi vírusdiagnosztika még szép jövő előtt áll.

13. Summary

Plant viruses are very small, submicroscopic infectious particles composed of a nucleic acid core and a protein coat surrounding. Viruses are common agents of plant infectious diseases. Early detection of viral diseases is crucial to prevent or minimize the spread of the virus and potential crop losses. Once the identity of the virus is confirmed, specific control strategies must be implemented immediately.

Understanding the morphology, genome structure and replication method of viruses is essential for most of the strategies. Viruses are too small to be seen and identified with a light microscope, but there are some type of test have used for decades. Correct diagnosis and detection of plant viruses both in symptomatic plants and for screening propagation material is of critical importance for effective control. Today numerous methods used for diagnosis or detection include serological tests (ELISA), different PCR-based approaches, bioassays using indicator plants, and electron microscopy. ELISA and PCR are appropriate for routine analysis, however, both methods can only be used for detection of a single or a few species and are thus not ideal for diagnosis of unknown viruses or for broad range screening for the presence of viruses. Bioassays and EM are both generic assays; however, they do not provide identification to species level and furthermore require expertise and are time consuming. Bioassays do not detect viruses that are not transmissible mechanically, and spherical viruses are not identified easily using EM. For diagnosis and also for screening propagation material, high throughput generic methods are needed.

On the next level, the hybridization techniques have appeared. Microarrays with virus-specific probes could offer such generic assays that in principle could identify every virus in a sample for which sequence data are available, that means thousands of probes. And on the top of the evolution of diagnostic methods there is the next generation sequencing, that isn’t only reliable, accurate and quick, but clearly suitable for the discovery of new virus species. All in all, the plant virus diagnostics is still standing in front of a bright future.

14. Köszönetnyilvánítás

Hálás vagyok Dr. Várallyay Évának, a témavezetőmnek, akihez bármikor fordulhattam segítségért, ellátott hasznos tanácsaival, és szakmai támogatásával hozzásegített szakdolgozatom elkészítéséhez.

Köszönöm a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézete, Genomika Főosztály, Diagnosztikai Csoportjának, hogy segítették szakmai fejlődésemet, és lehetőséget biztosítottak számomra, hogy egyes módszereket a gyakorlatban is megismerjek.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Böddi Béla, tanszékvezetőnek, hogy BSc szakdolgozatomat az ELTE Növényszervezettani Tanszékén készíthettem el, és Dr. Preininger Éva adjunktus tanárnőnek, aki volt olyan szíves és elvállata a belső konzulens szerepét.

Köszönöm barátaimnak és családomnak, hogy mellettem álltak és lelkileg támogattak.

15. Irodalomjegyzék

1. **Adams,** I. P., Glover, R. H., Monger, W. a., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., … Boonham, N. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, *10*(4), 537–545. http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x
2. **Al Rwahnih**, M., Daubert, S., Golino, D., & Rowhani, a. (2009). Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, *387*(2), 395–401. http://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.028
3. **Barba,** M., Czosnek, H., & Hadidi, A. (2014). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, *6*(1), 106–36. http://doi.org/10.3390/v6010106
4. **Boonham**, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, *186*, 20–31. http://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007
5. **Bunikis,** J., & Barbour, A. G. (2002). Laboratory Testing for, *86*(2), 311–340.
6. **Burnet**, Macfarlane Sir, Stanley, Wendell Meredith. *The viruses: vol.2 - Plant and bacterial viruses*. New York: Academic Press, 1959., 6037966
7. **Clark**, M. F., & Adams, a N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *The Journal of General Virology*, *34*(3), 475–483. http://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475
8. **Coetzee, B.,** Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J. G., & Burger, J. T. (2010). Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, *400*(2), 157–163. http://doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.023
9. **D'Arcy**, C.J. and L.L. Domier. 2000. Barley yellow dwarf. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1103-01
10. **Elena,** S. F., Fraile, A., & García-Arenal, F. (2014). Evolution and emergence of plant viruses. *Advances in Virus Research*, *88*, 161–191. http://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00003-9
11. **Érsek** T., Gáborjányi R. *Növénykórokozó mikroorganizmusok*. ELTE Eötvös Kiadó, 1998., 963-463-087-1
12. **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. http://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1223
13. **Gan**, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, *133*(9), e12. http://doi.org/10.1038/jid.2013.287

14. **Ghoshal,** B., & Sanfaçon, H. (2015). Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology*, 1–12. http://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.008
15. **Hajdu,** E.1, Korać, N.2, Cindrić, P.2, Ivaniševic, D.2 & Medić, M.2. „The importance of clonal selection of grapevine and the role of selected clones in production of healthy propagating stocks." *International Journal of Horticultural Science* (2011): 15–24
16. **Hameed**, A., Iqbal, Z., Asad, S., & Mansoor, S. (2014). Detection of Multiple Potato Viruses in the Field Suggests Synergistic Interac- tions among Potato Viruses in Pakistan, *30*(4), 407–415.
17. **Herranz**, M. C., Sanchez-Navarro, J. a., Aparicio, F., & Pallás, V. (2005). Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or "polyprobe." *Journal of Virological Methods*, *124*(1-2), 49–55. http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.11.003
18. **Hipper**, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., & Revers, F. (2013). Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Frontiers in Plant Science*, *4*(May), 154. http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154
19. **Horváth**, József - dr. Gáborjányi Richard. *Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek.* Mezőgazda Kiadó, 1999., 9789639239371
20. **Jones**, R. a C. (2014). Trends in plant virus epidemiology: Opportunities from new or improved technologies. *Virus Research*, *186*, 3–19. http://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.11.003
21. **Kamthan**, A., Chaudhuri, A., Kamthan, M., & Datta, A. (2015). Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, *06*(April), 1–17. http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00208
22. **Kreuze**, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., & Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, *388*(1), 1–7. http://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.024
23. **Kumar**, R. (2014). Role of MicroRNAs in Biotic and Abiotic Stress Responses in Crop Plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 93–115. http://doi.org/10.1007/s12010-014-0914-2
24. **Láng F.**, *Növényélettan - A növényi anyagcsere I-II.* ELTE Eötvös Kiadó, 2007.
25. **Lázár**, J.1 & Bisztray, Gy. D.2. „Virus and virus-like diseases of grapevine in Hungary." *International Journal of Horticultural Science 2011, 17 (3): 25–36.* (2011): 25–36.
26. **Li**, R., Baysal-Gurel, F., Abdo, Z., Miller, S. a, & Ling, K.-S. (2015). Evaluation of disinfectants to prevent mechanical transmission of viruses and a viroid in greenhouse tomato production. *Virology Journal*, *12*(1). http://doi.org/10.1186/s12985-014-0237-5
27. **Massart**, S., Olmos, A., Jijakli, H., & Candresse, T. (2014). Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research*, *188*, 90–96. http://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.029
28. **Mauck,** K. E., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2014). Evidence of local adaptation in plant virus effects on host-vector interactions. *Integrative and Comparative Biology*, *54*(2), 193–209. http://doi.org/10.1093/icb/icu012
29. **Mehta**, R., Radhakrishnan, T., Kumar, A., Yadav, R., Dobaria, J. R., Thirumalaisamy, P. P., … Chigurupati, P. (2013). Coat protein-mediated transgenic

resistance of peanut (Arachis hypogaea L.) to peanut stem necrosis disease through Agrobacterium-mediated genetic transformation. *Indian Journal of Virology*, *24*(2), 205–213. http://doi.org/10.1007/s13337-013-0157-9

30. **Nam**, M., Kim, J., Lim, S., Park, C. Y., Kim, J., Choi, H., … Lee, S. (2014). Development of the Large-Scale Oligonucleotide Chip for the Diagnosis of Plant Viruses and its Practical Use, *30*(1), 51–57.
31. **Nicolaisen,** M. (2011). An oligonucleotide-based microarray for detection of plant RNA viruses. *Journal of Virological Methods*, *173*(1), 137–143. http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.01.022
32. **Roossinck**, M. J. (2015). Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology*. http://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.041
33. **Saurabh,** S., Vidyarthi, A. S., & Prasad, D. (2014). RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*, 1–22. http://doi.org/10.1007/s00425-013-2019-5
34. **Southern**, E. (2006). Southern blotting. *Nature Protocols*, *1*(2), 518–525. http://doi.org/10.1079/PNS19960052
35. **Truernit**, E. (2014). Phloem imaging. *Journal of Experimental Botany*, *65*(7), 1681–1688. http://doi.org/10.1093/jxb/ert445
36. **Tvezet,** R. (2014). Transzgénikus vírusrezisztencia I . Növényi vírusok molekuláris biológiája, 130–134.
37. **Zaitlin,** M., & Mayer, A. (1998). The Discovery of the Causal Agent of the Tobacco Mosaic Disease. *New York*, *23*(4), 105–110. Retrieved from http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Documents/1998/ZaitlinDiscoveryCausalAgentTobaccoMosaicVirus.pdf
38. **Zechmann**, B., Graggaber, G., & Zellnig, G. (2011). Microwave Assisted Rapid Diagnosis of Plant Virus Diseases by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, (56), 1–6. http://doi.org/10.3791/2950

Internetes hivatkozások:

http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/275/1647/2111

http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/emergingviruses.htm

http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/PlantDiseaseDiagnosis.aspx

http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/text18/plantvectors.html

http://abe.leeward.hawaii.edu/Protocols/RNeasy%20Principle.htm

http://www.socmucimm.org/elisa-method/

http://virology-online.com/general/Test5.htm

http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction

http://www.virology.ws/2013/09/06/how-many-viruses-on-earth/

http://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-image-tree-s-cleft-grafting-methods-image28350806

http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/ANovenyiAnyagcsere/ch07s05.html

http://gerichtsmedizin.at/realtimepcr.html

NYILATKOZAT

Név: Czakó Éva Kamilla

Neptun azonosító: FWNGKB

ELTE Természettudományi Kar, **biológia alapszak**

Szakdolgozat címe: Molekuláris biológiai módszerek fejlődése a növényi vírusdiagnosztikában.

A szakdolgozat szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam.

Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít:

– szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
– tartalmi hivatkozás a forrás megjelölése nélkül;
– más személy publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Kijelentem továbbá, hogy a szakdolgozat leadott nyomtatott példányai és elektronikus változata szövegükben, tartalmukban megegyeznek.

Budapest, 2015.05.15.

_____

a hallgató aláírása