

Magyarországon megjelenő új szőlő vírusok azonosítása kis RNS-ek szekvenálásán alapuló metagenomikai módszerekkel

Czotter Nikoletta^{1*}, Molnár János², Deák Tamás³, Tusnády E. Gábor², Kocsis László⁴, Burgyán József¹ és Várallyay Éva¹

¹*Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi A. u. 4.*

²*Enzimológiai intézet, MTA Természettudományi Kutatóközpont, H-1117, Budapest, Magyar Tudósok körútja 2*

³*Budapesti Corvinus Egyetem, Szőlészeti és Borászati Intézet, Szőlészeti tanszék, H-1118 Budapest, Villányi út 29-43.*

⁴*Pannon Egyetem, Georgikon Kar, Kertészeti Tanszék, H-8360, Deák Ferenc utca 16.*

*e-mail: czotter.niki@gmail.com

Összefoglalás

A szőlőt több, mint 60 vírus és viroid képes megfertőzni, így az ültetvények egészségügyi állapotát alapvetően befolyásolja ezen kórokozókkal való fertőzöttségének mértéke. Munkánk során a főbb hazai borvidékeket képviselő termő ültetvényekben a növény védekező folyamatai során keletkező vírus specifikus kis RNS-ek újgenerációs szekvenálásával határoztuk meg az ültetvényekben előforduló vírusokat és viroidokat. A felmérésünk két, hazánkban eddig nem izolált vírus: Szőlő Syrah vírus 1 és Szőlő Pinot gris vírus gyakori elterjedését mutatta ki, mely vírusok jelenlétét RT-PCR reakcióval és hagyományos szekvenálással is visszaigazoltuk.

Kulcsszavak: szőlő, vírus, diagnosztika, kis RNS újgenerációs szekvenálás

Abstract

Among several grapevine infecting pathogens there are more than 60 viruses and viroids. Lifespan of grapevine plantations are greatly influenced by their possible infection with viruses and viroids. In our work instead of traditional virus diagnostics methods we used a basically new strategy to detect virus infection in grapevine: next generation sequencing of virus derived small RNAs. We used this technique to determine the presence of these pathogens in grapevine

plantations from distant part of the country. During our survey we detected widespread distribution of two viruses, never described in our country before: Grapevine Pinot gris virus and Grapevine Syrah virus1. Their presence was validated by RT-PCR and traditional Sanger sequencing.

Keywords: grapevine, virus, diagnostics, smallRNA-NGS

Bevezetés

A szőlőt igen sok kórokozó betegítheti meg, köztük több, mint 60 vírus és viroid (Martelli, 2014). A vírusfertőzések elleni egyetlen hatékony védekezési mód a fertőzés megelőzése lehet. A megelőzés egyrészt a vírusokat terjesztő vektorok elleni védelmet, másrészt az egészséges, vírusmentes szaporítóanyagok alkalmazását jelenti. A szőlőt fajtafenntartás miatt vegetatívan szaporítják, így a legnagyobb fertőzési forrás maga a szaporítóanyag. A megelőzés, azaz az egészséges szaporítóanyag előállításának és alkalmazásának kulcsa a kórokozók kimutatására alkalmazott diagnosztikai módszerek érzékenységében rejlik. A magyarországi hatósági vírus diagnosztika a hagyományosnak mondható fás- és lágyszárú biotesztekre, a vírus köpenyfehérjéjének kimutatására tervezett szerológiai (ELISA), a vírus örökítő anyagának kimutatására használt molekuláris biológiai vizsgálatokra (reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR), nukleinsav hibridizációs technikák) támaszkodik. Ezen módszerek azonban csak azon ismert vírusok kimutatására alkalmasak, melyek esetében rendelkezésre áll az ELISA vizsgálat esetében a vírus specifikus ellenanyag, molekuláris biológiai módszerek esetében pedig legalább részben ismernünk kell a vírus örökítő anyagának bázissorrendjét.

Az újgenerációs szekvenálások fejlődése és az RNS interferencia folyamatának felderítése teljesen új megközelítési módot nyitott a vírusdiagnosztikában (Pantaleo és mtsai, 2010, Navarro és mtsai, 2009, Giampetruzzi mtsai, 2012). Vírusfertőzés során a növény védekező rendszere (RNS interferencia vagy géncsendesítés), olyan specifikus reakciókat indít, melynek eredményeképpen a növény, a fertőző vírust lebontja (Csorba és mtsai, 2009). A lebontás specifikusát a vírus szekvenciájával megegyező szekvenciájú rövid, 21-25nt hosszúságú kisRNS-ek (small interfering RNA – siRNS) adják (Baulcombe, 2004). A siRNS-ek a védekezési reakció során keletkeznek a vírus replikációja során létrejövő duplaszálú RNS-ről a növény egy RN-áz aktivitással rendelkező, DICER enzimének aktivitásának eredményeképpen. A siRNS-ek egyik szála beépül a géncsendesítés végrehajtó komplexébe a RISC (RNA induced silencing complex – RNS indukálta géncsendesítési komplex)-be, ami ezután felismer és hasít minden, olyan RNS-t, amely szekvencia komplementaritást mutat a beépült kisRNS-el. Vírussal, vagy viroiddal fertőzött növényben tehát

jelen vannak a kórokozó szekvenciájával megegyező kis RNS-ek, melyeket klónozni lehet. Az így nyert kisRNS könyvtárban jelenlevő RNS-ek szekvenciája NGS-sel meghatározható (Pantaleo és mtsai, 2010, Navarro és mtsai, 2009). A megközelítés előnye a hagyományos molekuláris biológiai szemlélettel szemben, hogy olyan patogéneket is detektálni tud, amelyeket eddig nem ismertünk, vagy az adott növényen korábban nem kerültek leírásra (Al Rwahnih és mtsai, 2009, Giampetruzzi és mtsai, 2012).

Munkánk során kisRNS-ek újgenerációs szekvenálásával végeztünk vírusdiagnosztikai felmérést Magyarország legfontosabb borvidékeinek szőlőültetvényein, mely során új szőlőről izolált vírusok, a Szőlő Syrah vírus-1 (GSyV-1) és Szőlő Pinot gris (GPGV) vírus széleskörű elterjedését mutattuk ki.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkhoz a szükséges növényanyagot Magyarország 9 különböző borvidékének, 20 mintavételi helyéről, ültetvényenként véletlenszerűen kijelölt 5-10 tőkéről gyűjtöttük be. A növényi minták különböző részeiből (levél, hajtáscsúcs, virág és kacs) RNS-t vontunk ki Gambino és munkatársai (2008) módszere alapján. Az egyes szőlő minták szerveiből kivont RNS-ből egyszemélyes, illetve ültetvény RNS keveréket, „poolokat” állítottunk elő. Az így kapott ültetvény RNS keverékből az Illumina TrueSeq Small RNA Sample preparation általunk módosított protokollja alapján kisRNS könyvtárat készítettünk, majd a kisRNS könyvtárakat Illumina platformon az UD Genomed szekvenálta. A szekvenálás minőségének ellenőrzésére FastQC programot használtunk. Ezt követően eltávolítottuk a primer és adapter szekvenciákat, erre alkalmas a Trimmomatic program alkalmazásával. Annak érdekében, hogy mintáinkban vírusokat azonosíthassunk, felillesztettük őket az NCBI-ből származó vírus eredetű referencia vírusgenomjait tartalmazó adatbázishoz. Az illesztéshez BWA aln módszert alkalmaztunk. A kisRNS szekvenciákat de novo is összeillesztettük hosszabb „kontig” szekvenciákba, 13-as és 15-ös kmer méret beállítás mellett Velvet Software segítségével. A velvet alkalmazás segítségével összeszerelt vírus genomi szekvenciákat Blast program segítségével az NCBI vírus referencia szekvencia adatbázisához illesztettük, hogy beazonosítsuk őket. Az így nyert bioinformatikai eredmények valódiságát molekuláris biológiai módszerekkel kezdtük el visszaigazolni. Ehhez az RNS kivonatokról cDNS-t szintetizáltunk RevertAid kit (RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit-Thermo Scientific) segítségével, melyeket templátként használva PCR reakcióval vizsgáltuk az adott vírus jelenlétét irodalomban publikált vírus specifikus diagnosztikai primereket használva GSyV-1 (Al Rwahnih és mtsai, 2009, Sabanadzovic és mtsai, 2009) és GPGV (Glasa és mtsai, 2014). A kapott termékek egy

részének bázissorrendjét a tisztított PCR termékek hagyományos Sanger szekvenálásával is ellenőriztük.

Megvitatás

Munkánk során, az ország 9 borvidékének, 20 ültetvényének vírusdiagnosztikáját végeztük el kisRNS-ek újgenerációs szekvenálásával. Az általunk használt módszerek segítségével nagy számban tudtunk szőlő mintákból jó minőségű kisRNS könyvtárat készíteni. A nyers szekvenciák trimmelése után átlagosan 8 millió kisRNS szekvenciát, „read”-et, kaptunk könyvtáranként. A referencia adatbázishoz illesztés során magas találatot kaptunk két vírusra, Szőlő Pinot gris (GPGV) és Szőlő Syrah vírus-1 (GSyV-1) vírusokra, melyeket eddig magyarországi szőlő ültetvényeken nem írtak le. A vírusok jelenlétét RT-PCR reakcióval is igazoltuk. A GSyV-1 vírus elterjedtség PCR vizsgálat alapján nem volt jelentős, azonban a szekvenálási adatok a vírus nagyfokú elterjedésre utalnak. A GSyV1 esetében két különböző primerpárral a metiltranszferáz, és a köpenyfehérje gén egy darabját sokszoroztuk és azonosítottuk a vírus specifikus terméket. A legszélesebb körű vírus fertőzöttséget a GPGV mutatta, mind a bioinformatikai eredmények mind a RT-PCR alapján. A GPGV esetében a köpenyfehérje egy darabját sokszoroztuk vírus specifikus indítószekvenciákkal és csupán egy ültetvényt találtunk e vírustól mentesnek.

Következtetések

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a vírus eredetű kisRNS-ek újgenerációs szekvenálása, a bioinformatikai elemzések és a molekuláris biológiai módszerek kombinációja hatékony vírusdiagnosztikát eredményezett. A vírus specifikus kisRNS-ek újgenerációs szekvenálásával azonosítottuk két, Magyarországon eddig ismeretlen vírus előfordulását. Mivel e vírusok elterjedése rendkívül széles körű, a jövőben fokozott figyelmet érdemelnek.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük Pájtli Éva és Csorba Tibor mintagyűjtésben, Szittya György és Baksa Ivett kisRNS könyvtár készítésben nyújtott segítségét. Munkánkhoz a KTIA_AIK_12-1-2013-0001 és az OTKA K108718 projekt nyújtott támogatást. Czotter Nikoletta az FM Kutatói utánpótlást elősegítő programjában vesz részt, a Pannon Egyetem Georgikon karán a Festetics Doktori Iskola hallgatója.

Hivatkozások

- 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: 395-401.
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature*, 431: 356-63.
- Csorba, T., Pantaleo, V., Burgyan, J., 2009. RNA silencing: an antiviral mechanism. *Adv Virus Res*, 75: 35-71.
- Gambino, G., Perrone, I., Griboaud, I., 2008. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal*, 19: 520-5.
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., Terlizzi, F., Credi, R. and Saldarelli, P. 2012 A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus research*, 163: 262-268.
- Glasa, M., Predajna, L., Kominek, P., Nagyova, A., Candresse, T. and Olmos, A. 2014 Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Arch Virol.*, DOI 10.1007/s00705-014-2031-5.
- Martelli, GP., 2014. Directory of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine and Their Agents. *Journal of Plant Pathology*, 96: 1-136.
- Navarro, B., Pantaleo, V., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., Di Serio, F., Burgyan, J. 2009 Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant-viroid interaction. *PLoS one*, 4: e7686.
- Pantaleo, V., Saldarelli, P., Miozzi, L., Giampetruzzi, A., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray and G., Burgyan, J. 2010 Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot Noir grapevine. *Virology*, 408: 49-56.
- Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N. and Gorbalenya, A. E. 2009 Permutation of the active site of putative RNA-dependent RNA polymerase in a newly identified species of plant alpha-like virus. *Virology*, 394: 1-7.