

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**KÜLÖNBÖZŐ TERMÉSZETES ÉS MESTERSÉGES
REKOMBINÁNS SZILVA HIMLŐ VÍRUS
(*PLUM POX VIRUS*, PPV) IZOLÁTUMOK JELLEMZÉSE**

Koósné Szathmáry Erzsébet

Budapest

2009

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Palkovics László
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Növénykórtani Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Dr. Tóth Magdolna
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Palkovics László
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2009. június 9-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Bernáth Jenő, DSc

Tagjai

Rimóczi Imre, DSc

Pluhár Zsuzsanna, PhD

Almási Asztéria, PhD

Horváth József, MHAS

Opponensek

Gáborjányi Richard, DSc

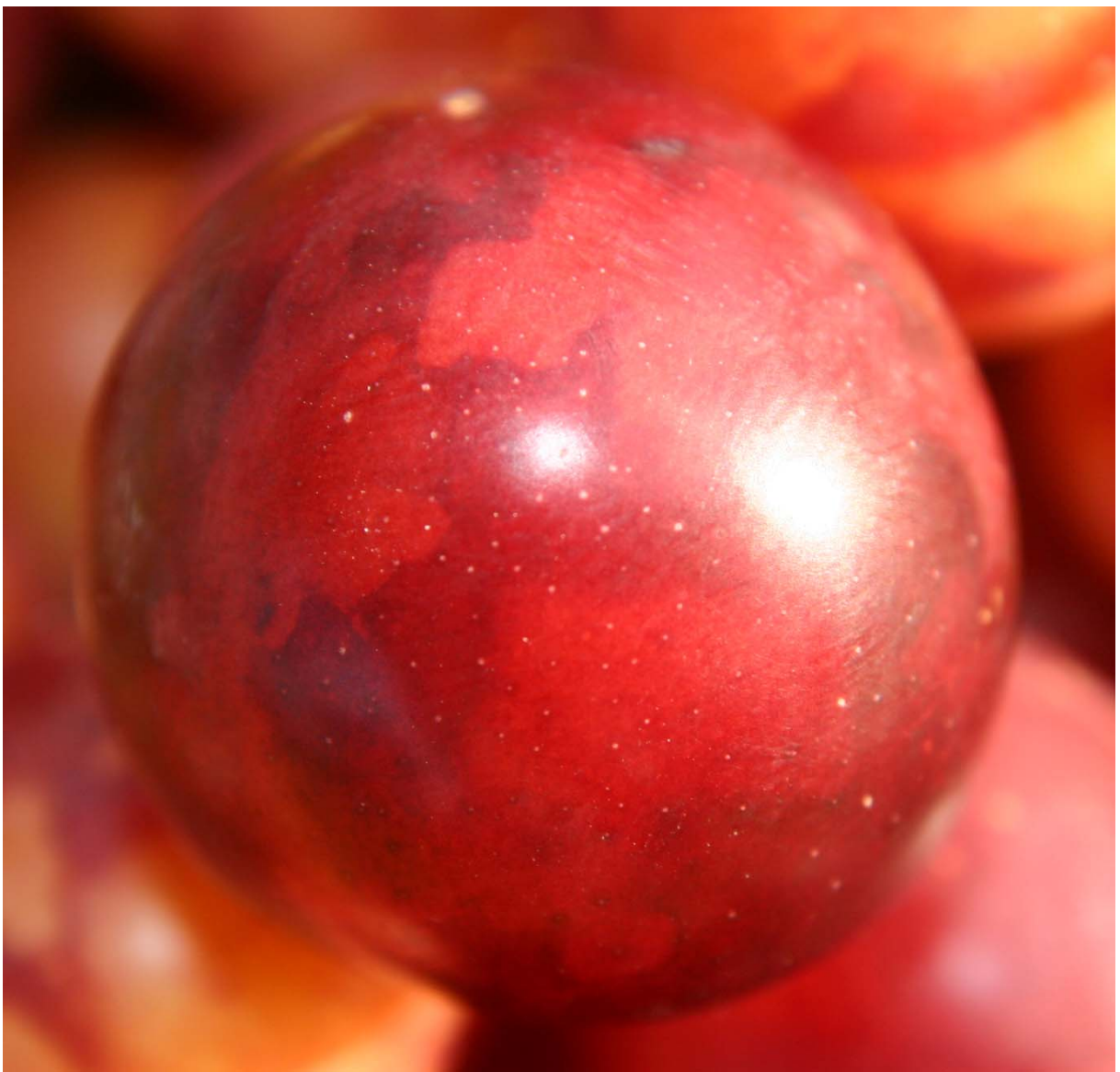
Takács András Péter, PhD

Titkár

Pluhár Zsuzsanna, PhD

*„... a piros szilvák sokkal többet
szennvednek bizonyos betegségektől,
mint a sárga szilvák.”*

(Charles Darwin, 1911)



TARTALOMJEGYZÉK

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	7
2. CÉLKITŰZÉS	8
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3.1. A PPV gazdasági jelentősége, és a főbb gazdanövényeken okozott tünetek.....	9
3.1.1. Tünetek szilván	10
3.1.2. Tünetek kajszin	11
3.1.3. Tünetek őszibarackon.....	13
3.1.4. Tünetek cseresznyén és meggyen	14
3.1.5. Tünetek japán szilván.....	15
3.2. A PPV világméretű elterjedése	15
3.3. A PPV természetes gazdanövényköre	19
3.4. A PPV természetes terjedési módjai	21
3.5. A PPV rendszertani besorolása és a Potyviridae család molekuláris jellemzése.....	23
3.5.1. A CP és funkciói	26
3.6. A PPV-izolátumok típusai	27
3.6.1. A PPV-izolátumok sokszínűsége	28
3.6.2. PPV-Dideron (PPV-D) csoport	32
3.6.3. PPV-Marcus (PPV-M) csoport.....	33
3.6.4. PPV-El Amar (PPV-EA) csoport	34
3.6.5. PPV-Cherry (PPV-C) csoport	34
3.6.6. PPV-Winona (PPV-W) csoport.....	36
3.6.7. PPV-Recombinant (PPV-Rec, PPV-R) csoport	37
3.6.7.1. RNS rekombináció.....	37
3.6.7.2. A PPV-Rec izolátumok biológiai tulajdonságai	39
3.6.7.3. A PPV-Rec izolátumok szerológiai jellemzői	39
3.6.7.4. A PPV-Rec izolátumok molekuláris jellemzői	40
3.6.7.5. A PPV-Rec izolátumok elterjedése.....	41
3.6.7.6. A PPV-Rec izolátumok eredete	42
3.6.8. Magyarországi PPV-izolátum típusok	43
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	46
4.1. Vizsgálatok helye és ideje.....	46

4.2. Vizsgálatok anyaga	46
4.2.1. Növények	46
4.2.2. Baktérium törzsek	46
4.2.3. Vírus izolátumok	46
4.2.4. Plazmidok és fertőzőképes vírusklónok	48
4.2.5. Oligonukleotid indítószekvenciák (primerek).....	48
4.2.6. Vegyszerek, enzimek, kitek	48
4.3. Vizsgálatok módszere	49
4.3.1. Mechanikai vírusátvitel	49
4.3.2. Össznukleinsav-kivonás levélszövetből.....	49
4.3.3. RT-PCR.....	49
4.3.4. A PCR-termékek restrikciós analízise.....	51
4.3.5. A PCR-termékek klónozása	51
4.3.6. A plazmid tisztítása és az inzert ellenőrzése	52
4.3.7. A B1298 rövidebb CP gént hordozó fertőzőképes cDNS klón előállítása.....	53
4.3.8. Inokulálás a B1298 rövidebb CP gént hordozó fertőzőképes PPV klónnal és a fertőzőképesség megállapítása.....	53
4.3.9. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus virionjainak vizsgálata.....	53
4.3.10. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus átvitele levéltetvekkel	54
4.3.11. A B1298 rövidebb CP szerkezetének vizsgálata.....	54
4.3.12. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus szerológiai (Western blot) módszerrel történő kimutathatóságának tesztelése	54
4.3.13. Kompetíciós kísérletek.....	55
4.3.14. A vírusgenomról készült cDNS nukleotid szekvenciájának meghatározása (szekvenálás).....	55
4.3.15. A nukleotid és aminosav szekvenciák vizsgálata.....	55
4.3.16. Statisztikai analízis.....	56
5. EREDMÉNYEK.....	57
5.1. Bulgáriai és hazai PPV-izolátumok molekuláris jellemzése	57
5.1.1. A 3'NIb-CP régió molekuláris jellemzése.....	57
5.1.1.1. A 3'NIb-CP régió nukleotid és aminosav sorrendjének jellemzése	58
5.1.1.2. A 3'NIb-CP régió filogenetikai analízise.....	63
5.1.2. A 3'P3-6K ₁ -5'CI régió molekuláris jellemzése.....	68
5.1.2.1. A 3'P3-6K ₁ -5'CI régió restrikciós analízise.....	68

5.1.2.2. A 3'P3–6K ₁ –5'CI régió nukleotid és aminosav sorrendjének jellemzése és filogenetikai analízise.....	69
5.1.3. A 3'HC-Pro–5'P3 régió molekuláris jellemzése.....	74
5.1.3.1. A 3'HC-Pro–5'P3 régió nukleotid és aminosav sorrendjének jellemzése és filogenetikai analízise.....	74
5.2. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus vizsgálata.....	76
5.2.1. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus patogenitása és virionjainak jellemzése.....	76
5.2.2. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus átvihetősége levéltetvekkkel.....	77
5.2.3. A B1298 rövidebb CP szerkezete.....	78
5.2.4. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus kimutathatósága szerológiai (Western blot) módszerrel	79
5.2.5. A deléció hatása a vírus-akkumulációra.....	81
5.3. Új tudományos eredmények	82
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	84
6.1. Bulgáriai és hazai PPV-izolátumok molekuláris jellemzése	84
6.2. A B1298 rövidebb köpenyfehérje gént hordozó vírus vizsgálata.....	91
7. ÖSSZEFOGLALÁS	96
8. SUMMARY	98
9. MELLÉKLETEK	100
M1. IRODALOMJEGYZÉK.....	100
M2. Az EMBL nemzetközi adatbázisba benyújtott szekvenciák	125
M3. PPV-izolátumok CP régiójának megfelelő cDNS nukleotid (átló felett) és abból származó aminosav sorrendjének (átló alatt) hasonlósága (%).....	147
M4. PPV-izolátumok filogenetikai törzsfája	148
M5. PPV-izolátumok 3'P3–6K ₁ –5'CI régiójának megfelelő cDNS nukleotid (átló felett) és abból származó aminosav sorrendjének (átló alatt) hasonlósága (%).....	149
M6. PPV-izolátumok 3'P3–6K ₁ –5'CI régiójának megfelelő cDNS-szekvencia származtatott aminosav sorrendjének többszörös illesztése.....	150
M7. PPV-izolátumok 3'HC-Pro–5'P3 régiójának megfelelő cDNS nukleotid (átló felett) és abból származó aminosav sorrendjének (átló alatt) hasonlósága (%).....	152
M8. PPV-izolátumok filogenetikai törzsfája	153
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	154

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3'HC-Pro-5'P3	a HC-Pro gén 3' végének és a P3 gén 5' végének megfelelő cDNS-szakasz
3'NIb-5'CP	az NIb gén 3' végének és a CP gén 5' végének megfelelő cDNS-szakasz
3'NIb-CP	az NIb gén 3' végének és a teljes CP génnek megfelelő cDNS-szakasz
3'NIb-CP-3'UTR	az NIb gén 3' végének, a teljes CP génnek és a 3'UTR-nek megfelelő cDNS-szakasz
3'P3-6K₁-5'CI	a P3 gén 3' végének, a teljes 6K ₁ génnek és CI gén 5' végének megfelelő cDNS-szakasz
6K₁	first 6K protein, első 6 kD-os fehérje
6K₂	second 6K protein, második 6 kD-os fehérje
ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> , alma klorotikus levélfoltosság vírus
bp	bázis pár
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i> , karfiol mozaik vírus
cDNS	komplementer DNS
CI	cylindrical inclusion protein, henger alakú zárványfehérje
CLRV	<i>Cherry leaf roll virus</i> , cseresznye levélsodródás vírus
Co-PCR	co-operational PCR; PCR eljárás, melynek során egy lépésben két indítószekvenciapárt (két belső és két külső) alkalmaznak
CP	capsid protein, coat protein, köpenyfehérje
DAS-ELISA	double antibody sandwich ELISA, kettősellenanyag-szendvics ELISA
DNS	deoxiribonukleinsav
dNTP	deoxiribonukleotid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, enzimhez kötött ellenanyagvizsgálat
H-PCR	hemineded-PCR; a PCR-termékek ismételt felszaporítása egy belső, újabb indítószekvencia, és az eredeti indítószekvenciapár megfelelő tagjának felhasználásával
HC-Pro	helper component protease, segítő fehérje és proteáz
IgG	immunoglobulin G
IC-RT-PCR	immunocapture-RT-PCR, ellenanyaghoz kötött (immunkapcsolt) RT-PCR, „ellenanyagcsapdás”-RT-PCR
kD	kilodalton, relatív molekulatömeg
MAb	monoclonal antibody, monoklonális antitest
mRNS	messenger RNS, hírvivő RNS
nested-PCR	a PCR-termékek ismételt felszaporítása két belső, újabb indítószekvenciapárral
NIa	nuclear inclusion „a” protein, kis sejtmagi zárványfehérje
NIb	nuclear inclusion „b” protein, nagy sejtmagi zárványfehérje
nt	nukleotid
ATP-áz	adenozin-trifoszfátáz

ORF	open reading frame, nyitott leolvasási keret
P1	first protein/protease, első fehérje
P3	third protein, harmadik fehérje
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PCR-ELISA	a PCR-termékek kimutatása és koncentrációjának megállapítása szerológiai módszerrel
piPo	pretty interesting Potyviridae ORF
PPV	<i>Plum pox virus</i> , szilva himlő vírus, sharka vírus
PC-PCR	print-capture-PCR; „lenyomatcsapdás” PCR
PVA	<i>Potato virus A</i> , burgonya A vírus
PVY	<i>Potato virus Y</i> , burgonya Y vírus
RFLP	restriction fragment length polymorphism, nukleinsav hasítási eljárás
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz transzkripció, fordított átírás
RT-PCR	reverse transcription-PCR, reverz transzkripció-PCR, fordított átírást követő PCR
SDS-PAGE	SDS-poliakrilamid-gélelektroforézis
SMV	<i>Soybean mosaic virus</i> , szója mozaik vírus
ssRNS	single stranded RNS, egyszálú RNS
TEV	<i>Tobacco etch virus</i> , dohány karcolatos vírus
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i> , tarlórépa mozaik vírus
TVMV	<i>Tobacco vein mottling virus</i> , dohány érfoltosság vírus
UTR	nem-kódoló régió
VPg	viral protein genome-linked, genomhoz kötött protein
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> , cukkini sárga mozaik vírus

Aminosavak rövidítései:

A	alanin (Ala)	M	metionin (Met)
C	cisztein (Cys)	N	aszparagin (Asn)
D	aszparaginsav (Asp)	P	prolin (Pro)
E	glutaminsav (Glu)	Q	glutamin (Gln)
F	fenilalanin (Phe)	R	arginin (Arg)
G	glicin (Gly)	S	szerin (Ser)
H	hisztidin (His)	T	treonin (Thr)
I	izoleucin (Ile)	V	valin (Val)
K	lizin (Lys)	W	triptofán (Trp)
L	leucin (Leu)	Y	tirozin (Tyr)

1. BEVEZETÉS

A csonthéjasok termesztésével világszerte foglalkoznak, gazdaságos termesztésüket azonban számos tényező befolyásolja. A kedvezőtlen időjárási hatások nem jelentenek akkora veszélyt a növények számára, mint a folyamatos, és egyre erősödő növényvédelmi problémák, különösen a súlyos károkat okozó vírushatások.

A csonthéjasokat fertőző vírusok közül a szilva himlő vírus (*Plum pox virus*, PPV, sharka vírus) jelentősége a legnagyobb, mely a szaporítóanyagok nemzetközi kereskedelme révén jelenleg már szinte az egész világon elterjedt, és súlyosan veszélyezteti elsősorban a szilva, a kajszi és az őszibarack gazdaságos termesztését. A kórokozó kisebb távolságra való terjedésében a levéltetvek játsszák a legfontosabb szerepet, melyekkel nem-perzisztens módon terjed, de ismert a pollenátvitel is.

A csonthéjas gyümölcsfajok termesztésében Magyarországon is a PPV okozza a legjelentősebb virológiai problémát. Hazánk a PPV-vel fertőzött országok közül az elsők között szerepel. A beteg fák termésének mennyisége és minősége jelentősen csökken. Az előrehaladott PPV-fertőzés hatására a termésen megjelenő elváltozások miatt a gyümölcs áruértéke romlik, valamint ipari felhasználhatósága is nagymértékben csökken a megváltozott cukor-sav arány következtében, így nemzetgazdasági szinten is jelentős kár következik be. A termés nagy része még érés előtt lehullhat a fáról. A gyümölcshullás az érzékeny szilvafajtáknál elérheti a 100%-ot is. Más vírusokkal történő komplex fertőzés gyakran a fa pusztulását is eredményezheti.

A vírusos betegségek elleni védekezés leghatékonyabb módja a megelőzés. A betegség okozta kár mérséklését a vírusmentes szaporítóanyag használatával, az ültetvények rendszeres virológiai ellenőrzésével, a beteg növények eltávolításával, a visszafertőződés megakadályozásával, illetve toleráns vagy rezisztens fajták alkalmazásával lehet elérni. Ezért gyors és megbízható diagnosztikai eljárásokra van szükség, amelyekkel a szabadföldi szemlét követően, már kezdeti stádiumban kiszűrhetők a fertőzött növények. A jelenlegi gyakorlatban az egész világon az enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálatot (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) alkalmazzák a szaporítóanyagok vírusmentességének előtesztelésére, ami nagyszámú minta gyors vizsgálatát teszi lehetővé. A módszer a vírus köpenyfehérje (CP) kimutatásán alapszik. Elsősorban a nem megfelelő érzékenység miatt a diagnosztizálás során polimeráz láncreakción (polymerase chain reaction, PCR) alapuló technikát is alkalmaznak.

Napjainkban a vírusok elleni védekezés további és egyben legperspektivikusabb módja a vírusrezisztens transzgenikus növények előállítás.

2. CÉLKITŰZÉS

A PPV gazdasági jelentőségére és a virológiai ellenőrzés fontosságára való tekintettel (PhD) dolgozatomban különböző földrajzi területekről és eltérő csonthéjas fajokról származó PPV-izolátumok molekuláris szintű jellemzését, valamint egy rövidebb CP génnel rendelkező természetes rekombináns PPV-izolátum kimutathatóságának vizsgálatát, a delécióknak a vírus epidemiájában betöltött lehetséges szerepének feltárását tekintetem fő feladatommak. Az erősödő piaci verseny és a növekvő fogyasztói igények olyan nyomást gyakorolnak a termesztőkre, amely kizárólag a gyakorlatban is alkalmazható kutatási eredményekre alapozott ismeretek átadásával enyhíthető. Ennek tükrében munkám kiemelt, megoldandó feladatai, illetve céljai a következők:

1. Szilváról származó bulgáriai, valamint kajsziról, illetve szilváról származó hazai PPV-izolátumok molekuláris jellemzése, a vírusgenom változékonyságának és az izolátumok csoportbeli hovatartozásának megállapítása, mert ezek ismerete a hatékony védekezési módszerek kidolgozásának és a diagnosztikának egyik fontos eszköze;
2. A vizsgált bulgáriai és hazai izolátumok egymással és más PPV-izolátumokkal való rokonsági viszonyainak feltárása a vírusevolúció pontosabb megismerése céljából;
3. Természetes mutáció következtében kialakult új, rövidebb CP gént hordozó PPV-izolátum (PPV-B1298) genomján a deléció pontos helyének és méretének meghatározása;
4. A rövidebb CP gént hordozó vírus patogenitásának, virionjainak és levéltetűvel való terjedésének vizsgálata;
5. A PPV-B1298 izolátum szerológiai kimutathatóságának megállapítása, hiszen a megelőzés szempontjából a vírus megbízható diagnosztizálása alapvető fontosságú;
6. A deléció elhelyezkedésének és méretének a természetes mutáns vírus akkumulációjára, valamint a CP szerkezetére gyakorolt hatásának vizsgálata.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A PPV gazdasági jelentősége, és a főbb gazdanövényeken okozott tünetek

A PPV Európában a csonthéjas gyümölcsfajok egyik legveszedelmesebb vírus eredetű kórokozója, az előidézett károk (csökkent gyümölcsminőség, idő előtti gyümölshullás, más vírusokkal való együttes fertőzés esetén a fa gyors pusztulása), a levéltetvekkel történő gyors terjedése és a nagymértékű földrajzi elterjedtsége miatt. A PPV jelentősége gazdasági szempontból a szilva, a kajszi és az őszibarack ültetvényekben a legnagyobb.

A legjelentősebb károkat szilván idézi elő. A fertőzött fákon súlyos levél- és gyümölcstünetek fejlődhetnek ki. A fertőzés hatására a gyümölcsök mérete és súlya csökken. Érzékeny szilvafajtáknál akár 34%-os súlycsökkenés is bekövetkezhet (Jordović és Janda, 1963). A beteg gyümölcs beltartalmi értékei is megváltoznak. A gyümölcs cukortartalma csökken, savtartalma viszont emelkedik. A gyümölcsök íztelessé válnak, létartalmukat elvesztik, rostos állományúak lesznek, ezáltal közvetlen fogyasztásra és technológiai felhasználásra (aszalás, pálinkafőzés, lekvárkészítés) is alkalmatlanná válnak. A beteg szilvából készített alkoholos italok vagy párlatok minősége nem megfelelő, így azok értékesíthetetlenek. A gyümölcsök tárolhatósága is romlik. A fertőzött gyümölcs antocián tartalma is alacsonyabb, ami ugyancsak hátrányos a gyümölcsfeldolgozásnál (György, 1976). A vírusra érzékeny szilvafajták (pl. Besztercei) fáiról a gyümölcsök akár 95–100%-a még érés előtt lehullhat. Bulgáriában a „Kjüstendil” szilvafajta esetében a termésveszteség átlaga az évi 60 ezer tonnát is elérte, hazánkban szilvánál a gyümölshullás átlaga a 37%-ot meghaladja (Németh, 1979). Csehszlovákiában 1949 és 1963 között a súlyosan fertőzött körzetekben a fánkenti átlagos termésmennyiség 83,4%-kal csökkent (Blatný és Heger, 1965).

A PPV gazdasági jelentősége hazánkban kajszin is igen nagy. A beteg gyümölcsök romlékonyak, és rosszul szállíthatók, könnyen megbarnulnak, és esetenként elvesztik a fajtára jellemző ízűket, zamatukat. A romlandóság, és a csonthéjon látható foltosodás, mely még a külsőleg tünetmentes gyümölcsöknél is megfigyelhető, rontják export lehetőségeinket.

Az őszibarack termésén a tünetek nem olyan súlyosak, de az érés előtt megjelenő mintázat (gyűrűk, gyűrűrészek, szalagok, pigmentfoltok) azonban csökkenti a gyümölcs piaci értékét, valamint romlik a gyümölcs eltarthatósága és szállíthatósága is, mely szintén exportunkat veszélyezteti.

A PPV nagy gazdasági jelentőségét hangsúlyozza, hogy Spanyolországban 1988 és 1993 között 560 ezer fát, Franciaországban 1992-ben 27 ezer fát, 1993-ban 100 ha gyümölcsöst (főleg őszibarackost) számoltak fel, Kanadában 2000 és 2006 között közel 264 ezer fát semmisítettek meg a PPV-fertőzés országhatárokon belüli továbbterjedésének

megfékezése, és a gazdasági károk mérséklése céljából (Roy és Smith, 1994; Thompson, 2006).

3.1.1. Tünetek szilván

A vírusfertőzés első tünetei már a fiatal leveleken megjelennek, melyek azonban nem feltűnőek. Később a leveleken jellegzetes, klorotikus foltok, gyűrűk, gyűrűszerű rajzolatok, szalagok alakulnak ki (1. ábra), melyek áteső fényben láthatók a legjobban. A nyári melegben a tünetek kevésbé feltűnőek, halványabbak, maszkírozódnak. Egyes fajtáknál (pl. Zöld ringlő) azonban a tünetek egészen őszig megmaradnak, és a klorotikus gyűrűket vagy foltokat vörösesbarna szegély övezi (Németh, 1979).



1. ábra. PPV okozta tünetek szilva levelén (fotó: Szathmáry E.)

Az érzékeny szilvafajták esetében (pl. Besztercei) a termés felületén besüppedő, kemény, gyűrűs vagy szabálytalan alakú foltok, vonalak („himlőfoltok”) láthatók (2. ábra), melyek színe az érett gyümölcshöz hasonló, így éréskor alig észrevehetőek. A gyümölcstünetek már a termés éretlen állapotában megfigyelhetők, az érésel párhuzamosan fokozódnak, és gyümölcstorzulást eredményeznek. A terméshéj és az alatta lévő sejtek nekrotizálódnak, a termés belsejében vörösbarna elszíneződés és mézgásodás alakul ki. A gyümölcs ízetlen, és létartalmát is elveszti. A mag csonthéján az alapszíntől sötétebb elszíneződés jelenik meg. A fajta érzékenységtől függően a termés nagy része (akár 100%-a) még érés előtt lehullhat a fáról. A toleráns szilvafajták (pl. Stanley) termésén a foltok csak az

epidermiszen jelentkeznek, mint egyenlőtlen pigmenteloszlások, terméshullás nem tapasztalható (Németh, 1979).



2. ábra. PPV okozta tünetek szilva gyümölcsén (fotó: Dr. Palkovics L.)

A fajták érzékenysége és toleranciája igen változó lehet az egyes országokban, ami a jelen lévő izolátum típusok változékonyságával, valamint az eltérő ökológiai és talajtani viszonyokkal magyarázható (Németh, 1979).

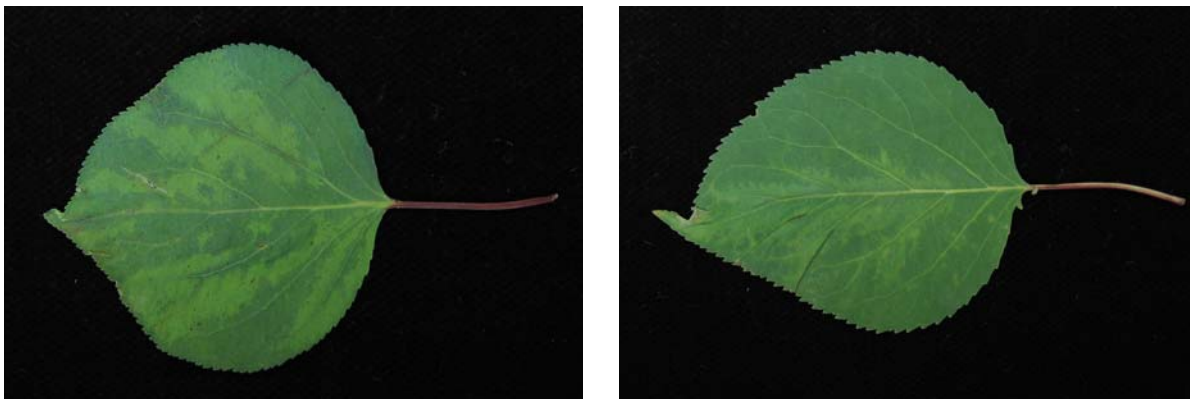
Németh (1986) a fás részek károsodásáról, fiatal szilva hajtások kérgének felrepedéséről, és nyílt rákos sebek kialakulásáról, valamint a floém, és később a xylém szövetek vörösesbarnává színeződéséről is említést tesz. Llácer és Cambra (2006) azonban felhívja a figyelmet arra, hogy eddig még nem erősítették meg, hogy ezek a fás részeken tapasztalható tünetek PPV-fertőzés hatására alakultak ki.

Egyes szilvafajták termésén bemélyedő foltok, vonalak, úgynevezett álhimlő (plum pseudo-pox), az alma klorotikus levélfoltosság vírus (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) fertőzése hatására is kialakulhat (Németh, 1979). Így amennyiben csak a termésen észlelhetők tünetek, akkor a gyümölcstünetek alapján történt elsődleges diagnózist a vírusfaj pontos azonosítására alkalmas módszer használatával meg kell erősíteni (Llácer és Cambra, 2006).

3.1.2. Tünetek kajszin

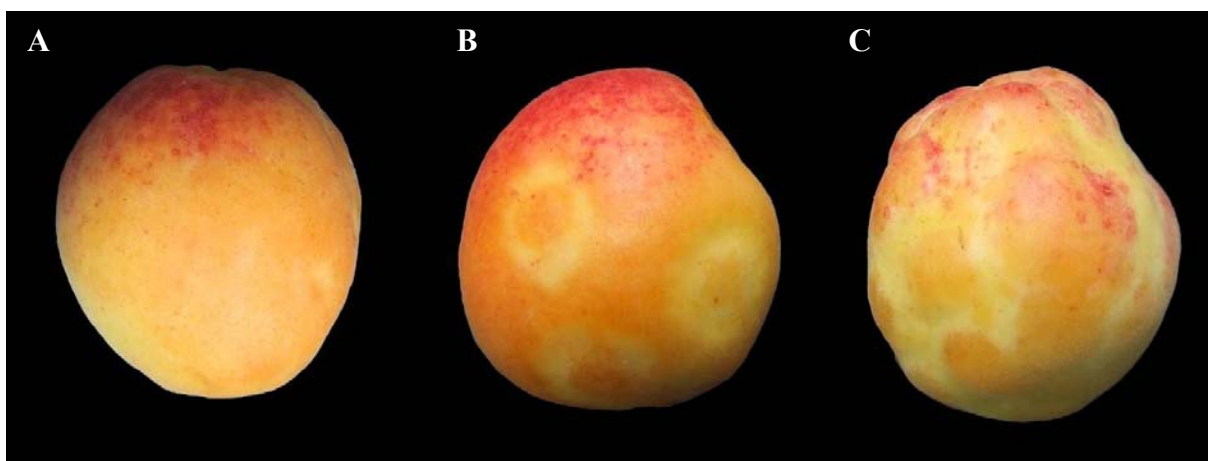
Kajszin a levéltünetek nem feltűnőek. Nem sokkal a kihajtást követően halványzöld foltok, gyűrűk alakulnak ki, melyek áteső fényben láthatók a legjobban. Az elsőrendű erek

körül gyakran klorotikus szalagok jelennek meg, a levél széle pedig csavarodhat (3. ábra). A tünetek a nyári melegben gyengülnek, esetleg teljesen el is tűnnek (Németh, 1979).



3. ábra. PPV okozta tünetek kajszi levelén (fotó: Szathmáry E.)

A külső gyümölcstünetek változóak, csak egyes fajtáknál súlyosak. Rendszerint a gyümölcshéjon gyűrű, félkör vagy szalag alakú elszíneződés látható (4B. ábra), mely világos héjú fajták esetén a gyümölcs alapszínénél világosabb, jól színeződő fajtáknál világosabb vagy sötétebb. A gyűrűk érés után megbarnulhatnak, a húsbba besüppedhetnek. A gyümölcs a besüppedt részeken ízetlen, rostos állományú, könnyen megbarnul, esetenként mézgásodás alakul ki benne. Súlyos fertőzés esetén nagy dudorok is keletkezhetnek, és a gyümölcs torzul (4C. ábra). A fertőzés hatására két héttel korábbi érés is előfordulhat. Egyes fajtáknál a beteg termések még érés előtt lehullanak.



4. ábra. PPV okozta tünetek kajszi gyümölcsén (21/1 jelű hibrid): (A) egészséges, (B) és (C) PPV fertőzött fa termése (fotó: Szathmáry E.)

Gyakori, hogy a gyümölcsön külső tünetek nincsenek, a magon azonban minden esetben láthatók elváltozások. A csonthéjon világosbarna gyűrűk és foltok alakulnak ki („leopárd bőr mintázatú foltosodás”) (5. ábra) (Németh, 1979; Llácer és Cambra, 2006).

A beteg fa gyengébben fejlődik, növekedése lelassul, a hajtások vékonyabbak (Németh, 1979).

A mediterrán vidékeken a korai fajták gyümölcsfejlődése idején mérhető a legmagasabb víruskoncentráció a növényben, míg a kései fajták gyümölcseinek fejlődésekor, nyár folyamán, a PPV koncentrációja már lecsökken. Ezért a korai fajtákon gyakrabban és sokkal erősebb gyümölcstünetek jelennek meg, mint a késeiken. Egyes PPV-re érzékeny kajszifajták gyümölcsén az agresszív ACLVS-izolátumok fertőzésének hatására a PPV tüneteire emlékeztető, besüppedő, nekrotizálódó foltok keletkeznek, a maghéjon viszont nincsenek elváltozások (Llácer és Cambra, 2006).



5. ábra. PPV okozta tünetek kajszi magon (fotó: Szathmáry E.)

3.1.3. Tünetek őszibarackon

Az őszibaracknál a leveleken jelentkező tünetek is jelentősek lehetnek, melyek már kihajtáskor jelentkeznek. Az erek és érmenti mezők kivilágosodnak, fejlődésükben visszamaradnak, és a levelek deformálódhatnak. Később a levéllemezen apró klorotikus foltok, gyűrűk, erek körüli szalagok alakulnak ki. A levéltünetek a vegetáció során később fejlődő leveleken ritkábban jelennek meg, és a nagy melegben el is tűnnek. A levéltünetek a magoncokon a legsúlyosabbak, sok fajtánál azonban ki sem alakulnak (Németh, 1979).

A gyümölcsön lévő tünetek legtöbbször csak a külső héjra korlátozódnak. A fehér húsú fajtákon az érés előtt világos, gyűrűs rajzolatok (6. ábra), elmosódó szalagok jelennek meg, melyek éréskor elhalványulnak. A sárga húsú fajtákon sárga gyűrűk alakulnak ki, vagy a

pigment szabálytalan foltokban helyezkedik el („lázfoltok”). Súlyos fertőzéskor a gyűrűk bemélyednek, a hús megbarnul, és a gyümölcsök deformálódhatnak. Esetenként a beteg termések még érés előtt lehullanak. Egyes őszibarackfajták szíromleveleinek színtörése is bekövetkezhet PPV-M izolátumok fertőzésének hatására (Németh, 1979; Llácer és Cambra, 2006).

A korai fajták sokkal érzékenyebbek, és súlyosabb tüneteket mutatnak a gyümölcsön, mint a kései érésűek. A kialakuló tünetek azonban a fát fertőző izolátum típusától függően is változnak. A PPV-M izolátumok sokkal súlyosabb tüneteket okoznak őszibarackon, mint a PPV-D izolátumok (Llácer és Cambra, 2006).



6. ábra. PPV okozta tünetek őszibarack gyümölcsén (fotó: Szathmáry E.)

3.1.4. Tünetek cseresznyén és meggyen

A fertőzött meggy- és cseresznyefák levelein klorotikus foltok, pöttyök és gyűrűk jelennek meg. A tünetek főleg tavasszal vehetők észre, nyáron teljesen eltűnnek. A fertőzött gyümölcsökön klorotikus, nekrotikus gyűrűs foltok és nekrotikus mélyedések, repedések láthatók. A beteg fa termésének nagy része lehullik. (Kalashyan és mtsai, 1994; Crescenzi és mtsai, 1995; Nemchinov és mtsai, 1995).

A PPV-SwC izolátum mesterséges fertőzését követően a cseresznye és a meggyfák levelein a levél szélétől kiinduló érmenti sárga szalagok és nekrozisok fejlődtek ki (Crescenzi és mtsai, 1997).

Fanigliulo és mtsai (2004) a PPV-SwC izolátummal 35 cseresznye- és meggyfajta egy éves oltványait mechanikailag inokulálták. A tünetek fajtától függően az inokulációt követően 8–30 nap múlva alakultak ki. A legtöbb fajta levelein kezdetben klorotikus foltok vagy gyűrűk, később nekrozisok, diffúz pöttyök jelentek meg, és a levelek deformálódtak. Körülbelül két hónappal az inokulációt követően a tünetek a növények többségéről eltűntek, majd nyugalmi időszakot követően, rügyfakadáskor újra megjelentek.

3.1.5. Tünetek japán szilván

A leveleken kialakuló tünetek erőssége fajtafüggő. Egyes fajták levelein jól látható klorotikus gyűrűk, szalagok és pettyek alakulnak ki, melyek később nekrotizálódnak (Llácer és Cambra, 2006).

Gyümölcstünetek csak a termés kis hányadán (maximum 15%-án) láthatók. Éréskor gyűrűk, pettyek, barna színű bemélyedések jelennek meg, és a gyümölcs deformálódik. A toleráns fajták levelein és gyümölcsein tünetek nem láthatók, vagy csak nagyon gyenge tünetek jelennek meg. A fertőzött fákról származó gyenge vagy nagyon gyenge tüneteket mutató gyümölcsök nagy része értékesíthető (Llácer és Cambra, 2006).

3.2. A PPV világméretű elterjedése

A PPV által okozott betegség tüneteire először több mint 90 éve, 1917–18 táján figyeltek fel Bulgáriában szilvafákon (*Prunus domestica* cv. Kjustendil) a termesztők. Az első tudományos munka azonban csak 1932-ben (Atanasoff, 1932) jelent meg, amikor már a kórokozó a bolgár szilvásokban hatalmas károkat okozott. Ezt követően a valamikori Jugoszlávia területén (Szerbia, Horvátország), Romániában és Magyarországon is észlelték a betegség tüneteit. A II. világháborút követő 10 évben a betegség folyamatosan észak felé terjedt Európában, és megjelent Csehországban, Szlovákiában és Németországban. Az 1960–1980-as években számos európai országból, különböző csonthéjas gyümölcsfajokról közölték előfordulását (Ausztria, Albánia, Belgium, Ciprus, Egyesült Királyság (Anglia), Franciaország, Görögország, Hollandia, Lengyelország, Olaszország, Portugália, Spanyolország, Svédország, Svájc, Szlovénia, Törökország, volt Szovjetunió). Az 1980-as években eljutott Ázsiába (Szíria) és Afrikába (Egyiptom) is. Az 1990-es évek elején megjelent Dél-Amerikában (Chile), majd később Észak-Amerikában (Amerikai Egyesült Államok) is. A PPV-vel fertőzött terület folyamatosan növekszik. Az egyre nagyobb mértékű

nemzetközi szaporítóanyag-kereskedelem révén a szigorú növény-egészségügyi intézkedések ellenére is a PPV gyorsan elterjedt a világon. Most már Európa legtöbb országában megtalálható, és jelenleg Ausztrália és Óceánia kivételével már valamennyi kontinensen jelen van (1. táblázat).

1. táblázat. A PPV első észlelésének időpontjai a világ különböző országaiban, és az adott országban azonosított izolátum típusok

Földrész	Ország	Megjelenés éve (hivatkozás)	Az országban azonosított izolátum típusok (hivatkozás)
Európa	Albánia B	1965 (Kölber és mtsai, 2001)	PPV-D (Myrta és mtsai, 1998a) PPV-M (Myrta és mtsai, 1998a ¹ ; Glasa és mtsai, 2004) PPV-Rec (Glasa és mtsai, 2004)
	Ausztria B	1961 (Németh, 1994)	PPV-D (Candresse és mtsai, 1995) PPV-M (Candresse és mtsai, 1998 ³ ; Laimer és mtsai, 2003 ³)
	Azerbajdzsán (K)	n. a.	n. a.
	Belgium (D)	1974 (Roy és Smith, 1994)	PPV-D (Candresse és mtsai, 1998)
	Bosznia-Hercegovina X	n. a.	PPV-D (Matic és mtsai, 2006) PPV-M (Matic és mtsai, 2006) PPV-Rec (Matic és mtsai, 2006)
	Bulgária A	1917–18 (Atanasoff, 1932)	PPV-D (Myrta és mtsai, 2001; Kamenova és mtsai, 2003; Dallot és mtsai, 2008; Kamenova, 2008) PPV-M (Glasa és mtsai, 2004; Dallot és mtsai, 2008; Kamenova, 2008) PPV-Rec (Glasa és mtsai, 2004; Dallot és mtsai, 2008; Kamenova, 2008)
	Ciprus B	1982 (Roy és Smith, 1994)	PPV-D (Papayiannis és mtsai, 2007) PPV-M (Myrta és mtsai, 1998a ¹ ; Dallot és mtsai, 2008)
	Csehország A	1952 (Roy és Smith, 1994)	PPV-D (Navrátil és mtsai, 1998; Candresse és mtsai, 1998; Myrta és mtsai, 2001; Glasa és mtsai, 2004; Dallot és mtsai, 2008; Gadiou és mtsai, 2008) PPV-M (Glasa és mtsai, 2004; Dallot és mtsai, 2008) PPV-Rec (Glasa és mtsai, 2004; Dallot és mtsai, 2008; Gadiou és mtsai, 2008)
	Dánia (E)	n. a.	n. a.
	Egyesült Királyság (Anglia) B	1965 (Mumford, 2006)	PPV-D (Mumford, 2006)
	Észtország (D)	n. a.	n. a.
	Franciaország B	1970 (Quiot és mtsai, 1995)	PPV-D (Kerlan és Dunez, 1979; Candresse és mtsai, 1995, 1998; Quiot és mtsai, 1995; Glasa és mtsai, 2002a; Dallot és mtsai, 2008) PPV-M (Glasa és mtsai, 2002a; Dallot és mtsai, 2008)

1. táblázat. folytatás

Földrész	Ország	Megjelenés éve (hivatkozás)	Az országban azonosított izolátum típusok (hivatkozás)
Európa	Görögország A	1968 (Roy és Smith, 1994)	PPV-D (Varveri, 2006; Dallot és mtsai, 2008) PPV-M (Kerlan és Dunez, 1979 ¹ ; Candresse és mtsai, 1995, 1998 ³ ; Glasa és mtsai, 2004; Dallot és mtsai, 2008)
	Grúzia (D)	n. a.	n. a.
	Hollandia C	1965 (Verhoeven és mtsai, 2006)	n. a.
	Horvátország A	1949 (Kajic és mtsai, 2008)	PPV-D (Kajic és mtsai, 2008; Mikec és mtsai, 2008)
			PPV-M (Kajic és mtsai, 2008)
			PPV-Rec (Kajic és mtsai, 2008)
	Lengyelország A	1962 (Roy és Smith, 1994)	PPV-D (Candresse és mtsai, 1995; Malinowski, 2003) PPV-M (Malinowski, 2003 ³) PPV-Rec (Acc. No.: EU117116 ⁴)
	Litvánia C	1996 (Staniulis és mtsai, 1998)	PPV-D (Staniulis és mtsai, 1998)
	Luxemburg X	n. a.	n. a.
	Magyarország A	1938 (Szirmai, 1948)	PPV-D (Pribék és Gáborjányi, 1997; Myrta és mtsai, 2001)
			PPV-M (Palkovics és mtsai, 1993; Candresse és mtsai, 1995)
			PPV-C (Nemchinov és mtsai, 1998)
			PPV-Rec (Salamon és Palkovics, 2002; Glasa és mtsai, 2004)
	Moldávia B	1962 (Kölber és mtsai, 2001)	PPV-D (Myrta és mtsai, 2001)
			PPV-C (Nemchinov és Hadidi, 1996; Nemchinov és mtsai, 1996; Fanigliulo és mtsai, 2003)
	Montenegró	2002 (Viršček Marn és mtsai, 2007)	PPV-D (Viršček Marn és mtsai, 2007)
PPV-Rec (Viršček Marn és mtsai, 2007)			
Németország A	1955 (Roy és Smith, 1994)	PPV-D (Maiss és mtsai, 1989; Candresse és mtsai, 1995, 1998; Krczal és Avenarius, 1995; Myrta és mtsai, 2001; Glasa és mtsai, 2004)	
		PPV-M (Krczal és Avenarius, 1995 ²)	
		PPV-Rec (Glasa és mtsai, 2004)	
Norvégia B	1998 (Blystad és Munthe, 2006)	PPV-D (Blystad és Munthe, 2006)	
Olaszország B	1973 (Roy és Smith, 1994)	PPV-D (Candresse és mtsai, 1998; Myrta és mtsai, 1998a, 2001)	
		PPV-M (Myrta és mtsai, 1998a ¹ ; Dallot és mtsai, 2008)	
		PPV-C (Crescenzi és mtsai, 1995, 1997; Myrta és mtsai, 2001; Fanigliulo és mtsai, 2003)	
		PPV-Rec (Myrta és mtsai, 2005)	

1. táblázat. folytatás

Földrész	Ország	Megjelenés éve (hivatkozás)	Az országban azonosított izolátum típusok (hivatkozás)	
Európa	Oroszország B	1969 (Kölber és mtsai, 2001)	n. a.	
	Portugália B	1984 (Roy és Smith, 1994)	n. a.	
	Románia A	1920-as évek (Roy és Smith, 1994)	PPV-D (Ravelonandro és Minoiu, 1998; Zagrai és mtsai, 2008) PPV-M (Zagrai és mtsai, 2008) PPV-C (Zagrai és mtsai, 2008 ⁴) PPV-Rec (Zagrai és mtsai, 2008)	
	Spanyolország B	1984 (Llácer és mtsai, 1985)	PPV-D (Candresse és mtsai, 1995, 1998; Myrta és mtsai, 2001) PPV-M ⁵ (Cambra és mtsai, 2004 ³)	
	Svájc (E)	1967(Roy és Smith, 1994)	n. a.	
	Svédország (F)	1970 (Németh, 1994)	n. a.	
	Szerbia	1935 (Dulic-Markovic és Jevremovic, 2006)	PPV-D (Dulic-Markovic, 2003; Dallot és mtsai, 2008) PPV-M (Cervera és mtsai, 1993; Glasa és mtsai, 2005; Dallot és mtsai, 2008) PPV-Rec (Cervera és mtsai, 1993; Glasa és mtsai, 2005; Dallot és mtsai, 2008)	
	Szlovákia A	1950 körül (Glasa, 2006)	PPV-D (Myrta és mtsai, 2001; Glasa és mtsai, 2002a, 2004; Dallot és mtsai, 2008) PPV-M (Glasa és mtsai, 2004; Dallot és mtsai, 2008) PPV-Rec (Glasa és mtsai, 2001, 2004; Dallot és mtsai, 2008)	
	Szlovénia B	1987 (Roy és Smith, 1994)	PPV-D (Dallot és mtsai, 2008) PPV-M (Dallot és mtsai, 2008) PPV-Rec (Dallot és mtsai, 2008)	
	Törökország B	1968 (Roy és Smith, 1994)	PPV-D (Myrta és mtsai, 2001) PPV-M (Candresse és mtsai, 1995 ² , Myrta és mtsai, 1998a ¹) PPV-Rec (Candresse és mtsai, 2007)	
	Ukrajna B	1967 (Kondratenko és Udovychenko, 2006)	n. a.	
	Ázsia	India B	1994 (Thakur és mtsai, 1994)	Variáns (Bhardwaj és mtsai, 1995 ¹)
		Irán X	n. a.	n. a.
Jordánia C		1999 (Al Rwahnih és mtsai, 2001)	PPV-M (Al Rwahnih és mtsai, 2001 ¹)	
Kazahsztán X		2004 (Spiegel és mtsai, 2004)	PPV-D (Spiegel és mtsai, 2004)	
Kína		2001 (Navratil és mtsai, 2005)	D (Navratil és mtsai, 2005)	
Libanon (H)		n. a.	n. a.	
Pakisztán		2006 (Kollerová és mtsai, 2006)	PPV-D (Kollerová és mtsai, 2006) PPV-Rec (Kollerová és mtsai, 2006)	
Szíria C		1984–85 (Dunez, 1986)	PPV-M (Ismail és mtsai, 2002 ¹)	

1. táblázat. folytatás

Földrész	Ország	Megjelenés éve (hivatkozás)	Az országban azonosított izolátum típusok (hivatkozás)
Afrika	Egyiptom X	1987 (Németh, 1994)	PPV-EA (Wetzel és mtsai, 1991a; Candresse és mtsai, 1995; Myrta és mtsai, 2001; Shalaby és mtsai, 2003)
	Tunézia C	2000 (Boulila és mtsai, 2004)	PPV-D (Boulila és mtsai, 2004)
Észak- Amerika	Amerikai Egyesült Államok C		
	Michigan	2006 (O'Dell és Beckman, 2006)	PPV-D (O'Dell és Beckman, 2006 ⁴)
	New York	2006 (Snover-Clift és mtsai, 2007)	PPV-D (Snover-Clift és mtsai, 2007)
	Pennsylvania C	1999 (Milius, 1999)	PPV-D (Levy és mtsai, 2000)
	Kanada B		
	Ontario B	2000 (Thompson és mtsai, 2001)	PPV-D (Thompson és mtsai, 2001) PPV-W ⁵ (James és mtsai, 2003; James és Varga, 2005)
	Új-Skócia (D)	2000 ⁵ (Thompson, 2006)	n. a.
Dél- Amerika	Argentína C	2004 (Dal Zotto és mtsai, 2006)	PPV-D (Dal Zotto és mtsai, 2006)
	Chile A	1992 (Roy és Smith, 1994)	PPV-D (Rosales és mtsai, 1998; Candresse és mtsai, 1998)
Ausztrália és Óceánia	Új Zéland (H)	n. a.	n. a.

Jelmagyarázat: n.a.: nincs adat; 1: csak a CP szerológiai vizsgálata; 2: csak a CP gén 3' végének molekuláris vizsgálata; 3: csak a CP szerológiai és a CP gén 3' végének molekuláris vizsgálata; 4: módszerre nincs adat; 5: a fertőzött fákat megsemmisítették; X: jelen van, nincs adat; A: jelen van, széleskörűen elterjedt; B: jelen van, korlátozottan elterjedt; C: jelen van, néhány előfordulás; (D): nincs jelen, a kórokozó továbbiakban nincs jelen, (E): nincs jelen, a kórokozó megsemmisítve, (F): nincs jelen, csak eseti feljegyzés; (H): nincs jelen, felméréssel megerősítve; (J): nincs jelen, téves adat; (K): nincs jelen, megbízhatatlan adat [PPV státusz jelölése EPPO elterjedési térkép szerint (OEPP/EPPO, 2006)].

3.3. A PPV természetes gazdanövényköre

A PPV természetes gazdanövényei közé számos gyümölcséért termesztett, dísz és vad *Prunus*-faj, valamint más fás és lágyszárú növény tartozik. A vírus természetes gazdanövényei a *Prunus*-fajok közül: a mandulabarack [*Prunus davidiana* Franch. × *P. persica* (L.) Batsch. (*Persica* × *davidiopersica* 'Atropurpurea')], a mandula (*P. amygdalus* Batsch.), a kajszi (*P. armeniaca* L.), a cseresznye (*P. avium* L.), a Bessey-cseresznye (*P. besseyi* L. H. Bailey), a vérszilva (*P. × blireana* André), a cseresznyeszilva (*P. cerasifera* Ehrh.), a *P. cerasifera* × *munsoniana* 'Marianna' (*P. cerasifera* × *P. munsoniana* W. Wight & Hedrick), a meggy (*P. cerasus* L.), a szilva (*P. domestica* L.), a japán díszmeggy (*P. glandulosa* Thunb.), a kökényszilva (*P. insititia* L.), a japán meggy (*P. japonica* Thunb.), az

őszibarack (*P. persica* (L.) Batsch.), a kökény (*P. spinosa* L.), a japánszilva (*P. salicina* Lindl.), a pelyhes meggy (*P. tomentosa* Thunb.) és a díszmandula (*P. triloba* Lindl.) (Németh, 1979; Llácer és Cambra, 1986; Kalashyan és mtsai, 1994; Crescenzi és mtsai, 1995; OEPP/EPPO, 2004; Sebestyen és mtsai, 2008). A nem a *Prunus* nemzetségbe tartozó fás szárú fajok közül a csikos kecskerágó (*Euonymus europaeus* L.) és a közönséges fagyal (*Ligustrum vulgare* L.) természetes PPV fertőzöttségéről is beszámoltak (Polák, 2001). A PPV jelenlétét dión (*Juglans regia* L.) is kimutatták a természetben, kettősellenanyag-szendvics ELISA (double antibody sandwich ELISA, DAS-ELISA) tesztek eredményei és lágy szárú tesztnövényre történő sikeres átvitel alapján (Baumgartnerová, 1996). Glasa és Candresse (2006) azonban a diónak a PPV természetes gazdanövényei közül való törlését javasolta, mivel a tüneteket mutató szlovák diófáról származó mintákban a későbbi szerológiai és molekuláris vizsgálatokkal a PPV jelenlétét nem tudták igazolni, míg a cseresznye levélsodródás vírus (*Cherry leaf roll virus*, CLRV) fertőzését DAS-ELISA módszerrel bizonyították. A vírust kimutatták ördögcérnából (*Lycium barbarum* L.), és számos, a gyümölcsösökben megtalálható gyomnövényből is, melyek: közönséges ínfű (*Ajuga genevensis* L.), kánya harangvirág (*Campanula rapunculoides* L.), pásztortáska (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik.), katáng (*Cichorium* sp.), mezei aszat (*Cirsium arvense* (L.) Scop.), iszalag (*Clematis* sp.), apró szulák (*Convolvulus arvensis* L.), csattanó maszlag (*Datura stramonium* L.), keszegsaláta (*Lactuca serriola* L.), fehér árvacsalán (*Lamium album* L.), bársonyos árvacsalán (*L. amplexicaule* L.), piros árvacsalán (*L. purpureum* L.), mezei gyöngyköles (*Lithospermum arvense* L.), fehér csillagfürt (*Lupinus albus* L.), komlós lucerna (*Medicago lupulina* L.), orvosi somkóró (*Melilotus officinalis* (L.) Lam.), réti boglárka (*Ranunculus acer* L.), mezei boglárka (*R. arvensis* L.), erdei kányafű (*Rorippa sylvestris* (L.) Bess.), fodros lórom (*Rumex crispus* L.), hólyagos habszegfű (*Silene vulgaris* (Moench.) Garcke.), ebszőlő csucsor (*Solanum dulcamara* L.), fekete csucsor (*Solanum nigrum* L.), csorbóka (*Sonchus* sp.), pongyola pitypang (*Taraxacum officinale* Web.), bíbor here (*Trifolium incarnatum* L.), borostyánlevelű veronika (*Veronica hederifolia* L.) (Kröll, 1973; Pribék és mtsai, 1998; Milusheva és Rankova, 2002; Viršček Marn és mtsai, 2004).

A PPV-t szilváról, majd kajsziról írták le először, Bulgáriában (Atanasoff, 1932; Christoff, 1958), ezt követően hosszú ideig csak erről a két fajról közölték a betegséget. A kór magyarországi megjelenéséről kajszifákról először Szirmai (1948) számolt be, az alsótekeresi faiskolából, és a kajszii „csillagfoltosság betegségének” nevezte el. Szilváról Husz és Klement (1950) közölte, őszibarackról a világon először Németh (1963) írta le hazánkban. A vírus meggyen és cseresznyén való természetes előfordulásáról, a moldáviai (Kalashyan és mtsai, 1994), bulgáriai (Topchiiska, 1994) és olaszországi (Crescenzi és mtsai, 1995) észleléseket

követően, hazánkból is beszámoltak (Kölber és mtsai, 1998a, 1998b; Nemchinov és mtsai, 1998). A kórokozó mandulán (Pribék és Gáborjányi, 1997) és kökényen (Salamon és Palkovics, 1997) való természetes hazai előfordulását is megerősítették. Hazánkban a PPV eseti előfordulását észlelték ördögcérnán és csattanó maszlagon (Pribék és Gáborjányi, 1997; Pribék és mtsai, 1998). Legújabban Sebestyén és mtsai (2008) számos dísz *Prunus*-faj (*P. × blireana*, *P. japonica* és a *P. persica* f. *atropurpurea*) természetes PPV fertőzöttségéről számoltak be Magyarországról.

3.4. A PPV természetes terjedési módjai

A PPV terjedésének legfontosabb módjai a fertőzött növények vegetatív részeivel, a levéltelvekkel és a fertőzött pollennel való átvitel.

A vegetatív szaporítás (oltás, szemzés) során történő vírusátvitel a vírus terjedésének egyik legjelentősebb és legáltalánosabb módja. Akár az alany, akár az oltóvessző fertőzött, a betegség az egész növényre átterjed, így egészséges oltvány előállításához mind az alanynak, mind a nemesnek vírusmentesnek kell lennie. A PPV vegetatív szaporítóanyaggal az emberi tevékenység által hatalmas távolságokra jutott el, és terjedt el az egész világon. A PPV-t Magyarországra is vegetatív úton szaporított szilvaalanyokkal huzolták be a Balkánról (Németh, 1979).

A PPV kisebb távolságra való terjedésében, és a járványok kialakulásában a levéltetvek játsszák a legfontosabb szerepet. Számos levéltetűfajról megállapították, hogy vektorai a vírusnak, az átviteli hatékonyság azonban függ a PPV-izolátum típusától és a gazdanövény fajtától (Šutić és mtsai, 1976). Ezenfelül, ugyanazon levéltetűfaj különböző populációi eltérő vírusátviteli hatékonysággal rendelkezhetnek (Labonne és mtsai, 1995). A vírust leghatékonyabban terjesztő vektoroknak az *Aphis spiraecola* Patch és a *Myzus persicae* Sulz. levéltetveket tekintik, de más fajok is képesek a vírus átvitelére: *A. arbuti* Ferr., *A. craccivora* Koch, *A. fabae* Scop., *A. gossypii* Glov., *A. hederæ* Kalt., *A. idaei* v. d. Goot, *A. nasturtii* Kalt., *A. sambuci* L., *A. spiraephaga* Müll., *Brachycaudus cardui* L., *B. helichrysi* Kalt., *B. persicae* Pass., *Dysaphis plantaginea* Pass., *D. pyri* B. de F., *Hyalopterus amygdali* Blanch., *H. pruni* Geoffr., *Macrosiphum rosae* L., *Megoura viciae* Buckt., *Metopolophium dirhodum* Walk., *Myzus cerasi* Fab., *M. varians* Davidson, *Phorodon humuli* Schrank, *Rhopalosiphum padi* L., *Sitobion avenae* Fab., *S. fragariae* Walk., *Toxoptera citricida* Kirkaldy, *Uroleucon achilleae* Koch, *U. sonchi* L. (Krczal és Kunze, 1972; Leclant, 1973; Minoiu, 1973; Fos és Massonié, 1993; Avinent és mtsai, 1994; Labonne és mtsai, 1994, 1995; Pribék és mtsai, 1997; Pribék, 2001; Gildow és mtsai, 2004). A PPV terjesztésében nem csak azoknak a levéltetveknek van hatékony szerepük, melyek fő tápnövénye valamely *Prunus* spp., amin

kolóniákat képeznek, hanem az egyéb növényeken élő, és a *Prunus*-fajokon csak próbaszívogatásokat végző levéltetűfajoknak is (Labonne és mtsai, 1995). A PPV a nem-perzisztens (stylet-borne) vírusok közé tartozik. A vektor a vírust a szipókáján viszi át a fertőzött növényről az egészségesre. A levéltetű a felvételi szívás után azonnal fertőzőképes, nincs szükség inkubációs időre. A vektor azonban hamar, 1-2 szívás után elveszti fertőzőképességét (Horváth, 1972). A vírus epidemiájában nagy szerepük van a vírus természetes gazdanövényei közé tartozó különböző gyomnövényeknek, valamint a dísz és vad *Prunus*-fajoknak (Salamon és Palkovics, 2003), melyek állandó fertőzési forrásul szolgálhatnak az akár csak próbaszívogatást végző levéltetű vektorok számára. Kísérleti körülmények között bizonyították, hogy a fertőzött őszibarack és kajszai termésekből az azt szívogató *Myzus persicae* levéltetvek képesek a vírust őszibarack magoncokra átvinni (Labonne és Quiot, 2001).

A PPV-vel fertőzött fa virágpora is fertőzési forrásul szolgálhat. A pollenátvitelre PPV esetében először Trifonov (1965) hívta fel a figyelmet. A PPV a fertőzött kajszifákról származó virágok portokjaiból is kimutatható (Levy és mtsai, 1995). Nemchinov és mtsai (1995) PPV-vel fertőzött meggyfajták pollenjének és portokjainak PPV fertőzöttségéről számoltak be. Később kimutatták, hogy a PPV fertőzésére jellemző forgókerékszerű (pinwheel) zárványtestek a portok falának sejtjeiben figyelhetők meg, a pollenben nem található meg (Nemchinov és Hadidi, 1996).

A vírus fertőzött maggal történő terjedésével kapcsolatban az 1960-as évek eleje óta ellentmondásos eredmények születtek. A magátvitel lehetőségét kajszin Szirmai (1961) írta le elsőként, majd Németh és Kölber (1983) szerológiai teszttel (ELISA poliklonális antitestekkel) bizonyították, hogy a kórokozó jelen van a magban, és belőle beteg növény fejlődik. Kísérletükben a fertőzött fákról származó magvából fejlődött magoncok 3,4–13,9%-a bizonyult vírusfertőzöttnek. Albán, görög, olasz, román és szerb kutatók viszont a PPV maggal történő terjedésével kapcsolatban szerológiai, illetve molekuláris vizsgálatok során negatív eredményt kaptak (Pasquini és Barba, 2006). Pasquini és mtsai (1998, 2000) kísérleteikben PPV-D típusú izolátummal fertőzött kajszai- és PPV-M típusú izolátummal fertőzött őszibarackfákról származó magok esetében ELISA és immunocapture-RT-PCR („ellenanyagcsapás”-RT-PCR, IC-RT-PCR) módszerrel kimutatták, hogy a vírus ugyan jelen van a maghéjban és a sziklevelekben, a rügyecskében és a gyököcskében azonban nem található meg. A fertőzött magokból fejlődött magoncokon, a kísérlet során (kajszai esetében 3 év, őszibarack esetében 6 hónap) nem alakultak ki tünetek, és a reverz transzkripció-PCR (reverse transcription-PCR, fordított átírást követő PCR, RT-PCR) vizsgálatok eredményei alapján nem bizonyultak PPV fertőzöttnek. Milusheva és mtsai (2008) PPV-M típusú

izolátummal fertőzött szilváról és PPV-Rec típusú izolátummal fertőzött kajsziról származó magok és azokból fejlődött magoncok PPV fertőzöttségének vizsgálata során hasonlóan negatív eredményt kaptak.

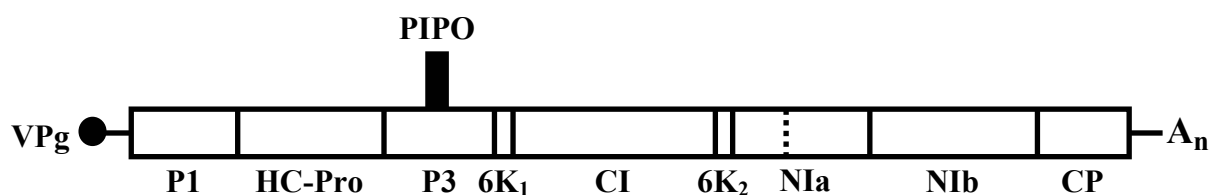
Természetes vizekből számtalan vírus, így a PPV is kimutatható. Stabil vírusok az öntözővízzel a vírus terjedésének egy új módját jelenthetik (Pocsai és Horváth, 1997).

3.5. A PPV rendszertani besorolása és a Potyviridae család molekuláris jellemzése

A PPV a *Potyviridae* család *Potyvirus* nemzetségébe tartozik. A *Potyviridae* család, mely nevét a burgonya Y vírusról (*Potato virus Y*, PVY) kapta, a növényi vírusok gazdaságilag egyik legjelentősebb és legnépesebb víruscsaládja. Az összes ismert növényi vírus 30%-a, közel 200 bizonyított és lehetséges faj tartozik ide (Shukla és mtsai, 1994). A családhoz hat nemzetséget sorolnak (*Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* és *Tritimovirus*). A virionok hajlékony, fonal alakúak, burok nélküliek, 11–15 nm átmérőjűek, hosszuk nemzetségenként változó. A *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus* nemzetségek fajai osztatlan genommal rendelkező, 650–900 nm hosszúságú növényi vírusok. A *Bymovirus* nemzetség fajainak osztott genomja két, egyenként 250–300, és 500–600 nm hosszúságú virionná csomagolódik. A *Potyvirus* és a *Macluravirus* nemzetség fajai nem-perzisztens módon levéltetvekkkel, a *Rymovirus* és *Tritimovirus* nemzetség fajai levélatkákkal, a *Bymovirus* nemzetség fajai gombákkal, míg az *Ipomovirus* nemzetség fajai a dohány molytetűvel (*Bemisia tabaci* Genn.) terjednek (van Regenmortel és mtsai, 2000). A családba tartozó fajok jellegzetes forgókerékszerű zárványtesteket képeznek a fertőzött sejtek citoplazmájában, mely diagnosztikai értékű (Edwardson és mtsai, 1984).

A *Potyvirus* nemzetség osztatlan genomja, megközelítőleg 10000 bázis hosszúságú pozitív értelmű (szensz), egyszálú RNS (+ssRNS), melyet körülbelül 2000 CP alegység burkol (Urcuqui-Inchima és mtsai, 2001). A pozitív értelmű vírusgenom hírvivő RNS-ként (messenger RNS, mRNS) viselkedik. A PPV genomja izolátumtól függően változó, 9741 – 9795 nukleotid (nt) hosszúságú (2. táblázat). A virionok megközelítőleg 5% nukleinsavat és 95% fehérjét tartalmaznak (van Regenmortel és mtsai, 2000). Az RNS genomon az 5' nem-kódoló régiót (5'UTR), egy hosszú nyitott leolvasási keret (open reading frame, ORF), majd a 3' nem-kódoló régió (3'UTR) követi. A vírusgenom 5' végéhez az úgynevezett genomhoz kötött protein (viral protein genome-linked, VPg) kapcsolódik kovalens kötéssel, 3' végén pedig poliadenilált régió (A_n) található. Az ORF egyetlen nagy, több mint 3000 aminosav hosszú (340–370 kilodalton (kD) tömegű) poliprotein prekuzort kódol, amelyet a vírus által kódolt proteázok (P1, HC-Pro és NIa) vágnak el specifikus heptapeptid szekvenciáknál a transzláció során és/vagy azt követően funkcionális fehérjékre (7. ábra) (Urcuqui-Inchima és

mtsai, 2001). Riechmann és mtsai (1991) meghatározták, hogy a PPV esetében a transláció a genomon található második start kodonnál (147–149. nt) iniciálódik. A poliprotein vágása után az N-terminális végtől a C-terminális vég felé haladva keletkező géntermékek: első fehérje (first protein/protease, P1); segítő fehérje és proteáz (helper component protease, HC-Pro); harmadik fehérje (third protein, P3); első 6 kD-os fehérje (first 6K protein, 6K₁); henger alakú zárványfehérje (cylindrical inclusion protein, CI); második 6 kD-os fehérje (second 6K protein, 6K₂); kis sejtmagi zárványfehérje (nuclear inclusion „a” protein, NIa), melynek N-terminális doménje a VPg; nagy sejtmagi zárványfehérje (nuclear inclusion „b” protein, NIB); köpenyfehérje (capsid protein, coat protein, CP) (Riechmann és mtsai, 1992). Chung és mtsai (2008) nemrég egy újabb potyvírus fehérjéről számoltak be. Különböző, a *Potyviridae* családhoz tartozó vírusfajok izolátumainak teljes genomi szekvenciáinak megfelelő komplementer DNS (cDNS) szekvenciák bioinformatikai elemzése során, a vírusgenom P3 fehérjét kódoló régiójába ágyazódott, a poliproteinhez képest +2 leolvasási keretben található rövid (60 nukleotid vagy hosszabb) ORF-et mutattak ki, mely a „pipo” (pretty interesting Potyviridae ORF) nevet kapta. A „pipo”-nak nevezett ORF megléte a nagy és diverz *Potyviridae* család tagjai között konzervatívnak bizonyult, a bioinformatikai vizsgálatok erősen valószínűsítették a meglétét. Az ORF 5’ végén egy erősen konzervatív G₁₋₂A₆₋₇ motívum található (*Potyvirus*: G₁₋₂A₆₋₇, *Bymovirus*: G(G/C)A₆, *Tritimovirus*: A₂G₂A₆₋₇, *Rymovirus*: GA₆GA, *Ipomovirus*: GA₇). A bioinformatikai eredményeket a tarlórépa mozaik vírus (*Turnip mosaic virus*, TuMV) esetében kísérleti úton is bizonyították. Mutációs kísérletek során vizsgálták a PIPO fehérje vírus „működésében” betöltött szepét. A poliprotein aminosav sorrendjét változatlanul hagyó, a PIPO fehérje kifejeződését viszont megakadályozó (knock out) mutációkat hordozó fertőzőképes TuMV klónnal nem tudtak *Nicotiana benthamiana* Domin. növényeket mesterségesen fertőzni. Immunoblot során, a TuMV PIPO fehérje ellen készült antiszérumokkal egy megközelítőleg 25 kD molekulatömegű fehérjét mutattak ki TuMV fertőzött dohánynövényekben, melyből arra következtettek, hogy a PIPO fehérje P3-PIPO fúziós termékként expresszálódik a riboszómákon bekövetkező kereteltolódással, vagy a replikáznak a pipo cisztron 5’ végén található G₁₋₂A₆₋₇ motívumnál bekövetkező megcsúsztatása által keletkező RNS másolat translációja során.



7. ábra. Potyvírusok genomszerveződése és géntermékei [Urququi-Inchima és mtsai (2001) nyomán]

2. táblázat. PPV-izolátumok teljes genomjának hossza, az eredeti gazdanövény, a származási ország, az izolátum csoportbeli hovatartozása és az EMBL/NCBI/DBJ adatbázisbeli azonosító szám (Acc. No.) feltüntetésével

Izolátum neve	Eredeti gazdanövény	Származási ország	Genomhossz	Csoport	Azonosító szám (Acc. No.)
Dideron	<i>Prunus armeniaca</i>	Franciaország	9787	PPV-D	X16415
NAT	n. a.	Németország	9741	PPV-D	D13751, NC_001445
SC	<i>P. cerasus</i>	Moldávia	9786	PPV-D	X81083
PENN1	<i>P. persica</i>	USA	9786	PPV-D	AF401295
PENN2	<i>P. domestica</i>	USA	9786	PPV-D	AF401296
PENN3	<i>P. persica</i>	USA	9786	PPV-D	DQ465242
PENN3	borsóra (<i>Pisum sativum</i> L.) történt 5 egymást követő mechanikai passzálás után	USA	9786	PPV-D	EF611243
PENN3	borsóra történt 6 egymást követő mechanikai passzálás után	USA	9785	PPV-D	EF611244
PENN3	levéltetűvel borsóra történt 5 egymást követő passzálás után	USA	9786	PPV-D	EF611241
PENN3	levéltetűvel borsóra történt 6 egymást követő passzálás után	USA	9786	PPV-D	EF611242
PENN4	<i>P. persica</i>	USA	9786	PPV-D	DQ465243
PENN4	borsóra történt 5 egymást követő mechanikai passzálás után	USA	9788	PPV-D	EF611247
PENN4	borsóra történt 6 egymást követő mechanikai passzálás után	USA	9786	PPV-D	EF611248
PENN4	levéltetűvel borsóra történt 5 egymást követő passzálás után	USA	9786	PPV-D	EF611245
PENN4	levéltetűvel borsóra történt 6 egymást követő passzálás után	USA	9786	PPV-D	EF611246
48-922	<i>P. persica</i>	Kanada	9786	PPV-D	AY912058
Cdn 123-1	<i>Prunus persica</i>	Kanada	9700*	PPV-D	AY953267
Cdn 12	<i>Prunus domestica</i>	Kanada	9700*	PPV-D	AY953266
Cdn 7-2	<i>Prunus glandulosa</i>	Kanada	9700*	PPV-D	AY953265
Cdn 5	<i>Prunus persica</i>	Kanada	9700*	PPV-D	AY953264
Cdn 4	<i>Prunus persica</i>	Kanada	9700*	PPV-D	AY953263
Cdn 3	<i>Prunus persica</i>	Kanada	9700*	PPV-D	AY953262
Cdn 1	<i>Prunus domestica</i>	Kanada	9700*	PPV-D	AY953261
Fantasia	<i>P. persica</i> var. <i>nectarina</i>	Kanada	9786	PPV-D	AY912056
Vulcan	<i>P. persica</i>	Kanada	9786	PPV-D	AY912057
PS	<i>Prunus</i> spp.	Szerbia és Montenegró	9786	PPV-M	AJ243957
SK68	<i>P. domestica</i>	Magyarország	9786	PPV-M	M92280
El Amar	<i>P. armeniaca</i>	Egyiptom	9791	PPV-EA	DQ431465
El Amar	<i>P. armeniaca</i>	Egyiptom	9791	PPV-EA	AM157175
SoC	<i>P. cerasus</i>	Moldávia	9795	PPV-C	AY184478
SwC	<i>P. avium</i>	Olaszország	9795	PPV-C	Y09851
BOR-3	<i>P. armeniaca</i>	Szlovákia	9786	PPV-Rec	AY028309
J4c	<i>P. domestica</i>	Lengyelország	9786	PPV-Rec	EU117116
W3174	<i>P. domestica</i>	Kanada	9788	PPV-W	AY912055
Ab-Tk	<i>P. armeniaca</i>	Törökország	9786	n. i. (PPV-?)	EU734794

Jelmagyarázat: *: 5'UTR és 3'UTR nem teljes, n. a.: nincs adat, n. i. (PPV-?) : nem ismert.

3.5.1. A CP és funkciói

A potyvírus CP a legrészletesebben jellemzett fehérje, amelyet a genetikai diverzitás és a taxonómiai viszonyok feltárása céljából is leggyakrabban vizsgálnak. Három régióra bontható: a variábilis N- és C-terminális, valamint az erősen konzervatív központi (core) régiókra. Az N- és C-terminális végek más pálcika alakú virionnal rendelkező vírusokhoz hasonlóan, mint pl. a potexvírusok (Koenig és mtsai, 1978; Sawyer és mtsai, 1987), a tobamovírusok (Bloomer és mtsai, 1978) és a tobnavírusok (Mayo és Cooper, 1973; Mayo és mtsai, 1974) esetében, a vírusrészecske külső felszínén helyezkednek el, és enyhe proteolízissel eltávolíthatók (Allison és mtsai, 1985; Shukla és mtsai, 1988, 1989). A végek a vírusrészecske kialakulásához nem szükségesek, eltávolításuk nem befolyásolja a virion fertőzőképességét mechanikai inokulálás során (Shukla és mtsai, 1988; Jagadish és mtsai, 1991). Az N-terminális rész tartalmazza a fő vírusspecifikus aminosav motívumokat (epitópokat), és mind hosszában, mind szekvenciájában nagy változatosságot mutat a különböző potyvírusfajok között, így alkalmas a víruscsaládon belül az egyes fajok, sőt egy adott faj különböző típusú izolátumainak elkülönítésére is. A CP aminosav sorrendjének hasonlósága különböző potyvírusfajok esetén 38–71%, egy adott faj izolátumai között 90 – 99% között változik. A C-terminális régió az N-véghez képest kevésbé változékony, a központi rész erősen konzervatív szekvenciát mutat (Shukla és mtsai, 1988, 1989).

A CP több funkcióval rendelkező fehérje, mely fő feladatán, a vírusrészecske fehérjeburkának kialakításán kívül részt vesz a levéltetűvel történő átvitelben, a vírus növényen belüli mozgásában, és a vírusgenom felszaporításának (amplifikációjának) szabályozásában. A CP különböző régiói a vírus „működése” során különféle feladatokat látnak el. Az N-terminális résznek kulcs szerepe van a levéltetűekkel történő terjedésben (Harrison és Robinson, 1988; Pirone, 1991; Salomon és Bernardi, 1995). Ez a funkció az N-terminális vég lelegején elhelyezkedő DAG aminosav szekvenciához köthető, de bizonyos esetekben a motívumot határoló aminosavaknak is meghatározó szerepük lehet (Atreya és mtsai, 1990, 1991, 1995; Gal-On és mtsai, 1992; López-Moya és mtsai, 1999). A NAG, illetve DAL aminosav motívummal rendelkező PPV-SC és PPV-NAT izolátumok levéltetűekkel nem vihetők át, de a DAG motívum helyspecifikus mutagenézissel való helyreállításával az izolátumok levéltetűekkel átvihetőké váltak (Deborré és mtsai, 1995; Maiss és mtsai, 1995). Az átvitel során a CP a DAG aminosav motívumon keresztül kapcsolatba lép a HC-Pro PTK motívumával, mely fehérje a K1TC aminosav motívumon keresztül a levéltetű szájszervéhez kapcsolódik („bridge hypothesis”) (Pirone és Blanc, 1996; Blanc és mtsai, 1997; Peng és mtsai, 1998). A potyvírusok mozgásának mechanizmusa még nem kellő mértékben tisztázott. A dohány karcolatós vírus (*Tobacco etch virus*, TEV)

esetében kimutatták, hogy a CP N-terminális régiójának eltávolítása megakadályozza a vírus szisztemikus terjedését, melyből arra következtettek, hogy az N-terminális vég nélkülözhetetlen a hosszútávú mozgáshoz (Dolja és mtsai, 1994). Egy másik potyvírus, a cukkini sárga mozaik vírus (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) CP N-terminális régiója azonban részben vagy egészben eltávolítható, vagy nem vírus eredetű szekvenciával helyettesíthető a szisztemikus fertőzés kialakulásának gátlása nélkül (Arazi és mtsai, 2001). López-Moya és Pirone (1998) a dohány érfoltosság vírus (*Tobacco vein mottling virus*, TVMV) és a TEV esetében megfigyelték, hogy a CP N-terminális részén elhelyezkedő DAG motívum első aminosavának megváltoztatása a szisztemikus fertőzés hiányát eredményezi, melyért feltételezésük szerint a DAG motívum nettó töltésének megváltozása a felelős. Később Kimalov és mtsai (2004) kimutatták, hogy a ZYMV hatékony szisztemikus terjedésében az N-terminális vég nettó töltésének, és nem az eredeti aminosav szekvenciának van meghatározó szerepe.

A konzervatív központi régió valószínűleg kölcsönhatásba lép a vírus RNS-sel (Shukla és mtsai, 1988), nélkülözhetetlen a virion összeépüléséhez (Jagadish és mtsai, 1991, 1993; Dolja és mtsai, 1995; Varrelmann és Maiss, 2000) és a rövid távú mozgáshoz (Dolja és mtsai, 1995; Rojas és mtsai, 1997). Képes a plazmodezmák méretbeli átteresztőképességét (size exclusion limit) megnövelni, lehetővé téve a nukleoprotein komplex sejtről-sejtre történő terjedését (Rojas és mtsai, 1997). Ezenfelül, szerepe van a genom felszaporításának szabályozásában is (Mahajan és mtsai, 1996).

A TEV CP C-terminális doménje szerepet játszik a hosszútávú mozgásban (Dolja és mtsai, 1995). Kang és mtsai (2006) a szója mozaik vírus (*Soybean mosaic virus*, SMV) esetében a CP-CP kölcsönhatást vizsgálva élesztő két-hibrid rendszerben, arra a megállapításra jutottak, hogy a C-terminális régió felelős a CP alegységek közti kölcsönhatásért, közvetve pedig feltehetően a virion összeépüléséért. Nemrég kimutatták, hogy a burgonya A vírus (*Potato virus A*, PVA) CP ATP-áz aktivitással rendelkezik, melynek megnyilvánulásában a C-terminális vég feltehetően központi szerepet játszik (Rakitina és mtsai, 2005).

3.6. A PPV-izolátumok típusai

A PPV igen nagyfokú változékonyságát jelzi, hogy az elmúlt három évtized során a PPV-izolátumok számos típusát, illetve csoportját különítették el biológiai, szerológiai, molekuláris, ill. járványtani tulajdonságok alapján. A legújabb szerológiai és molekuláris kutatások eredményei azt mutatják, hogy a PPV-izolátumoknak jelenleg legalább öt különálló, monofiletikus természetű, és legalább egy, rekombináns izolátumokat magában

foglaló csoportja, illetve típusa különböztethető meg a világon, melyek közül a PPV-M, PPV-D és a PPV-Rec csoportok tagjai a legelterjedtebbek.

3.6.1. A PPV-izolátumok sokszínűsége

A PPV-izolátumok különböző típusainak létezésére az idő folyamán fokozatosan derült fény. Az izolátumok sokszínűségének vizsgálata kezdetben elsősorban egyes biológiai tulajdonságok figyelembevételével, pl. a különböző lágy szárú vagy fás szárú kísérleti gazdanövényeken okozott tünetek, vagy a különböző levéltetűfajokkal való átvitel hatékonysága alapján történt. Ezeken felül egyéb jellemzőket, pl. az izolátumok fizikai sajátosságait (hőinaktivációs pont) vagy a különböző gazdanövényekben mérhető víruskoncentrációt is vizsgálták (Candresse és Cambra, 2006). Tünettani sajátosságokon alapulva, a *Chenopodium foetidum* Schrad. tesztnövényen előidézett lokális léziók milyensége alapján, a PPV-izolátumok három csoportját különböztették meg, melyeket „sárga” (yellow, Y), „köztes” (intermediate, Y/N) és „nekrotikus” (necrotic, N) törzseknek nevezték el (Šutić és mtsai, 1971). Jóllehet a módszert az 1970-es években előszeretettel alkalmazták, néhány esetben arról számoltak be, hogy a három fenotípus elkülönítése nem mindig volt könnyű feladat (Kerlan és Dunez, 1979). Később kimutatták, hogy a megjelenő fenotípust a környezeti feltételek is befolyásolják (Pocsai, 1976), ami a kapott eredmények reprodukálhatóságával kapcsolatos nehézségeket jelezte. A kezdeti eredmények bizonyítékul szolgáltak ugyan a PPV-izolátumok közötti változékonyság meglétére, de az alkalmazott módszerek és a vizsgált tulajdonságok nem voltak alkalmasak a PPV-izolátumok stabil csoportjainak kialakítására, illetve az izolátumok közötti rokonsági kapcsolatok feltárására.

A PPV-izolátumok közötti szerológiai különbségek kimutatására tett kezdeti próbálkozások sem sok sikerrel jártak. Az előrelépést Kerlan és Dunez (1979) vizsgálatai jelentették, akik szerológiai tulajdonságok alapján, kettős agargél-diffúziós tesztek segítségével, poliklonális antitestek és tisztított, formaldehiddel kezelt vírusszuspenzió felhasználásával a PPV-izolátumok két jellemző szerológiai csoportját, a Dideron (D) és a Marcus (M) főcsoportokat különítették el, melyek gazdasági szempontból a legjelentősebbek. A technikai nehézségek (elsősorban a megfelelő minőségű tisztított vírusszuspenzió előállítása) azonban korlátozták a módszer széleskörű használatát a PPV-izolátumok típusainak elkülönítésére. Kerlan és Dunez (1979) szerológiai tulajdonságok alapján tett megállapítását, a két fő típus meglétét, RNS-próbát alkalmazó molekuláris hibridizációval is megerősítették (Varveri és mtsai, 1989). A CP feltételezett harmadlagos szerkezetén alapuló csoportosítás is megegyezett a D és M szerológiai csoportokkal (Palkovics és mtsai, 1993; Maiss és mtsai, 1995), mely alapján a hazai PPV-SK68 izolátum az M csoportba tartozott. A

PPV-izolátumokat a CP alegységek SDS-poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE) során való vándorlásának gyorsasága alapján két csoportba sorolták, mely csoportosítás ugyancsak azonos volt a Kerlan és Dunez (1979) által felállított két fő szerológiai csoporttal. A D típushoz tartozó izolátumok CP alegységei gyorsabban (becsült molekulatömeg 36 kD), az M típusba sorolható izolátumoké lassabban (becsült molekulatömeg 38 kD) vándoroltak, és így a módszer alkalmas volt a két fő izolátum típus elkülönítésére (Bousalem és mtsai, 1994a, 1994b).

Az 1980-as évek végétől, illetve az 1990-es évek elejétől az előbb felsorolt módszerekkel párhuzamosan, a PPV-izolátumok közötti különbségek kimutatására alkalmasabb szerológiai és molekuláris eljárásokat fejlesztettek ki, melyek alkalmazásával nyilvánvalóvá vált, hogy a PPV-izolátumok két fő csoportba sorolhatók. Molekuláris oldalról nézve a vírusgenomról készült cDNS klónozása és bázissorrendjének meghatározása (szekvenálás) (Laín és mtsai, 1989; Maiss és mtsai, 1989; Teycheney és mtsai, 1989), RT-PCR analízist követő nukleinsav hasítós eljárás (restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Wetzel és mtsai, 1991b) vagy szekvenálás (Candresse és mtsai, 1994) a molekuláris szintű változékonyság egyszerűbb vizsgálatát tette lehetővé. A PPV szerológiai sokszínűségének jobb megismeréséhez az ELISA-technika (Clark és Adams, 1977) különböző változatainál megbízhatóbb Western blot módszer használata, valamint a vírus- és csoport-specifikus monoklonális antitestek (monoclonal antibody, MAb) előállítása vezetett (Navrátil és mtsai, 1992; Cambra és mtsai, 1994; López-Moya és mtsai, 1994; Pasquini és Barba, 1994; Asensio és mtsai, 1995; Pasquini és mtsai, 1995; Boscia és mtsai, 1997; Myrta és mtsai, 1998b, 2000, 2001; Cambra és mtsai, 2006a).

A három, kezdetben ismert CP génnek megfelelő cDNS-szekvencia (PPV-NAT, Maiss és mtsai, 1989; PPV-Rankovic, Laín és mtsai, 1989; PPV-D, Teycheney és mtsai, 1989) alapján azonban csak csekély (átlagban 2% alatti eltérés) mértékű molekuláris szintű változékonyságot tudtak kimutatni az izolátumok között. Ez az eredmény jelenlegi ismereteink szerint nem meglepő, hiszen ezekről az izolátumokról kiderült, hogy mind PPV-D típusúak. Az egyiptomi PPV-El Amar izolátum (Wetzel és mtsai, 1991a), valamint a valamikori Jugoszlávia területéről származó izolátumok (PPV-PS, PPV-ö6, Cervera és mtsai, 1993), majd később egy moldáviai, meggyről gyűjtött izolátum (PPV-SoC, Nemchinov és mtsai, 1995, 1996) 3' genomi régióinak megfelelő cDNS-szakaszok bázissorrendjének elemzése során kiderült, hogy a PPV-izolátumok genetikai variabilitása jóval nagyobb, mint ahogy azt az első eredmények mutatták.

Ezzel párhuzamosan a PCR kifejlesztésével (Mullis és Faloona, 1987), majd az eredeti módszer továbbfejlesztésével [fordított átírást követő PCR (reverz transzkripció-PCR, RT-

PCR), „ellenanyagcsapás”-RT-PCR (immunocapture RT-PCR, IC-RT-PCR), „lenyomatesapás”-PCR (print-capture-PCR, PC-PCR), heminested-PCR (H-PCR), PCR-ELISA, nested-PCR, co-operational PCR (Co-PCR), real-time RT-PCR (valós idejű RT-PCR)], valamint a reverz-transzkripciót követő hurok-irányított izotermikus felszaporításon alapuló eljárás alkalmazásával (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) lehetővé vált a PPV-fertőzés kimutatása és az izolátumok nukleinsav szintű vizsgálata, gyors és hatékony módon (Wetzel és mtsai, 1991b, 1992; Candresse és mtsai, 1994, 1995; Olmos és mtsai, 1996, 1997, 1999, 2002, 2004; Varga és James, 2006). A CP gén 3' végének megfelelő cDNS-szakasz RT-PCR analízist követő *RsaI* restrikciós enzim hasításos vizsgálatával is megerősítették a Kerlan és Dunez (1979) által meghatározott D („occidental”) és M („oriental”) fő típusok meglétét (Wetzel és mtsai, 1991b). Az RT-PCR során felszaporított cDNS-szakaszt D-típusú izolátumok esetében az *RsaI* enzim egy helyen hasította, míg az M izolátumok ezen régiójában nem volt felismerő helye (Wetzel és mtsai, 1991b; Bousalem és mtsai, 1994a, 1994b; Candresse és mtsai, 1995).

Bousalem és mtsai (1994a, 1994b) a PPV-izolátumok típusainak elkülönítésére használt szerológiai (a CP alegységek gélelektroforetikus mobilitása, a CP N- és C-terminális régióinak szerológiai tulajdonsága) és molekuláris eljárásokat (a CP gén 3' végének megfelelő cDNS-szakasz *RsaI* polimorfizmusa) párhuzamosan alkalmazva teljes azonosságot tártak fel a különböző módszerekkel kialakított csoportok között. Vizsgálataikkal igazolták a két alapvető típus meglétét. Ezt követően a CP gén 3' végének megfelelő PCR-termék *RsaI* polimorfizmusának vizsgálata, illetve a felszaporított cDNS-szakasz szekvencia analízise a két fő PPV csoport megkülönböztetésének alapvetően elfogadott nukleinsav-alapú módszerévé vált, ami a jelenleg is elfogadott PPV-D és PPV-M típusok, illetve csoportok leírásához vezetett.

Az előbb említett molekuláris módszereket alkalmazva a két fő típus mellett két kisebb PPV csoportot, a PPV-El Amar (PPV-EA, Wetzel és mtsai, 1991a) és a PPV-Cherry (PPV-C, Nemchinov és mtsai, 1996) csoportokat is elkülönítették.

Az elmúlt 15 év során a PPV-D, PPV-M, PPV-EA és PPV-C csoporthoz sorolható izolátumok CP-jét specifikusan felismerő monoklonális antitesteket állítottak elő, mellyekkel lehetővé vált a négy típus szerológiai tulajdonságok alapján történő azonosítása (4DG5 és 4DG11 PPV-D specifikus MAb, AL PPV-M specifikus MAb, EA24 PPV-EA specifikus MAb, AC és TUV PPV-C specifikus MAb, Cambra és mtsai, 1994; Boscia és mtsai, 1997; Myrta és mtsai, 1998b, 2000). Ezenfelül az egyre bővülő szekvencia adatok felhasználásával a CP génnek megfelelő cDNS-szakasz változékony régióira olyan PCR-primereket terveztek, melyek lehetővé tették a különböző csoportokba tartozó PPV-izolátumok specifikus

felszaporítását (Candresse és mtsai, 1994, 1995, 1998; Nemchinov és Hadidi, 1998; Szemes és mtsai, 2001). Ezek a primerek képesek az ismert szekvenciájú szakaszon a legváltozékonyabb régióhoz hozzákapcsolódni. A csoport-specifikus monoklonális antitestek, valamint a csoport-specifikus PCR-primerek megjelenésével kezdetben a két fő csoport, később már az addig ismert négy PPV csoport (PPV-D, PPV-M, PPV-EA és PPV-C) specifikus azonosítása, és a PPV csoportok rokonsági viszonyainak feltárása is lehetővé vált.

Különböző PPV-izolátumokat csoport-specifikus monoklonális antitestekkel, csoport-specifikus primerekkel és RFLP-eljárással párhuzamosan vizsgálva a szerológiai és molekuláris eredmények kiváló összhangban voltak. Az eltérő technikák hasonlóan tudták azonosítani a PPV-D, PPV-M fő, valamint a PPV-EA és PPV-C típusokat, néhány izolátum esetében azonban ellentmondást tapasztaltak a különböző fehérje- és nukleinsav-alapú módszerek eredményei között (Candresse és mtsai, 1998).

Később monoklonális antitestekkel végzett szerológiai tesztek eredményeinek számítógépes elemzése során, a PPV-M csoporton belül két alcsoport, a PPV-M1 és a PPV-M2 létezésére is fény derült (Myrta és mtsai, 2001), melyet a CP származtatott aminosav szekvenciáján alapuló filogenetikai vizsgálattal is megerősítettek (Salamon és Palkovics, 2002). A Myrta és mtsai (2001) által elkülönített két alcsoport az izolátumok földrajzi származásával összefüggést mutatott, mely szerint az M2 alcsoportba főleg a Közép- és Kelet-Európából (Magyarország, Szlovákia, Németország), míg az M1 csoportba elsősorban a mediterráneumból (Görögország, Olaszország, Törökország, Albánia, Ciprus, Franciaország, volt Jugoszlávia) származó izolátumok tartoztak.

A PPV-izolátumok típusainak elkülönítésére alkalmas szerológiai és molekuláris eszközök (módszerek és anyagok) folyamatos fejlődése következtében addig ismeretlen PPV típusok azonosítására, és egy új kisebb csoport, a PPV-Winona (PPV-W; James és mtsai, 2003; James és Varga, 2005), valamint a rekombinánsok széleskörűen elterjedt csoportjának (PPV-Rec) az elkülönítésére is sor került (Glasa és mtsai, 2004).

A rekombináns PPV-izolátumok létezését hosszú időn keresztül figyelmen kívül hagyták, mivel az izolátumok különböző típusainak elkülönítésére különféle, kizárólagosan a CP vagy a CP gén vizsgálatán alapuló módszereket használtak. A PPV-Rec izolátumok azonosítását és széleskörű elterjedésének felismerését a CP-alapú technikákat kiegészítő, az NIb gén 3' végén található rekombinációs ponttól 5' (upstream) irányban elhelyezkedő genomi régiókat célzó módszerek alkalmazása tette lehetővé. Glasa és mtsai (2002b) a P3 gén 3' végének, a teljes 6K₁ génnek és a CI gén 5' végének (3'P3–6K₁–5'CI) megfelelő cDNS-szakaszok molekuláris vizsgálata során kapott eredményeken alapulva egy egyszerű RT-PCR/RFLP módszert dolgoztak ki. A 3'P3–6K₁–5'CI genomi régió RT-PCR során történő

felszaporítását követően a PCR-termék *DdeI*, *EcoRI*, illetve *AsnI* enzimekkel végzett hasításával lehetővé vált a PPV-D és PPV-M izolátumok CP-től, illetve CP géntől független elkülönítése. Ezzel egyidejűleg egy, a CI gén egy szakaszának megfelelő cDNS PPV-D, ill. PPV-M csoport-specifikus primerekkel történő felszaporításán alapuló módszert is kidolgoztak, mely alkalmas volt a PPV-D és a PPV-M izolátumok kevert fertőzésének kimutatására is (Glasa és mtsai, 2002a). A rekombináns izolátumok CP-jüket, illetve CP génjüket vizsgálva M-típusú, míg a genom egy előrébb elhelyezkedő régióját tekintve D-típusú szekvenciával rendelkeznek, így a rekombináns jelleg kimutatása a CP, illetve a CP gén, valamint az N1b génben lévő rekombinációs ponttól 5' irányban elhelyezkedő egyéb régiók (3'P3–6K₁–5'CI, CI) együttes vizsgálatával volt lehetséges. Nemrég Šubr és mtsai (2004) az N1b génben lévő rekombinációs pont határoló régióra PPV-D és PPV-M csoport-specifikus primereket terveztek, melyek használatával a PPV-Rec izolátumok azonosítása egyetlen genomi régió RT-PCR vizsgálatával is lehetővé vált. Ez a módszer egyben a PPV-D és PPV-M izolátumok kevert fertőzésének kimutatására is alkalmas.

Jelenleg a PPV-D és PPV-M izolátumok azonosítására már a PPV kimutatására alkalmas legérzékenyebb technika, a valós idejű RT-PCR analízis is használható (Olmos és mtsai, 2004; Varga és James, 2005; Capote és mtsai, 2006). A Varga és James (2005) által kidolgozott valós idejű multiplex RT-PCR technika segítségével a PPV-D és PPV-M izolátumok a PCR-termékek eltérő olvadási hőmérséklete alapján azonosíthatók.

Nemrég Dallot és mtsai (2008) különböző európai országokból származó tipikus PPV-M izolátumok CP génnek és 3'P3–6K₁–5'CI régióinak megfelelő cDNS-szekvenciáinak filogenetikai analízise során a tipikus PPV-M izolátumok csoportját két alcsoportra („A” és „B”) osztották, melyek az izolátumok földrajzi eredetével összefüggést mutattak. A Dél-Európából (Görögország, Olaszország, Ciprus, Franciaország) származó izolátumok a PPV-SK68 izolátummal együtt az „A” alcsoportba, míg a Bulgáriából, Szerbiából (köztük a PPV-PS), Csehországból és Szlovákiából származó izolátumok a „B” alcsoportba tartoztak.

3.6.2. PPV-Dideron (PPV-D) csoport

A csoport névadó tagját (PPV-Dideron izolátum) Franciaország délkeleti részén, kajszifáról izolálták. Nyugat-Európában és a mediterráneum különböző területein és egyes közép-európai országokban (pl. Csehország) ez a leggyakoribb típus (Myrta és mtsai, 1998a; Gadiou és mtsai, 2008). Jelenleg már Európán kívül Dél- és Észak-Amerikában, Afrikában és Ázsiában is megtalálható, ahol szinte egyeduralgó (1. táblázat).

A PPV-D izolátumok elsősorban a kajszii- és a szilvafákat fertőzik, és természetes körülmények között csak ritkán fordulnak elő őszibarackon (Myrta és Boscia, 2001). Dallot és

mtsai (1998) Franciaországban a PPV-D izolátumokat túlnyomórészt kajszi ültetvényekben izolálták, míg az őszibarack ültetvényekben a PPV-M izolátumok voltak gyakoriak. Vizsgálataik során azonban olyan PPV-D izolátumokat is kimutattak, melyek hatékonyan képesek őszibarackot fertőzni.

A PPV-D izolátumok általánosságban más típusú izolátumokhoz képest lassabban terjednek az ültetvényben. Ennek oka feltehetően az, hogy többségében levéltetvekkel kevésbé hatékonyan vihetők át. Így a PPV-D izolátumoknak epidemiológiailag általában nincs akkora jelentősége, járványok kialakulására kevésbé kell számítani (Myrta és Boscia, 2001). Spanyolországban azonban a PPV-D izolátumok levéltetvekkel való igen hatékony terjedését figyelték meg különféle japánszilva-, házi szilva és kajszi fajták között, míg őszibarackra való átvitelt nem tapasztaltak, még akkor sem, ha az őszibarackfák a fertőzött szilva- és kajszi fák közvetlen szomszédságában helyezkedtek el (Cambra és mtsai, 2006b).

A PPV-D izolátumok CP alegységei SDS-PAGE során gyorsabban vándorolnak, mint a PPV-M izolátumoké (Bousalem és mtsai, 1994a, 1994b). A CP gén 3' végének megfelelő cDNS-szakaszon a PPV-D izolátumok többségében egy-egy *RsaI*, *AluI*, *DraI* és *SfuI* restriktív felismerő hely található (Wetzel és mtsai, 1991b; Deborré és mtsai, 1995). A 3'P3–6K₁–5'CI régióknak megfelelő PCR-termék *AsnI* helyet nem, míg egy *DdeI* és egy *EcoRI* enzim hasító helyet tartalmaz (Glasa és mtsai, 2002b).

A csoportba tartozó izolátumok közül számos teljes nukleinsav sorrendje ismert (2. táblázat).

3.6.3. PPV-Marcus (PPV-M) csoport

A csoport névadó tagja (PPV-Marcus izolátum) Észak-Görögországból, őszibarackról származik. A PPV-M izolátumok Európa-szerte megtalálhatók, de leggyakrabban Közép-, Kelet- és Délkelet-Európában fordulnak elő. Afrikában, valamint Észak- és Dél-Amerikában eddig nem mutatták ki jelenlétüket (1. táblázat).

A PPV-M izolátumok elsősorban az őszibarack ültetvényekben okoznak súlyos károkat (Dallot és mtsai, 1998), de ritkán szilván és kajszin is előfordulnak (Myrta és Boscia, 2001; Glasa és mtsai, 2004). Járványtani szempontból a PPV-M izolátumok a legjelentősebbek, mivel levéltetvekkel általában gyorsan terjednek, így rendkívül nehéz ellenük védekezni (Myrta és Boscia, 2001).

A PPV-M izolátumok CP alegységei SDS-PAGE során lassabban vándorolnak, mint a PPV-D izolátumoké (Bousalem és mtsai, 1994a, 1994b). A CP gén 3' végének megfelelő cDNS-szakaszon egy *AluI* hasító hely található, míg az *RsaI*, a *DraI* és az *SfuI* enzimeknek nincs felismerő helye (Wetzel és mtsai, 1991b; Deborré és mtsai, 1995). A 3'P3–6K₁–5'CI

régióinak megfelelő PCR-termék *DdeI* és *EcoRI* enzim hasító helyeket általában nem, míg egy *AsnI* helyet tartalmaz (Glasa és mtsai, 2002b). A csoportba tartozó izolátumok közül kettő teljes nukleotid szekvenciája ismert cDNS formában (2. táblázat).

3.6.4. PPV-El Amar (PPV-EA) csoport

A csoport névadó tagja (PPV-El Amar izolátum) Egyiptomból, kajsziról származik. A PPV-El Amar izolátumot szekvencia hasonlóság alapján különítették el. A PPV-El Amar izolátum és más PPV csoportok képviselői között a legnagyobb különbség a CP N-terminális részének megfelelő származtatott aminosav szekvenciában mutatkozott (Wetzel és mtsai, 1991a). Később Candresse és mtsai (1994) is megerősítették, hogy ez az izolátum valóban egy önálló csoportot képvisel. A PPV-EA csoporthoz napjainkban is csak néhány Egyiptomból származó izolátum tartozik (Myrta és mtsai, 1998a, 2001, 2006; Shalaby és mtsai, 2003; Glasa és mtsai, 2006), más országokban nem mutatták ki jelenlétüket (1. táblázat). A csoport tagjai kajszin kívül a szilvát és az őszibarackot is fertőzik a természetben (Shalaby és mtsai, 2003). A PPV-El Amar izolátum levéltetvekkel való átvihetőségét kísérleti úton bizonyították (Wetzel és mtsai, 1991a).

A PPV-El Amar izolátum egyes CP, illetve CP gén jellemzői hasonlóak a PPV-M izolátumokéhoz, de azoktól szerológiai vizsgálattal elkülöníthető, mivel specifikus epitópokkal rendelkezik (Myrta és mtsai, 1998b).

A PPV-El Amar izolátum CP alegységei SDS-PAGE során lassabban vándorolnak, mint a PPV-D izolátumoké (Bousalem és mtsai, 1994a, 1994b). A CP gén 3' végének megfelelő cDNS-szakaszon az *AluI* és az *SfuI* restrikciós endonukleázoknak van, míg az *RsaI*, és a *DraI* enzimeknek nincs felismerő helye (Deborré és mtsai, 1995).

Újabban már mind az eredeti (Glasa és mtsai, 2006), mind pedig egy, ugyancsak a PPV-EA csoporthoz tartozó, és az eredetiből származó izolátum (Myrta és mtsai, 2006) teljes nukleotid szekvenciája ismert (2. táblázat). A két izolátum teljes nukleotid sorrendje 3,8%-ban tér el egymástól, ami azt jelzi, hogy a PPV-EA izolátumokra más PPV csoportok izolátumaihoz képest nagyobb fokú variabilitás a jellemző (Glasa és mtsai, 2006).

3.6.5. PPV-Cherry (PPV-C) csoport

A PPV-C csoportba olyan PPV-izolátumok tartoznak, melyek természetes körülmények között szisztemikusan képesek fertőzni meggyet (PPV-SoC izolátum), illetve cseresznyét (PPV-SwC izolátum). A csonthéjasok közül ezeket a fajokat a PPV-vel szemben kezdetben ellenállónak gondolták (Németh, 1986), a csoport természetes csonthéjas gazdanövényköre viszont épp a meggyre és a cseresznyére korlátozódik.

A csoport első tagját (PPV-SoC izolátum) Moldáviában, meggyről izolálták, és a PPV fertőzését biológiai és szerológiai vizsgálatokkal megerősítették (Kalashyan és mtsai, 1994). Később az izolátumot molekuláris módszerekkel is jellemezték. A CP gén 3' végének megfelelő DNS másolat *RsaI* enzimmel végzett RFLP analízise azt valószínűsítette, hogy ez az izolátum a PPV-M csoport egy kivételes képviselője (Nemchinov és mtsai, 1995). A genom 3' végének [az N1b gén 3' végének, a teljes CP génnek és a 3'UTR-nek (3'N1b-CP-3'UTR)] megfelelő cDNS-szakasz szekvenálását követő szekvencia hasonlóságon alapuló vizsgálatok azonban egyértelműen azt mutatták, hogy ezt az izolátumot egy különálló, új csoport első tagjának kell tekinteni (Nemchinov és Hadidi, 1996; Nemchinov és mtsai, 1996).

Később dél-olaszországi, Ferrovia fajtájú cseresznyefák természetes PPV fertőzöttségéről számoltak be (Crescenzi és mtsai, 1995). A cseresznyéről származó izolátum (PPV-SwC) a CP gén 3' végi régiójának megfelelő cDNS-szakasz szekvencia analízise során a PPV-SoC izolátummal mutatta a legközelebbi rokonságot (Crescenzi és mtsai, 1997).

Jelenleg mindkét izolátum teljes nukleotid szekvenciája ismert, mely alapján egy különleges, önálló PPV csoportot képviselnek (Fanigliulo és mtsai, 2003) (2. táblázat).

Meggy és cseresznyefák természetes PPV fertőzöttségéről már számos európai országból beszámoltak (Kalashyan és mtsai, 1994; Topchiiska, 1994; Crescenzi és mtsai, 1995; Nemchinov és mtsai, 1998; Kölber és mtsai, 1998b; Navrátil és mtsai, 2004; Tolay Arikán és mtsai, 2004; Mikec és mtsai, 2006; Zagrai és mtsai, 2008). PPV-C izolátumok előfordulását a moldáviai és az olaszországi észleléseken felül hazánkból is közölték (PPV-Van; Nemchinov és mtsai, 1998).

A PPV-SoC, illetve a PPV-SwC, valamint más PPV-izolátumok között molekuláris szinten a legnagyobb különbségek a CP N-terminális részének megfelelő származtatott aminosav szekvenciában mutatkoztak (Nemchinov és mtsai, 1996, Fanigliulo és mtsai, 2003). A nagyfokú szekvenciabeli eltérés, valamint a nem szokványos természetes gazdanövénykör alapján arra következtettek, hogy a PPV-SoC izolátum egy eddig ismeretlen, a PPV-vel feltehetően rokon vírus és egy PPV-izolátum közötti nem-homológ rekombinációs esemény terméke (Nemchinov és mtsai, 1996).

A meggyet és cseresznyét fertőző moldáviai és olasz izolátumokat kísérleti körülmények között levéltetvekkel, mechanikai inokulálással, és oltással átvitték számos lágyszárú tesztnövényre, valamint különböző *Prunus*-fajokra (köztük szilvára és őszibarackra) (Kalashyan és mtsai, 1994; Nemchinov és Hadidi, 1996; Nemchinov és mtsai, 1996; Crescenzi és mtsai, 1997; Desvignes és mtsai, 1998; Boeglin és mtsai, 2004), ami azt valószínűsítette, hogy más csonthéjas fajok számára is potenciális fertőzési forrásul szolgálhatnak.

A PPV-C izolátumok CP alegységeinek elektroforetikus mobilitása a PPV-D izolátumokéhoz hasonló (Nemchinov és mtsai, 1996; Crescenzi és mtsai, 1997), és specifikus epitópokkal rendelkeznek (Myrta és mtsai, 2000). A CP gén 3' végének megfelelő cDNS-szakaszon *AluI* és *RsaI* felismerő helyek nem találhatók (Nemchinov és mtsai, 1995; Crescenzi és mtsai, 1997).

A természetben meggyről és cseresznyéről a PPV-C izolátumoktól eltérő típusú PPV-izolátumokat is azonosítottak. A PPV-SC, szisztémikus PPV tüneteket mutató meggyfáról származó, levéltetűvel át nem vihető, moldáviai izolátum a CP génnek megfelelő cDNS-szakasz szekvencia analízise alapján a PPV-D típusú izolátumokhoz sorolható (Maiss és mtsai, 1995). Csoport-specifikus RT-PCR vizsgálat és az N1b gén 3' végétől a CP gén 5' végéig terjedő genomi régióinak (3'N1b–5'CP) megfelelő cDNS szekvencia analízise alapján Csehországban cseresznyéről nemrég egy PPV-Rec izolátumot mutattak ki (Navrátil és mtsai, 2008).

3.6.6. PPV-Winona (PPV-W) csoport

A csoport eddig ismert egyetlen tagja egy kanadai izolátum (PPV-W3174), mely gyümölcsén tünetmentes, és levelein is csak enyhe tüneteket mutató szilvafáról származik (James és mtsai, 2003). A CP gén 3' végének RT-PCR analízisét követő *RsaI* és *AluI* enzimekkel végzett RFLP vizsgálat alapján arra lehetett következtetni, hogy ez az izolátum a PPV-C csoport képviselője, mivel egyik hasító hely sem volt jelen a PCR-terméken. A PPV-C izolátumok azonosítására alkalmas csoport-specifikus primerekkel, valamint csoport-specifikus monoklonális antitestekkel végzett vizsgálatok azonban negatív eredményt adtak (James és mtsai, 2003). James és Varga (2005) az izolátum teljes nukleotid sorrendjét is meghatározták (2. táblázat). A teljes szekvencia, vagy csupán az N1b, a CP vagy 3'UTR régióinak megfelelő cDNS-szakaszok nukleotid, illetve abból származó aminosav sorrendjének bevonásával végzett filogenetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a PPV-W3174 a PPV-izolátumok egy új, sajátos csoportját képviseli, mely a legközelebbi rokonságot a PPV-C izolátumokkal mutatja. Myrta és mtsai (2006) a genom P1 gén 3' végétől a HC-Pro gén 5' végéig terjedő régiójában (801–1450. nt pozíció) rekombinációra utaló jelet mutattak ki. Ennek a régióinak megfelelő cDNS nukleotid szekvenciáját vizsgálva a PPV-W3174 izolátum a PPV-M csoporthoz tartozik. Így a szerzők feltételezik, hogy a PPV-W3174 izolátum genomjának kialakulásában egy PPV-M izolátum (vagy annak őse) részvételével lezajló rekombinációs esemény közrejátszott.

A PPV-W3174 izolátum CP alegységeinek elektroforetikus mobilitása a PPV-D izolátumokéhoz hasonló. A CP gén 3' végének megfelelő cDNS-szakaszon az *AluI* és *RsaI*

enzimek felismerő helye nincs jelen. A 3'P3–6K₁–5'CI régiónak megfelelő PCR-termék *AsnI* hasító helyet nem, míg egy *EcoRI* és több (legalább három) *DdeI* helyet tartalmaz (James és mtsai, 2003).

3.6.7. PPV-Recombinant (PPV-Rec, PPV-R) csoport

3.6.7.1. RNS rekombináció

A növényi RNS vírusok nagyfokú genetikai variabilitással rendelkeznek (García-Arenal és mtsai, 2001, 2003). A változékonyság fontos forrásai a mutáció és a rekombináció. A rekombinációnak jelentős szerepe van az RNS vírusok evolúciójában, a vírus replikáz által okozott hibák kijavításában, és valószínűleg az adaptációban is (Lai, 1992, 1995; Simon és Bujarski, 1994; Nagy és Simon, 1997; Worobey és Holmes, 1999). Az RNS rekombináció szintén szerepet játszik a defektív interferáló (DI) RNS-ek keletkezésében, melyek képződése számos állati és növényi vírusnemzetségben jellemző (Furuya és mtsai, 1993; White és Morris, 1994).

Amíg az interspecifikus rekombináció a különböző funkcionális egységek nem rokon fajok közötti cseréjével feltehetően fontos szerepet játszott a vírusok makroevolúciójában (Moonan és mtsai, 2000; Desbiez és Lecoq, 2004), addig az intraspecifikus rekombináció közvetlenül hozzájárul a fajon belüli genetikai változékonysághoz (Bousalem és mtsai, 2000; Tomimura és mtsai, 2003).

Az RNS rekombináció során két eltérő RNS molekula asszociálódása történik, melynek következtében új genetikai kombinációk jöhetnek létre (Mohay, 1986). Az RNS rekombinációnak három típusát különböztetjük meg. Homológnak azt a rekombinációt nevezzük, mely két, szekvenciájában erősen homológ, hasonló vagy közeli rokon RNS molekula között megy végbe úgy, hogy a létrejött rekombináns molekula megőrzi a szülői molekulák szekvenciáját és szerkezeti felépítését. Az aberráns-homológ rekombináció ugyancsak két szekvenciájában hasonló RNS molekula között megy végbe, de a rekombináns RNS szerkezetében eltér a szülői molekuláktól, deléció vagy duplikációt hordoz. A nem-homológ rekombináció olyan RNS molekulák között történik meg, melyek szekvenciájukban eltérnek egymástól (Lai, 1992).

Az RNS vírusoknál a rekombináció a replikációhoz kapcsolódik, és leggyakrabban templát cserével („template switching”) valósul meg. A replikáció során a vírus replikáza abbahagyja az új szál (nascent) hosszabbítását, és leválik a templát szálról (template), majd vagy egy másik RNS szálhoz, vagy az eredeti templáton egy másik helyhez kapcsolódik – az újonnan épülő szál már elkészített részét primerként használva – és ott folytatja a szál hosszabbítását (Simon és Bujarski, 1994; Nagy és Simon, 1997; Aaziz és Tepfer, 1999).

Homológ és nem-homológ rekombinációt is feljegyeztek természetes körülmények között számos növényi vírusnemzetségnél, köztük a *Bromovirus* (Allison és mtsai, 1989), a *Nepovirus* (Le Gall és mtsai, 1995), a *Tobravirus* (MacFarlane, 1997; Swanson és MacFarlane, 1999), a *Cucumovirus* (Fraile és mtsai, 1997; Bonnet és mtsai, 2005; Kiss és mtsai, 2008), a *Closterovirus* (Rubio és mtsai, 2001) és a *Potyvirus* (Cervera és mtsai, 1993) nemzetségeknél. A *Potyvirus* nemzetségen belül ezidáig néhány faj, köztük a PPV esetében sikerült természetes rekombináns izolátumot kimutatni (Cervera és mtsai, 1993; Revers és mtsai, 1996; Bousalem és mtsai, 2000, 2003; Glais és mtsai, 2002; Glasa és mtsai, 2002a, 2004; Ohshima és mtsai, 2002; Tomimura és mtsai, 2003; Desbiez és Lecoq, 2004; Krause-Sakate és mtsai, 2004; Moreno és mtsai, 2004; Tan és mtsai, 2004). Revers és mtsai (1996) eredményei szerint a rekombinánsok előfordulásának gyakorisága a különböző potyvírusfajok között nagymértékben eltérő.

A vírus RNS-ek között bekövetkező rekombinációt kísérleti körülmények között is bizonyították (Cascone és mtsai, 1990; Gal-On és mtsai, 1998). Rekombinációs folyamatokat a fertőző vírus RNS-ek, és azokhoz szekvenciájukban hasonló, vírus eredetű transzgenekről keletkező mRNS-ek között is megfigyeltek már transzgenikus növényekben (Greene és Allison, 1994; Varrelmann és mtsai, 2000). A transzgenikus növényekben a vírus ellenállóságot legtöbbször patogéntől származtatott rezisztenciával érik el, melynek során vírus eredetű szekvenciákat építenek be a növényi genomba (Baulcombe, 1996). A transzgenről keletkező mRNS és a vírus RNS közötti rekombináció következtében megváltozott biológiai tulajdonságokkal (virulenciával, gazdanövénykörrel, illetve vektorátviteli móddal) rendelkező teljesen új vírusok vagy vírustörzsek alakulhatnak ki, ami a transzgenikus növények felhasználásának ökológiai kockázatát vetette fel (Schoelz és Wintermantel, 1993; Robinson, 1996; Tepfer, 2002). A fent említett példákon kívül rekombináció vírus RNS-ek és endogén növényi mRNS-ek között is létrejöhet, ahogy azt egy luteovírus és egy kloroplasztisz exon között, szekvenciavizsgálaton alapulva kimutatták (Mayo és Jolly, 1991), de ugyanakkor vírusnukleinsav-szakaszok a növényi genomba is integrálódhatnak (Harper és mtsai, 1999).

Az RNS rekombináció bekövetkeztéhez szükséges, hogy a rekombinálódó RNS-ek egy sejtben helyezkedjenek el. A PPV-izolátumok különböző típusainak (PPV-D és PPV-M, PPV-D és PPV-Rec, PPV-M és PPV-Rec) egyazon növényben való előfordulását feljegyezték már a természetben, ami lehetőséget szolgáltat a rekombináció bekövetkezéséhez (Candresse és mtsai, 1998; Myrta és mtsai, 1998a, 2001; Navrátil és mtsai, 1998; Szemes és mtsai, 2001; Kollerová és mtsai, 2006; Dallot és mtsai, 2008; Kajic és mtsai, 2008; Kamenova, 2008). Különböző vírusokon végzett sejtlokalizációs vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy az

eltérő vírusfajok, vagy vírus típusok elsősorban egymástól elkülönülten, különböző sejtekben fordulnak elő a fertőzött növényekben, ami potenciálisan korlátozhatja a rekombináció bekövetkeztét (Divéki és mtsai, 2002; Dietrich és Maiss, 2003). A PPV esetében Capote és mtsai (2006) PPV-D és PPV-M típusú izolátumok közötti rekombináció bekövetkezésének lehetőségét vizsgálták különböző japánszilva-fajtákban. Kísérletük során 7 év elteltével sem tudtak rekombinációt kimutatni a különböző izolátum típusok között.

3.6.7.2. A PPV-Rec izolátumok biológiai tulajdonságai

A PPV-Rec izolátumok többségét eddig szilvafákról izolálták, de más csonthéjas fajokat is fertőznek a természetben. Őszibarackon való természetes előfordulásukról azonban ezidáig még nem számoltak be (3. táblázat). Szemzéssel, és levéltetvekkel különböző *Prunus*-fajokra (szilva, kajszli, őszibarack) kísérletileg átvihetők (Glasa és mtsai, 2002a, 2004, 2005). A levéltetű-átvitel hatékonysága azonban növényfaj függő, őszibarack esetében csak csekély mértékű. Úgy tűnik, hogy a PPV-Rec izolátumok a PPV-M izolátumokhoz képest kevésbé alkalmazkodtak az őszibarackhoz, és megőrizték a legtöbb PPV-D izolátum azon tulajdonságát, hogy nem képesek az őszibarackot hatékonyan fertőzni (Glasa és mtsai, 2002a, 2004).

Egyes PPV-Rec izolátumok (PPV-Serbia-MI, PPV-Serbia-T, PPV-BOR-3, PPV-BOS64PL, PPV-BOS153PL, PPV-BOS257PL) a *Prunus persica* cv. GF305 növényeket tünetmentesen fertőzik, vagy csak gyenge, rövid ideig látható tüneteket okoznak, ami feltehetően a rekombináns izolátumok egy sajátos biológiai tulajdonságának tekinthető (Glasa és mtsai, 2002a, 2005; Matic és mtsai, 2006, Candresse és mtsai, 2007). Mivel a *Prunus persica* cv. GF305 őszibarack a PPV egy széleskörűen használt és általánosan elfogadott hatékony fás szárú indikátor növénye (OEPP/EPPO, 2004), így a tünetmentesen fertőző rekombináns PPV-izolátumok létezése megkérdőjelezi azok kimutatására való alkalmasságát.

3.6.7.3. A PPV-Rec izolátumok szerológiai jellemzői

A PPV-Rec izolátumokat, azok sajátos genetikai felépítéséből fakadóan a PPV-M csoport-specifikus monoklonális antitestek felismerik (Candresse és mtsai, 1998; Glasa és mtsai, 2005; Myrta és mtsai, 2005; Matic és mtsai, 2006).

Több rekombináns PPV-izolátum esetében megfigyelték, hogy CP alegységeik SDS-PAGE során dupla sávként jelennek meg (Šubr és Glasa, 1999; Glasa és mtsai, 2005), ami feltehetően a PPV-Rec izolátumok olyan konzervatív és megkülönböztető sajátossága, melynek vizsgálatával a PPV-D és PPV-M izolátumoktól elkülöníthetők. A rekombináns

izolátumok különös CP vándorlási mintázata feltehetően néhány translációt követő CP módosulás eredménye (Glasa és mtsai, 2005).

3.6.7.4. A PPV-Rec izolátumok molekuláris jellemzői

Glasa és mtsai (2004) különböző európai országokból származó, nagyszámú PPV-izolátum molekuláris és filogenetikai vizsgálata során kimutatták, hogy a rekombináns PPV-izolátumokra nagyfokú genetikai hasonlóság jellemző, mely alapján a PPV-izolátumok egy új, önálló csoportjának tekinthetők.

A PPV-Rec csoportba olyan közeli rokon, természetes rekombináns PPV-izolátumok tartoznak, melyek a PPV-M és PPV-D csoportok közötti ősi homológ rekombinációs esemény eredményei (Glasa és mtsai, 2004, 2005). A rekombináns PPV-izolátumok genomján ez idáig két rekombinációs pontot azonosítottak. Közülük az egyik a genom 3' végén, az N1b polimeráz gén 3' régiójában, a 8450. nt pozíció környékén helyezkedik el (Glasa és mtsai, 2002a), mely valamennyi eddig jellemzett PPV-Rec izolátumban megtalálható (Cervera és mtsai, 1993; Glasa és mtsai, 2001, 2002a, 2004, 2005; Myrta és mtsai, 2005; Matic és mtsai, 2006; Kollerová és mtsai, 2006; Zagrai és mtsai, 2008). A PPV-Rec izolátumok 3' végi rekombinációs régiójukban (8433–8449. nt pozíció) magas szintű szekvencia hasonlóságot mutatnak (Cervera és mtsai, 1993; Glasa és mtsai, 2002a, 2004).

Az eddig jellemzett rekombináns PPV-izolátumok – a PPV-Pd4 izolátum kivételével – CP-je N-terminális, hipervariábilis régiójában öt aminosav pozíció specifikusan konzervált (K₂₈₁₄, I₂₈₄₈, T₂₈₅₂, I₂₈₆₈, T₂₈₇₈). A PPV-Pd4 izolátum esetében a 2878. aminosav pozícióban treonin (T) helyett alanin (A) található (Glasa és mtsai, 2002a, 2004).

Az adatbázisokban hozzáférhető PPV-M, PPV-D, PPV-Rec és PPV-C izolátumok teljes genomjának megfelelő cDNS-szekvenciák vizsgálata során Glasa és mtsai (2004) a PPV evolúciós történetében egy jóval ősbibb, ugyancsak a PPV-M és PPV-D csoportok között lezajlott rekombinációs eseményt is kimutattak, és meghatároztak egy másik rekombinációs pontot a genom 5' végén, a P3 gén 5' részén, a 2813. nt pozíció környékén. Megállapították, hogy a rekombináns PPV-izolátumok genomja az 5' és a 3' végi rekombinációs pontok között D-típusú, míg a 3' végi rekombinációs pontot követő szakaszon (3'N1b–CP–3'UTR) M-típusú. Ezenfelül kimutatták, hogy a PPV-D, PPV-M és PPV-Rec izolátumok ősi, közös eredetű 5' régióval rendelkeznek, mely körülbelül az 1–2813. nt pozícióig terjed (5'UTR–P1–HC-Pro–5'P3 régió) (Glasa és mtsai, 2002a, 2004).

A közelmúltban egy különös szerológiai és molekuláris tulajdonságokkal rendelkező, nem a PPV-Rec csoportba tartozó török izolátum (Abricotier Turquie, PPV-Ab-Tk) vizsgálata során a genom 5' végén, a P3 génben előzőleg azonosított rekombinációs ponton felül, egy

újabb, a HC-Pro gén 3' végén (1478–1568. nt pozíciók között) bekövetkezett rekombinációs esemény létezésére is fény derült (Glasa és mtsai, 2005). Ebből arra következtettek, hogy – ahogy azt már más potyvírusok, pl a PVY esetében kimutatták (Glais és mtsai, 2002) – a PPV genom 5' régiója a legjelentősebb rekombinációs aktivitás színtere (Glasa és mtsai, 2005). A PPV-Ab-Tk izolátum CP-je PPV-M és PPV-D specifikus epitópokat is hordozott, a CP génnek megfelelő cDNS nukleotid sorrendje alapján azonban M-típusú szekvenciával rendelkezett, az N1b gén 3' végén rekombinációs pontot nem sikerült kimutatni, 5' genomi régiója pedig mozaikos felépítést mutatott, mely tulajdonságok alapján a PPV populációk egy különös tagjának tekinthető. Glasa és Candresse (2005) a PPV-Ab-Tk izolátum mozaikos felépítésű 5' genomi régiójából kiindulva a PPV evolúciójára vonatkozóan két hipotézist állított fel. Mindkettőben közös, hogy a jelenlegi PPV-izolátumok egy közös, eddig ismeretlen őstől származnak. Feltételezésük szerint az ősi rekombinációs esemény a közös ős, és vagy egy PPV-M vagy egy PPV-D izolátum között zajlott le, melynek következtében vagy a PPV-M, vagy a PPV-D típusú izolátumok ősi rekombinánsoknak tekinthetők. Majd ezt követően következett be a genom 3' végét érintő rekombinációs esemény, melynek során alakultak ki a jelenleg rekombinánsnak nevezett PPV-izolátumok.

Glasa és mtsai (2002a) az adatbázisokban hozzáférhető PPV-izolátumok cDNS-szekvenciáinak vizsgálatát követően felvetették, hogy a PPV-M és PPV-D izolátumok N1b génje 3' végének eltérő jóslható másodlagos struktúrája magyarázatul szolgálhat arra, hogy miért 5'D/3'M típusú rekombináns PPV-izolátumokat mutattak ki és miért nem 5'M/3'D típusúakat.

A 3'P3–6K₁–5'CI régiónak megfelelő PCR-termék *AsnI* helyet nem, míg többségében egy *DdeI* és egy *EcoRI* enzim hasító helyet tartalmaz (Glasa és mtsai, 2002a, 2002b; Matic és mtsai, 2006).

3.6.7.5. A PPV-Rec izolátumok elterjedése

A rekombinációt kezdetben nem tekintették a PPV evolúciójában jelentőséggel bíró folyamatnak. A rekombináns izolátumok azonosítása és jellemzése az 1980-as évek végén kezdődött meg. Az első rekombináns izolátumokat a PPV populációk különleges, nem jellegzetes képviselőiként tartották számon (Cervera és mtsai, 1993; Glasa és mtsai, 2001). Ezzel ellentétben nemrég a PPV-D és PPV-M típusok közötti RNS rekombinációból eredő PPV-izolátumok gyakori elfordulásáról számoltak be számos közép- és kelet-európai országban (Glasa és mtsai, 2002a, 2004).

A legelső természetes rekombináns PPV-izolátumot (PPV-ö6), a valamikori Jugoszlávia területén (Szerbiában) izolálták és a 1990-es évek elején jellemezték. A genom 3' végi

régiójának megfelelő cDNS-szekvencia alapján kimutatták, hogy a PPV-06 izolátum két vad típusú PPV-izolátum közötti természetes homológ rekombináció eredménye (Cervera és mtsai, 1993). Később Glasa és mtsai (2001) egy természetes rekombináns PPV-izolátumról (PPV-BOR-3) számoltak be Szlovákiából, kajsziról, majd számos rekombináns PPV-izolátum előfordulásáról tudósítottak különféle szilvafajtákról, Nyugat- és Közép-Szlovákia különböző területeiről (Glasa és mtsai, 2002a). Hazánkban két szilváról és egy kökényről származó izolátum (Salamon és Palkovics, 2002) esetében kimutatták azok rekombináns jellegét. Ezt követően a rekombináns izolátumok kutatása felgyorsult, és Európa számos országában (Albániában, Bulgáriában, Csehországban, Németországban, Magyarországon) igazolták gyakori jelenlétüket (Glasa és mtsai, 2004) (3. táblázat). Napjainkra már Olaszországban (Myrta és mtsai, 2005) és Bosznia-Hercegovinában (Matic és mtsai, 2006) is kimutatták jelenlétüket, de természetes előfordulásuk a többi európai országban sem zárható ki. Franciaországban is végeztek ez irányú kutatásokat, de a rekombinánsok jelenlétét nem sikerült igazolni (Glasa és mtsai, 2002a; Dallot és mtsai, 2008). Ennek ellenére természetesen jelenlétük a francia gyümölcsösökben sem zárható ki. Már Európán kívül, Pakisztánból (Kollerová és mtsai, 2006) is beszámoltak rekombináns PPV-izolátumról, nemrég pedig Törökországban (Candresse és mtsai, 2007), valamint Horvátországban (Kajic és mtsai, 2008) figyelték meg előfordulásukat.

3.6.7.6. A PPV-Rec izolátumok eredete

Feltételezhető, hogy a PPV-Rec izolátumok a valamikori Jugoszlávia területéről kiindulva terjedtek el Közép-, Kelet- és Dél-Európában (Glasa és mtsai, 2005). Lehetségesnek tartják, hogy a valamikori Jugoszlávia területén nemesített sharka-toleráns (a gyümölcsön tüneteket nem mutató) szilvafajták (Stanley, Cacaki fajtakör: Čačanska rana, Čačanska najbolja, Čačanska leptica, Valjevka) (Ranković és mtsai, 1994, 1995) nemzetközi kereskedelme révén jutottak el Európa számos országába. Ezekben a toleráns fajtákban hasonló mértékű a víruskoncentráció, mint a fogékony szilvafajtákban (Glasa nem publikált adat). Kisebb távolságra való terjedésükben a levéltetvek játszhattak fontos szerepet, melyekkel hatékonyan átvihetők (Glasa és mtsai, 2004; Matic és mtsai, 2006). A sharka-toleráns fajtákat az 1980-as évek eleje óta előszeretettel telepítették a hagyományos fogékony fajtákon felül számos európai országban. Szlovákiában és Csehországban is olyan szilvaültetvényekből izoláltak PPV-Rec izolátumokat, melyeket az 1980-as években, részben vagy egészben ilyen szaporítóanyagból (*P. domestica* cv. Čačanska najbolja, *P. domestica* cv. Čačanska leptica) létesítettek (Glasa és mtsai, 2002a; Gadiou és mtsai, 2008).

3.6.8. Magyarországi PPV-izolátum típusok

A hazai ültetvényekben a *Chenopodium foetidum*-on okozott tünetek alapján kezdetben a vírus „sárga” törzse volt általánosan elterjedt (Roy és Smith, 1994), de később a „köztes” és a „nekrotikus” törzs előfordulását is kimutatták (Pribék és Gáborjányi, 1997; Salamon és Palkovics, 2002).

Az 1990-es évek elején hazánkban még csak a PPV-M típus jelenlétét bizonyították, a PPV-SK68 izolátum, melyet dr. Németh Mária gyűjtött Besztercei szilvafajtáról, is ebbe a csoportba tartozott. Az izolátum nukleotid sorrendjét is meghatározták (Palkovics és mtsai, 1993), ez volt az első PPV-M csoportba tartozó teljes szekvencia a világon, és jelenleg ez az egyetlen olyan magyar PPV-izolátum, amelynek teljes nukleotid sorrendje ismert. Akkoriban úgy vélték, hogy a PPV-M típus előfordulása elsősorban Kelet- és Dél-Európára, a PPV-D pedig Nyugat-Európára jellemző (Candresse és mtsai, 1995). Később azonban monoklonális antitestek használatával, illetve RT-PCR vizsgálatot követő RFLP analízissel kimutatták a hazai izolátumok szerológiai és molekuláris sokszínűségét. Megállapították, hogy a PPV-D típus is előfordul, sőt gyakori hazánkban, és a két fő típus közötti átmeneti tulajdonsággal rendelkező izolátumokat is találtak (López-Moya és mtsai, 1997; Pribék és Gáborjányi, 1997, 1998; Pribék és mtsai, 1998, 2001). Egy 'Van' fajtájú cseresznyéről gyűjtött hazai PPV-izolátumról, annak molekuláris biológiai tulajdonságai alapján megállapították, hogy az a PPV-C csoportba tartozik (Nemchinov és mtsai, 1998). A PPV-M csoporton belül Myrta és mtsai (2001) által monoklonális antitestek használatával elkülönített két alcsoport közül az addig jellemzett magyar izolátumok mindegyike a PPV-M2 alcsoportba tartozott, de később egy kökényről származó PPV-izolátum molekuláris vizsgálata során kimutatták, hogy az a PPV-M1 alcsoport (melyet jelenleg már PPV-Rec csoportnak neveznek) egy hazai képviselője (Salamon és Palkovics, 2002). Nemrég további magyar PPV-izolátumok rekombináns jellegét bizonyították (Glasa és mtsai, 2004).

3. táblázat. Rekombináns PPV-izolátumok származási helye, az eredeti gazdanövény és az EMBL/NCBI/DDBJ adatbázisbeli azonosító szám feltüntetésével

Származási hely	Izolátum neve (hivatkozás)	Eredeti gazdanövény	Azonosító szám
Albánia	ALB7 (Glasa és mtsai, 2004)	<i>Prunus domestica</i>	AY553368
	ALB9 (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>	AY553369
	ALB3 (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>	
Bosznia-Hercegovina	BOS64PI (Matic és mtsai, 2006)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptotica	AJ749998
	BOS148PI (Matic és mtsai, 2006)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska rodna	AJ749996
	BOS153PI (Matic és mtsai, 2006)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptotica	
	BOS257PI (Matic és mtsai, 2006)	<i>P. domestica</i> cv. Bjelica	AJ749997
Bulgária	[Bulgarian (Glasa és mtsai, 2004)]	[n. a.]	[X57976]*
	BULG (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>	AY324846, AY553376, AY553374
	Troy1 (Szathmáry és mtsai, 2006)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska rodna	AM260933
	Troy4 (Szathmáry és mtsai, 2006)	<i>P. domestica</i> cv. Kjustendilska	AM260935
	Troy5 (Szathmáry és mtsai, 2006)	<i>P. domestica</i> cv. Gabrovska	AM260936
	Troy6 (Szathmáry és mtsai, 2006)	<i>P. domestica</i> cv. Hanita	AM260937, AM933761
Csehország	13/2 CZ (Navrátil és mtsai, 2008)	<i>Prunus avium</i>	
	302 (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>	AY324845
	BOH1CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptotica	EF504280
	BOH2CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptotica	EF504284
	BOH3CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptotica	EF504279
	BOH4CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptotica	EF504282
	BOH5CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptotica	EF504283
	BOH6CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptotica	EF504281
	Horomerice (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>	AY324844, AY553377, AY553373
	LIP7CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Domáci velkoplodá	EF504286
	LIP10CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Domáci velkoplodá	EF504295
	LIP14CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Domáci velkoplodá	EF504289
	LIP20CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Domáci velkoplodá	EF504293
	LIP23CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Domáci velkoplodá	EF504287
	LIP49CZ (Gadiou és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Domáci velkoplodá	EF504288
Slivoň (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>	AY324843	
Spy4 (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>		
Horvátország	2Rec (Kajic és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i> cv. Valjevka	EU327553
	6Rec (Kajic és mtsai, 2008)	n. a.	EU327554
Lengyelország	J4c	<i>P. domestica</i>	EU117116
Magyarország	B1298 (Szathmáry és mtsai, 2009a)	<i>P. domestica</i>	AM184114, FN179156
	Bt-H (Salamon és Palkovics, 2002)	<i>P. spinosa</i>	AJ306420
	Bt-H2 (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. spinosa</i>	AJ566346
	Gödöllő2	<i>P. armeniaca</i>	FN179153
	Pd4 (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>	AJ566344, AJ620687
	Pd31 (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>	AJ566345, AJ620686
	Sóskút1	<i>P. armeniaca</i> cv. Bergeron	FN179152, FN179155
	Szigetcsép1	<i>P. armeniaca</i>	FN179154

3. táblázat. folytatás

Származási hely	Izolátum neve (hivatkozás)	Eredeti gazdanövény	Azonosító szám
Németország	143A (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>	AY324848, AY553375, AY553372
	ASL-1 (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>	AY324847
	[CG (Glasa és mtsai, 2004)]	[n. a.]	[X81082]*
	[CGG-M2 (Glasa és mtsai, 2004)]	[n. a.]	[AY450594]*
	[CGG-M3 (Glasa és mtsai, 2004)]	[n. a.]	[AY450595]*
	[CGG-M6 (Glasa és mtsai, 2004)]	[n. a.]	[AY450596]*
Olaszország	BR (Myrta és mtsai, 2005)	<i>P. armeniaca</i>	AJ812242
Románia	Bisritra 4, Bisritra 5, Bisritra 9, Bisritra 10, Bisritra 11, Bisritra 13, Bisritra 14, Bisritra 15, Bisritra 17, Bisritra 18, Bisritra 19, Dumitra 2, Dumitra 3, Dumitra 5, Dumitra 6, Dumitra 8, Dumitra 10, Mihaiesti 3, Mihaiesti 6, Mihaiesti 7, Mititei 1, Mititei 2, Mititei 3 (Zagrai és mtsai, 2008)	<i>P. domestica</i>	
Szerbia és Montenegró	ö6 (Cervera és mtsai, 1993)	n. a.	S57404
	Serbia-B (Glasa és mtsai, 2005)	<i>P. domestica</i>	AY690603
	Serbia-MI (Glasa és mtsai, 2005)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska rodna	AY690605, AY690611
	Serbia-PO2 (Glasa és mtsai, 2005)	<i>P. domestica</i> cv. Požegaca	AY690606
	Serbia-PO3 (Glasa és mtsai, 2005)	<i>P. domestica</i> cv. Požegaca	AY690607
	Serbia-ST (Glasa és mtsai, 2005)	<i>P. domestica</i> cv. Stanley	AY690608
	Serbia-T (Glasa és mtsai, 2005)	<i>P. tomentosa</i>	AY690609, AY690612
	Serbia-V (Glasa és mtsai, 2005)	<i>P. domestica</i>	AY690610
Szlovákia	BNE-6 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska najbolja	
	BNE-10 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i> cv. Stanley	AF450311
	BOR-3 (Glasa és mtsai, 2001)	<i>P. armeniaca</i>	AY028309
	BRC-3 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. cerasifera</i>	AF421118
	BRC-4 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. cerasifera</i>	AF421119
	BRC-8 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i>	AF421120
	DV-27, DV-36, DV-37, DV-39, DV-40, DV-46, KRA-64, KRA-65, KRA-66, PL-3, PL-4, PL-5 (Glasa és mtsai, 2004)	<i>P. domestica</i>	
	KRN-1 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptica	AF421121, AF450314
	KRN-3, KRN-8, POD-2 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptica	
	KRN-4 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptica	AF421122
	KRN-6 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska najbolja	
	KRN-7 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptica	AF421123
	LOZ-3 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i>	AF450312
	LOZ-4 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i>	
MYV-1 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska najbolja	AF450315	
MYV-3 (Glasa és mtsai, 2002a)	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska leptica	AF450313	
Pakisztán	Pakistan-Rec (Kollerová és mtsai, 2006)	<i>P. armeniaca</i>	DQ422148
Törökország	Isparta (Candresse és mtsai, 2007)	<i>P. salicina</i>	EF051630

Jelmagyarázat: n. a.: nincs adat, *: csak a CP gént kódoló régiónak megfelelő szekvencia ismert

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Vizsgálatok helye és ideje

A vizsgálatokat 2003 és 2008 között a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Környezetbiotechnológiai Intézet virológiai laboratóriumában és a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar Növénykórtani Tanszékén végeztük.

4.2. Vizsgálatok anyaga

4.2.1. Növények

A kísérletekben vírus inokuláláshoz üvegházi körülmények között nevelt (25 °C, 16 óra megvilágítás) 6–7 hetes *Nicotiana benthamiana* és *N. clevelandii* Gray, a levéltetű-átviteli kísérlethez *N. benthamiana* növényeket használtunk.

4.2.2. Baktérium törzsek

Kísérleteink során a klónozáshoz az *Escherichia coli* DH5 α törzsét, a fertőzőképes klónok felszaporításához az *E. coli* TG90 törzsét használtuk.

4.2.3. Vírus izolátumok

Munkánk során különböző szilva- és kajszi fajokról a PPV fertőzésének jellegzetes tüneteit mutató leveleket gyűjtöttünk. Az izolátumok hazánk négy területéről, Vilyvitányból, Sós-kútról, Gödöllőről és a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszék szigetcsépi kajszi ültetvényéből, valamint Bulgáriából (Troján) a RIMSA (Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture) kísérleti szilvaültetvényéből származtak (4. táblázat).

A rövidebb CP génnel rendelkező PPV-izolátummal (PPV-B1298) kapcsolatos kísérletek során kontrollként Dr. V. Németh Máriától kapott, érdei gyümölcs ültetvényéből származó Besztercei NM 122 szilváról izolált és GF305 őszibarack vonalon fenntartott PPV-M típusú, PPV-SK68 izolátumot, illetve annak fertőzőképes klónját [pPPV-SK68 (p609/13), Palkovics és mtsai, 1993], valamint a PPV-Rec típusú PPV-Pd4 hazai szilva izolátumot használtuk. A pPPV-SK68 fertőzőképes PPV klón a karfiol mozaik vírusból (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) származó 35S promóter mögött a teljes PPV szekvenciát tartalmazta DNS formában.

4. táblázat. A vizsgált bulgáriai és hazai PPV-izolátumok neve, származási helye és ideje, az eredeti gazdanövény neve, csoportbeli hovatartozásuk a CP, a 3'P3–6K₁–5'CI és a 3'HC-Pro–5'P3 régiók hasonlóság-vizsgálata, valamint a 3'P3–6K₁–5'CI régió RT-PCR/RFLP analízise alapján; és az EMBL/NCBI/DDBJ adatbázisbeli azonosító szám feltüntetése

Izolátum neve	Származási hely és idő	Eredeti gazdanövény	Típus				Csoport	Azonosító szám
			3'HC-Pro–5'P3	3'P3–6K ₁ –5'CI		CP		
			Hasonlóság-vizsgálat	RT-PCR/RFLP	Hasonlóság-vizsgálat	Hasonlóság-vizsgálat		
PPV-B1298	Vilyvitány, 1998	<i>Prunus domestica</i>	n. v.	n. v.	n. v.	M (Rec)	PPV-Rec	AM184114 ^a
PPV-Troy1	Troján (Bulgária), 2004	<i>P. domestica</i> cv. Čačanska rodna	n. v.	D	n. v.	M (Rec)	PPV-Rec	AM260933 ^a
PPV-Troy2	Troján (Bulgária), 2004	<i>P. domestica</i> cv. Stanley	n. v.	D	n. v.	D	PPV-D	AM260934 ^a
PPV-Troy4	Troján (Bulgária), 2004	<i>P. domestica</i> cv. Kjustendilska	n. v.	D	n. v.	M (Rec)	PPV-Rec	AM260935 ^a
PPV-Troy5	Troján (Bulgária), 2004	<i>P. domestica</i> cv. Gabrovska	n. v.	D	n. v.	M (Rec)	PPV-Rec	AM260936 ^a
PPV-Troy6	Troján (Bulgária), 2004	<i>P. domestica</i> cv. Hanita	D	D*	D	M (Rec)	PPV-Rec	AM260937 ^a , AM933761 ^c
PPV-Sóskút1	Sóskút, 2008	<i>P. armeniaca</i> cv. Bergeron	n. v.	D*	D	D	PPV-D	FN179152 ^a , FN179155 ^b
PPV-Gödöllő2	Gödöllő, 2008	<i>P. armeniaca</i>	n. v.	D	n. v.	M (Rec)	PPV-Rec	FN179153 ^a
PPV-Szigetsép1	Szigetsép, 2008	<i>P. armeniaca</i> 10/7 jelű hibrid	n. v.	D	n. v.	D	PPV-D	FN179154 ^a

Jelmagyarázat: n. v.: nem vizsgált, *: atipikus restrikciós mintázat, a: 3'NIb–CP–3'UTR, b: 3'P3–6K₁–5'CI, c: 3'HC-Pro–5'CI.

4.2.4. Plazmidok és fertőzőképes vírusklónok

A klónozáshoz a pBluescript II SK(+) (Stratagene) és a pGEM-T Easy (Promega) plazmidokat használtuk.

A rövidebb PPV CP gént hordozó fertőzőképes cDNS klón [pPPV-SK68CPB1298 (P634/11)] előállításához, valamint a 3'P3–6K₁–5'CI régióknak megfelelő cDNS-en elhelyezkedő jellemző restrikciós hasító helyekben pontmutációval rendelkező PPV-izolátumokkal végzett vizsgálatokhoz a pPPV-SK68 fertőzőképes klónt alkalmaztuk.

4.2.5. Oligonukleotid indítószekvenciák (primerek)

A felhasznált primerek (5. táblázat) szintézisét a Csertex Kft. és a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban Egedi Sándor végezte.

5. táblázat. A vizsgált PPV-izolátumok molekuláris biológiai jellemzéséhez használt primerek neve, nukleotid szekvenciája és orientációja, a felhasználási cél megjelölésével

Primer neve	Szekvencia 5'–3'(forrás)	Orientáció	Felhasználási cél
PPV-P3-RC	CAAGGATCCTGCGATTCCAAGATTGCA	antiszensz	RT-PCR, szekvenálás
PPV-HC-RC	ATACCGCGGATCACTGTCAACTGGAATGC'	szensz	RT-PCR, szekvenálás
PCI	TTGAGTCAAATGG(AG)ACAGTTGG (Glasa és mtsai, 2002b)	antiszensz	RT-PCR, szekvenálás
PP3	TTATCTCCAGGA(AG)TTGGAGC (Glasa és mtsai, 2002b)	szensz	RT-PCR, szekvenálás
PolyT ₂	CGGGGATCCTCGAGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	antiszensz	RT-PCR, szekvenálás
Poty7941	GGAATCCC CGG(AGCT)AA(CT)AA(CT)AG(CT)GG(AGCT)CA(AG)CC	szensz	RT-PCR, szekvenálás
Unipoty	GGAATCCC CGGAAAAGCCCCGTACATTGC (Deborré és mtsai, 1995)	szensz	szekvenálás
PPV-CP5	CACTACACTCCCCTCACACCGAGG	antiszensz	szekvenálás
PPV-CP4	CTACATCAGATAACAAGGGCCTGTG	antiszensz	szekvenálás

4.2.6. Vegyszerek, enzimek, kitek

Munkánk során az oldatok és táptalajok elkészítéséhez különböző, kereskedelmi forgalomban kapható vegyszereket használtunk (elsősorban Reanal, Sigma, Duchefa termékeket). A restrikciós endonukleázokat, a DNS-polimerázt és a deoxiribonukleotidokat (dNTP) a Fermentas-tól szereztük be. A GelRed fluoreszcens festéket az Izinta szállította. A PCR-termékek és más DNS-szakaszok izolálásához Roche (High Pure Purification Kit), szekvenálásra történő plazmid tisztításhoz Bio-Rad (Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit) kitekét használtunk. A PPV-B1298 vírus izolátum CP szerológiai módszerrel (Western blot) történő kimutatásához a következő kitekét alkalmaztuk: Bioreba PPV ELISA Kit, DSMZ PPV

ELISA Kit, Real Durviz PPV ELISA Kit, Sanofi Planttest PPV ELISA Kit. Az alkalikus foszfátazzal nem konjugált ellenanyagokhoz a Sant Cruz Biotechnology anti-nyúl IgG alkalikus foszfátáz konjugátumát használtuk.

4.3. Vizsgálatok módszere

4.3.1. Mechanikai vírusátvitel

A fertőzött növények présnedvével *N. benthamiana* és *N. clevelandii* dohánynövényeket fertőztünk. Az inokulumokat a PPV-fertőzés tüneteit mutató szilva és kajszi levelekből steril, hűtött dörzscsészében végzett homogenálással állítottuk elő. Az inhibitorok jelenléte miatt homogenálás előtt a levelekhez 1:5 (v/w) arányban feltáró puffert (6,7 mM foszfát puffer pH: 7,0; 3% PEG 6000; 1 mg/ml aktív szén) adtunk. Abrázívumként celitet (10–40 µm) használtunk, melyet finom eloszlásban a tesztnövények leveleire szórtunk, majd az inokulumokkal óvatosan bekentük a kísérleti tesztnövények 3-3 levelének felületét.

4.3.2. Össznukleinsav-kivonás levélszövetből

Az össznukleinsav-kivonást *N. benthamiana* dohánynövények szisztemikus tüneteket mutató leveleiből White és Kaper (1989) módszere szerint végeztük kisebb módosításokkal. Az RNS vírusok sérülékenysége miatt hűtött eszközöket használtunk. Két kis levélkorongnyi (kb. 5 mg) növényi mintát 600 µl TNA extrakciós puffer (50 mM Tris pH: 7,6; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,3% 2-merkaptó-etanol) és 600 µl fenol jelenlétében hűtött dörzscsészében homogenáltunk. Centrifugálást követően a felülúszót 600 µl fenol-kloroform 1:1 (v/v) arányú keverékével, majd ismételt centrifugálás után 600 µl kloroformmal extraháltuk. Újabb centrifugálást követően 600 µl felülúszót 1 ml abszolút alkohollal 20 µl 4 M-os nátrium-acetát (pH: 5,4) jelenlétében kicsaptunk, majd azonnali centrifugálással a nukleinsavakat összegyűjtöttük. A csapadékot 1 ml 70%-os alkohollal mostuk, majd vákuum koncentrátorban 7–12 percig szárítottuk. Végül a nukleinsavakat 40 µl steril desztillált vízben oldottuk fel. A kivonatokat fluoreszcens festéket (etidium-bromid vagy GelRed) tartalmazó 1%-os TBE agarózgélen [1x TBE (12,11 g Tris; 5,135 g bórsav; 0,372 g EDTA 1000 ml desztillált vízben), 1% agaróz] elektroforézissel ellenőriztük, és felhasználásig –70 °C-on tároltuk.

4.3.3. RT-PCR

A jellemezni kívánt PPV-izolátumok esetén a vírus RNS-eket is tartalmazó össznukleinsav-kivonatból a megfelelő antiszensz primer felhasználásával reverz transzkripció (reverse transcription, fordított átírás, RT) során állítottuk elő a

vírusnukleinsavval komplementer DNS első szálát. A reakcióelegy a következő komponensekből állt: 4 µl össznukleinsav, 100 pmol antiszensz primer (PolyT₂ vagy PPV-P3-RC vagy PCI), 2 µl 5x RT puffer (250 mM Tris-HCl pH: 8,3; 250 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 50 mM DTT), 1 µl 5 mM-os dNTP keverék, 100 u M-MuLV reverz transzkriptáz, 20 u RiboLock ribonukleáz inhibitor, desztillált vízzel 10 µl végtérfogatra kiegészítve. Az össznukleinsavat az antiszensz primer jelenlétében 65 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd az elegyet 2 percig jégen hűtöttük. Ezt követően adtuk hozzá a reakcióelegy többi komponensét. A reverz transzkripció 42 °C-on 1 óráig tartott. A cDNS-t közvetlenül felhasználtuk, vagy –20 °C-on tároltuk.

A vírusszekvenciáról készült DNS másolatokat PCR során sokszoroztuk meg a megfelelő antiszensz (PolyT₂ vagy PPV-P3-RC vagy PCI) és szensz (Poty7941 vagy PPV-HC-RC vagy PP3) primerek felhasználásával. A PCR Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 készüléken történt. A PCR-analízist 50 µl végtérfogatban végeztük. A reakcióelegy 3 µl – az RT reakcióból származó – cDNS-t, 5 µl 10x Taq puffert (750 mM Tris-HCl pH: 8,8; 200 mM (NH₄)SO₄; 0,1% Tween 20), 3 µl 25 mM-os MgCl₂-ot, 2 µl 5 mM-os dNTP keveréket, 20-20 pmol antiszensz és szensz primert, valamint 2,5 u Taq DNS polimeráz enzimet tartalmazott.

A PCR során a PolyT₂ és a Poty7941 primerekkel a vírusgenom 3'N1b–CP–3'UTR régiójának megfelelő szakaszát szaporítottuk fel DNS formában, mely régió a 3' végi rekombinációs pontot is magában foglalta. A reakció az alábbi PCR-programon ment végbe: 94 °C 3 min (elődenaturáció), 40 cikluson keresztül 94 °C 15 s (denaturáció), 50 °C 30 s (primerkötés) és 72 °C 3 min (láncépítés), végül 72 °C 10 min (végső láncépítés). A 3'P3–6K1–5'CI genomi régióknak megfelelő DNS másolat felszaporításához a PCI és a PP3 primereket használtuk. A PCR során Glasa és mtsai (2002b) által leírtakat követve, az alábbi paramétereket állítottuk be: 94 °C 5 min, 35 cikluson keresztül 94 °C 1 min, 50 °C 1 min és 72 °C 1 min, a végső láncépítés 72 °C-on 10 min. A vírusgenom 5' végén található rekombinációs pont vizsgálatához a cDNS HC-Pro gén 3' végétől a P3 gén 5' végéig terjedő genomi régióknak megfelelő szakaszának (3'HC-Pro–5'P3) megsokszorozását Glasa és mtsai (2004) által leírtaknak megfelelően a PPV-P3-RC és PPV-HC-RC primerek felhasználásával az alábbi PCR-programon végeztük: 94 °C 5 min, 35 cikluson keresztül 94 °C 45 s, 54 °C 45 s és 72 °C 1 min, majd végül 72 °C 10 min.

A PCR-termékeket fluoreszcens festéket tartalmazó 1%-os TBE agarózgélben tettük láthatóvá. Az elektromos térbe helyezett gélben a negatív töltésű nukleinsavak a pozitív pólus felé mozogtak. A vándorlás gyorsaságát a molekula mérete határozta meg. Az egyes fragmentumok fluoreszcens festék jelenlétében ultraibolya fényben láthatóvá váltak.

4.3.4. A PCR-termékek restrikciós analízise

Az RT-PCR során a 3'P3–6K₁–5'CI genomi régióról készült cDNS-szakaszt olyan restrikciós endonukleázokkal [*DdeI* (*HpyF3I*), *EcoRI*] hasítottuk, melyek csak a vizsgált régióban D-típusú genomú izolátumokról készült DNS-szekvenciákat ismerik fel (Glasa és mtsai, 2002b). A restrikciós analízis 37 °C-on 1 óráig tartott. A hasítás után keletkezett DNS-fragmentumok elválasztását, és méretének meghatározását fluoreszcens festéket tartalmazó 1%-os TBE agarózgélben elektroforézissel végeztük.

4.3.5. A PCR-termékek klónozása

A vizsgált genomi régiók nukleinsav szintű elemzéséhez a megfelelő méretű PCR-fragmentumot 1%-os agarózgélből High Pure Purification Kittal izoláltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A tisztított PCR-termékek klónozása kétféle plazmiddal történt. Tisztítást követően a cDNS-szakaszt (i) vagy olyan restrikciós endonukleázokkal [*SacII* (*Cfr42I*) és *BamHI*] hasítottuk, melyek felismerő helyei a primerek szekvenciáiban is megtalálhatók voltak, és az így kapott fragmentumot ugyanezen enzimekkel vágott ampicillin rezisztencia gént hordozó pBluescript II SK(+) plazmidba ligáltuk, (ii) vagy – mivel a PCR-termék 3' végén extra adenin található – tisztítás után közvetlenül ugyancsak ampicillin rezisztencia gént tartalmazó pGEM-T Easy Vektorba kapcsoltuk, melynek 3' végén extra timin található. A ligálás (az inzert és a plazmid összekapcsolása) egy éjszakán át szobahőmérsékleten (20–24 °C) 10 µl végtérfogatban történt. A reakcióelegy 50–70 ng cDNS-t (inzert; tisztított, illetve tisztított és emésztett PCR-termék), 25 ng plazmidot, 1 µl 10x ligáz puffert (400 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 5 mM ATP; pH: 7,8) és 2,5 u T4 DNS ligázt tartalmazott, desztillált vízzel kiegészítve.

A ligálás után a genetikailag megváltoztatott (rekombináns) plazmidot *E. coli* DH5α plazmidmentes kompetens sejtekbe jutattuk (transzformálás). A kompetens sejtek előállítását és a hősokkos transzformálást Sambrook és mtsai (1989) szerint végeztük. A 10 µl ligátumot 100 µl, 10 percig jégen lassan kiolvastott kompetens baktérium-szuszpenzióval finoman elegyítettük, majd 15 percen át jégen tartottuk. Ezután 1 percre 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd azonnal jégre tettük, ahol 2 percig állt. Végül 400 µl antibiotikum-mentes, folyékony LB táptalaj (10 g/l tripton; 5 g/l élesztőkivonat; 10 g/l NaCl; pH: 7,2) hozzáadása után 37 °C-on 1 órán keresztül rázattuk, 190 rpm fordulatszámmal. Ezt követően 100 µl-nyi szuszpenziót ampicillin tartalmú szilárd LB/IPTG+X-Gal táptalajon szélesztettünk [10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, 10 g/l agar; 50 µg/ml ampicillin; szélesztés előtt a lemez (plate) felszínén 10 µl (100 mM/ml) IPTG-t és 40 µl (20 mg/ml) X-Galt oszlattunk szét egyenletes eloszlásban].

A kész lemezeket, táptalajt tartalmazó oldalukkal felfelé, egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Az antibiotikummal kezelt táptalajon csak azok a baktérium sejtek voltak képesek felszaporodni, amelyek ampicillin rezisztencia gént hordoztak. A ligálás sikerességét az ún. „kék-fehér” szelekció segítségével értékeltük. Azok a baktérium kolóniák, amelyekben az inzert beépülése következtében a plazmidban lévő enzim működésképtelenné vált fehér színűek lettek, míg azok, amelyekben az inzert nem épült be a plazmidba kék színűek voltak. Ennek ismeretében minden lemezről 4–6 különálló, fehér színű telepet oltottunk le steril fogpiszkáló felhasználásával. A fogpiszkálóval leemeltünk egy kolóniát, és először egy mesterlemezhez (masterplate) érintettük, majd 2 ml 50 µg/ml ampicillin tartalmú, folyékony LB táptalajt tartalmazó üvegcsőbe tettük. A csöveget lezártuk, és egy éjszakán át 37 °C-on rázattuk, 190 rpm fordulatszámmal. Az eredeti telepek felszaporítására szolgáló mesterlemezt, egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

4.3.6. A plazmid tisztítása és az inzert ellenőrzése

A baktérium sejtéből a rekombináns plazmid DNS tisztítását alkalikus lízisen alapuló minipreparálással végeztük. A ligálás sikerességének ellenőrzéséhez a plazmidot Sambrook és mtsai (1989) szerint a következőképpen izoláltuk. A táptalaj eltávolításához a folyékony baktérium sejt-kultúrát 3 percig 13400 rpm fordulatszámon, szobahőmérsékleten centrifugáltuk (Eppendorf), majd az összegyűjtött baktérium sejteket 200 µl „A” (sejt szuszpendáló) oldatban (15 mM Tris-HCl pH: 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM glükóz) szuszpendáltuk, és 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezután 400 µl „B” (sejt lízis) oldattal [0,2 M NaOH, 1% SDS], majd 300 µl „C” (semlegesítő) oldattal (3 M nátrium-acetát; 11,5% ecetsav) történt elegyítést követően 5 percig jégre tettük az elegyet. A kicsapott nemkívánatos sejtalkotók maradványait 5 perces, szobahőmérsékleten végzett centrifugálással távolítottuk el. A felülúszóból az oldott állapotban lévő nukleinsavakat kétszer csaptuk ki: először 600 µl izopropanollal, majd a centrifugálással összegyűjtött nukleinsavak 200 µl „D” oldatban (0,1 M nátrium-acetát pH: 7,0; 50 mM Tris-HCl pH: 8,0) történt visszaoldását követően 400 µl abszolút alkohollal. A csapadékot vákuum koncentrátorban 7–10 percig szárítottuk. Végül a nukleinsavakat 50 µl 1x-es RN-áz TE-ben [10 mM Tris pH: 7,6; 1 mM EDTA; 10 µl (10 mg/ml) RN-áz] oldottuk fel. Az inzertek ellenőrzését a pBluescript II SK(+) plazmidba történt ligálás esetén *SacII* és *BamHI* endonukleázok, míg a pGEM-T Easy Vector használatakor *EcoRI* restrikciós enzim alkalmazásával végeztük. A reakcióelegyet 1 órán át 37 °C-on tartottuk. A hasítás után keletkezett DNS-fragmentumokat fluoreszcens festéket tartalmazó 1%-os TBE agarózgélben tettük láthatóvá.

Szekvencia meghatározáshoz a plazmidot Quantum Prep Plasmid Miniprep Kittel a gyártó utasításainak megfelelően izoláltuk.

4.3.7. A B1298 rövidebb CP gént hordozó fertőzőképes cDNS klón előállítása

A PPV-B1298 vírus izolátumról készült, a rövidebb CP-t kódoló genomi régiót is tartalmazó, RT-PCR során a PolyT₂ és Poty7941 primerpár felhasználásával felszaporított cDNS-t *Sac*II és *Bam*HI hasítást követően ugyanezen enzimekkel vágott pBluescript II SK(+) plazmidba ligáltuk. Az így kapott B1298/3 plazmidból a rövidebb CP génnek megfelelő DNS-szakaszt *Eco*RI és *Hind*III enzimekkel klónoztuk a p616/6 klón ugyanezen helyeire, mely a p633/3 plazmidot eredményezte. A p616/6 klón a pPPV-SK68 fertőzőképes cDNS klónból származott, és a PPV-SK68 izolátumról származó cDNS-ből csak a 7633–9786. nt-ig terjedő genomi régióknak megfelelő szakaszt tartalmazta. A p633/3 plazmid *Nco*I–*Bam*HI szakaszát kivágva, és azt az ugyanezen enzimekkel hasított pPPV-SK68 klónba beépítve kaptuk a pPPV-SK68CPB1298 (P634/11) klónt. A pPPV-SK68CPB1298 fertőzőképes klón 35S promóter mögött DNS formában tartalmazta a PPV teljes genomját, de a PPV-B1298 rövidebb CP gént hordozta.

4.3.8. Inokulálás a B1298 rövidebb CP gént hordozó fertőzőképes PPV klónnal és a fertőzőképesség megállapítása

A rövidebb PPV CP gént hordozó fertőzőképes pPPV-SK68CPB1298 cDNS klónnal 4–6 leveles *N. benthamiana* növényeket mechanikailag inokuláltunk. Növényenként 3-3 celittel beszórt, kifejlett levelet fertőztünk üvegspatulával. Az inokulum 10 µg plazmidot és 2,5 mM foszfát puffert (pH: 7,5) tartalmazott 60 µl végtérfogatban. Kontrollként az eredeti izolátumot (PPV-B1298) és a pPPV-SK68 fertőzőképes klónt használtuk. A fertőzőképességet szemrevételezéssel (szisztémikus tünetek megjelenése), valamint a PolyT₂ és a Poty7941 primerekkel végzett RT-PCR analízissel igazoltuk.

4.3.9. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus virionjainak vizsgálata

A víruspartikulumok kialakulását és morfológiai vizsgálatát Zeiss EM910 típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal negatív festéses módszerrel végeztük. Egy csepp tisztított vírusszuszpenziót egy előzetesen műanyag hártáival bevont, aranyozott mintahordozó fémrácsra (gridre) cseppentettünk. A víruspreparátum hártáéhoz kötődése után egy csepp 1%-os uranil-acetát oldatot pipettáztunk a gridre, majd desztillált vizes mosás és a felesleges folyadék eltávolítása után hagytuk megszáradni. Végül a gridet az

elektronmikroszkópba helyeztük, és megmértük a virionok átmérőjét. Kontrollként a pPPV-SK68 fertőzőképes klónból származó vírus partikulumait vizsgáltuk.

4.3.10. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus átvitele levéltetvekkel

A nem-perzisztens vírusok átvitele levéltetvekkel viszonylag egyszerű, mert 2-3 perces próbaszívás elegendő ahhoz, hogy a parenchimában lévő vírus a rovar szipókájában megtapadjon. A levéltetű-átviteli teszthez szárnyatlan – még szárnykezdeménnyel sem rendelkező – nem-vírushordozó *Myzus persicae* egyedeket használtunk. Forrásnövényként (donor) a pPPV-SK68CPB1298 klónból származó vírussal szisztemikusan fertőzött *N. benthamiana* növényt alkalmaztunk. A levéltetvek 2 órás éheztetés után 5 percig táplálkozhattak a vírusfertőzött *N. benthamiana* forrásnövény levelén. Ezután 10 egyedet ecsettel a fogadó növényekre (akceptor) áthelyeztünk. Akceptorként 5, vírusmentes, fiatal *N. benthamiana* növény szolgált. 24 óra múlva a még életben lévő egyedeket pirimikarb hatóanyagú Pirimor 50 WG inszekticiddel kezeltük. Az átvitel eredményességét 3 hetes inkubációs idő után szemrevételezéssel, valamint a PolyT₂ és a Poty7941 primerekkel végzett RT-PCR analízissel vizsgáltuk.

4.3.11. A B1298 rövidebb CP szerkezetének vizsgálata

A származtatott B1298 CP jóslható harmadlagos szerkezetét számítógépes analízissel, a Genetic Computer Group (GCG) Wisconsin programcsomag 10.0 verzió Madison, Wisc. (Devereux és mtsai, 1984) PLOTSTRUCTURE és PEPTIDESTRUCTURE programjaival vizsgáltuk. Kontrollként egy kökényről származó hazai PPV-izolátum, a PPV-Bt-H (Salamon és Palkovics, 2002) CP harmadlagos struktúráját alkalmaztuk.

4.3.12. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus szerológiai (Western blot) módszerrel történő kimutathatóságának tesztelése

A PPV-B1298 CP kimutathatóságának hatékonyságát különböző gyártóktól származó poliklonális és monoklonális ellenanyagok felhasználásával, Western blot technikával vizsgáltuk. Az összfehérje-kivonást vírusfertőzött *N. benthamiana* növények szisztemikus tüneteket mutató leveleiből Laemmli (1970) módszere szerint végeztük. Két kis levélkorongnyi (kb. 5 mg) növényi mintát 300 µl 1x Laemmli puffer (50 mM Tris-HCl pH: 6,8; 100 mM DTT; 2% SDS; 0,1% brómfenolkék; 10% glicerol) jelenlétében homogenáltunk. Az összfehérje-kivonatokot 3 perces forralást követő centrifugálás után 12%-os poliakrilamid gélen elektroforézissel választottuk el, majd a gélből a fehérjéket egy éjszakán keresztül, alacsony feszültségen (30 V) Hybond-C membránra (Amersham) kötöttük (elektroblottoltuk).

Valamennyi minta esetében azonos mennyiségű összfehérje-kivonatot vittünk fel a géltre. A membránhoz kötődött fehérjéket PPV ellen nyúlban termeltetett poliklonális és monoklonális ellenanyagokkal hibridizáltattuk. Az alkalikus foszfátázzal nem konjugált ellenanyagokhoz anti-nyúl IgG alkalikus foszfátáz konjugátumot használtuk.

4.3.13. Kompetíciós kísérletek

Első lépésként a B1298 rövidebb CP gént hordozó, fertőzőképes pPPV-SK68CPB1298 kiméra klónnal, és a teljes hosszúságú CP gént hordozó, fertőzőképes pPPV-SK68 vad típusú klónnal külön-külön *N. benthamiana* tesztnövényeket mechanikailag inokuláltunk. Két héttel az inokulációt követően Western blot technikával a Real Durviz 5B (IVIA) jelű, PPV-specifikus monoklonális ellenanyag felhasználásával meghatároztuk a két vírussal külön-külön fertőzött indikátor növényekben a vírusok koncentrációját. Ezt követően az első lépésben fertőzött növények szisztémikus tüneteket mutató leveleiből készített szövetnedvvel egészséges *N. benthamiana* növényeket fertőztünk. Az inokuláció kétféle módszerrel történt. Az egyik esetben az egészséges *N. benthamiana* növények azonos leveleit mind a két vírussal együttesen inokuláltuk, míg a másik esetben egyazon egészséges *N. benthamiana* növény különböző leveleit fertőztük, külön-külön a vad típusú, illetve a kiméra vírussal. Ezt az első passzálást két hetes időközökkel még további 5 követte, melyek alkalmával, mind a kétféle inokulációs módszer esetén, a szisztémikus tüneteket mutató levelekben Western blot módszerrel a Real Durviz 5B (IVIA) jelű, PPV-specifikus monoklonális ellenanyag felhasználásával vizsgáltuk a vad típusú és a kiméra vírus akkumulációját.

4.3.14. A vírusgenomról készült cDNS nukleotid szekvenciájának meghatározása (szekvenálás)

A nukleotid sorrend meghatározása a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban BigDye Terminator Cycles Sequencing Kit 3.1 (Applied Biosystems) segítségével ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer automata DNS-szekvenátorral (Applied Biosystems) standard szekvenáló módban történt. Minden izolátum esetében mindegyik régió tekintetében 2-2 klón szekvenálását végeztük el mindkét irányból. A nukleotid sorrend meghatározásához felhasznált primereket az 5. táblázat tartalmazza.

4.3.15. A nukleotid és aminosav szekvenciák vizsgálata

A nukleotid és aminosav szekvenciákat a Genetic Computer Group (GCG) Wisconsin programcsomag 10.0 verzió Madison, Wisc. (Devereux és mtsai, 1984) SEQED, GAP, ASSEMBLE és TRANSLATE programjai segítségével dolgoztuk fel, és az

EMBL/NCBI/DDBJ nemzetközi adatbázisok adatainak felhasználásával elemeztük. A DNS és aminosav szekvenciák hasonlóság-vizsgálatához az EMBOSS-Align (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>; Rice és mtsai, 2000) programját használtuk. A szekvenciák illesztését a CLUSTAL X programmal (Thompson és mtsai, 1997) és a MEGA 3.1 szoftverrel (Kumar és mtsai, 2004), a filogenetikai vizsgálatokat a CLUSTAL X programmal végeztük. A Neighbor-Joining eljárással készített filogenetikai törzsfákat a TREEVIEW program 1.6.6 verziója (Page, 1996) segítségével rajzoltuk meg.

4.3.16. Statisztikai analízis

A filogenetikai törzsfák megbízhatóságának becslésére a nukleotid szekvencia-pozíciók véletlenszerű ismétléses mintavételét és az ezt követő fa szerkesztést 1000-es ismétlésben alkalmazó bootstrap-analízist végeztünk a CLUSTAL X programmal.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Bulgáriai és hazai PPV-izolátumok molekuláris jellemzése

Munkánk során gyűjtött PPV-izolátumok közül nukleotid és aminosav szinten öt bulgáriai, szilváról izolált, valamint három hazai, kajsziról és egy hazai szilváról származó izolátumot vizsgáltunk (4. táblázat).

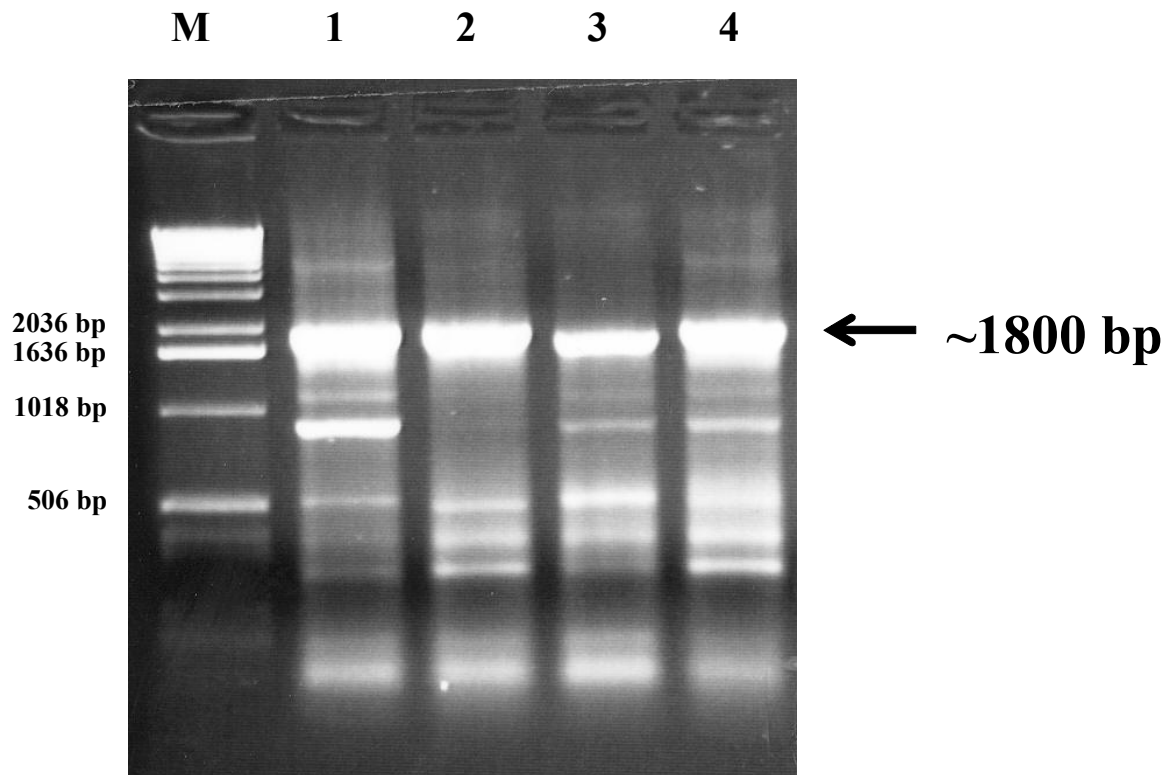
RT-PCR során a *Potyvirus*-specifikus PolyT₂ és Poty7941 primerekkel a vírusgenomról készült cDNS 3'N**ib**–CP–3'UTR régióinak megfelelő, megközelítőleg 1800 bázispár (bp) hosszú fragmentumát, a PCI és PP3 primerpár felhasználásával a 3'P3–6K₁–5'CI régióinak megfelelő, 836 bp hosszú szakaszát, míg a PPV-P3-RC és PPV-HC-RC primerek segítségével a 3'HC-Pro–5'P3 régióinak megfelelő, 654 bp hosszú fragmentumát szaporítottuk fel DNS formában. A PCR-termékek nukleotid szekvenciáját meghatároztuk. A kapott cDNS-szekvenciákat benyújtottuk az European Molecular Biology Laboratory (EMBL) nemzetközi adatbázisba, ahol a következő azonosító számok alatt található meg: AM260933; AM260934; AM260935; AM260936; AM260937, AM933761; AM184114; FN179152, FN179155; FN179153; FN179154 (2. melléklet).

5.1.1. A 3'N**ib**–CP régió molekuláris jellemzése

A cDNS 3'N**ib**–CP–3'UTR genomi régióinak (8. ábra) megfelelő szakaszát mind az öt Bulgáriából (PPV-Troy1, PPV-Troy2, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6) és a négy hazánkból származó (PPV-B1298, PPV-Sóskút1, PPV-Gödöllő2, PPV-Szigetcsép1) PPV-izolátum esetében megszoszoroztuk. A PPV-B1298 izolátum RT-PCR analízise során a várt, megközelítőleg 1800 bp hosszú PCR-fragmentumnál rövidebb termék keletkezett (9. ábra). A PCR-termékek nukleotid, valamint az abból származtatott aminosav szekvenciáját klónozást követően meghatároztuk.



8. ábra. A 3'N**ib**–CP–3'UTR régió elhelyezkedése a PPV genomján



9. ábra. Néhány PPV-izolátummal mechanikailag inokulált *N. benthamiana* RT-PCR analízise
Jelmagyarázat: M: DNS-marker (Invitrogen 1Kb DNA Ladder), 1: PPV-Pd4, 2: PPV-Pd7, 3: PPV-B1298, 4: PPV-Pd31 PPV-izolátumok PolyT₂ és Poty7941 primerekkel felszaporított PCR-termékei. A kb. 1800 bp potyvírus-specifikus PCR-fragmentum (nyíl) a minta PPV fertőzöttségét mutatja.

5.1.1.1. A 3'Nib-CP régió nukleotid és aminosav sorrendjének jellemzése

A PPV-Troy4, a PPV-Troy5, a PPV-Troy6, a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumok esetében az Nib C-terminális végének megfelelő származtatott aminosav sorrend a NIVIHQ↓A, a PPV-Troy2, a PPV-Sóskút1 és a PPV-Szigetcsép1 izolátumok esetében a NVVVHQ↓A, míg a PPV-Troy1 izolátum esetében a NFVIHQ↓A szekvenciával zárult. A levéltetű-átvitelben nélkülözhetetlen szerepet játszó DAG aminosav motívum a származtatott CP N-végének legelején mind a kilenc szekvenciában jelen volt. A jellemezni kívánt PPV-izolátumok cDNS-ből származtatott, CP-nek megfelelő aminosav szekvenciájában mutatkozó eltérések többsége a fehérje N-terminális részén helyezkedett el, a C-terminálisra és a központi régióra a magas szintű konzerváltság volt jellemző (10. ábra). Mindegyik CP alaninnal (A) kezdődött. Az öt bulgáriai, és két hazai kajsi izolátum (PPV-Sóskút1 és PPV-Szigetcsép1) CP-je azonos méretű, 330 aminosav hosszú volt. A szilváról származó PPV-B1298 és a kajsziról gyűjtött PPV-Gödöllő2 magyar izolátumok CP-je azonban rövidebbnek bizonyult. A PPV-B1298 izolátum genomjáról készült cDNS CP génnek megfelelő szakaszán 135 nukleotid (8700–8834. nt pozíció) hosszú deléciót mutattunk ki, mely 45 aminosav

hiánynak felel meg a származtatott CP N-terminális régiójában és nem okozott kereteltolódást. A PPV-Gödöllő2 izolátum nukleotid sorrendjében, a PPV-B1298 izolátuméhoz hasonló pozícióban 33 bázis (8748–8780. nt pozíció) hosszúságú kereteltolódást nem okozó deléciót analizáltunk, mely 11 aminosav hiányt jelent ugyancsak a CP N-terminális részén (10. ábra).

Ezt követően elvégeztük a jellemezni kívánt izolátumok, valamint további 18, a nemzetközi adatbázisokban hozzáférhető PPV-izolátum CP génjének (8577–9566. nt pozíció) megfelelő cDNS nukleotid és abból származó aminosav szekvenciájának hasonlóság-vizsgálatát (identity) (3. melléklet). A bulgáriai izolátumok közül a legmagasabb fokú hasonlóság nukleotid szinten a PPV-Troy4 és a PPV-Troy5 izolátum (99,1%), aminosav szinten pedig ugyanezen két izolátum, valamint a PPV-Troy4 és a PPV-Troy6 izolátumok között (98,5%) mutatkozott. A legalacsonyabb szintű hasonlóságot a PPV-Troy2 és a többi öt bulgáriai izolátum között figyeltük meg, ami nukleotid szinten 85,7%–87,4%, aminosav szinten 88,5%–91,2% között változott. A PPV-Troy2 izolátum a dolgozatban jellemezni kívánt izolátumok közül, nukleotid és aminosav szinten is, leginkább a PPV-Sóskút1 és a PPV-Szigetcsép1 izolátumokhoz volt hasonló (nukleotid szinten: 97,9%, illetve 97,8%; aminosav szinten: 97,9%, illetve 98,5%).

A hazai kajszi izolátumok között a legmagasabb fokú hasonlóság a PPV-Sóskút1 és a PPV-Szigetcsép1 izolátum között mutatkozott (nukleotid szinten: 98,5%, aminosav szinten: 98,2%). A PPV-Gödöllő2 izolátum a jellemezni kívánt izolátumok közül, mind nukleotid, mind aminosav szinten a PPV-Troy4 izolátummal volt leginkább azonos (95,6%, illetve 95,8%).

A PPV-B1298 izolátum a dolgozatban jellemezni kívánt izolátumok közül, nukleotid és aminosav szinten is, a PPV-Gödöllő2 izolátummal mutatta a legnagyobb hasonlóságot (88,8%, illetve 88,4%).

A nemzetközi adatbázisokból kiválasztott izolátumok közül a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumok az M-típusú CP-vel, illetve CP génnel rendelkező izolátumokhoz, azok közül is a PPV-Rec csoport tagjaihoz voltak leginkább hasonlóak. Nukleotid szinten a legmagasabb fokú azonosságot mindkét izolátum a magyar PPV-Pd4 izolátummal mutatta (PPV-B1298 esetében 86,1%, PPV-Gödöllő2 esetében 96,2%). Aminosav szinten a PPV-B1298 izolátum ugyanehhez a magyar izolátumhoz állt legközelebb (85,5%), míg a PPV-Gödöllő2 a PPV-Pd4 izolátumon kívül a magyar PPV-Bt-H (PPV-Bt-H2) és a szlovák PPV-BOR-3 izolátumokkal is ugyanolyan szintű hasonlóságot mutatott (95,8%).

2796 2920

◆
◆

```

Troy1  NDTDDSLDSNFVIHQADEKEDDEEVDACKPTVVTAPAATVATTQPAPGIQPAIQTTTTPMFNPIFTPATTQPAIRPVSPPIYRATPQSFGVYGNDASPSTTNTSVNTGRDRDVDAGSIGTFVPRF
Troy2  D.IN.DGEF.V.V....R.E.....I.A.....SPIL.P.V...PR.A.L...S.....TK..RVSGPQL.T.T..E...NS.AL..N.....T...L
Troy4  .....I.....V.....S.....E.....S.L.....L
Troy5  ..I.....I.....N.....V.....S.....E.....S.L.....L
Troy6  ..I..R..I.....A..V..V.....SG.....E.....S.L..R.....L
B1298  ..I.....I.....P.....V.....L.....L
Sóskút1  .IN.DGE..V.V....R.E.....I.....SPIL.P.V...PRA.A.....TT..RVSGPQL.T.TH.E...NS.AL.T.N.....T...L
Gödöllő2  ..I.....I.....V.....T-----EG...S.L.....L
Szigetcsép1  .IN.DGE..V.V....R.E.....I.....SPIL.P.V...PR.A.....TK..PRVSGPQL.T.T..E...NS.AL..N.....T...L

```

2921 3020

```

Troy1  KTMTSKLSLPKVKGKAIMNHLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQTWYEGVKRKYDVTDEEMSIILNGLMVWCIEGTSPNINGMWVMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFR
Troy2  .A.....D.....
Troy4  .....G.....P.....
Troy5  .....
Troy6  .....
B1298  .....
Sóskút1  .A.....D.....
Gödöllő2  .....
Szigetcsép1  RA.....D.....

```

3021 3140

◆

```

Troy1  QIMAHFSNVAEAYIEKRNYEKAYMPRYGIQRNLTDSLARYAFGFYEMTSATPVRAREAHIQMKAALRNQNRFLGLDGNVGTQEEDTERHTAGDVNRNMHLLGVRGV
Troy2  .....D.....T.....
Troy4  .....D.....T.....K.....
Troy5  .....D.....T.....P.....
Troy6  .....D.....T.....
B1298  .....D.....T.....PP.....
Sóskút1  .....D.....T.....
Gödöllő2  .....D.....T.....
Szigetcsép1  .....D.....T.....

```

10. ábra. A bulgáriai és hazai PPV-izolátumok 3’NIB–CP régiójának megfelelő cDNS származtatott aminosav sorrendjének a MEGA 3.1 szoftver alkalmazásával készített többszörös illesztése

Jelmagyarázat: A ◆ a CP első aminosavát, a ◆ a központi (core) régió, a ◆ a C-terminális rész kezdetét jelöli. A DAG motívum aláhúzva. Csak a konszenzus szekvenciától eltérő aminosavakat jelöltük. A pontok azonos aminosavakat, a “-” aminosav hiányt jelöl. Az aminosavak számozása a PPV-SK68 izolátum genomjáról keletkező poliprotein aminosav sorrendjének megfelelően történt.

A bulgáriai izolátumok közül négy (PPV-Troy1, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6) az adatbázisokból származó izolátumok közül – mind nukleotid, mind pedig aminosav szinten – ugyancsak az M-típusú CP-vel, illetve CP génnel rendelkező izolátumokhoz, közülük is a PPV-Rec izolátumokhoz hasonlított legjobban. Nukleotid szinten a PPV-Troy1, a PPV-Troy4 és a PPV-Troy5 a PPV-Pd4 magyar izolátummal, a PPV-Troy6 pedig a PPV-Pd31 magyar és a PPV-BOR-3 szlovák izolátumokkal mutatta a legmagasabb hasonlóságot. Aminosav szinten mind a négy izolátum a PPV-Bt-H (PPV-Bt-H2) magyar és a PPV-BOR-3 szlovák izolátumokkal volt leginkább azonos. A hasonlóság nukleotid szinten 98,2%–99,0%, aminosav szinten 97,0%–99,1% között változott.

A PPV-Troy2 bolgár, valamint a PPV-Sóskút1 és a PPV-Szigetcsép1 hazai kajszi izolátumok az adatbázisokból származó izolátumok közül a D-típusú CP-vel, illetve CP génnel rendelkező izolátumokkal, a PPV-D csoport tagjaival mutatták a legmagasabb fokú hasonlóságot. A hasonlóság nukleotid szinten 96,9%–99,6%, aminosav szinten 95,2%–99,1% között változott. A bolgár PPV-Troy2 mind a nukleotid, mind az aminosav sorrendet tekintve a PPV-PA magyar mandula izolátumhoz állt legközelebb (a hasonlóság mértéke 99,6%, illetve 99,1%). A PPV-Sóskút1 a francia PPV-Dideron és az amerikai PPV-PENN2 izolátumokkal (98,3%), a PPV-Szigetcsép1 a PPV-Dideron izolátummal (98,2%) volt nukleotid szinten leginkább azonos. Az aminosav sorrendet tekintve a PPV-Sóskút1 a PPV-PENN2 (98,2%), a PPV-Szigetcsép1 pedig a PPV-Dideron és a PPV-PENN2 izolátumokhoz (98,5%) volt leginkább hasonló (3. melléklet).

A jellemezni kívánt kilenc PPV-izolátum és néhány, a nemzetközi adatbázisokban elérhető PPV-izolátum származtatott CP-je N-terminális végének többszörös aminosav szekvencia illesztését az 11. ábra mutatja. A CP N-terminális végén a PPV-Rec típusú izolátumok szekvenciáihoz képest a PPV-Troy1 esetében hat (G₂₈₄₃, Y₂₈₇₅, R₂₈₇₆, D₂₈₈₈, T₂₈₉₅, S₂₈₉₈), a PPV-Troy4 esetében egy (R₂₈₇₆), a PPV-Troy5 esetében kettő (N₂₈₁₇, R₂₈₇₆), a PPV-Troy6 esetében három (A₂₈₃₈, V₂₈₄₈, R₂₉₀₂), valamint a PPV-B1298 esetében a deléció fölül egy (P₂₈₂₆), a PPV-Gödöllő2 esetében pedig kettő (T₂₈₆₈, G₂₈₈₉) pozícióban mutatkozott eltérés. Az előbb említett pozíciók közül négy (2875., 2876., 2895., 2898.) a vizsgált PPV-D, PPV-M, PPV-Rec szekvenciák mindegyikében konzervatív, kettő pedig (2848., 2868.) a PPV-Rec izolátumokra nézve specifikus. A PPV-Gödöllő2 izolátum származtatott CP szekvenciájában az egyik pozíció (T₂₈₆₈) a deléció által érintett. A PPV-Troy2 és a PPV-Szigetcsép1 izolátumok CP N-terminális szekvenciájában egy (R₂₈₇₃), a PPV-Sóskút1 esetében négy (A₂₈₅₀, T₂₈₆₉, R₂₈₇₃, T₂₉₀₀) pozícióban tapasztaltunk aminosav cserét a PPV-D típusú izolátumokhoz képest, melyek közül kettő (2850., 2900.) a három fő csoport tagjai között konzervatív, egy pedig (2873.) a PPV-D csoport tagjaira nézve specifikus (11. ábra).

		2811 *		*	*		*	*	2903
PPV-M	PS	~ADE-REDDEE-VDAGRPTVV-TAPAATVATTQPAPVIQAPAPQTTAPMFNPIFTPATTQPAVRFPVPPISGKPRSFGVYGNEDASPSTSNLTVNTGR							
	SK68	~...E.....-.....A.....							
PPV-?	Ab-Tk	~...-K.....-G..K.I.....L.....T.....TK.ISS...ATSQ.....							
PPV-Rec	Pd4	~...-K.....-.....K.....-.....I...T.S.....I...S...AA.Q.....							
	Pd31	~...-K.....-I...K.....-.....I...T.S.....I...S...AT.Q.....							
	Bt-H (Bt-H2)	~...-K.....-.....K.....-.....I...T.S.....I...S...AT.Q.....							
	CG	~...-K.....-.....K.....-.....A.....I...T.....VI...S...AT.Q.....							
	Bulgarian	~...-K.....-.....K.....-.....A.....I...T.....I...S...AT.Q.....A							
	o6	~...-K.....-.....K.A.....-.....I...T.....I...SLV...AT.Q.....							
	BOR-3	~...-K.....-.....K.....-.....I...T.....I...S...AT.Q.....							
	Troy1	~...-K.....-.....K.....-..... CI...T.....I...S... YR AT.Q..... D T S							
	Troy4	~...-K.....-.....K.....-.....I...T.....I...S...RAT.Q.....							
	Troy5	~...-K... N-.....K.....-.....I...T.....I...S...RAT.Q.....							
	Troy6	~...-K.....-.....K.....-..... A VI...S...AT.Q..... R							
	B1298	~...-K.....-.....K... P-.....I...T.....							
	Gödöllő2	~...-K.....-.....K.....-.....I...T..... T -----Q..... G							
PPV-D	NAT	~...-...E...-...-----L.P.....R.....L.....TK.SQV.PQLQT.T.SH.....N.A...N.							
	SH	~...-...E...-...-----IL.P.....R.....L.....TK.SQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
	KAZ	~...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....R.....L.....S.....TK.SQV.PQLQT.TH.....N.A...N.							
	Troy2	~...-...E...-...K.I.A.....-.....S.PIL.....R.....L.....S.....TK.SQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
	Sóskút1	~...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....R... A TS.QV.PQLQT.TH.....N.A... TN.							
	Szigetcsép1	~...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....R.....L.....S.....TK... R V...PQLQT.T.....N.A...N.							
	PA	~...-...E...-...K.I.A.....-.....S.PIL.....R.....L.....S.....TK.SQV.PQLQT.T...G.....N.A...N.							
	Ran	~...-...E...-...K.S.....-.....S.PIL.....R.....S.L.....TK.SQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
	D	~...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....R.....L.....S.....TK.SQVP.PQLQT.T.....N.A...N.							
	PENN1	~...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....R.....L.....S.....TK.SQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
	PENN2	~...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....R.....L.....S.....TK.SQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
	PENN4	~...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....R.....L.....S.....TK.ISQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
	SC	~VA...-...E...-...N.KSN.....-.....S.PIL.....P.L.....R.....S.L.....TK.SQV.PQLQT.T.....N.A...S.							
	NL	~VA...-...E...-...N.K.N.....-.....S.PIL.....P.L.....R.....S.L.....TK.SQV.PQLQT.T.....N.A...S.							
	3,3	~...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....P.....R.....L.....S.....TK.SQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
	OB1	~...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....P.....R.....L.....S.....IK.SQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
	AT	~...-...E...-...K.L.F.....-.....S.PIL.....P.....R.....L.....S.....TK.SQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
	NEB	~...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....P.....R.....L.....S.....A...TK.SQV.PQSQT.T.....N.A...N.							
	AL	~...G...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....P.....R.....L.....S.....TK.LQV.PQLQT.T...G.....N.A...N.							
	DOH1	~...-...E...-...K.I.....-.....S.PIL.....P.....R.....L.....S.....TK.TQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
	Skw	~...-...E...-...K.I.....-.....S.P.L.....P.....R.....L.....S.....TK.SQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
	HB	~...-...E.G...-...K.I.....-.....S.PIL.....P.A.HL.R.....L.....S.....TK.SQV.PQLQT.T.....N.A...N.							
PPV-C	SwC	~.K.GND.VTL...KS.TTAVSTPA.TSS.FP.PPL.NL.S...D.....N...IA.VVTS-.F.Y..I..QSVT..S..A..TR.K							
	SoC	~.K.GND.VTL...KS.TTA.STPA.TSS.FP.PPF.NL.SA...D.....N...IA.VVTS-.F.Y..I..QNV.T..S..A...RK							
PPV-EA	El Amar	~...-K.....E.....L.TT.QQPIVTT...QT.ITSTTL.A.QA.....E.TT.T.HTTT.T.P...V...TATNA..AV.R...							
PPV-W	W	~...-ED..PTI.....ALLA.T.PS.ATAP.VTATSTQPL.S.TS...V.....S.K.T-TSATIN.T...V...SVA..S..A..T.LE.							

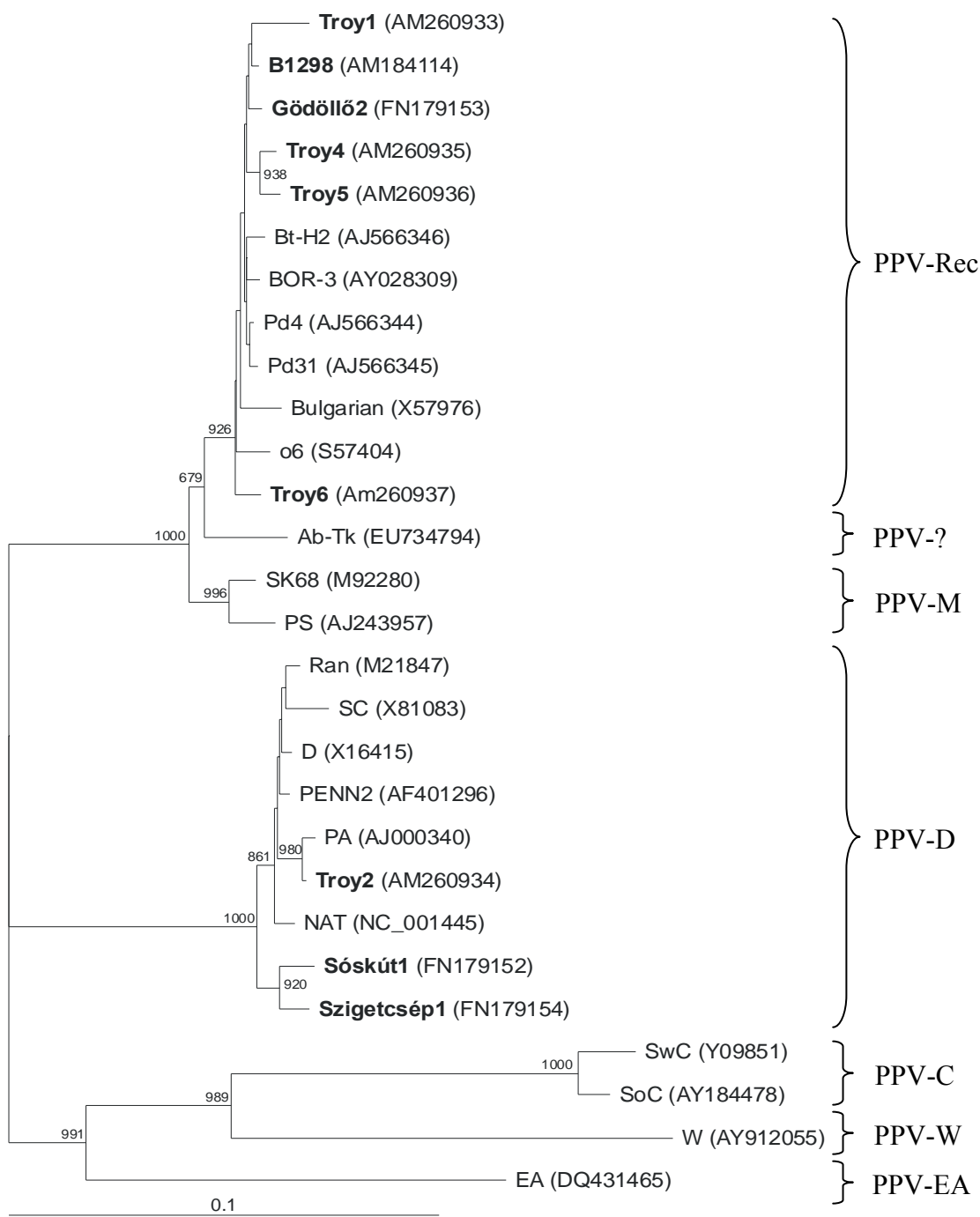
11. ábra. PPV-izolátumok származtatott köpenyfehérjéje N-terminális régiója aminosav szekvenciájának többszörös illesztése

Jelmagyarázat: A “*” a rekombináns izolátumok származtatott aminosav szekvenciájában specifikusan konzervatív pozíciókat jelöli. A vastagított “*” a három fő csoport (PPV-D, PPV-M, PPV-Rec) elkülönítésére alkalmas két aminosav pozíciót mutatja. Csak a konszenzus szekvenciától eltérő aminosavakat jelöltük. A pontok azonos aminosavakat, a “-” aminosav hiányt jelöl. A jellemezni kívánt izolátumok származtatott köpenyfehérjéjében lévő aminosav cseréket kiemeltük. Bal oldalt az izolátumok típusát jelöltük. A PPV-Ab-Tk izolátum típusa még nem ismert. Az aminosavak számozása a PPV-SK68 izolátum genomjáról keletkező poliprotein aminosav sorrendjének megfelelően történt.

5.1.1.2. A 3'NIb–CP régió filogenetikai analízise

A vizsgált öt bulgáriai és négy hazai PPV-izolátum CP génjének (8577–9566. nt pozíció) megfelelő cDNS nukleotid sorrendjének, valamint további 19, a nemzetközi adatbázisokban hozzáférhető PPV-izolátum ugyanezen régiójának megfelelő nukleotid szekvencia bevonásával filogenetikai analízist végeztünk. A hasonlóság-vizsgálat során kapott eredményekkel összhangban a Neighbor-Joining eljárással készült törzsfán az öt bulgáriai izolátum közül négy (PPV-Troy1, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6), valamint a deléciós PPV-B1298 hazai szilva és a PPV-Gödöllő2 hazai kajszi izolátumok a PPV-M típusú izolátumokkal egy fő ágon, de a tipikus PPV-M izolátumoktól elkülönülve, a rekombináns izolátumokkal csoportosultak. A PPV-Troy2 bulgáriai, és a fennmaradó két hazai kajszi izolátum (PPV-Sóskút1, PPV-Szigetcsép1) a PPV-D izolátumokkal alkotott egy csoportot (12. ábra).

Bár a rekombináció nyomot hagy a CP gén, illetve a CP szekvenciájában – a 3', illetve az N-terminális részen (Glasa és mtsai, 2004) –, a PPV-Rec izolátumok rekombináns jellege csak az NIb gén 3' végén elhelyezkedő rekombinációs pont vizsgálatával bizonyítható. Ezért a 3' végen található rekombinációs pont körüli régióknak megfelelő cDNS-szakasz nukleotid sorrendjét is megvizsgáltuk. A PPV-izolátumok 3'NIb–5'CP (8050–8902. nt pozíció) régiójának megfelelő cDNS-szekvenciák többszörös illesztésének analízise a jellemezni kívánt izolátumok közül a PPV-Troy1, a PPV-Troy4, a PPV-Troy5, a PPV-Troy6, a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumok esetében a PPV-D és a PPV-M típusú izolátumok közötti rekombinációs eseményre engedett következtetni. A rekombinációs pont az NIb gén 3' végén, a 8450. nt pozíció környékén helyezkedett el. A rekombinációs esemény bizonyítékeként a jellemezni kívánt izolátumok teljes 3'NIb–5'CP genomi régiójának (8050–8902. nt pozíció) megfelelő nukleotid szekvencia, és további 22, a nemzetközi adatbázisokban hozzáférhető PPV-izolátum ugyanezen régiója bevonásával filogenetikai analízist végeztünk. Továbbá a rekombinációs ponttól 5' (upstream) (8050–8449. nt pozíció), illetve 3' (downstream) (8450–8902. nt pozíció) irányban elhelyezkedő régióknak megfelelő cDNS-szakaszokat is elemeztük, és a rekombinációs pont előtti 400 nt, illetve a rekombináció utáni 453 bázis hosszúságú nukleinsav szakaszokra külön-külön is elkészítettük a filogenetikai törzsfát. A teljes 3'NIb–5'CP régiót vizsgálva a jellemezni kívánt izolátumok a CP génnek megfelelő cDNS-szekvencia alapján készült dendrogramhoz hasonlóan helyezkedtek el (4. melléklet).

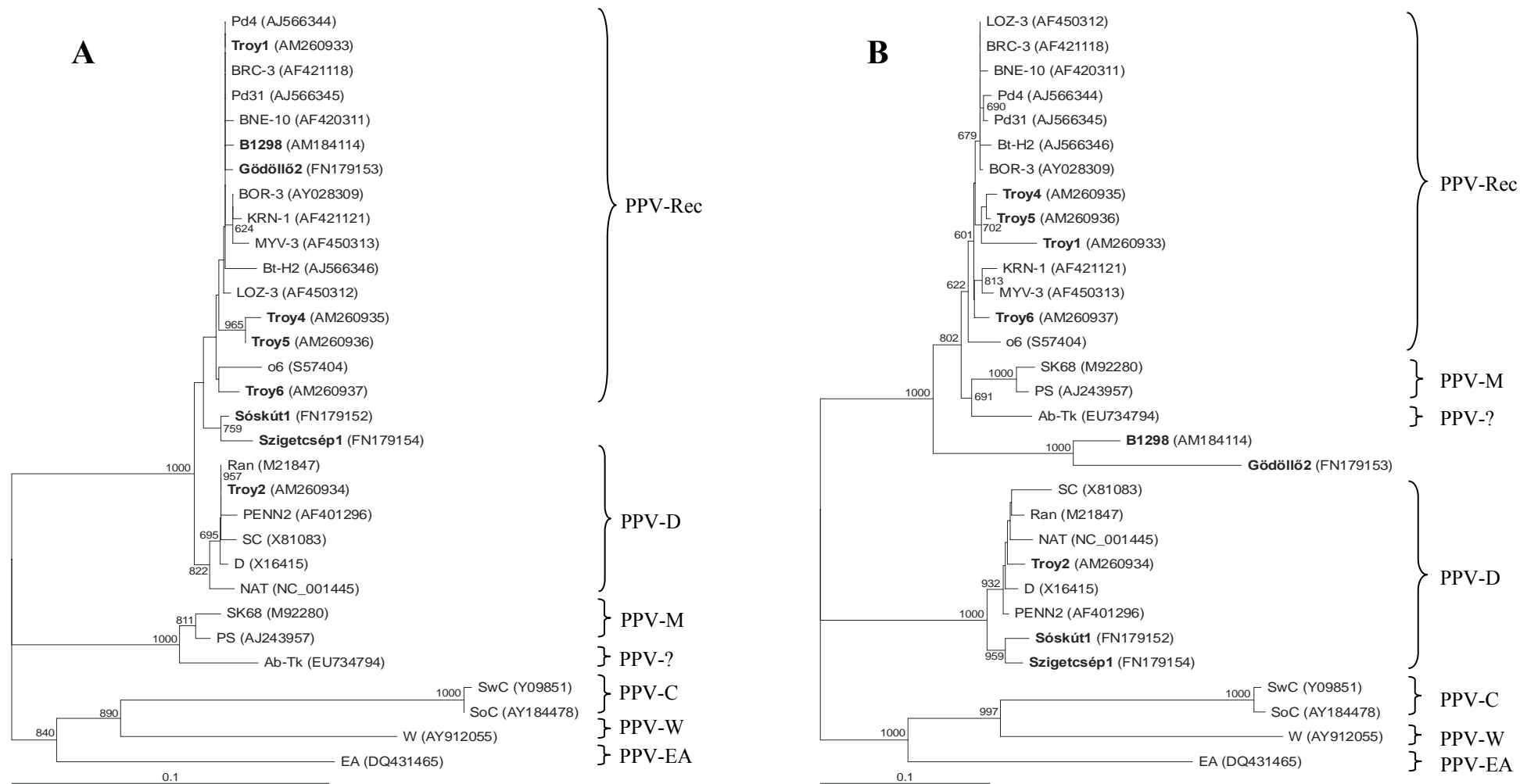


12. ábra. PPV-izolátumok CP génnek (8577–9566. nt) megfelelő cDNS nukleotid szekvencián alapuló filogenetikai analízise Neighbor-Joining eljárás alapján

Jelmagyarázat: Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményét mutatják; csak a 60%-nál nagyobb támogatottságú csoportokat jelöltük. Az SoC, SwC, EA és W izolátumok csoporton kívüli kontroll izolátumok. Az izolátumok neve mögött zárójelben a felhasznált nukleotid szekvenciák EMBL/NCBI/DDBJ adatbázisbeli azonosító száma szerepel. Jobb oldalt az izolátumok típusát jelöltük. A PPV-Ab-Tk izolátum típusa még nem ismert. A jellemezni kívánt izolátumokat kiemeltük (vastagítva).

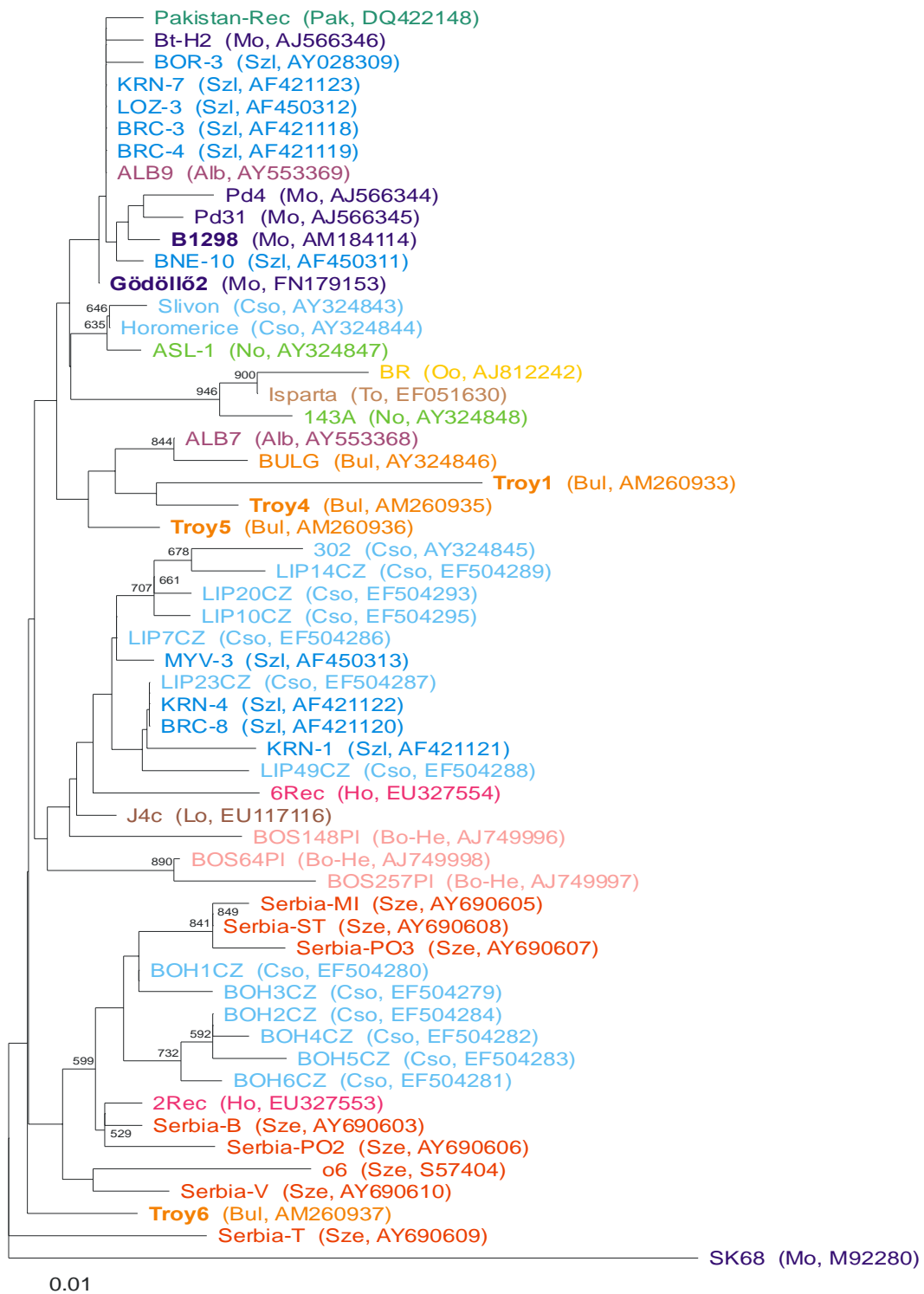
A rekombinációs pontot megelőző szekvencia alapján a PPV-Troy1, a PPV-Troy4, a PPV-Troy5, a PPV-Troy6, a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumok, más rekombináns izolátumokhoz hasonlóan, a PPV-D izolátumokkal egy fő ágon csoportosultak, de a tipikus PPV-D izolátumoktól elkülönülő mellékágon található. A rekombinációs pontot követő nukleotid sorrendet tekintve pedig a PPV-M csoport tagjaival egy fő ágon, de a tipikus PPV-M izolátumoktól nagy megbízhatósági szinttel elkülönülve helyezkedtek el. Ezt a régiót tekintve a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 a vizsgált rekombináns izolátumoktól különálló csoportot alkottak. A PPV-Troy2 izolátum a rekombinációs pont utáni és az az előtti nukleotid sorrendet tekintve is a PPV-D izolátumokkal csoportosult. A PPV-Sóskút1 és a PPV-Szigetcsép1 izolátumok a rekombinációs pontot követő szekvencia alapján a PPV-D csoporthoz tartoztak, míg az azt megelőző szekvencia alapján ugyancsak a PPV-D izolátumokkal egy fő ágon, de a PPV-Rec izolátumok alkotta mellékágon, a rekombináns és a tipikus PPV-D izolátumok között, egy átmeneti pozícióban helyezkedtek el (13A. és 13B. ábra).

Ezt követően a rekombinánsnak bizonyult jellemezni kívánt izolátumok 3'NIB–5'CP (8466–8795. nt pozíció) régiójának megfelelő cDNS nukleotid szekvenciáját összevetve a nemzetközi adatbázisokban hozzáférhető valamennyi PPV-Rec izolátum ugyanezen régiójának DNS-szekvenciájával is készítettünk egy törzsfát, hogy elhelyezzük azokat a PPV-Rec izolátumok filogenetikai rendszerében (14. ábra). A Neighbor-Joining eljárás alapján készült dendrogramon a rekombináns izolátumok három alcsoportja különíthető el, melyek azonban földrajzilag nem egységesek. A dolgozatban jellemezni kívánt izolátumok közül mindkét hazai (PPV-B1298 és PPV-Gödöllő2) és három bulgáriai rekombináns (PPV-Troy1, PPV-Troy4, PPV-Troy5) az adatbázisokban elérhető más magyar, illetve bulgáriai PPV-Rec izolátumokkal egy alcsoportban található. A PPV-Troy6 bolgár rekombináns izolátum – igaz csak alacsony bootstrap érték mellett – a többi Bulgáriából származó izolátumtól elkülönülve helyezkedett el a fán, és egyik alcsoportba sem volt besorolható. A legközelebbi rokonságot Szerbiából származó izolátumokkal mutatta.



13. ábra. PPV-izolátumok Neighbor-Joining eljárással készült filogenetikai törzsfája

Jelmagyarázat: (A) a 3' végi rekombinációs ponttól 5' irányban található 400 nukleotidnak (8050–8449. nt) és (B) az attól 3' irányban elhelyezkedő 453 bázisnak (8450–8902. nt) megfelelő cDNS nukleotid szekvencia alapján. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményét mutatják; csak a 60%-nál nagyobb támogatottságú csoportokat jelöltük. Az SoC, SwC, EA és W izolátumok csoporton kívüli kontroll izolátumok. Az izolátumok neve mögött zárójelben a felhasznált nukleotid szekvenciák EMBL/NCBI/DDBJ adatbázisbeli azonosító száma szerepel. Jobb oldalt az izolátumok típusát jelöltük. A PPV-Ab-Tk izolátum típusa még nem ismert. A jellemezni kívánt izolátumokat kiemeltük (vastagítva).



14. ábra. PPV-Rec izolátumok Neighbor-Joining eljárással készült filogenetikai törzsfája a 3'NIB-5'CP genomi régió (8466–8795. nt) megfelelő cDNS-szekvencia alapján

Jelmagyarázat: A elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményét mutatják; csak a 60%-nál nagyobb támogatottságú csoportokat jelöltük. A PPV-SK68 izolátum csoporton kívüli kontroll. Az izolátumok neve mögött zárójelben a származási ország, és a felhasznált nukleotid szekvenciák nemzetközi EMBL/NCBI/DDBJ adatbázisbeli azonosító száma szerepel. A jellemezni kívánt izolátumokat kiemeltük (vastagítva). Az azonos országokból származó izolátumokat azonos színekkel jelöltük. Alb: Albánia, Bo-He: Bosznia-Hercegovina, Bulg: Bulgária, Cso: Csehország, Ho: Horvátország, Lo: Lengyelország, Mo: Magyarország, No: Németország, Oo: Olaszország, Pak: Pakisztán, Sze: Szerbia, Szl: Szlovákia, To: Törökország.

5.1.2. A 3'P3–6K₁–5'CI régió molekuláris jellemzése

Az izolátumok további jellemzése céljából a cDNS 3'P3–6K₁–5'CI genomi régióinak (15. ábra) megfelelő szakaszát mind az öt Bulgáriából szilváról gyűjtött (PPV-Troy1, PPV-Troy2, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6), valamint a három hazai kajsziról származó (PPV-Sóskút1, PPV-Gödöllő2, PPV-Szigetcsép1) PPV-izolátum esetében megvizsgáltuk.

RT-PCR során, a PCI antiszensz és PP3 szensz primereket felhasználva felszaporított PCR-fragmentumok nukleotid, valamint az abból származtatott aminosav szekvenciáját közvetlenül a tisztított PCR-termékből vagy klónozást követően meghatároztuk.



15. ábra. A 3'P3–6K₁–5'CI régió elhelyezkedése a PPV genomján

5.1.2.1. A 3'P3–6K₁–5'CI régió restriktív analízise

A 3'P3–6K₁–5'CI régiónak megfelelő PCR-termékeket olyan restriktív endonukleázokkal hasítottuk, melyek felismerő helyei csak a vizsgált régióban D-típusú genomú izolátumokról (PPV-D, PPV-Rec) készült cDNS-szekvenciákon található meg. Kontrollként egy PPV-M csoportba tartozó izolátum, a PPV-SK68 fertőzőképes cDNS klónját (pPPV-SK68; Palkovics és mtsai, 1993) használtuk. A primerpár mindegyik minta esetében egy megközelítőleg 836 bp méretű PCR-fragmentumot szaporított fel, melyet tisztítás után *EcoRI*, illetve *DdeI* (*Hpy3FI*) restriktív endonukleázokkal hasítottunk.

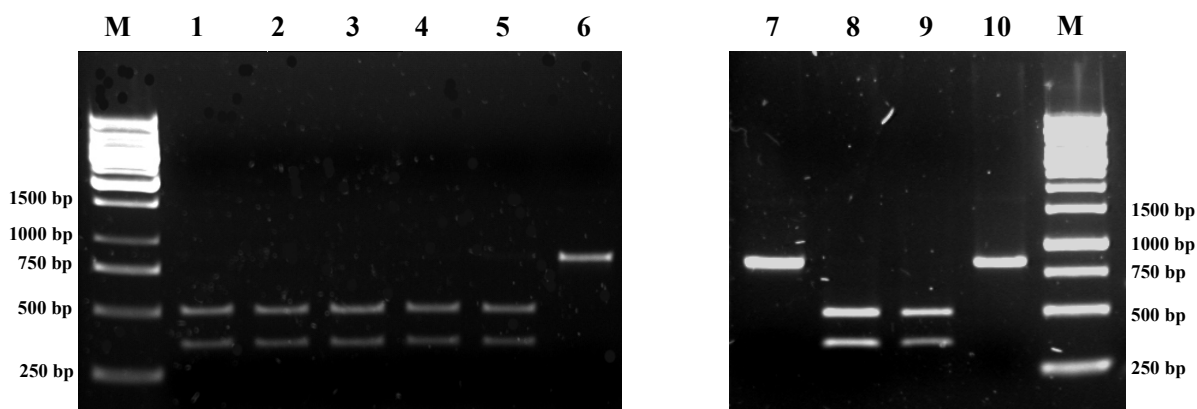
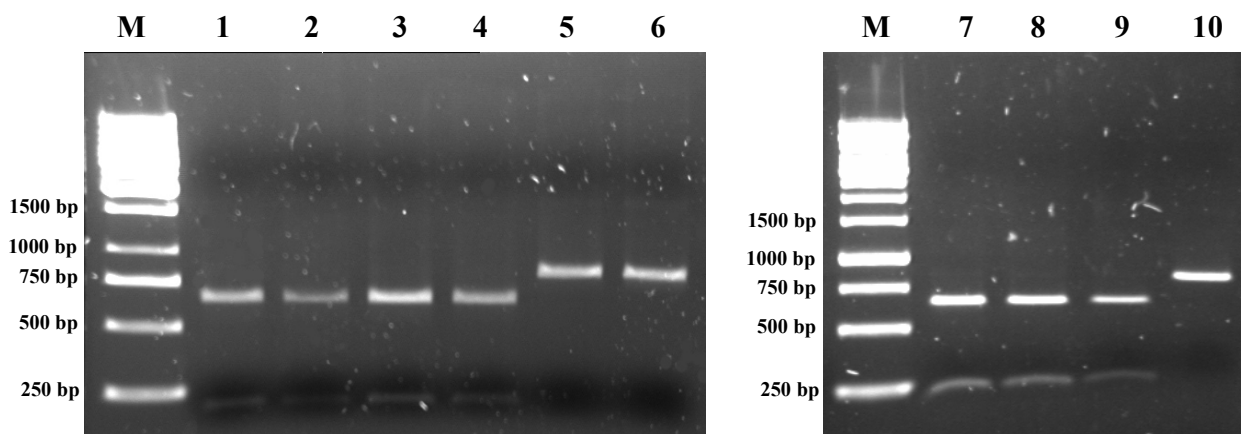
A 3'P3–6K₁–5'CI régióban a PPV-D és PPV-Rec típusú izolátumok a cDNS ezen szakaszán egy *EcoRI*, és egy vagy két *DdeI* hasító helyet tartalmaznak (Glasa és mtsai, 2002a, 2002b; Matic és mtsai, 2006). Ezek a restriktív enzimek az ebben a régióban M-típusú szekvenciákról (PPV-M csoport tagjai) készült cDNS-szakaszokat nem vágják. Ahol a hasítás bekövetkezik ott két, esetleg három (két *DdeI* hely esetén) fragmentum keletkezik, és ezen izolátumok genomja a vizsgált régióban D-típusú. Azoknál az izolátumoknál, amelyek szekvenciájáról származó cDNS-en nem található meg az enzimek felismerő helyei, ott nem történik hasítás, és a PCR-termékek egészben maradnak. Ezek az izolátumok az adott szakaszon M-típusú nukleinsavval rendelkeznek.

Az *EcoRI* hasítás az öt bulgáriai (PPV-Troy1, PPV-Troy2, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6), és két hazai, kajsziról származó izolátum (PPV-Gödöllő2 és PPV-Szigetcsép1) esetében két fragmentumot eredményezett (491 bp + 345 bp) jelezve, hogy ezek genomja

ebben a régióban D-típusú. A 3'NIB-CP régió alapján PPV-D csoportba sorolt kajszirol származó PPV-Sóskút1 izolátum ezen régiójáról készült cDNS-t azonban, a PPV-M típusú szekvenciához hasonlóan, az enzim nem vágta, és a PCR-termék egészben maradt (16A. ábra). A *DdeI* enzim felismerő helye mindhárom hazai kajszi izolátum (PPV-Sóskút1, PPV-Gödöllő2, PPV-Szigetcsép1) genomjáról készült cDNS-en jelen volt, és a hasítás két fragmentumot (651 bp + 185 bp) eredményezett. A bulgáriai izolátumok közül azonban az endonukleáz csak a 3'NIB-CP régió vizsgálata alapján PPV-D csoportba tartozó PPV-Troy2, és a rekombináns PPV-Troy1, PPV-Troy4 és PPV-Troy5 izolátumokat vágta, az ugyancsak rekombináns PPV-Troy6 izolátumot nem hasította (16B. ábra). Az elvártaknak megfelelően az M-típusú genomú PPV-SK68 fertőzőképes klónról származó PCR-terméken egyik enzim felismerő helye sem volt jelen. A PPV-Troy6 és a PPV-Sóskút1 izolátumok esetében az *EcoRI*, illetve *DdeI* enzimekkel végzett RFLP analízis során ellentmondást tapasztaltunk. A PPV-Troy6 izolátum az *EcoRI* enzimmel történt hasításkor, úgy viselkedett, mintha D-típusú, a *DdeI* endonukleázos restriktós analízis során pedig, mintha M-típusú genomja lenne ebben a régióban. A PPV-Sóskút1 izolátumot pedig éppen ellenkezőleg, az *EcoRI* hasító hely hiánya miatt, ebben a régióban M-típusú, míg a *DdeI* felismerő hely jelenléte alapján D-típusú genomú izolátumnak is lehetne tekinteni.

5.1.2.2. A 3'P3-6K1-5'CI régió nukleotid és aminosav sorrendjének jellemzése és filogenetikai analízise

A PPV-Troy6 és a PPV-Sóskút1 izolátumok RFLP vizsgálata során megfigyelt ellentmondás fakadhat egyrészt a restriktós helyeket érintő pontmutációkból, másrészt azonban, a PPV-D és a PPV-M csoportok közötti, rekombinációs eseményre is utalhat. Ennek tisztázása érdekében az RT-PCR során felszaporított cDNS-szakaszok nukleotid sorrendjét meghatároztuk és a D-típusú szekvencia-specifikus *EcoRI*, illetve *DdeI* enzimek hasító helyeinek pontos pozícióját számítógépes analízissel vizsgáltuk. Ezenfelül egy M-típusú szekvencia-specifikus restriktós endonukleáz, az *AsnI* felismerő helyét is térképeztük. Ebben a régióban M-típusú szekvenciával rendelkező izolátumok genomjáról készült cDNS-en egy *AsnI* felismerő hely található, mely a D-típusú nukleinsavakon nincs jelen (Glasa és mtsai, 2002b).

A**B**

16. ábra. PPV-izolátumok 3'P3–6K₁–5'CI genomi régiójának megfelelő PCR-termékek restrikciós endonukleázokkal történt hasítása

Jelmagyarázat: (A) *EcoRI* és (B) *DdeI*. Ezek az enzimek az ebben a régióban D-típusú vírusszekvenciákról származó DNS-szakaszokat képesek csak vágni (két fragmentum). M: DNS-marker (Fermentas GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder), 1: PPV-Troy1, 2: PPV-Troy2, 3: PPV-Troy4, 4: PPV-Troy5, 5: PPV-Troy6, 6: pPPV-SK68 kontroll plazmid, 7: PPV-Sóskút1, 8: PPV-Gödöllő és 9: PPV-Szigetcsép1 enzimmel hasított, 10: pPPV-SK68 plazmid hasítás nélküli PCR-termékei.

A PPV-Troy6 izolátum 3'P3–6K₁–5'CI (2976–3696. nt pozíció) régiójának megfelelő cDNS nukleotid sorrendje egy *EcoRI* helyet tartalmazott, a *DdeI* hely azonban hiányzott belőle, míg a PPV-Sóskút1 szekvenciájában egy *DdeI* helyet találtunk, de az *EcoRI* felismerő hely nem volt jelen. Az *AsnI* restriktions hely egyik izolátumról készült cDNS vizsgált régiójában sem volt megtalálható (17. ábra). A vizsgált két izolátum nukleotid sorrendjét ebben a régióban D-típusú genomú izolátumok ugyanezen régiója nukleotid szekvenciájával összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a PPV-Troy6 izolátum szekvenciájában a *DdeI* hely negyedik nukleotidja (A₃₁₀₂C, CTNAG>CTNCG), míg a PPV-Sóskút1 izolátum esetén az *EcoRI* hely hatodik bázisa (C₃₄₁₀T, GAATTC>GAATTI) megváltozott (17. ábra). A pontmutációk aminosav szinten egyik izolátum esetében sem okoztak változást.

		3067	DdeI	3126
D:	D	TTCGGTCATTACTTGGCAACCAGTACAAACGC	CTGAGAGACGCTAGTCCGACGGAAAAGAG	
	Sóskút1	TTCGGTCATTACTTGGCAACCAGTACAAACGC	CTGAGAGACATAGTCCGACGGAAAAGAG	
Rec:	BOR-3	TTCGGTCATTACTTGGCAACCAGTACAAACGC	CTGAGAGACGCTAGTCCGCCGGAAAAGAG	
	Troy6	TTCGGTCATTACTTGGCAACCAGTACAAACGCCTG	CGAGACGCTAGTCCGCCGGAAAAGAG	
M:	SK68	TTCGGTCATTACTTGGCAGCCAATACAAACGCCT	GAAAGACGCTAGTTCGGCGGAAAAGAG	
?:	Ab-Tk	TTCGGTCATTACTTGGCAGTCAATACAAACGCCT	GAAAGACGCTAGTTCGGCGGAAAAGAG	

		3247	AsnI	3306
D:	D	TCTTGCTTTC AATAGGAGCCACATGCAACTCAATGATCAATGAGCATAAACATCTTAAGC		
	Sóskút1	TCTTGCTTTC AATAGGAGCCACATGCAACTCGATGATCAATGAGCATAAACATCTTAAGC		
Rec:	BOR-3	TCTTGCTTTC AATAGGAGCCACATGTA ACTCAATGATCAATGAGCATAAACATCTTAAGC		
	Troy6	TCTTGCTTTC AATAGGAGCCACATGTA ACTCAATGATCAATGAGCATAAACAGCTTAAGC		
M:	SK68	TCTTGCTTTC AATAGGAGCCACATGCAATTCAATGATTAATGAGCATAAACATTTAAAGC		
?:	Ab-Tk	TCTTGCTTTC AATAGGAGCCACATGCAATTCAATGATTAATGAACATAAACATTTAAAGC		

		3367	EcoRI	3426
D:	D	GGTTATCAGAGAAAGTTGGTTGCACACCAACAGCAGAT	GAATTC	CTGGAGTATGTGGGAG
	Sóskút1	GGTTATTAGAGAAGGTCGGTTGTACACCAACAGCAGAT	GAATTT	CTGGAGTATGTGGGAG
Rec:	BOR-3	GATTATCGGAGAAGGCTGGTTGCACACCAACAGCAGAT	GAATTC	CTGGAGTATGTGGGAG
	Troy6	GATTATCAGAGAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCAGAT	GAATTC	CTGGAGTATGTGGGAG
M:	SK68	GACTATTAGAAAAGATTGGTTGCACACCAACAGCGGAT	GAATTT	CCTGGAATATGTGCAAG
?:	Ab-Tk	GACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGAAT	GAATTC	CTAGAATATGTGCAAG

17. ábra. PPV-izolátumok 3'P3–6K₁–5'CI genomi régiójának megfelelő cDNS nukleotid sorrend a 3067. és a 3126., a 3247. és a 3306., illetve a 3367. és a 3426. bázisok közötti régióban

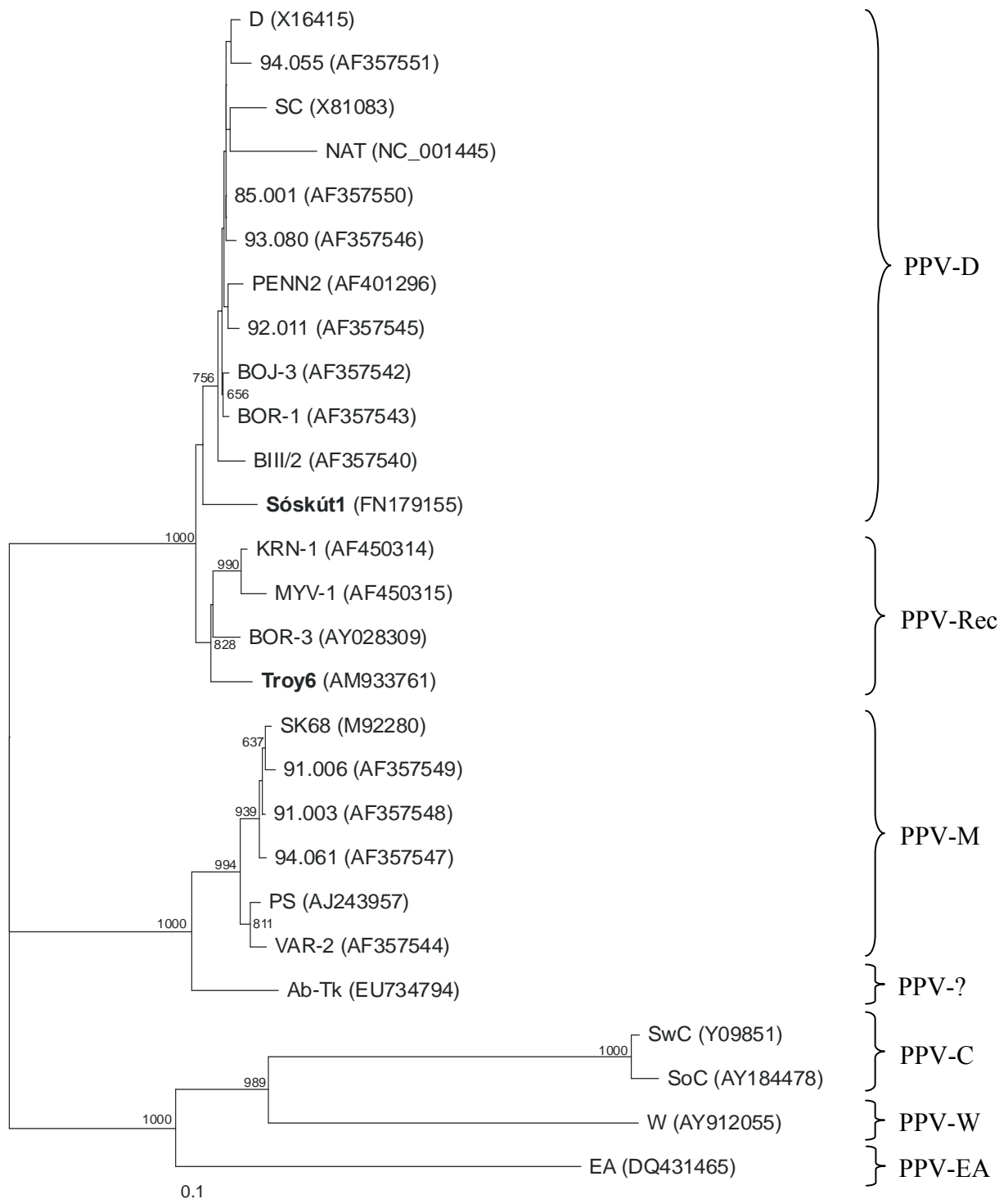
Jelmagyarázat: Az izolátumok csoportbeli hovatartozását bal oldalon jelöltük (aláhúzva és vastagítva). A PPV-Ab-Tk izolátum típusa még nem ismert. A *DdeI* hasító hely (PPV-Troy6 izolátum) és az *EcoRI* felismerő hely (PPV-Sóskút1 izolátum) hiányáért felelős nukleotidokat kiemeltük (vastagítva). Az aminosavak számozása a PPV-SK68 izolátum genomjáról keletkező polipeptid aminosav sorrendjének megfelelően történt.

Ezt követően a PPV-Troy6 és a PPV-Sóskút1 izolátumok 3'P3–6K₁–5'CI régiójának (2976-3696. nt pozíció) megfelelő cDNS nukleotid és aminosav sorrendjét összehasonlítottuk egymással, majd 25, a nemzetközi adatbázisokban hozzáférhető PPV-izolátum ezen régiója

szekvencia adataival (5. melléklet). A PPV-Troy6 a PPV-Sóskút1 izolátumhoz nukleotid szinten 96,5%-ban, aminosav szinten 97,5%-ban volt hasonló. A hasonlóság-vizsgálat azt mutatta, hogy az adott szakaszt tekintve a PPV-Troy6 és a PPV-Sóskút1 izolátumok mind nukleotid, mind aminosav szinten a vizsgált régióban D-típusú genomú, adatbázisokból származó izolátumokhoz (PPV-D és PPV-Rec csoport tagjai) álltak legközelebb. A PPV-Troy6 nukleotid szinten a legmagasabb fokú hasonlóságot (98,1%) a rekombináns PPV-BOR-3 izolátummal, míg a PPV-Sóskút1 egyes PPV-D izolátumokkal (PPV-PENN2, PPV-85.001, PPV-BOJ-3, PPV-BOR-1) mutatta (97,8%). Aminosav szinten mindkét izolátum a rekombináns PPV-KRN-1, és egyes PPV-D izolátumokkal (PPV-PENN2, PPV-85.001, PPV-BOJ-3, PPV-BOR-1) volt leginkább azonos (PPV-Troy6 izolátum: 99,2%, PPV-Sóskút1 izolátum: 98,3%).

PPV-izolátumok 3'P3–6K₁–5'CI régiójának megfelelő cDNS-ből származtatott aminosav sorrend (mely a P3 utolsó 173, a teljes 6K₁ (52 aminosav) és a CI első 15 aminosavát tartalmazza) többszörös illesztését a 6. melléklet mutatja. Az adott régiót tekintve a PPV-Sóskút1 izolátum négy (I₉₇₄, I₉₈₈, L₁₀₇₆, T₁₁₆₄), a PPV-Troy6 kettő (Q₁₀₅₁, N₁₁₂₀) aminosavban tért el a vizsgált szakaszon D-típusú genomú izolátumoktól (PPV-D és PPV-Rec csoport tagjai). Ezek közül a PPV-Sóskút1 izolátum egy (974.), a PPV-Troy6 izolátum két olyan aminosav pozícióban (1051. és 1120.) tartalmazott változást, melyek a vizsgált PPV-D, PPV-M és PPV-Rec szekvenciák mindegyikében konzervatívak.

A PPV-Troy6 és a PPV-Sóskút1 izolátumok 3'P3–6K₁–5'CI régiójának (2976–3696. nt pozíció) megfelelő cDNS nukleotid szekvenciája, és további 25, a nemzetközi adatbázisokban hozzáférhető PPV-izolátum ugyanezen régiója bevonásával filogenetikai analízist végeztünk. A PPV-Troy6 és a PPV-Sóskút1 izolátumok az adott régióban D-típusú genomú izolátumokkal (PPV-D és PPV-Rec csoport) csoportosultak (18. ábra). A filogenetikai törzsfán a tipikus PPV-D és a PPV-Rec típusú izolátumok egy fő ágon helyezkedtek el – jelezve, hogy ebben a régióban mindkét csoport tagjainak genomja D-típusú –, de egymástól 100%-os bootstrap érték mellett elkülönülő mellékágakon foglaltak helyet. A PPV-Sóskút1 izolátum a tipikus PPV-D izolátumokkal, a PPV-Troy6 pedig a már jellemzett PPV-Rec csoport tagjaival együtt csoportosult.

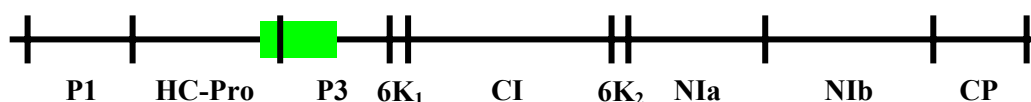


18. ábra. PPV-izolátumok Neighbor-Joining eljárással készült filogenetikai törzsfája a 3'P3–6K₁–5'CI genomi régiónak (2976–3696. nt) megfelelő cDNS-szekvencia alapján

Jelmagyarázat: A elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményét mutatják; csak a 60%-nál nagyobb támogatottságú csoportokat jelöltük. Az SoC, SwC, EA és W izolátumok csoporton kívüli kontroll izolátumok. Az izolátumok neve mögött zárójelben a származási ország, és a felhasznált nukleotid szekvenciák nemzetközi EMBL/NCBI/DDBJ adatbázisbeli azonosító száma szerepel. Jobb oldalt az izolátumok típusát jelöltük. A PPV-Ab-Tk izolátum típusa még nem ismert. A jellemezni kívánt izolátumokat kiemeltük (vastagítva).

5.1.3. A 3'HC-Pro-5'P3 régió molekuláris jellemzése

A bulgáriai PPV-Troy6 izolátum rekombináns jellegének megerősítése céljából a genom 5' végén elhelyezkedő rekombinációs pont körüli régióját is megvizsgáltuk. Ennek érdekében a vírusgenomról készült cDNS 3'HC-Pro-5'P3 régiónak (19. ábra) megfelelő szakaszát, mely a genom 5' végén, a P3 génben elhelyezkedő rekombinációs pontot is magában foglalta (Glasa és mtsai, 2004), RT-PCR során felszaporítottuk. A PCR-fragmentum nukleotid, valamint abból származtatott aminosav szekvenciáját közvetlenül a termékből meghatároztuk.

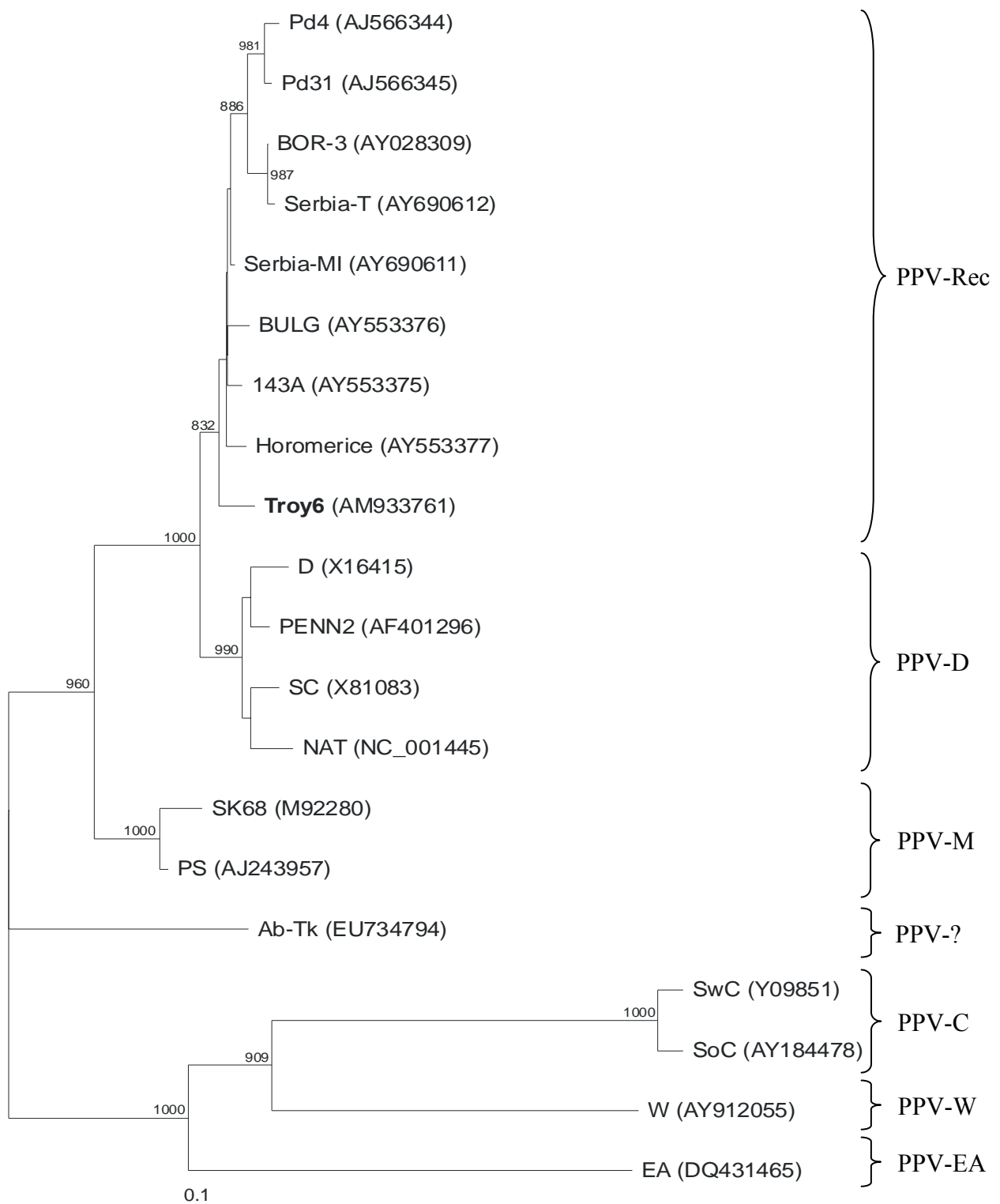


19. ábra. 3'HC-Pro-5'P3 régió elhelyezkedése a PPV genomján

5.1.3.1. A 3'HC-Pro-5'P3 régió nukleotid és aminosav sorrendjének jellemzése és filogenetikai analízise

A PPV-Troy6 izolátum 3'HC-Pro-5'P3 régiójának (2387–2907. nt pozíció) megfelelő nukleotid és abból származó aminosav szekvenciákat 19, a nemzetközi adatbázisokban elérhető PPV-izolátum ugyanezen régiója szekvencia adataival hasonlítottuk össze (7. melléklet). Az adatbázisokból származó izolátumok közül nukleotid szinten a PPV-Troy6 a genom ezen szakaszán D-típusú szekvenciával rendelkező izolátumokhoz (PPV-D és PPV-Rec csoport tagjai), közülük is a PPV-Rec csoport tagjaihoz volt leginkább hasonló (97,5%–98,7%). Aminosav szinten a PPV-D (97,1%–98,8%), a PPV-M (97,7%–98,8%) és a PPV-Rec (96,5%–99,4%) típusú izolátumokkal közel azonos szintű hasonlóságot mutatott. Nukleotid szinten a szerb rekombináns PPV-Serbia-MI izolátummal (98,7%), aminosav szinten ugyanezen szerb rekombinánsal, valamint egy német (PPV-143A) és egy cseh (PPV-Horomerice) rekombináns izolátummal volt leginkább azonos (99,4%).

A PPV-Troy6 izolátum 3'HC-Pro-5'P3 régiójáról (2387–2907. nt pozíció) készült cDNS nukleotid szekvenciája és 19, a nemzetközi adatbázisokban elérhető PPV-izolátum ugyanezen régiója felhasználásával filogenetikai vizsgálatot végeztünk. A Neighbor-Joining eljárással készített törzsfán a PPV-Troy6 izolátum a fa, ebben a régióban D-típusú genomú izolátumok által képviselt fő ágán, de a tipikus PPV-D izolátumoktól 100%-os bootstrap érték mellett elkülönülő mellékágon, az adatbázisokból származó PPV-Rec izolátumokkal együtt csoportosult (20. ábra), mely megegyezik a régió nukleotid szintű hasonlóság-vizsgálata során kapott eredményekkel.



20. ábra. PPV-izolátumok Neighbor-Joining eljárással készült filogenetikai törzsfája a 3'HC-Pro-5'P3 genomi régió (2387–2907. nt) megfelelő cDNS-szekvencia alapján

Jelmagyarázat: A elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményét mutatják; csak a 60%-nál nagyobb támogatottságú csoportokat jelöltük. Az SoC, SwC, EA és W izolátumok csoporton kívüli kontroll izolátumok. Az izolátumok neve mögött zárójelben a felhasznált nukleotid szekvenciák nemzetközi EMBL/NCBI/DDBJ adatbázisbeli azonosító száma szerepel. Jobb oldalt az izolátumok típusát jelöltük. A PPV-Ab-Tk izolátum típusa még nem ismert. A PPV-Troy6 izolátumot kiemeltük (vastagítva).

A PPV-izolátumok 3'HC-Pro-5'P3 régiójának megfelelő nukleotid szekvenciák többszörös illesztésének analízise a PPV-D és a PPV-M típusú izolátumok közötti rekombinációra utalt a PPV-Troy6 izolátum esetében a P3 gén 5' végén, a 2813. nt pozíció környékén. A rekombinációs esemény bizonyítékeként az 5' végi rekombinációs pontot követő (downstream) 95 bázis hosszúságú (2813–2907. nt pozíció) és az azt megelőző (upstream) 426 bázis hosszú (2387–2812. nt pozíció) nukleinsav szakaszokra külön-külön is elkészítettük a törzsfát. A 2813–2907. nukleotidoknak megfelelő szekvencia alapján a PPV-Troy6 izolátum az adatbázisokból származó rekombináns izolátumokhoz hasonlóan, a PPV-D izolátumokkal csoportosult. A 2387–2812. nukleotidoknak megfelelő nukleinsav szakasz alapján a többi PPV-Rec izolátummal együtt csoportosult, de ezt a régiót tekintve a PPV-D, PPV-M és PPV-Rec típusú izolátumok a fa egy fő ágán helyezkedtek el (8. melléklet).

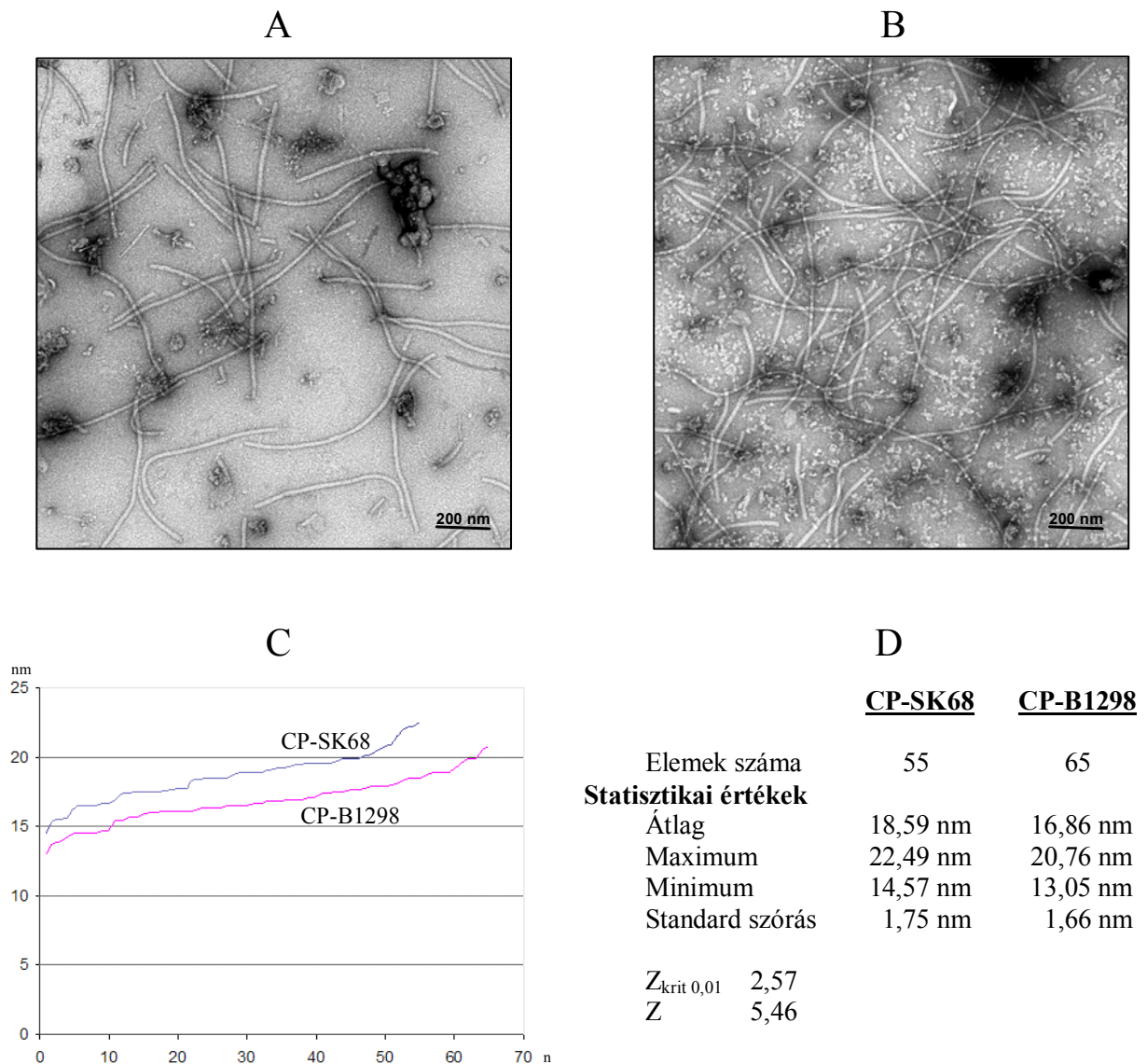
5.2. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus vizsgálata

5.2.1. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus patogenitása és virionjainak jellemzése

Annak tisztázása érdekében, hogy a PPV-B1298 izolátum CP génje valóban rövidebb, és nem csak PCR-műtermékről van szó, a vírusgenomról készült cDNS CP génnek megfelelő szakaszát beépítettük a CaMV-ből származó 35S promóter mögött a PPV teljes szekvenciáját cDNS formában hordozó pPPV-SK68 fertőzőképes klónba (Palkovics és mtsai, 1993), és megvizsgáltuk az eredeti PPV-B1298 izolátum és a PPV-B1298 CP gént hordozó PPV klónból (pPPV-SK68CPB1298) származó vírus fertőzőképességét.

Az eredeti izolátum izolálásakor szilván hasonló tüneteket mutatott, mint más PPV-izolátumok. A pPPV-SK68CPB1298 plazmiddal történt mechanikai inokulálást követően a *N. benthamiana* növények 100%-ban fertőződtek. A *N. benthamiana* tesztnövényeken a pPPV-SK68CPB1298 klónból származó vírus és az eredeti izolátum is hasonló erős tüneteket mutatott, mint a kontroll, nem deléciós CP gént hordozó fertőzőképes pPPV-SK68 klónból származó vírus.

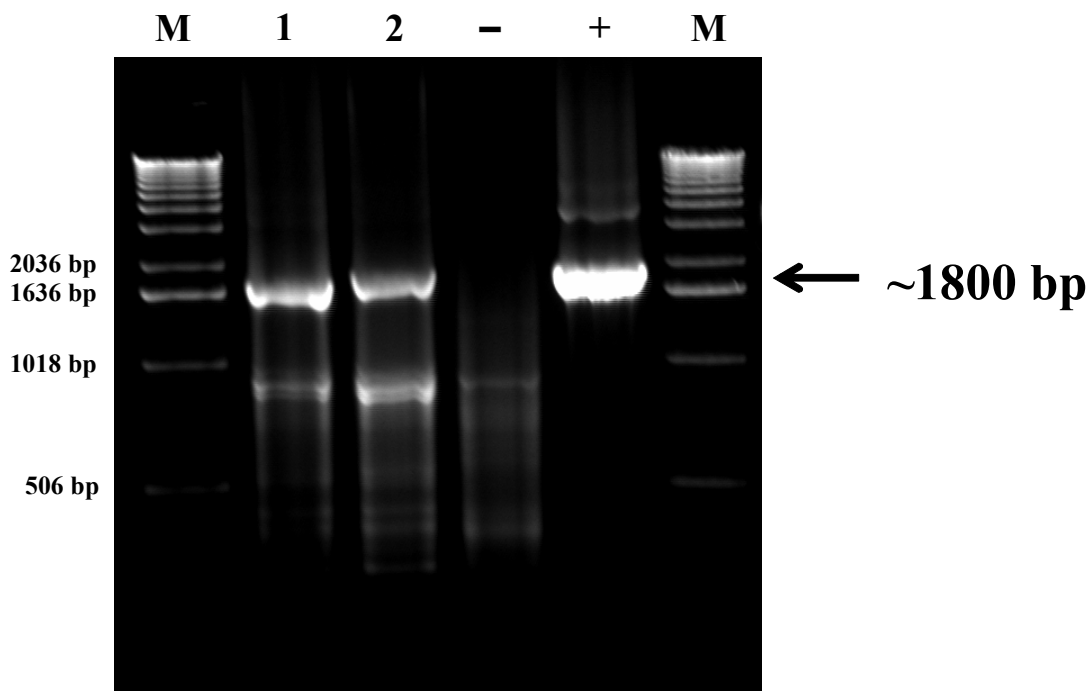
A pPPV-SK68CPB1298 klónból származó vírus virionjainak kialakulását elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A rövidebb CP gént hordozó kiméra vírus partikulumai, más PPV-izolátumokhoz hasonló morfológiai tulajdonságokkal rendelkeztek. A vírusrészecskék átlagos átmérője azonban a pPPV-SK68 klónból származó virionok esetében mértéknél kisebbnek bizonyult. A deléciónak következtében a rövidebb CP gént hordozó vírus virionjainak átmérője 9,3%-kal csökkent (21. ábra).



21. ábra. (A) a pPPV-SK68 klónból és (B) a pPPV-SK68CPB1298 klónból származó virionok elektronmikroszkópos képe (fotó: Szabó L.), (C) a partikulumok mért átmérője nagyság szerint növekvő sorrendbe rendezve (a vízszintes tengelyen a mintaszám látható), valamint (D) a statisztikai értékek

5.2.2. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus átvihetősége levéltetvekkel

Eddigi kísérleti eredmények szerint a levéltetű átvitelért a CP-ben a DAG aminosav motívum a felelős (Atreya és mtsai, 1990, 1991, 1995). Jóllehet ez a motívum a PPV-B1298 származtatott CP-ben jelen volt, mégis az átvitel kísérletes bizonyítékként elvégeztük a levéltetű-átviteli tesztet. A fogadó növényként használt *N. benthamiana* növényeken 3 hét elteltével a PPV fertőzésére jellemző szisztemikus mozaik tünetek jelentek meg. A tesztnövények RT-PCR analízis során is fertőzöttnek bizonyultak a rövidebb CP gént hordozó vírussal (22. ábra).

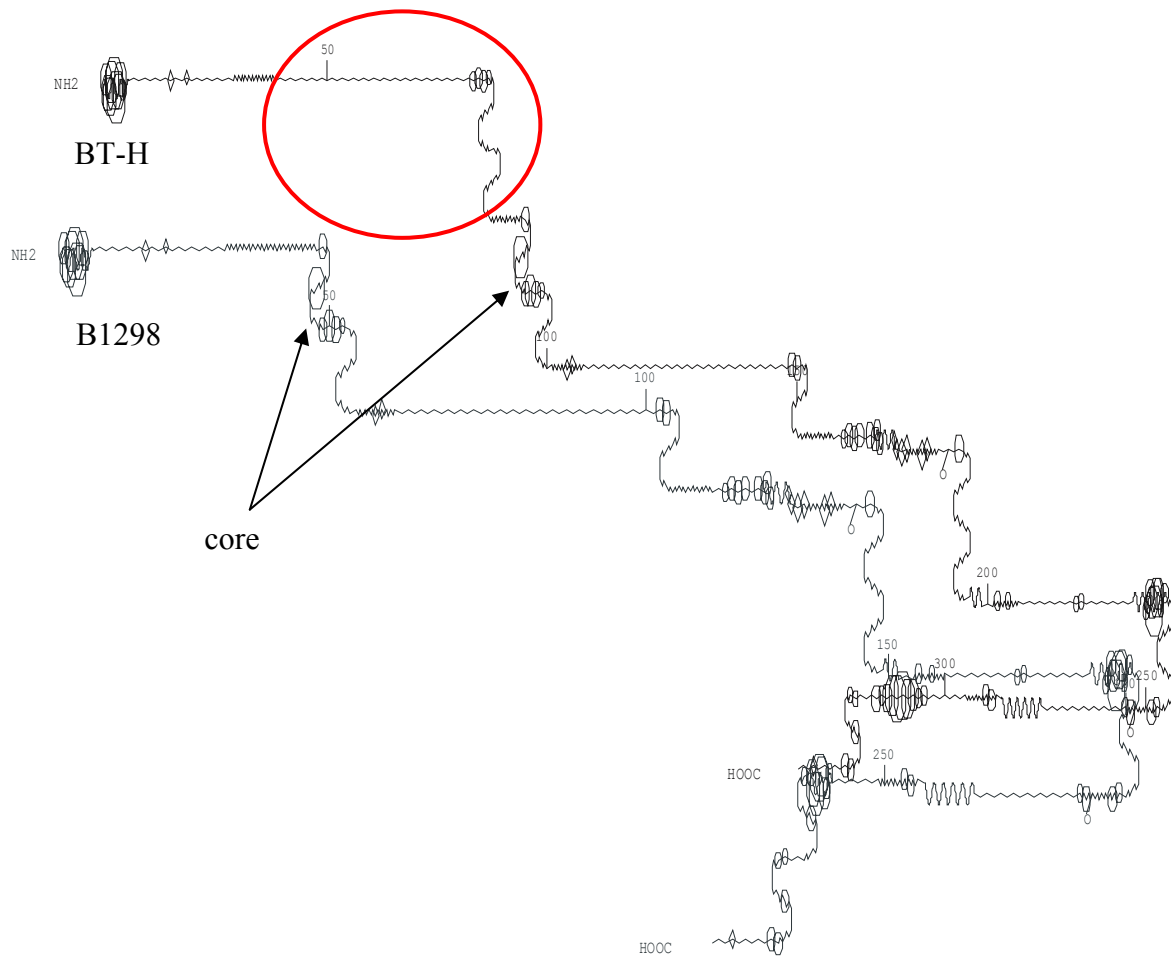


22. ábra. A PPV-B1298 izolátum levéltetű-átviteli vizsgálata RT-PCR analízissel

Jelmagyarázat: Az RT-PCR analízis során a PolyT₂ és Poty7941 primereket használtuk. M: DNS-marker (Invitrogen 1Kb DNA Ladder), 1: pPPV-SK68CPB1298 fertőzőképes klónból származó vírussal inokulált *N. benthamiana*, 2: pPPV-SK68 fertőzőképes klónból származó vírussal inokulált *N. benthamiana*, -: egészséges *N. benthamiana*, +: pPPV-SK68 kontroll plazmid PCR-termékei. A kb. 1800 bp potyvírus-specifikus PCR-fragmentum (nyíl) a minta PPV fertőzöttségét mutatja.

5.2.3. A B1298 rövidebb CP szerkezete

Az irodalomból ismert, hogy a vírusrészecske fehérjeburkának kialakításában a CP központi régiója vesz részt (Jagdish és mtsai, 1991, 1993; Dolja és mtsai, 1995; Varrelmann és Maiss, 2000), az N-terminális régióknak nincs ebben szerepe (Dolja és mtsai, 1994). A PPV-B1298 izolátum köpenyfehérjében a deléció ugyan az N-terminális részen történt, de igen közel a központi régióhoz (10. ábra), ezért számítógépes programok segítségével elkészítettük a származtatott PPV-B1298 CP jósolható harmadlagos struktúráját, és összehasonlítottuk azt a PPV-Bt-H izolátum származtatott CP szerkezetével. A PPV-Bt-H CP-hez viszonyítva, a deléció semmilyen strukturális változást nem eredményezett a rövidebb CP központi régiójában (23. ábra).

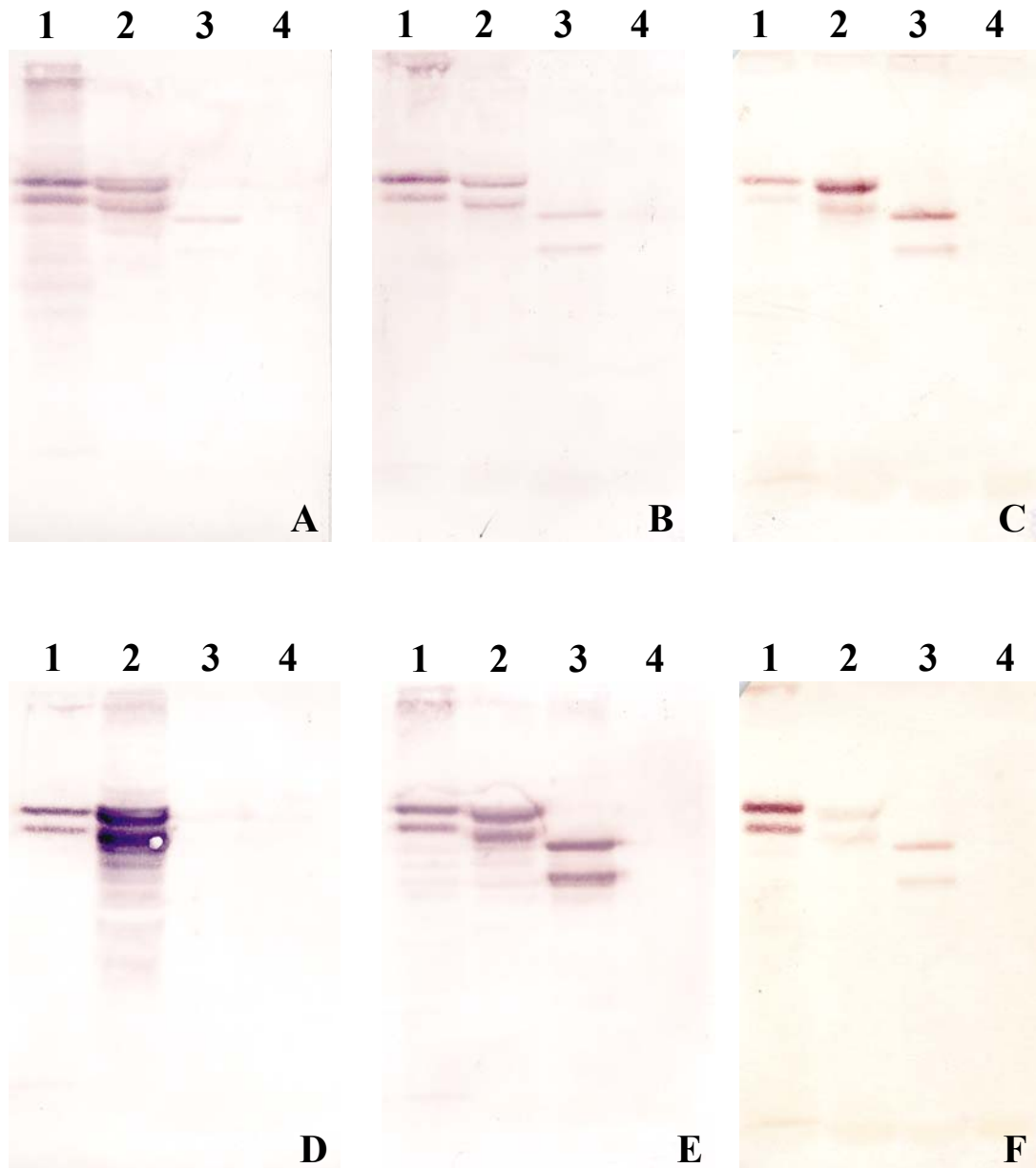


23. ábra. A PPV-B1298 és a PPV-Bt-H izolátumok köpenyfehérje térszerkezete

Jelmagyarázat: A nyilak a központi (core) régiók kezdőpontjait jelölik. A piros ovális a PPV-B1298 CP N-terminális részéből kiesett részt mutatja a nem deléciós PPV-Bt-H izolátum térszerkezetén.

5.2.4. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus kimutathatósága szerológiai (Western blot) módszerrel

A PPV-B1298 deléciós mutáns rekombináns izolátum szerológiai kimutathatóságának megbízhatóságát egy hazai PPV-M (PPV-SK68) és egy ugyancsak hazai PPV-Rec csoportba tartozó (PPV-Pd4) izolátumhoz viszonyítva, különböző gyártóktól származó PPV CP-specifikus poliklonális és monoklonális ellenanyagok felhasználásával végzett Western blot módszerrel vizsgáltuk (24. ábra).



24. ábra. PPV-izolátumok kimutathatósága szerológiai (Western blot) módszerrel különböző ellenanyagok felhasználásával

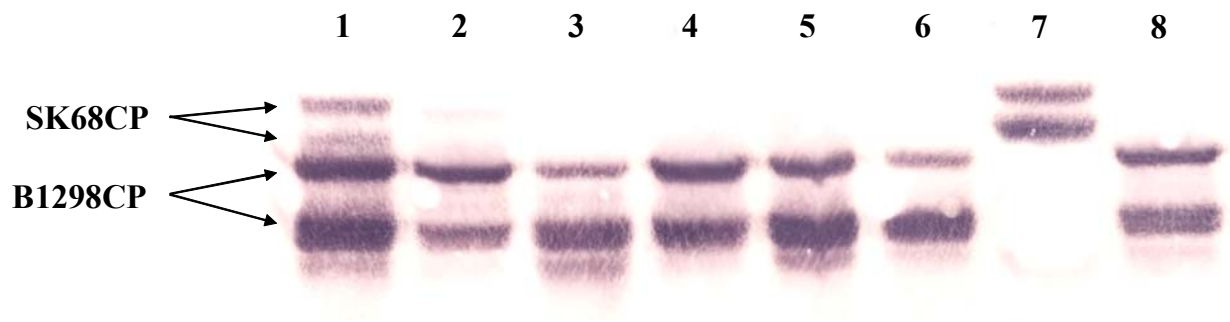
Jelmagyarázat: (1) PPV-SK68 izolátummal (PPV-M) fertőzött *N. benthamiana*, (2) PPV-Pd4 izolátummal (PPV-Rec) fertőzött *N. benthamiana*, (3) PPV-B1298 izolátummal (deléciós PPV-Rec) fertőzött *N. benthamiana* szisztemikus tüneteket mutató leveleiből készített szövetnedv-kivonatok, (4) egészséges *N. benthamiana* (kontroll) leveléből készített szövetnedv-kivonat. A–C poliklonális ellenanyagok: (A) Real Durviz PPV ELISA Kit PPV-specifikus poliklonális ellenanyag, (B) DSMZ PPV ELISA Kit PPV-specifikus poliklonális ellenanyag (AS-0019), (C) Bioreba PPV ELISA Kit AP-konjugált PPV-specifikus poliklonális ellenanyag; D–F monoklonális ellenanyagok: (D) Real Durviz PPV ELISA Kit PPV-M csoport-specifikus AL jelű monoklonális ellenanyag, (E) Real Durviz PPV ELISA Kit PPV-specifikus 5B jelű monoklonális ellenanyag, (F) Sanofi PPV ELISA Kit A és B jelű, PPV-M és PPV-D csoport-specifikus AP-konjugált monoklonális ellenanyag.

A poliklonális ellenanyagok közül a Real Durviz PPV ELISA Kit PPV-specifikus poliklonális ellenanyagának érzékenysége messze elmaradt a másik két poliklonális ellenanyagétól (DSMZ, Bioreba), melyek a vizsgált izolátumokat közel azonos hatékonysággal ismerték fel. A monoklonális ellenanyagok közül a Real Durviz PPV ELISA Kit AL jelű, PPV-M csoport-specifikus monoklonális ellenanyaga nem ismerte fel a PPV-B1298 izolátum CP-jét, jóllehet a vizsgált antitestek közül ez volt a leghatékonyabb a rekombináns PPV-Pd4 izolátum detektálásában. Emellett ez az antitest a vizsgált izolátum típusok közül a rekombináns típust ismerte fel a legnagyobb érzékenységgel. Ezzel ellentétben, a Real Durviz PPV ELISA Kit általános, 5B jelű (IVIA) PPV-specifikus monoklonális ellenanyag a nem deléciós vírusokhoz hasonlóan igen hatékonyan felismerte a deléciós rekombináns PPV-B1298 izolátumot is. A Sanofi PPV ELISA Kit A és B jelű, PPV-M és PPV-D csoport-specifikus, AP-konjugált monoklonális ellenanyag nem volt túl hatékony a PPV-B1298 és a nem deléciós rekombináns izolátum detektálásában sem.

5.2.5. A deléció hatása a vírus-akkumulációra

A PPV-B1298 izolátum CP génjében történt természetes deléció lehetséges szelektív előnyének vagy hátrányának vizsgálatához kompetíciós kísérleteket végeztünk, melyek során a vírus-akkumulációt vizsgáltuk. A kísérletek első lépéseként, a B1298 rövidebb CP gént hordozó, fertőzőképes pPPV-SK68CPB1298 kiméra klónnal, illetve a teljes hosszúságú CP gént hordozó, fertőzőképes pPPV-SK68 vad típusú klónnal külön-külön inokulált *N. benthamiana* növények szisztemikus tüneteket mutató leveleiben a vírusok koncentrációja két héttel a fertőzést követően azonos mértékű volt, ahogy azt az 5B (IVIA) PPV-specifikus monoklonális ellenanyag felhasználásával végzett Western blot analízis eredményei mutatták (nincs bemutatva).

A pPPV-SK68CPB1298 klónból és a pPPV-SK68 klónból származó vírusokkal a *N. benthamiana* növény ugyanazon levelét együttesen inokulálva, vagy a két vírussal a tesztnövény különböző leveleit külön-külön fertőzve is ugyanazt az eredményt kaptuk. A sorozatos mechanikai átvitel során a rövidebb CP gént hordozó kiméra vírus akkumulációja nem változott, a vírus végig azonos mértékben expresszálta a CP-t. A vad típusú vírus koncentrációja azonban már az első passzálást követően jelentős mértékben csökkent, és a harmadik után a kimutathatósági határ alá került. A kiméra és a vad típusú vírussal együttesen fertőzött növényi kivonatoknál a második passzálásig négy CP-specifikus jel volt megfigyelhető a membránon, melyek közül a nagyobb molekulatömegű CP-nek megfelelő kettő a pPPV-SK68 klónból származó vírus jelenlétét mutatta. A kisebb molekulatömegű másik kettő pedig a pPPV-SK68CPB1298 klónból származó vírusnak felelt meg (25. ábra).



25. ábra. A pPPV-SK68 és a pPPV-SK68CPB1298 klónokból származó vírusokkal együttesen fertőzött *N. benthamiana* növények szisztemikus tüneteket mutató leveleiből készített szövetnedv-kivonatok különböző időkből végzett Western blot analízise

Jelmagyarázat: (1) az első, (2) a második, (3) a harmadik, (4) a negyedik, (5) az ötödik, (6) a hatodik passzálás után; (7) a pPPV-SK68 klónból származó vírussal és (8) a pPPV-SK68CPB1298 klónból származó vírussal végzett kontroll fertőzés. A nyilak a teljes hosszúságú CP-specifikus kettős jelet (SK68CP), illetve a kisebb méretű, deléciós CP-specifikus kettős jelet (B1298CP) mutatják.

5.3. Új tudományos eredmények

1. Elvégeztük kilenc, öt bulgáriai szilváról származó, valamint három hazai kajsziról, és egy hazai szilváról származó PPV-izolátum részleges molekuláris szintű jellemzését, megállapítottuk csoportbeli hovatartozásukat, és elhelyeztük azokat a PPV-izolátumok filogenetikai rendszerében. Vizsgálataink során kapott szekvenciákat benyújtottuk a nemzetközi adatbázisban.
2. Elsőként azonosítottunk a PPV-Rec és a PPV-D típusú izolátumok 3'P3–6K₁–5'CI régiójának megfelelő cDNS-szakaszon konzervatív *DdeI* restrikciós helyben pontmutációval rendelkező PPV-Rec, illetve az *EcoRI* hasító helyben pontmutációt hordozó PPV-D izolátumot. Eredményünk a 3'P3–6K₁–5'CI régióknak megfelelő cDNS *DdeI* és *EcoRI* restrikciós endonukleázokkal végzett RFLP analízisének, mint a PPV-izolátumok csoportbeli hovatartozásának meghatározására széleskörűen használt molekuláris diagnosztikai módszernek a megbízhatóságát megkérdőjelezi.
3. Azonosítottunk két, a CP génben deléciót hordozó természetes mutáns PPV-izolátumot, és meghatároztuk a deléciók pontos hosszát és helyét. A szilváról származó PPV-B1298 izolátum genomjáról készült cDNS CP génnek megfelelő szakasza 135 nukleotiddal, a kajsziról gyűjtött PPV-Gödöllő2 izolátumé 33 bázissal rövidebbnek bizonyult, mely 45, illetve 11 aminosav hiánynak felel meg a származtatott CP N-terminális részén. A CP génben deléciót hordozó eddig ismert természetes mutáns PPV-izolátumok közül a PPV-B1298 a leghosszabb delécióval rendelkező izolátum.

4. Elkészítettünk egy, a B1298 rövidebb CP gént hordozó fertőzőképes PPV cDNS klónt.
5. Meghatároztuk a rövidebb CP gént hordozó vírus patogenitását, levéltetűvel való átvihetőségét, virionjainak átmérőjét és a mutáns CP harmadlagos szerkezetét. A deléció a vírus patogenitását és levéltetűvel való átvihetőségét *N. benthamiana* növényeken nem befolyásolta, a partikulumok átmérője azonban csökkent a teljes hosszúságú CP gént hordozó virionhoz képest. A deléció a CP struktúrájában nem okozott változást.
6. Meghatároztuk a rövidebb CP gént hordozó vírus szerológiai módszerrel, különböző gyártóktól származó poliklonális és monoklonális ellenanyagokkal való kimutathatóságának megbízhatóságát. Megállapítottuk, hogy a különböző ellenanyagok eltérő hatékonysággal ismerik fel a PPV-B1298 izolátumot, sőt egyesek nem alkalmasak a mutáns vírus kimutatására.
7. Meghatároztuk a PPV-B1298 izolátum CP génjében történt deléció hatását a vírus-akkumulációra. Kimutattuk, hogy a rövidebb CP gént hordozó vírus a teljes hosszúságú CP génnel rendelkező vírushoz képest nagyobb mértékű akkumulációra képes *N. benthamiana* tesztnövényen.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. Bulgáriai és hazai PPV-izolátumok molekuláris jellemzése

Jelenleg a PPV-izolátumoknak három nagyobb (PPV-D, PPV-M és PPV-Rec) és három kisebb (PPV-EA, PPV-C és PPV-W) csoportja ismert a világon (Candresse és mtsai, 1998; Glasa és mtsai, 2004; James és Varga, 2005). A három fő csoport tagjai a legelterjedtebbek, és közösen fordulnak elő a legtöbb európai országban, míg a három kisebb csoportot napjainkban is csak egy, vagy legfeljebb néhány jellemző izolátum képviseli. A PPV-izolátumok csoportjai patogenitásukban, gazdanövénykörükben, levéltetvekkel való átviteli hatékonyságukban és földrajzi elterjedésükben különböznek egymástól. Ezenfelül a természetben lejátszódó rekombinációs és mutációs események következtében új, eddig ismeretlen, megváltozott biológiai, szerológiai, molekuláris és járványtani tulajdonságokkal rendelkező vírusizolátumok alakulhatnak ki (Worobey és Holmes, 1999; García-Arenal és mtsai, 2003). Ezért a PPV-izolátumok genetikai változékonyságának és csoportbeli hovatartozásának pontos meghatározása a szilvahimlő leküzdéséhez szükséges védekezési stratégiák kidolgozásának és a diagnosztikának alapvetően fontos eszköze.

Régebben a PPV-izolátumok típusának meghatározása kizárólag a CP vagy a CP gén vizsgálatán alapuló szerológiai és molekuláris módszerek alkalmazásával történt, ezért az izolátumok többségét a két fő csoport (PPV-M, PPV-D) valamelyikébe sorolták (Bousalem és mtsai, 1994a, 1994b; Candresse és mtsai, 1998). Nemrég azonban több európai országban is számos rekombináns PPV-izolátumot mutattak ki (Glasa és mtsai, 2004). A rekombináns izolátumok CP-je M-típusú, hiszen a rekombinációs pont a CP gén előtt, az N1b gén 3' végén helyezkedik el, a rekombinációs pontot megelőzően pedig genomjuk D-típusú. Így a PPV-Rec izolátumok azonosítását és széleskörű elterjedésének felismerését a CP-t, illetve a CP gént, valamint attól eltérő genomi régiókat célzó módszerek együttes alkalmazása tette lehetővé (Glasa és mtsai, 2004).

A Bulgáriából szilváról, valamint hazánkból kajsziról és szilváról származó PPV-izolátumok molekuláris változékonyságának megállapítása érdekében végzett vizsgálatainkat a 3'N1b-CP régió nukleotid és aminosav szintű elemzésével kezdtük. A 3'N1b-CP régiónak megfelelő cDNS-ből származtatott aminosav sorrend tartalmazta a vírusgenomon kódolt fehérjék bizonyos funkcióihoz szükséges motívumokat. Az N1b fehérjének megfelelő származtatott aminosav szekvencia C-terminális vége valamennyi jellemezni kívánt izolátum esetében olyan heptapeptid motívummal zárult, mely lehetővé teszi a vírus fő proteázának (N1a) hasítását az N1b és a CP között (Riechmann és mtsai, 1992). Valamennyi a dolgozatban jellemezni kívánt PPV-izolátum CP-je N-terminális végének megfelelő származtatott

aminosav sorrend tartalmazta a levéltetű-átvitelben nélkülözhetetlen szerepet játszó DAG motívumot (10. ábra), a levéltetűvel átvihető PPV-izolátumokhoz hasonlóan a 2821–2823. aminosav pozícióban (Lain és mtsai, 1989; Maiss és mtsai, 1989).

A jellemezni kívánt izolátumok közül 7 (PPV-Troy1, PPV-Troy2, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6, PPV-Sóskút1, PPV-Szigetcsép1) származtatott CP-je az adatbázisokban hozzáférhető izolátumok többségéhez hasonló méretű (330 aminosav hosszú) volt. A vírusgenomról készült cDNS CP génnek megfelelő szakaszának szekvencia analízise során 2 hazai izolátum, a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2, esetében kereteltolódást nem okozó deléciót mutattunk ki közvetlenül a központi régió előtt, eltérően az eddig ismert deléciós izolátumoktól, ahol a kiesett szakaszok a köpenyfehérje N-terminális részének legelején található. Ezidáig a szakirodalomból mindösszesen három, a CP régióban deléciót hordozó természetes mutáns PPV-izolátum ismert. A PPV-NAT izolátum esetében, mely nevét azon tulajdonságáról kapta, hogy levéltetűvel nem vihető át (non aphid transmissible), 15 aminosav hosszú deléciót figyeltek meg (Maiss és mtsai, 1989). A PPV-SH izolátum esetében a deléció egy aminosavval rövidebb (Deborré és mtsai, 1995). A Kazahsztánból származó PPV-KAZ izolátum 2 aminosav hosszú deléciót hordoz (Spiegel és mtsai, 2004). Mindhárom eddig jellemzett PPV-izolátumnál a deléció a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumokhoz hasonlóan a CP N-terminális, hipervariábilis régiójában következett be, de a PPV-B1298 izolátumban lévénél mindhárom jóval rövidebb volt (26. ábra).

	2811		2902
NAT	ADEREDEEEVDA-----LQPPVVIQAPRITAEMLNPIFTPATTQPAIKPVSQVSGPQLQTFGTYSHEDASPSNSNALVNTIN		
SH	ADEREDEEEVDA-----ILQPPVVIQAPRITAEMLNPIFTPATTQPAIKPVSQVSGPQLQTFGTYGNEDASPSNSNALVNTIN		
KAZ	ADEREDEEEVDAKPIVVTAPAATSPILQ--PVIQAPRITAEMLNPIFTPATTQPAIKPVSQVSGPQLQTFGTYGNEDASPSNSNALVNTIN		
Gödöllő2	ADEKEDDEEVDAKPIVVTAPAATVATTQPAIQTITTEMLNPIFTPATTQPAI-----QSFVYVYGNEDASPSNSTLNVNTIG		
B1298	ADEKEDDEEVDAKPPVVTAPAATVATTQPAIQTITTEMLNPIFTPATTQPAI-----LVNTIG		
Bt-H	ADEKEDDEEVDAKPIVVTAPAATVATTQPAIQTITTEMLNPIFTPATTQPAIRFVSPISGATPQSFVYVYGNEDASPSNSTLNVNTIG		

26. ábra. Néhány PPV-izolátum származtatott köpenyfehérjéje N-terminális, hipervariábilis régiója aminosav szekvenciájának a MEGA 3.1 szoftver alkalmazásával készített többszörös illesztése

Jelmagyarázat: A DAG motívum aláhúzva. A szekvenciák megfelelő illesztéséhez a PPV-Bt-H hazai, kökényről származó izolátumot használtuk nem deléciós kontrollként. A “-” aminosav hiányt jelöl. PPV-NAT (Acc. No.: [D13751](#)), PPV-SH (Acc. No.: [X81073](#)), PPV-KAZ (Acc. No.: [AY591253](#)), PPV-Gödöllő2 (Acc. No.: [FN179153](#)), PPV-B1298 (Acc. No.: [AM184114](#)), PPV-Bt-H (Acc. No.: [AJ306420](#)). Az aminosavak számozása a PPV-SK68 izolátum genomjáról keletkező poliprotein aminosav sorrendjének megfelelően történt.

Ismert, hogy a PPV-NAT és a PPV-SH izolátumok esetében a deléció nem a természetes gazdanövényükön, hanem csak a lágyszárú tesztnövényeken való hosszú laboratóriumi fenntartás után, a folyamatos mechanikai átvitel során alakult ki, melynek következtében mindkét mutáns izolátumban a levéltetű-átvitelben nélkülözhetetlen szerepet játszó DAG aminosav motívum is sérült, és helyette DAL, illetve DAI található (Maiss és mtsai, 1989; Deborré és mtsai, 1995). A PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumokban, a PPV-KAZ izolátumhoz hasonlóan, a deléció a motívumot nem érinti.

Az RT-PCR során felszaporított vizsgált régiók szekvencia-analízise alapján a PPV-Troy1, a PPV-Troy4, a PPV-Troy5, a PPV-Troy6, a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumok genomja a rekombináns izolátumok genomjának 3' végén található rekombinációs ponttól 3' irányban (pl. CP gén) M-típusúnak, attól 5' irányban (pl. az NIB gén 3' végének rekombinációs pontot megelőző szakasza, illetve a 3'P3-6K₁-5'CI régió) D-típusúnak bizonyult. Míg a PPV-Troy2, a PPV-Sóskút1 és a PPV-Szigetcsép1 izolátumok mindkét régió alapján D-típusú szekvenciával rendelkeztek. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a jellemzett 9 PPV-izolátum közül 6 (PPV-Troy1, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6, PPV-B1298, PPV-Gödöllő2) a PPV-D és PPV-M csoportok közötti rekombináns izolátum, 3 pedig (PPV-Troy2, PPV-Sóskút1, PPV-Szigetcsép1) a PPV-D csoport tagja. Valamennyi rekombinánsnak bizonyult izolátum genomjának NIB gén 3' végén kimutatott, továbbá a PPV-Troy6 izolátum esetében a P3 gén 5' végén azonosított rekombinációs pontok a már jellemzett PPV-Rec izolátumok 3', illetve 5' végi szekvenciáján korábban már meghatározott rekombinációs pontokkal azonos pozíciókban helyezkednek el (Cervera és mtsai, 1993; Glasa és mtsai, 2004, 2005; Myrta és mtsai, 2005; Matic és mtsai, 2006).

Az NIB gén 3' részén lévő rekombinációs pontot követő 453 nt hosszúságú nukleotid szekvencia felhasználásával készített filogenetikai törzsfán a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 rekombináns izolátumoknak a többi PPV-Rec típusú izolátumtól való nagymértékű elkülönülését a CP génben található deléció okozta. A PPV-D csoportba tartozó PPV-Sóskút1 és PPV-Szigetcsép1 izolátumok a PPV-Rec izolátumok genomjának 3' végén található rekombinációs pontot megelőző 400 bázis hosszúságú cDNS-szekvencia filogenetikai vizsgálata alapján a többi vizsgált PPV-D izolátumtól eltérően, a fa rekombináns izolátumok által elfoglalt mellékágán való elhelyezkedése egy, a PPV-Rec és PPV-D csoportok közötti rekombinációs eseményre utalhat. A rekombináns PPV-Troy6 izolátumnak a PPV-Rec izolátumok filogenetikai rendszerében a Bulgáriából származó rekombinánsoktól való elkülönülése jelzi, hogy ez az izolátum feltehetően a többi bolgár rekombinánsstól eltérő evolúciós utat járt be.

Érdemes megemlíteni, hogy az eddig jellemzett rekombináns izolátumok CP-je N-terminális végének megfelelő származtatott aminosav szekvenciában – a PPV-Pd4 izolátum kivételével, ahol a 2878. pozícióban T helyett A található – öt aminosav (K₂₈₁₄, I₂₈₄₈, T₂₈₅₂, I₂₈₆₈, T₂₈₇₈) specifikusan konzervált (Glasa és mtsai, 2004), így ezek vizsgálatával a PPV-Rec típusú izolátumok elkülöníthetők a másik két nagy csoport (PPV-M és PPV-D) tagjaitól. Ezen öt pozíció közül kettő (2868. és 2878.) alkalmas a PPV-M, PPV-D és PPV-Rec csoportok specifikus azonosítására is, mivel a három nagy csoportot tekintve ezekben a pozíciókban csoportonként eltérő aminosavak helyezkednek el (Salamon és Palkovics, 2002). Az öt aminosavból álló jellemző motívum a PPV-Rec csoporthoz tartozó bulgáriai izolátumok közül a PPV-Troy1, a PPV-Troy4 és a PPV-Troy5 izolátumokban fellelhető, a PPV-Troy6 izolátum származtatott CP-je N-terminális részén azonban csak négy aminosav található meg, az ötödik izoleucinról (I₂₈₄₈) valinra (V₂₈₄₈) mutált. Az ugyancsak a rekombináns izolátumokhoz tartozó PPV-Gödöllő2 izolátum CP-je származtatott aminosav szekvenciájában a deléció következtében a három fő csoport tagjainak elkülönítésére alkalmas egyik pozícióban (2868. aminosav) a PPV-D izolátumokhoz hasonlóan izoleucin (I) helyett treonin (T) helyezkedik el. Ezt az aminosavat meghatározó kodon azonban a deléció által érintett. A deléció a triplet első nukleotidja után történt, és a deléciót követő kodon első bázisáig tart. Így a triplet utolsó két nukleotidját a deléciót követő kodon utolsó két bázisa helyettesíti. A rekombináns PPV-Troy6 izolátum 3'P3–6K₁–5'CI régiójának megfelelő cDNS-ből származó aminosav szekvenciában a Glasa és mtsai (2002b) által említett D-típusú szekvencia-specifikus (PPV-D és PPV-Rec izolátumok) konzervatív aminosavak (G₉₆₃, N₉₈₀, R₉₈₆, V₁₀₃₁, L₁₀₅₅, S₁₀₇₆, G₁₀₉₃, H₁₁₀₂, I₁₁₅₇, V₁₁₆₁, A₁₁₆₄, I₁₁₇₆) jelen vannak, a PPV-D csoportba tartozó PPV-Sóskút1 izolátum esetében azonban két konzervatív pozícióban (S₁₀₇₆L és A₁₁₆₄T) aminosav csere történt.

A PPV-izolátumok csoportbeli hovatartozásának megállapításához segítséget nyújthat a vírusgenom egy adott régiójáról származó cDNS-szakasz jellemző restriktions enzim hasítási mintázata. A 3'P3–6K₁–5'CI régiónak megfelelő PCR-termék *EcoRI*, illetve *DdeI* enzimekkel végzett hasításával az adott régióban D-típusú (PPV-D és PPV-Rec csoport tagjai), illetve M-típusú genomú izolátumok (PPV-M csoport tagjai) elkülöníthetők. A PPV-D és PPV-Rec izolátumok többsége a 3'P3–6K₁–5'CI régiónak megfelelő cDNS-szakaszon egy *EcoRI* és egy *DdeI* hasító helyet hordoz (Glasa és mtsai, 2002b). Nemrég azonban olyan rekombináns izolátumokat is kimutattak (KRN-1, MYV-1, BOS148PL), melyek egy második *DdeI* hellyel is rendelkeznek ebben a régióban (Glasa és mtsai, 2002a; Matic és mtsai, 2006). A PPV-M izolátumok szekvenciáin ezeknek az enzimeknek az adott régióban nincs felismerő helye, viszont valamennyi M-típusú szekvencia tartalmaz egy *AsnI* helyet (Glasa és mtsai, 2002b). A módszer önmagában csak a PPV-D és PPV-M fő csoportok azonosítására alkalmas, hiszen a

PPV-Rec izolátumok genomja, a PPV-D izolátumokhoz hasonlóan, ebben a régióban D-típusú, azonban a CP, illetve a CP gén vizsgálatával kiegészítve már a PPV-D és PPV-Rec csoport tagjai is elkülöníthetők egymástól. A dolgozatban jellemezni kívánt PPV-izolátumok 3'P3–6K₁–5'CI régiója típusának meghatározása céljából végzett restriktív analízis a 3'NIB–CP régió vizsgálata alapján rekombinánsnak bizonyult PPV-Troy6 és a PPV-D csoportba tartozó PPV-Sóskút1 izolátumok esetében értékelhetetlen eredményt adott. Az *EcoRI*, illetve a *DdeI* D-típusú szekvencia-specifikus endonukleázokkal végzett hasítás e két izolátum esetében atipikus restriktív mintázatot eredményezett, mivel az azokról származó cDNS-szakaszokat csak az egyik enzim hasította. A 3'P3–6K₁–5'CI régióknak megfelelő nukleotid és abból származó aminosav szekvenciák hasonlóság-vizsgálatának, illetve filogenetikai analízisének eredménye alapján ebben a régióban mindkét izolátum genomja D-típusú. Ennek alapján megállapítható, hogy az *EcoRI* (PPV-Sóskút1 izolátum), illetve a *DdeI* (PPV-Troy6 izolátum) hasító helyek hiányát a felismerő helyekben bekövetkezett pontmutációk okozták a D-típusú szekvenciákon, és nem egy, a régiót érintő rekombinációs esemény játszott abban szerepet. Ezt támasztja alá az is, hogy *AsnI* restriktív hely, mely a PPV-M izolátumok ezen régiójának megfelelő cDNS-en specifikusan konzervált, sem a PPV-Troy6 sem pedig a PPV-Sóskút1 izolátum 3'P3–6K₁–5'CI genomi régiójáról származó nukleinsav szakaszon nincs jelen. Nemrég Glasa és Candresse (2005) egy Törökországból származó izolátum („Abricotier Turqie”, PPV-Ab-Tk) esetében hasonló abnormalis tulajdonságot figyelt meg. A 3'P3–6K₁–5'CI régióknak megfelelő cDNS-szakaszt, a PPV-Troy6 izolátumnál tapasztalhoz hasonlóan, az *EcoRI* hasította, a *DdeI* viszont nem. Abban az esetben azonban a pontmutáció (T₃₄₁₀C) az *EcoRI* hasító hely meglétéért (GAATTI>GAATTC) volt felelős az M-típusú szekvencián, mivel ez az izolátum a régiót célzó filogenetikai vizsgálat alapján a PPV-M csoporthoz tartozott, és az *AsnI* restriktív hely a PPV-Ab-Tk izolátumról készült cDNS vizsgált régiójában megtalálható (17. ábra).

A PPV-izolátumok csoportbeli hovatartozásának a CP, illetve a CP gén vizsgálatával történő megállapítása során egyes izolátumok esetében szintén ellentmondásos eredmények születtek. Nemrég egy olyan kanadai PPV-izolátumról (PPV-48-922, Acc. No.: AY912058) számoltak be, mely csoport-specifikus primerekkel végzett H-PCR során a PPV-D csoportba tartozónak bizonyult, míg a CP gén 3' végének megfelelő cDNS-szakaszon nem tartalmazott *RsaI* enzim felismerő helyet, ami viszont a PPV-M csoport tagjaira jellemző tulajdonság. A szekvencia analízis során kiderült, hogy a hasító hely harmadik nukleotidja (GTAC>GTGC) megváltozott (James és Glasa, 2006). Laimer és mtsai (2003) szintén olyan osztrák PPV-izolátumokról tudósított, melyek a CP gén 3' végének megfelelő cDNS-szakaszon *RsaI* hellyel nem rendelkeztek, míg a régió szekvencia analízise alapján a PPV-D csoportba

tartoztak. Egy izolátum esetében kimutatták, hogy a felismerő hely hiányát a hasító helyben bekövetkezett pontmutáció okozta a D-típusú szekvencián. Dulic-Markovic (2003) szerológiai tulajdonságaik alapján (CP mobilitás, illetve PPV-D csoport-specifikus monoklonális antitestekkel adott negatív reakció) a PPV-M csoportba tartozó, a valamikori Jugoszlávia területéről származó PPV-izolátumokról számolt be, melyek mindegyike rendelkezett *RsaI* hellyel a vírusgenomról készült cDNS CP gén 3' végének megfelelő szakaszán, jóllehet ez a PPV-D izolátumokra jellemző. Egyes török és albán PPV-izolátumok a 4DG5 és a 4DG11 PPV-D, valamint az AL jelű PPV-M csoport-specifikus monoklonális antitestekkel is pozitívan reagáltak, így a szerológiai vizsgálat értékelhetetlen eredményt adott (Candresse és mtsai, 1998, Myrta és mtsai, 2001). A CP gént célzó molekuláris vizsgálatokkal azonban megállapították, hogy ennek oka egyrészt az, hogy a vizsgált mintában mindkét izolátum típus jelen volt (PPV-AL albán izolátum), másrészt pedig, hogy a CP mindkét típusú epitóppal rendelkezett (PPV-Turchia török izolátum) (Candresse és mtsai, 1998). Más esetekben, az izolátum típusára vonatkozóan, eltérések mutatkoztak a CP vizsgálatán alapuló, monoklonális antitestek használatával kapott szerológiai, valamint a CP gént célzó molekuláris módszerekkel kapott eredmények között. A már említett, a 3'P3–6K₁–5'CI régiójában M-típusú genomú török PPV-Ab-Tk izolátum CP-je szerológiai vizsgálat során pozitívan reagált a 4DG11 és a 4DG5 PPV-D csoport-specifikus monoklonális antitestekkel, az AL jelű PPV-M csoport-specifikus monoklonális antitest viszont nem ismerte azt fel. A CP gént célzó molekuláris vizsgálatok (csoport-specifikus primerekkel végzett RT-PCR, a CP gén 3' végének megfelelő cDNS-szakasz *RsaI* polimorfizmusa, illetve szekvencia analízise) alapján viszont M-típusú szekvenciával rendelkezett (Candresse és mtsai, 1995, 1998). Bizonyos izolátumokat pedig sem a 4DG5, illetve a 4DG11 jelű PPV-D sem pedig az AL jelű PPV-M csoport-specifikus monoklonális antitestek nem ismerték fel, míg a CP gént célzó molekuláris vizsgálatok alapján PPV-D csoportba tartoztak (Candresse és mtsai, 1998; Matic és mtsai, 2006).

Eredményeink alátámasztják a korábbi megfigyeléseket (Candresse és mtsai, 1998; Myrta és mtsai, 1998a), melyek szerint a standardizált módszerek jóllehet megbízhatóan alkalmasak a PPV-izolátumok csoportbeli hovatartozásának megállapítására, de a különös szerológiai és/vagy molekuláris tulajdonságokkal rendelkező PPV-izolátumok létezése megkérdőjelezi egyes jól bevált eljárások csoportbeli hovatartozás meghatározására való alkalmazhatóságát. A PPV genom 3'P3–6K₁–5'CI fragmentumának megfelelő PCR-termék *EcoRI*, illetve *DdeI* enzimekkel végzett restrikciós analízise más genomi régiókat célzó (CP gén, CI gén) eljárásokkal kombinálva a PPV-izolátumok csoportbeli hovatartozásának megállapítására széleskörűen használt módszer (James és mtsai, 2003; Myrta és mtsai, 2005;

Matic és mtsai, 2006). Saját vizsgálati eredményeinkből és a szakirodalomból ismert példákból is következik azonban, hogy a PPV-izolátumok csoportbeli hovatarozásának pontos megállapítása kizárólagosan a sajátos restriktációs helyek vizsgálatával nem lehetséges, még akkor sem, ha azok konzervatív régióban helyezkednek el, mivel a jellemző felismerő helyeket érintő pontmutációk megszüntethetők, vagy megváltoztathatják azokat. Ebből fakadóan a PPV-izolátumok típusának megbízható azonosítása vagy egyazon régiót célzó különböző módszerek (szerológiai vizsgálat csoport-specifikus monoklonális antitestekkel, RT-PCR csoport-specifikus primerekkel, vagy azt követő restriktációs analízis, illetve szekvenálás) együttes alkalmazásával, vagy különböző régiók párhuzamos vizsgálatával lehetséges. Candresse és Cambra (2006) megfogalmazása szerint egy adott izolátum csoportbeli hovatarozásának abszolút kritériuma a vizsgált izolátum és a jelenleg ismert PPV csoportok reprezentatív tagjainak szekvencia hasonlóságának foka. A pontmutáció ugyan gyakori a PPV-izolátumok genomjában, de a 3'P3–6K₁–5'CI régióban található konzervatív *EcoRI*, illetve *DdeI* restriktációs helyben pontmutációval rendelkező PPV-D (PPV-Sóskút1), illetve PPV-Rec (PPV-Gödöllő2) izolátumról eddig csak mi számoltunk be (Szathmáry és mtsai, 2009b).

Munkánk során vizsgált 9 PPV-izolátum közül 6, a minták 2/3-a rekombinánsnak bizonyult, 3 (1/3) pedig a PPV-D csoportba tartozott. A relatív kis számú megvizsgált minta ellenére eredményeink alátámasztják azt a megfigyelést, miszerint a rekombináns PPV-izolátumok a PPV populációk jelentős hányadát képviselik (Glasa és mtsai, 2004). Sok más potyvírushoz hasonlóan (Revers és mtsai, 1996; Glais és mtsai, 2002; Bousalem és mtsai, 2003; Tomimura és mtsai, 2003), a rekombináció nagyon fontos szerepet játszott a PPV evolúciójában és jelenlegi populáció-szerkezetének kialakításában. Azonban a PVY esetében megfigyeltekkel ellentétben (ahol is eddig több mint 10 rekombinációs pontot azonosítottak; Revers és mtsai, 1996; Glais és mtsai, 2002), úgy tűnik, hogy a PPV evolúciója során eredményes rekombinációs események csak ritkán fordulnak elő (Glasa és mtsai, 2004). Azonban nem zárható ki olyan izolátumok létezése sem, melyeknél a rekombinációs pont(ok) a PPV genomi RNS-ének egyéb régióiban található(k), ahogy ezt a nem a PPV-Rec csoportba tartozó PPV-Ab-Tk esetében már kimutatták. Ez az izolátum az Nib 3' végén rekombinációs ponttal viszont nem rendelkezik (Glasa és Candresse, 2005).

Jóllehet csak kevés adat áll rendelkezésre a rekombinációnak a növényi vírusok potenciális fitneszére gyakorolt hatásáról, azonban úgy vélik, hogy az valamiféle szelektív előnyt jelent a szülő változattal szemben, mely biztosítja a változó környezethez való alkalmazkodást. Ezt támasztja alá a PPV-SoC izolátum evolúciójával kapcsolatos hipotézis is, mely szerint az egy eddig ismeretlen, a PPV-vel feltehetően rokon vírus és egy PPV-izolátum

közötti nem-homológ rekombináció eredménye (Nemchinov és mtsai, 1996). Ez az elképzelés magyarázatul szolgálhat a PPV-C típusú izolátumoknak a PPV-izolátumok többségétől eltérő, „kiszélesedett” gazdanövénykörére, hiszen azok képesek természetes körülmények között cseresznyét, illetve meggyet is fertőzni. Az ilyen típusú izolátumokat a természetben eddig csak erről a két fajról írták le, de kísérleti körülmények között más *Prunus*-fajokat is képesek megbetegíteni (Nemchinov és mtsai, 1996; Crescenzi és mtsai, 1997; Desvignes és mtsai, 1998; Boeglin és mtsai, 2004).

6.2. A B1298 rövidebb köpenyfehérje gént hordozó vírus vizsgálata

A jellemezi kívánt PPV-izolátumok genomjáról RT-PCR során felszaporított cDNS CP génnek megfelelő szakaszán a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumok esetében deléciót mutattunk ki, mely a CP vírusspecifikus epitópokat tartalmazó (immunogén), a fehérjeburokkal rendelkező vírusrészecskén kívül elhelyezkedő N-terminális részén történt. A potyvírusok CP-jének N-terminális része mind hosszában, mind szekvenciájában igen változatos (Shukla és mtsai, 1988, 1989). A PPV a leghosszabb N-terminális doménnel rendelkező potyvírusok egyike (27. ábra) Az N-terminális régió hosszában mutatkozó nagymértékű különbségek oka azonban még nem ismert.

A szilváról származó PPV-B1298 az első olyan ismert PPV-izolátum, mely természetes deléciós folyamatok következtében a CP N-terminális részének (92 aminosav) 48,91%-át, a teljes hosszúságú CP (330 aminosav) 13,64%-át elvesztette. A PPV-Gödöllő2, valamint a szakirodalomból ismert 15, 14, illetve 2 aminosav hosszú deléciót hordozó PPV-izolátumok (Maiss és mtsai, 1989; Deborré és mtsai, 1995; Spiegel és mtsai, 2004) esetében a deléció az N-terminális rész jóval kisebb hányadának, 11,96%, 16,30%, 15,22%, illetve 2,17%-nak, a teljes CP 3,33%, 4,55%, 4,24%, illetve 0,61%-ának felel meg.

A CP több funkcióval rendelkező fehérje, számos a vírus „működéséhez” szükséges folyamatban szerepet játszik. Egyik legfontosabb feladata a virion fehérjeburkának kialakítása. A PPV-B1298 izolátum esetében az N-terminális rész közel felének elvesztése a vírusrészecskék kialakulását nem befolyásolta a vírussal fertőzött *N. benthamiana* növényekben, mely összhangban van a TEV-vel végzett deléciós mutációs kísérletek során kapott eddigi eredményekkel, melyek szerint a becsomagolódáshoz, illetve a CP alegységek összeépüléséhez a fehérje N-terminális része nem szükséges (Dolja és mtsai, 1994; Voloudakis és mtsai, 2004). A virionok átmérője azonban a teljes hosszúságú CP-t expresszáló vírusához képest a deléció következtében csökkent.



SCMV-B SGTVDAGAQQGGSGSQGTTTPPATGSGAKPATSGAGSGSGTGAGTGVTGGQARTGSGTGTGSGATGGQSGSGSGTEQVNTGSAGT NATGGQRDRV
SCMV-SC AGTVDAGAQQGGGNAGTQPPATGAAAQGAQPPATGAAAQPPT . TQGSQLPQGGATGGG . . . GAQTGAG GTGS VTGGQRDKDV
MDMV-Dallas AGENVDVGQKT EAQKEAEKKA AEKKAKEAEAKQKESKEKTTEKTGDGTSTGK TTEKTGDGASKEKDKDV
MDMV-Sc AGENVDVGQKT EAQKEAEKKA AEKKAKEAEAKQKENKEKATEKTGDGTSTG KDKDV
SrMV AGGGTVDAGANTADATAQAQREAAKAQQDADAKKRADDEAAEKQRQDAAAKKKADDDARAKADADAKKRADDEAAQRTQONQKDKDV
ZMV SGTVDVGQKSQTESQDKETGESVKNKDKQNEGESGKTTQDEKDKTGTSTTNSQKNDGKTSQ . EGKDKDV
DsMV ADDTVDAGNNDNKTKTETKTTPAAGGGNNTNNTPPPPAD . NTTNNPPPPPPAVPKATETPTNTQVPPASEKGEIVKDV
ZYMV SGTQPTVADAGTTKKNEDDKGKNKDATGSGSGEKTMAAVT KDKDV
JGMV SGNEDAGKQKSATPAANQTASGDGKPVQTTATADNKPSSDNTSNAQTSQTKGGGESGGTNATATKKDKDV
PPV-KAZ ADEREDE . EE . VDAGKPIVVTAPAATS . PILQ . . PVIQAPRRTTAPMFNPIFTTATTQPATKPVSVQSGPQLQTFGTHGNEDASPSNSNALVNTNRDRV
PPV-NAT ADEREDE . EE . VDA LQPPPVIQAPRRTTAPMLNPIFTTATTQPATKPVSVQSGPQLQTFGTYSHEDASPSNSNALVNTNRDRV
PPV-B1298 ADEKEDD . EE . VDAGKPPVVTAPAATV . ATTQAPVVIQPAIQTT TLVNTGRDRV
PPV-BT-H ADEKEDD . EE . VDAGKPTVVTAPAATV . ATTQAPVVIQPAIQTTTTFMFNPIFTTATTQPAIRPVSPISGATPQSFVYGNEDASPSNTLVNTGRDRV
PPV-El Amar ADEKEDDEE . VDAGRPLVTTTQQPIVTTTTTQOTPISTTLQATQAMFNPIFTTATTEPTTRTVPHTTTTTTPPSFGVIGNEDTAPNASNAVVRTGRDRV
PPV-SoC AKEGNDGDVTLVDAGKSTVTTAVSTPAVTSSQFPFPPFNLQSTAPMFDPIFTTATTQPNVRPIAPVV . TSPFSYGVIGNQNVTPSSSNALVNTNRKDRV
PTV AKDDSGTLDAGKDQAKDKAAKTVAATAGESSVKKSDEKDV
PVV AKEEAGSLDAGKDPAKEKSAKLPAAGEQSSKGLEERDV
PVY GNDTIDAGGSTKDD . . AKQEQGSIQPNLNKEKEKDV
CDV ADKVDAGSNTQAG . KNQSKEKDTSVVTTGERKDLVA KQDRDV
TEV SGTVDAG . ADAGKKKDKDDKVAEQ A SKDRDV
PVA AETLDASEALAQKSEGRKKERESNSSKAVA VKDKDV
TuMV AGETLDAGLTDEQQAEEKEREKAEKERERQQLALKKGKDVQEEGKRDKDV
LMV VDTKLDAGQGSKNDDKQKSSADSKDNVITEKSGSGQVR KDDDI
PSbMV AGDETKDERRRKEEEDRKKREESIDASQFGSNRDNKKNKESDTPNKLIVKSDRV
TVMV SDTVDAGKDKARDQKLDKPTLA IDRTKDKDV

27. ábra. Potyvirusfajok köpenyfehérjéje N-terminális régiójának többszörös illesztése

Jelmagyarázat: A nyíl a PPV CP központi régiójának kezdetét jelöli. SCMV (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV-B: Acc. No. [D00949](#), SCMV-SC: Acc. No. [D00948](#)), MDMV (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV-Dallas: Acc. No. [AJ563725](#), MDMV-Sc: Acc. No. [AJ542536](#)), SrMV (*Sorghum mosaic virus*, Acc. No. [NC004035](#)), ZMV (*Zea mosaic virus*, Acc. No. [AF228693](#)), DsMV (*Dasheen mosaic virus*, Acc. No. [NC003537](#)), ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*, Acc. No. [AJ251527](#)), JGMV (*Johnsongrass mosaic virus*, Acc. No. [NC003606](#)), PPV (*Plum pox virus*, PPV-KAZ: Acc. No. [AJ591253](#), PPV-NAT: Acc. No. [D00424](#), PPV-B1298: Acc. No. [AM184114](#), PPV-Bt-H: Acc. No. [AJ306420](#), PPV-El Amar: Acc. No. [DQ431465](#), PPV-SoC: Acc. No. [AY184478](#)), PTV (*Peru tomato virus*, Acc. No. [AJ437280](#)), PVV (*Potato virus V*, Acc. No. [NC004010](#)), PVY (*Potato virus Y*, Acc. No. [M95491](#)), CDV (*Colombian datura virus*, Acc. No. [AJ437482](#)), TEV (*Tobacco etch virus*, Acc. No. [M15239](#)), PVA (*Potato virus A*, Acc. No. [Z21670](#)), TuMV (*Turnip mosaic virus*, Acc. No. [NC002509](#)), LMV (*Lettuce mosaic virus*, Acc. No. [NC003605](#)), PSbMV (*Pea seed-born mosaic virus*, Acc. No. [NC111671](#)), TVMV (*Tobacco vein mottling virus*, Acc. No. [NC001768](#)).

A CP N-terminális részének a vírus mozgásában betöltött szerepe még nem kellő mértékben tisztázott. A különböző potyvírusokkal végzett deléciós mutációs kísérletek ellentmondásos eredményeket adtak. A TEV esetében a N-terminális domén nélkülözhetetlen a hosszú távú mozgáshoz *in planta*, annak eltávolítása a szisztemikus mozgás megszűnését eredményezi (Dolja és mtsai, 1994). Míg egy másik potyvírus, a ZYMV CP N-terminális része részben vagy egészében eltávolítható anélkül, hogy a vírus szisztemikus terjedése sérülést szenvedne (Arazi és mtsai, 2001). A B1298 CP N-terminális régiójának közel fele hiányzik, mégis a vírus képes *in vivo N. benthamiana* növényekben szisztemizálódni. Ez arra enged következtetni, hogy vagy (i) a hosszú távú terjedéshez szükséges szekvencia motívumok a PPV CP N-terminális régiójának más szakaszán helyezkednek el, vagy pedig, hogy (ii) a PPV szisztemikus transzportjában nem a CP N-terminális doménjének elsődleges szerkezete (eredeti szekvenciája) a fontos, hanem valami egyéb jellemzője lehet a meghatározó, mint például az N-terminális domén nettó töltése, ahogy azt már a ZYMV esetében kimutatták (Kimalov és mtsai, 2004).

Fernández-Fernández és mtsai (1998, 2002) antigén prezentációs rendszer kidolgozása céljából a PPV CP-t vizsgálták. Az N-terminális régióban olyan pozíciókat határoztak meg, melyekbe idegen szekvenciák építhetők be a szisztemikus terjedés gátlása nélkül. Ezt felhasználva növényi vírusok alkalmazásával lehetővé válna fehérjék termeltetése diagnosztikai, vagy gyógyászati célokból. Az általuk vizsgált pozíciók közül a δ a PPV-B1298 izolátum CP-jében analizált deléció végpontja, a γ pedig a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumok hiányzó régiójában helyezkedik el. Ebből arra következtethetünk, hogy ezek a pozíciók nem csak inzerciókat, hanem deléciókat is képesek elviselni anélkül, hogy a vírus alapvető funkciói sérülést szenvednének.

A növényi vírusok kimutatására évtizedek óta szinte kivétel nélkül minden karantén laboratóriumban az ELISA-technika különböző formáit alkalmazzák egyszerűsége és megbízhatósága miatt. Számos gyártó forgalmaz antiszérumot szinte az összes fontos növényi vírus kimutatására, azonban sok vírus esetében ma még csak poliklonális ellenanyagok állnak rendelkezésre, melyek érzékenysége és specifikussága elmarad a monoklonális ellenanyagokétól. A technika elterjedésével egy időben kiderült az is, hogy alkalmazásának korlátai vannak. A PPV egyetlenül oszlik el a fában, és a víruskoncentráció lényegesen változik a vegetáció során (Németh, 1986; Tóbiás és mtsai, 1992). Továbbá a vírus alacsony koncentrációban van jelen a növényi szövetben, gyakorlatilag az ELISA kimutathatósági határán. Számos növényi kórokozó detektálására nem is alkalmas ez a módszer. A vírusdiagnosztikában előszűrésre azonban jelen pillanatban is az ELISA-technikát használják. A vizsgálat során általában a vírus CP N-terminális része ellen készült ellenanyagokat

alkalmaznak, így a CP N-terminális részén lévő deléciónak meghatározó szerepe lehet a vírus detektálásában. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus szerológiai kimutathatóságának tesztelése során kapott eredményeink azt mutatják, hogy a különböző ellenanyagok eltérő hatékonysággal ismerik fel a mutáns vírust. Az AL jelű monoklonális antitest, melyet a PPV-M izolátumok specifikus azonosítására használnak, a B1298 deléciós CP-t nem képes detektálni. A PPV-B1298 egy rekombináns izolátum, ismert azonban, hogy a PPV-Rec izolátumok CP-je M-típusú, mivel a 3' végi rekombinációs pont a CP géntől 5' irányban, az NIb gén 3' végén található (Glasa és mtsai, 2004). Jóllehet a rekombináció változásokat okoz a CP aminosav sorrendjében, de ezekkel az eltérésekkel nem magyarázható az antitest érzéketlensége, mivel a vizsgált antitestek közül ez volt a legérzékenyebb a kontroll rekombináns PPV-Pd4 izolátum detektálásában, valamint ez az antitest a vizsgált izolátum típusok közül a rekombináns típust ismerte fel a legnagyobb hatékonysággal. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az antitest által felismert epitóp a CP hiányzó, 45 aminosav hosszú szakaszán helyezkedik el. Így egy vírusspecifikus epitópokat tartalmazó, erősen immunogén régiót érintő deléció, még a növényi vírusok kimutatására széleskörűen használt és jól jellemzett diagnosztikai reagensek alkalmazása esetén is megakadályozhatja a megbízható detektálást, és a vizsgálatok során vírusmentesnek talált szaporítóanyagok valójában vírushordozók lehetnek. A deléció a nukleinsav-alapú (PCR) kimutatást is megghiúsíthatja.

A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus *N. benthamiana* növényekben a teljes hosszúságú CP gént hordozó vírushoz képest nagyobb mértékű akkumulációra képes anélkül, hogy bármiféle változás történe a tünetek kifejlődésében. Amennyiben a deléciós CP génnel rendelkező vírus akkumulációja természetes körülmények között, a csonthéjas gyümölcsfajokban is hasonló szintű, akkor az ilyen típusú PPV változat igen gyorsan a természetes PPV populációk domináns tagjává válhat. Ehhez járul, hogy a deléciós CP gént hordozó vírus kísérletileg *N. benthamiana* tesztnövényekre levéltetvekkel hatékonyan átvihető. Eddigi ismereteink szerint a CP-ben a levéltetű-átvitelért kizárólag a DAG motívum a felelős (Atreya és mtsai, 1990, 1991, 1995), mely a PPV-B1298 izolátum CP-je N-terminális részén megtalálható. Az izolátum levéltetvekkel való átvihetőségét – igaz csak laboratóriumi körülmények között – *N. benthamiana* növényeken igazoltuk, de feltételezhető, hogy a vírus kísérletileg *Prunus*-fajokra is átvihető, ahogy azt az eddig vizsgált PPV-Rec izolátumok esetében kimutatták (Glasa és mtsai, 2002a, 2004). Így fennáll annak a lehetősége, hogy a természetben is hatékonyan képes levéltetvekkel terjedni természetes gazdanövényei között. Ezáltal a nagyobb mértékű akkumulációra képes deléciós mutáns változat tovább növelheti a Magyarországon amúgy is tapasztalt nagy fertőzési nyomást.

Az RNS genommal rendelkező vírusok nagyfokú genetikai variabilitással rendelkeznek (García-Arenal és mtsai, 2001, 2003). A mutáció és a rekombináció a változékonyság fontos forrásai és feltehetően jelentős szerepet játszottak és játszanak a vírusok evolúciójában (Cervera és mtsai, 1993; Simon és Bujarski, 1994; Worobey és Holmes, 1999). A PPV-B1298 rövidebb CP gént hordozó izolátum jelenléte a természetes PPV populációkban valószínűleg nem ritka esemény, hiszen a CP gént érintő deléciókat munkánk során a 9 vizsgált izolátum közül 2 esetében is megfigyeltük. Ezeket a vizsgálatokat tovább kívánjuk folytatni nagyobb mintaszám mellett. A CP génben deléciókat hordozó mutáns PPV-izolátumok gyors kimutatása és részletesebb jellemzése céljából terveink között szerepel a CP gén előtti és a központi régió 5' végére PPV-specifikus primerek előállításának.

A PPV elleni védekezés alapja az egészséges (vírusmentes) szaporítóanyag előállítása, forgalmazása és felhasználása, így a természetes deléciókat hordozó mutáns izolátumok nagy veszélyt jelenthetnek a vírusfertőzöttség megbízható kimutatásának tekintetében. Ez a jelenség a vírus akkumulációjában tapasztalt kompetitív előnnyel együtt egy eddig nem tapasztalt PPV járvány kialakulását eredményezheti.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A szilva himlő vírus (*Plum pox virus*, PPV) Európában a *Prunus*-fajok gazdaságilag legjelentősebb vírus eredetű kórokozója, mely súlyos károkat idéz elő hazánk csonthéjas ültetvényeiben. A vírus által okozott betegséget először Bulgáriában írták le, azóta gyorsan elterjedt Európában, és jelenleg szinte az egész világon megtalálható. Nagyszámú PPV-izolátum vizsgálata során az elmúlt 30 év alatt a PPV-izolátumok 3 nagyobb (PPV-D, PPV-M, PPV-Rec) és 3 kisebb (PPV-EA, PPV-C, PPV-W) csoportját különítették el.

A PPV által okozott betegség hatékony leküzdéséhez szükséges stratégiák kidolgozásának és a diagnosztikának fontos eszköze a vírusgenom változékonyságának és az izolátumok csoportbeli hovatartozásának ismerete. Ezért dolgozatomban Bulgáriából szilváról, valamint hazánkból kajsziról és szilváról származó PPV-izolátumok molekuláris szintű változékonyságának vizsgálatát, valamint az izolátumok csoportbeli hovatartozásának megállapítását végeztem el. Egy rövidebb CP génnel rendelkező, szilváról származó, hazai rekombináns PPV-izolátum (PPV-B1298) a PPV epidemiájában betöltött lehetséges szerepét is vizsgáltam. Munkánk során a PPV-izolátumok molekuláris szintű vizsgálatához, valamint a PPV-B1298 izolátum részletesebb jellemzéséhez széleskörűen használt molekuláris biológiai és egyéb módszereket alkalmaztuk. Eredményeim az alábbiakban foglalhatók össze:

A vírusgenom vizsgált régióinak (3'Nib-CP, 3'P3-6K₁-5'CI, 3'HC-Pro-5'P3) megfelelő, RT-PCR során felszaporított cDNS nukleotid és abból származó aminosav szekvencia hasonlóság-, illetve filogenetikai vizsgálata, valamint a 3'P3-6K₁-5'CI régióról készült PCR-termékek RFLP analízise alapján a jellemzett 9 izolátum közül 6 (PPV-Troy1, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6, PPV-B1298, PPV-Gödöllő2) a PPV-Rec izolátumokhoz, míg a fennmaradó 3 (PPV-Troy2, PPV-Sóskút1, PPV-Szigetcsép1) a PPV-D csoporthoz tartozott. Vizsgálataink során rekombinánsnak bizonyult izolátumok mindegyikében azonosítható volt a rekombinációs pont a genom 3' végén. A 3'HC-Pro-5'P3 régiójában is jellemzett PPV-Troy6 izolátum genomjának 5' végén is megfigyelhető volt egy rekombinációs esemény megtörténte.

A cDNS CP gének megfelelő szakaszán a vizsgált izolátumok közül két hazai rekombináns izolátum (PPV-B1298, PPV-Gödöllő2) esetében kereteltolódást nem okozó deléciókat mutattunk ki. A szilváról származó PPV-B1298 izolátum CP génje 135 nukleotiddal, a kajsziról gyűjtött PPV-Gödöllő2 izolátumé 33 bázissal rövidebbnek bizonyult, mely 45, illetve 11 aminosav hiánynak felel meg a származtatott CP N-terminális részén. A CP génben deléciókat hordozó eddig ismert természetes mutáns PPV-izolátumok közül a PPV-B1298 rendelkezik a leghosszabb delécióval.

A jellemezni kívánt PPV-izolátumok 3'P3-6K₁-5'CI régiója típusának meghatározása céljából 8 izolátum esetében RT-PCR során ezt a régiót is felszaporítottuk. A PCR-termékek *EcoRI*, illetve *DdeI* D-típusú szekvencia-specifikus endonukleázokkal végzett hasítása során a

3'NIB-CP régió alapján rekombinánsnak bizonyult PPV-Troy6 és a PPV-D csoportba tartozó PPV-Sóskút1 izolátumok esetében atipikus restriktív mintázatot kaptunk. Ezeket az izolátumokat csak az egyik enzim hasította. A 3'P3-6K₁-5'CI régió szekvencia analízise során kimutattuk, hogy a *DdeI* (PPV-Troy6), illetve az *EcoRI* (PPV-Sóskút1) hasító helyek hiányát a felismerő helyekben bekövetkezett pontmutációk okozták a D-típusú szekvenciákon, és nem egy, a régiót érintő rekombinációs esemény játszott abban szerepet. A kapott eredmények azt jelzik, hogy a restriktív analízis a PPV-izolátumok csoportbeli hovatartozásának megbízható meghatározására csak korlátozottan alkalmazható. Így a PPV-izolátumok típusának pontos megállapítása vagy azonos régiót célzó különböző módszerek együttes alkalmazásával, vagy különböző régiók párhuzamos vizsgálatával lehetséges. A pontmutáció ugyan gyakori a PPV-izolátumok genomjában, de a 3'P3-6K₁-5'CI régióban található konzervatív *EcoRI*, illetve *DdeI* restriktív helyben pontmutációval rendelkező PPV-D, illetve PPV-Rec izolátumról eddig csak mi számoltunk be.

A PPV-B1298 izolátum további jellemzése céljából, valamint annak igazolásaképpen, hogy a B1298 CP gén valóban rövidebb, és nem csak PCR-műtermékről van szó, a PPV-B1298 izolátum CP génjének megfelelő cDNS-szakaszt beépítettük egy fertőzőképes PPV klónba. A CP gén cseréje nem okozott változást az eredeti klón fertőzőképességében és a tünetek megjelenésében. A PPV-B1298 a természetes deléziós folyamatok következtében a teljes hosszúságú CP 13,64%-át, csupán az N-terminális részt vizsgálva annak 48,91%-át elvesztette, mely azonban nem okozott strukturális változást annak szerkezetében. A deléció nem befolyásolta a vírusrészecskék kialakulását vírusfertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben, a partikulumok átmérője azonban kisebbnek bizonyult a teljes hosszúságú CP gént hordozó virionhoz képest. Ezenfelül a B1298 CP gént hordozó vírus levéltetvekkel *N. benthamiana* növényekre kísérletileg átvihető volt. A rövidebb CP génnel rendelkező vírust a kereskedelmi forgalomból beszerezhető PPV CP-specifikus ellenanyagok eltérő hatékonysággal ismerték fel. A vírus nem mindegyik antitesttel volt kimutatható, ezáltal veszélyt jelenthet a PPV biztonságos detektálásában. Ennek a természetes deléciónak a vírus akkumulációjában betöltött szerepét kompetíciós kísérletek során vizsgáltuk. Az eredmények azt mutatták, hogy a rövidebb CP gént hordozó vírus szelekciós előnnyel rendelkezik, nagyobb mértékű akkumulációra képes *N. benthamiana* növényeken, mint a vad típusú vírus anélkül, hogy bármiféle változás történne a tünetek kifejeződésében. Amennyiben a deléziós CP génnel rendelkező vírus akkumulációja természetes körülmények között, a csontthéjas gazdanövényekben is hasonló szintű, akkor az ilyen típusú PPV változat igen gyorsan a természetes PPV populációk domináns tagjává válhat.

8. SUMMARY

Plum pox virus (PPV) is the economically most important viral pathogen of *Prunus* species in Europe, causing severe damage in Hungarian stone fruit orchards. Sharka disease, caused by PPV, was first described in Bulgaria, since then PPV has spread throughout Europe and nowadays it is present nearly all over the world. During the analysis of a large number of PPV isolates over the last 30 years three major (PPV-D, PPV-M, PPV-Rec) and three minor (PPV-EA, PPV-C, PPV-W) groups of isolates were identified.

Determination of genetic variability of PPV isolates, and accurate identification of their specific groups are important tools for designing effective disease-control strategies against Sharka. Therefore investigation of the molecular variability of some PPV isolates collected in Bulgaria from plum, and in Hungary from apricot and plum, as well as determination of their isolate groups were carried out. In addition, analysis of the possible role in the PPV epidemiology of a Hungarian recombinant PPV isolate (PPV-B1298), collected from plum bearing truncated coat protein (CP) gene was also done. For molecular characterization of the analysed Bulgarian and Hungarian PPV isolates and for further investigation of the PPV-B1298 isolate standard molecular biology protocols and other methods were used. The results can be summarized as follows:

On the bases of nucleotide and deduced amino acid sequence similarities and phylogenetic analysis generated using sequences of the RT-PCR amplified cDNA fragments corresponding to genomic regions under focus (3'Nib-CP, 3'P3-6K₁-5'CI, 3'HC-Pro-5'P3), as well as RFLP analysis of the PCR fragments derived from the 3'P3-6K₁-5'CI region six isolates (PPV-Troy1, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6, PPV-B1298, PPV-Gödöllő2) out of the nine analysed belonged to the PPV-Rec group, while the remaining three (PPV-Troy2, PPV-Sóskút1, PPV-Szigetcsép1) could be classified as members of the PPV-D group. All of the isolates identified as recombinants possessed recombination breakpoint at the 3' end of the PPV genome. In the case of the PPV-Troy6 isolate, of which nucleotide and deduced amino acid sequences derived from the 3'P3-6K₁-5'CI region were also analysed, a recombination event had also occurred at the 5' end of the genome.

In the case of two Hungarian PPV-Rec isolates (PPV-B1298, PPV-Gödöllő2) in frame deletions were detected in the CP genes during the sequence analysis of the RT-PCR amplified cDNA fragments corresponding to this region. The PPV-B1298 isolated from plum and the PPV-Gödöllő2 isolated from apricot bearing a 135- and a 33-nucleotide deletion, which correspond to a 45-, and a 11-amino acid deletion in the N-terminal region of the CP,

respectively. Among the known deletion mutant PPV isolates the PPV-B1298 is the one, which has the largest deletion in the CP region.

The 3'P3–6K₁–5'CI region was also amplified by RT-PCR in the case of eight analysed PPV isolates in order to determine the type of this region. Restriction analysis of the PCR products derived from the 3'P3–6K₁–5'CI genomic region using *EcoRI* and *DdeI* D-type sequence-specific restriction enzymes resulted an atypical restriction pattern in the case of PPV-Troy6 and PPV-Sóskút1 isolates. PCR fragments could be cleaved only by one of the two enzymes used, although these isolates were identified as PPV-Rec and PPV-D according to the 3'Nib–CP region, respectively. Sequence analysis of the 3'P3–6K₁–5'CI region revealed that the lack of the *EcoRI* (PPV-Sóskút1) and the *DdeI* (PPV-Troy6) cleavage sites resulted from point mutations occurred in the D-type sequences. These unusual restriction properties are not consequences of recombination events targeted the 3'P3–6K₁–5'CI region. Obtained data indicate some limitation of restriction enzyme mapping for accurate classification of PPV isolates and support the recommendation of multiple approaches used for proper identification. Point mutations are common among PPV isolates, but no PPV-Rec (PPV-Troy6) or PPV-D (PPV-Sóskút1) isolates have been detected to date that possess point mutation in the conserved *DdeI* or *EcoRI* restriction sites of the 3'P3–6K₁–5'CI region.

For further investigation of the PPV-B1298 isolate and to prove that the PCR product corresponding to the B1298 CP gene was not a PCR artifact, but it is shorter indeed, this fragment was cloned into an infectious PPV clone. The integration of the truncated CP gene had no effect on infectivity and symptomatology. Due to the natural deletion, the CP of the PPV-B1298 isolate had been shortened by 13.64%, while focusing solely on the N-terminal region, the reduction was 48.91%. This deletion neither caused structural changes in the CP, nor affected particle formation in virus infected *Nicotiana benthamiana* plants, but diameter of the virions was reduced compared to particles of the wild type virus bearing complete CP gene. In addition to, the B1298 CP gene bearing virus was experimentally aphid-transmissible to *N. benthamiana* plants. Immuno-detectability of the shorter CP gene carrying virus varied according to the PPV CP-specific antibody used, available from commercial sources. Not all antibodies recognized the CP deletion mutant virus, which could be dangerous with regard to safe detection of PPV infection. The advantage of this natural deletion in virus accumulation was evaluated in competition experiments. The results showed that the shorter CP gene containing virus has detectable advantage in virus accumulation over the wild-type CP expressing PPV, without any changes in symptom development on *N. benthamiana*. If the accumulation rates are similar in stone fruit trees in the nature, this type of PPV variant could become a dominant isolate of the virus populations in the near future.

9. MELLÉKLETEK

M1. IRODALOMJEGYZÉK

1. Aaziz, R., Tepfer, M. (1999): Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *Journal of General Virology*, 80 (6): 1339–1346. p.
2. Al Rwahnih, M., Boscia, D., Myrta, A., Di Terlizzi, B. (2001): First record of plum pox virus in Jordan. *Acta Horticulturae*, 550: 141–144. p.
3. Allison, R. F., Dougherty, W. G., Parks, T. D., Willis, L., Johnston, R. E., Kelly, M., Armstrong, F. B. (1985): Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology*, 147 (2): 309–316. p.
4. Allison, R. F., Janda, M., Ahlquist, P. (1989): Sequence of cowpea chlorotic mottle virus RNAs 2 and 3 and evidence of a recombination event during bromovirus evolution. *Virology*, 172 (1): 321–330. p.
5. Arazi, T., Shibolet, Y. M., Gal-On, A. (2001): A nonviral peptide can replace the entire N terminus of zucchini yellow mosaic potyvirus coat protein and permits viral systemic infection. *Journal of Virology*, 75 (14): 6329–6336. p.
6. Asensio, M., Gorris, M. T., Camarasa, E., Pérez, E., Carbonell, E. A., Cambra, M., Sanz, A., (1995): Characterization and detection of plum pox virus using monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae*, 386: 354–356. p.
7. Atanasoff, D. (1932): Sarka po slivite, Edna nova virus a bolest. [Plum pox. A new virus disease.] *Yearbook University of Sofia, Faculty of Agriculture*, 11: 49–70. p.
8. Atreya, C. D., Raccach, B., Pirone, T. P. (1990): A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology*, 178 (1): 161–165. p.
9. Atreya, P. L., Atreya, C. D., Pirone, T. P. (1991): Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88 (17): 7887–7891. p.
10. Atreya, P. L., Lopez-Moya, J. J., Chu, M., Atreya, C. D. (1995): Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology*, 76 (2): 265–270. p.

11. Avinent, L., Hermoso de Mendoza, A., Llácer, G. (1994): Transmission of plum pox potyvirus in Spain. *EPPO Bulletin*, 24 (3): 669–674. p.
12. Baulcombe, D. C., (1996): Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell*, 8 (10): 1833–1844. p.
13. Baumgartnerová, H. (1996): First findings of plum pox virus in walnut trees (*Juglans regia* L.). *Acta Virologica*, 40 (1): 59–60. p.
14. Bhardwaj, S. V., Kohosla, K., Sharma, D. R., Thakur, P. D. (1995): Detection of plum pox virus in India. *Acta Horticulturae*, 386: 237–240. p.
15. Blanc, S., López-Moya, J. J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D. W., Pirone, T. P. (1997): A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology*, 231 (1): 141–147. p.
16. Blatný, C., Heger, M. (1965): Some remarks to the economical importance of šarka disease in Czechoslovakia. *Zaštita Bilja*, 16: 417–418. p.
17. Bloomer, A. C., Champness, J. N., Bricogne, G., Staden, R., Klug, A. (1978): Protein disc of tobacco mosaic virus at 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits. *Nature*, 276 (5683): 362–368. p.
18. Blystad, D. R., Munthe, T. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in Norway. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 212. p.
19. Boeglin, M., Quiot, J. B., Labonne, G. (2004): Risk assessment of contamination of cherry trees by *Plum pox virus* in France. *Acta Horticulturae*, 657: 221–224. p.
20. Bonnet, J., Fraile, A., Sacristán, S., Malpica, J. M., García-Arenal, F. (2005): Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus. *Virology*, 332 (1): 359–368. p.
21. Boscia, D., Zeramdini, H., Cambra, M., Potere, O., Gorris, M. T., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V. (1997): Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (5): 477–480. p.
22. Boulila, M., Briard, P., Ravelonandro, M. (2004): *Plum pox virus* in Tunisia: Sources and preliminary characteristics. *Acta Horticulturae*, 657: 189–193. p.
23. Bousalem, M., Candresse, T., Quiot-Douine, L., Quiot, J. B. (1994a): Comparison of three methods for assessing plum pox virus variability: further evidence for the

- existence of two major groups of isolates. *Journal of Phytopathology*, 142 (2): 163–172. p.
24. Bousalem, M., Candresse, T., Quiot-Douine, L., Quiot, J. B. (1994b): Corrélation entre trois techniques permettant de différencier les isolats du plum pox potyvirus. [Correlation between three techniques for differentiating between plum pox potyvirus isolates.] *EPPO Bulletin*, 24 (3): 651–656. p.
 25. Bousalem, M., Dallot, S., Fuji, S., Natsuaki, K. T. (2003): Origin, world-wide dispersion, bio-geographical diversification, radiation and recombination: an evolutionary history of *Yam mild mosaic virus* (YMMV). *Infection, Genetics and Evolution*, 3 (3): 189–206. p.
 26. Bousalem, M., Douzery, E. J. P., Fargette, D. (2000): High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus*: a contribution to understanding potyvirus evolution. *Journal of General Virology*, 81 (1): 243–255. p.
 27. Cambra, M. A., Crespo, J., Gorrís, M. T., Martínez, M. C., Olmos, A., Capote, N., Cambra, M. (2004): Detection and eradication of *Plum pox virus* Marcus type in Aragón (Spain). *Acta Horticulturae*, 657: 231–235. p.
 28. Cambra, M., Asensio, M., Gorrís, M. T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J. A., Moya, J. J., López-Abella, D., Vela, C., Sanz, A. (1994): Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *EPPO Bulletin*, 24 (3): 569–577. p.
 29. Cambra, M., Boscía, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, M., Gorrís, M. T., Capote, N. (2006a): Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 254–261. p.
 30. Cambra, M., Capote, N., Cambra, M. A., Llácer, G., Botella, P., López-Quílez, A. (2006b): Epidemiology of sharka disease in Spain. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 271–275. p.
 31. Candresse, T., Cambra, M. (2006): Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 239–246. p.
 32. Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorrís, M. T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscía, D., Quiot, J. B., Dunez, J. (1998): Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates

- belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. *Phytopathology*, 88 (3): 198–204. p.
33. Candresse, T., Macquaire, G., Lanne[au], M., Bousalem, M., Quiot-Douine, L., Quiot, J. B., Dunez, J. (1995): Analysis of plum pox virus variability and development of strain-specific PCR assays. *Acta Horticulturae*, 386: 357–369. p.
 34. Candresse, T., Macquaire, G., Lanneau, M., Bousalem, M., Wetzel, T., Quiot-Douine, L., Quiot, J. B., Dunez, J. (1994): Detection of plum pox potyvirus and analysis of its molecular variability using immunocapture-PCR. *EPPO Bulletin*, 24 (3): 585–594. p.
 35. Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Caglayan, K., Çevik, B. (2007): First report of the presence of *Plum pox virus* Rec strain in Turkey. *Plant Disease*, 91(3): 331. p.
 36. Capote, N., Gorris, M. T., Martínez, M. C., Asensio, M., Olmos, A., Cambra, M. (2006): Interference between D and M types of *Plum pox virus* in Japanese plum assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96 (3): 320–325. p.
 37. Cascone, P. J., Carpenter, C. D., Li, X. H., Simon, A. E. (1990): Recombination between satellite RNAs of turnip crinkle virus. *EMBO Journal*, 9 (6): 1709–1715. p.
 38. Cervera, M. T., Riechmann, J. L., Martín, M. T., García, J. A. (1993): 3'-Terminal sequence of the plum pox virus PS and 6 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *Journal of General Virology*, 74 (3): 329–334. p.
 39. Christoff, A. (1958): Die Odstviroosen in Bulgarien. *Phytopath. Z.*, 31: 381–436. p.
 40. Chung, B. Y.-W., Miller, W. A., Atkins, J. F., Firth, A. E. (2008): An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105 (15): 5897–5902. p.
 41. Clark, M. F., Adams, A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34 (3): 475–483. p.
 42. Crescenzi, A., d'Aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzolla, P., Boscia, D., Hadidi, A. (1997): Characterization of the sweet cherry isolate of plum pox potyvirus. *Plant Disease*, 81 (7): 711–714. p.
 43. Crescenzi, A., Nuzzaci, M., Piazzolla, P., Levy, L., Hadidi, A. (1995): Plum pox virus (PPV) in sweet cherry. *Acta Horticulturae*, 386: 219–225. p.

44. Dal Zotto, A., Ortego, J. M., Raigón, J. M., Caloggero, S., Rossini, M., Ducasse, D. A. (2006): First report in Argentina of *Plum pox virus* causing sharka disease in *Prunus*. *Plant Disease*, 90 (4): 523. p.
45. Dallot, S., Kamenova, I., Glasa, M., Pittnerova, S., Kominek, P., Paunović, S., Jevremović D., Virscek-Marn M., Mavric Plesko I., Milusheva S. (2008): Prevalence and genetic structure of PPV-M in six European countries. *Acta Horticulturae*, 781: 227–234. p.
46. Dallot, S., Labonne, G., Boeglin, M., Quiot-Douine, L., Quiot, J. B., Candresse, T. (1998): Peculiar plum pox potyvirus D-populations are epidemic in peach trees. *Acta Horticulturae*, 472 (2): 355–365. p.
47. Deborré, G., Jelkman[n], W., Maiss, E. (1995): Biological and molecular biological investigations of several plum pox virus (PPV) isolates. *Acta Horticulturae*, 386: 253–262. p.
48. Desbiez, C., Lecoq, H. (2004): The nucleotide sequence of *Watermelon mosaic virus* (WMV, *Potyvirus*) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 5' part of the genome. *Archives of Virology*, 149 (8): 1619–1632. p.
49. Desvignes, J. C., Grasseau, N., Boyé, R., Gentit, P. (1998): Cherry plum pox potyvirus: receptivity of cherry trees and hosts of the sour cherry strain. *Acta Horticulturae*, 472 (2): 351–354. p.
50. Devereux, J., Haerberli, P., Smithies, O. (1984): A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX. *Nucleic Acids Research*, 12 (1/1): 387–395. p.
51. Dietrich, C., Maiss, E. (2003): Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of General Virology*, 84 (10): 2871–2876. p.
52. Divéki, Z., Salánki, K., Balázs, E. (2002): Limited utility of blue fluorescent protein (BFP) in monitoring plant virus movement. *Biochimie*, 84 (10): 997–1002. p.
53. Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G., Carrington, J. C. (1994): Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO Journal*, 13 (6): 1482–1491. p.
54. Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. A., Carrington, J. C. (1995): Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology*, 206 (2): 1007–1016. p.

55. Dulic-Markovic, I. (2003): *Plum pox virus* strains in Yugoslavia. 61–63. p. In: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. (Szerk.): *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region*. [Bari, Italy: CIHEAM-IAMB.] (Options Méditerranéenne: Series B. Studies and Research, 45) 172 p.
56. Dulic-Markovic, I., Jevremovic, D. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in Serbia. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 213. p.
57. Dunez, J. (1986): Primary observations on virus and virus-like diseases of stone-fruit trees in the Mediterranean and Near East countries. *FAO Plant Protection Bulletin*, 34 (1): 43–48. p.
58. Edwardson, J. R., Christie, R. G., Ko, N. J. (1984): Potyvirus cylindrical inclusions–subdivision-IV. *Phytopathology*, 74 (8): 1111–1114. p.
59. Fanigliulo, A., Comes, S., Crescenzi, A. (2004): Evaluation of cherry cultivars for their response to infection by *Plum pox virus* sweet cherry strain. *Acta Horticulturae*, 657: 309–316. p.
60. Fanigliulo, A., Comes, S., Maiss, E., Piazzolla, P., Crescenzi, A. (2003): The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationships within the species. *Archives of Virology*, 148 (11): 2137–2153. p.
61. Fernández-Fernández, M. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Casal, J. I., García, J. A. (1998): Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS Letters*, 427: 229–235. p.
62. Fernández-Fernández, M. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Roncal, F., Domínguez, E., García, J. A. (2002): Identification of immunogenic hot spots within plum pox potyvirus capsid protein for efficient antigen presentation. *Journal of Virology*, 76 (24): 12646–12653. p.
63. Fos, A., Massonié, G. (1993): Transmission expérimentale du virus de la sharka par *Brachycaudus persicae* Passerini. [Experimental transmission of plum pox virus by *Brachycaudus persicae* Passerini.] *Agronomie*, 13 (6): 515–518. p.
64. Fraile, A., Alonso-Prados, J. L., Aranda, M. A., Bernal, J. J., Malpica, J. M., García-Arenal, F. (1997): Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. *Journal of Virology*, 71 (2): 934–940. p.

65. Furuya, T., Macnaughton, T. B., La Monica, N., Lai, M. M. C. (1993): Natural evolution of coronavirus defective-interfering RNA involves RNA recombination. *Virology*, 194 (1): 408–413. p.
66. Gadiou, S., Šafářová, D., Navrátil, M. (2008): Genetic variability of *Plum pox virus* isolates in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, 121 (4): 513–517. p.
67. Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A., Raccach, B. (1992): A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *Journal of General Virology*, 73 (9): 2183–2187. p.
68. Gal-On, A., Meiri, E., Raccach, B., Gaba, V. (1998): Recombination of engineered defective RNA species produces infective potyvirus in planta. *Journal of Virology*, 72 (6): 5268–5270. p.
69. García-Arenal, F., Fraile, A., Malpica, J. M. (2001): Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 157–186. p.
70. García-Arenal, F., Fraile, A., Malpica, J. M. (2003): Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology: the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 6 (4): 225–232. p.
71. Gildow, F., Damsteegt, V., Stone, A., Schneider, W., Luster, D., Levy, L. (2004): Plum pox in North America: Identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread. *Phytopathology*, 94 (8): 868–874. p.
72. Glais, L., Tribodet, M., Kerlan, C. (2002): Genomic variability in *Potato potyvirus Y* (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. *Archives of Virology*, 147 (2): 363–378. p.
73. Glasa, M. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in Slovakia. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 214. p.
74. Glasa, M., Candresse, T. (2005): Partial sequence analysis of an atypical Turkish isolate provides further information on the evolutionary history of *Plum pox virus* (PPV). *Virus Research*, 108 (1-2): 199–206. p.
75. Glasa, M., Candresse, T. (2006): Appendix 1 Note concerning the reference to walnut as a natural host of PPV. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 226. p.
76. Glasa, M., Kúdela, O., Marie-Jeanne, V., Quiot, J. B. (2001): Evidence of a naturally occurring recombinant isolate of *Plum pox virus* from Slovakia. *Plant Disease*, 85 (8): 920. p.

77. Glasa, M., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Šubr, Z., Kúdela, O., Quiot, J.-B. (2002a): A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 108 (9): 843–853. p.
78. Glasa, M., Marie-Jeanne, V., Moury, B., Kúdela, O., Quiot, J.-B. (2002b): Molecular variability of the P3-6K₁ genomic region among geographically and biologically distinct isolates of *Plum pox virus*. *Archives of Virology*, 147 (3): 563–575. p.
79. Glasa, M., Palkovics, L., Komínek, P., Labonne, G., Pittnerová, S., Kúdela, O., Candresse, T., Šubr, Z. (2004): Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology*, 85 (9): 2671–2681. p.
80. Glasa, M., Paunovic, S., Jevremovic, D., Myrta, A., Pittnerová, S., Candresse, T. (2005): Analysis of recombinant *Plum pox virus* (PPV) isolates from Serbia confirms genetic homogeneity and supports a regional origin for the PPV-Rec subgroup. *Archives of Virology*, 150 (10): 2051–2060. p.
81. Glasa, M., Svanella, L., Candresse, T. (2006): The complete nucleotide sequence of the *Plum pox virus* El Amar isolate. *Archives of Virology*, 151 (8): 1679–1682. p.
82. Greene, A. E., Allison, R. F. (1994): Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science*, 263 (5152): 1423–1425. p.
83. György, B. (1976): Biochemical changes of plums caused by plum pox virus. *Acta Horticulturae*, 67: 77–82. p.
84. Harper, G., Osuji, J. O., Heslop-Harrison, J. S., Hull, R. (1999): Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: Molecular and Cytogenetic Evidence. *Virology*, 255 (2): 207–213. p.
85. Harrison, B. D., Robinson, D. J. (1988): Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 321 (1207): 447–462. p.
86. Horváth J. (1972): Vírusátvitel levéltetvekkkel (aphidofil vírusok). 147–195. p. In: *Növényvírusok, vektorok, vírusátvitel*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 515 p.
87. Husz B., Klement Z. (1950): A csonthéjas gyümölcsfák vírusos mozaikbetegsége. *Agrártudományi Egyetem Kert- és Szőlőgazdaságtudományi Karának Évkönyve*, 1950: 83–94. p.

88. Ismaeil, F., Myrta, A., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Al Chaabi, S., Savino, V. (2002): Viruses and viroids of stone fruits in Syria. *EPPO Bulletin*, 32 (3): 485–488. p.
89. Jagdish, M. N., Huang, D., Ward, C. W. (1993): Site-directed mutagenesis of a potyvirus coat protein and its assembly in *Escherichia coli*. *Journal of General Virology*, 74 (5): 893–896. p.
90. Jagdish, M. N., Ward, C. W., Gough, K. H., Tulloch, P. A., Whittaker, L. A., Shukla, D. D. (1991): Expression of a potyvirus coat protein in *Escherichia coli* and yeast and its assembly into virus-like particles. *Journal of General Virology*, 72 (7): 1543–1550. p.
91. James, D., Glasa, M. (2006): Causal agent of sharka disease: new and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization. *EPPO Bulletin*, 36 (2):247–250. p.
92. James, D., Varga, A. (2005): Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: Evidence of a new strain. *Virus Research*, 110 (1-2): 143–150. p.
93. James, D., Varga, A., Thompson, D., Hayes, S. (2003): Detection of a new and unusual isolate of *Plum pox virus* in plum (*Prunus domestica*). *Plant Disease*, 87 (9): 1119–1124. p.
94. Jordović, M., Janda, L. (1963): Morfološko anatomske i hemijske promene na plodovima nekih sorata šljiva zaraženih virusom šarke šljive. [Morphological, anatomical and chemical changes on the fruits of some plum varieties infected by virus plum pox disease.] *Zaštita Bilja*, 14: 653–670. p.
95. Kajic, V., Cerni, S., Krajacic, M., Mikec, I., Škoric, D. (2008): Molecular typing of *Plum pox virus* isolates in Croatia. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1S): S1.9–S1.13.
96. Kalashyan, Yu. A., Bilkey, N. D., Verderevskaya, T. D., Rubina, E. V. (1994): Plum pox potyvirus on sour cherry in Moldova. *EPPO Bulletin*, 24 (3): 645–649. p.
97. Kamenova, I. (2008): *Prunus cerasifera* as a host of *Plum pox virus* in Bulgaria. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1S): S1.15–S1.18.
98. Kamenova, V., Milusheva, S., Borisova, A., Stoev, A., Myrta, A. (2003): *Plum pox virus* strains in Bulgaria. 65–67. p. In: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. (Szerk.): *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region*. [Bari, Italy: CIHEAM-IAMB.] (Options Méditerranéennes: Series B. Studies and Research, 45) 172 p.

99. Kang, S. H., Lim, W. S., Hwang, S. H., Park, J. W., Choi, H. S., Kim, K. H. (2006): Importance of the C-terminal domain of soybean mosaic virus coat protein for subunit interactions. *Journal of General Virology*, 87 (1): 225–229. p.
100. Kerlan, C., Dunez, J. (1979): Différentiation biologique et sérologique de souches du virus de la Sharka. [Biological and serological differentiation of strains of sharka virus.] *Annales de Phytopathologie*, 11 (2): 241–250. p.
101. Kimalov, B., Gal-On, A., Stav, R., Belausov, E., Arazi, T. (2004): Maintenance of coat protein N-terminal net charge and not primary sequence is essential for zucchini yellow mosaic virus systemic infectivity. *Journal of General Virology*, 85 (11): 3421–3430. p.
102. Kiss, L., Sebestyén, E., László, E., Salamon, P., Balázs, E., Salánki, K. (2008): Nucleotide sequence analysis of peanut stunt virus Rp strain suggests the role of homologous recombination in cucumovirus evolution. *Archives of Virology*, 153 (7): 1373–1377. p.
103. Koenig, R., Tremaine, J. H., Shepard, J. F. (1978): In situ degradation of the protein chain of potato virus X at the N- and C-termini. *Journal of General Virology*, 38 (2): 329–337. p.
104. Kollerová, E., Nováková, S., Šubr, Z., Glasa, M. (2006): Plum pox virus mixed infection detected in apricot in Pakistan. *Plant Disease*, 90 (8): 1108. p.
105. Kondratenko, P., Udovychenko, V. (2006): Plum pox virus (PPV) in Ukraine. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 217. p.
106. Kölber, M., Nemeth, M., Chernets, A., Kalashian, Y., Dulic-Markovic, I., Glasa, M., Isac, M., Kriska, B., Malinowski, T., Zawadzka, B., Minoiu, N., Myrta, A., Navratil, M., Prichodko, Y., Slovakova, L., Topchiiska, M. (2001): Current situation of plum pox disease on stone fruit species in middle and eastern Europe. *Acta Horticulturae*, 550: 73–78. p.
107. Kölber, M., Németh, M., Krizbai, L., Szemes, M., Kiss-Tóth, E., Dorgai, L., Kálmán, M. (1998a): Detectability of prunus necrotic ringspot and plum pox viruses by RT-PCR, multiplex RT-PCR, ELISA and indexing on woody indicators. *Acta Horticulturae*, 472 (1): 243–247. p.
108. Kölber, M., Németh, M., Tőkés, G., Krizbai, L., Szönyegi, S., Ember, I., Bereczky, Zs., Pocsai, E., Hangyál, R., Vollent, Á., Bencze, E., Papp, E., Pete, A., Hajnóczy, Gy., Kiss, E., Imre, P., Takács, M., Merő, F. (1998b): A five-year study to determine the

- eventual occurrence of plum pox virus in cherry cultivars in Hungary. *Acta Horticulturae*, 472 (2): 495–502. p.
109. Krause-Sakate, R., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Pavan, M. A., Zerbini, F. M., Marrakchi, M., Candresse, T., Le Gall, O. (2004): A naturally occurring recombinant isolate of *Lettuce mosaic virus*. *Archives of Virology*, 149 (1): 191–197. p.
 110. Krczal, G., Avenarius, U. (1995): Detection and characterization of plum pox virus (PPV) isolates from southern Germany by polymerase chain reaction (PCR). *Acta Horticulturae*, 386: 370–375. p.
 111. Krczal, H., Kunze, L. (1972): Untersuchungen zur Übertragung des Scharkavirus durch Blattläuse. [Investigations on the transmission of the sharka virus by aphids.] *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*, 144: 71–83. p.
 112. Kröll, J. (1973): Natural and experimental host plants of the sharka virus of plum trees. *Plant Virology, Proceedings of the 7th Conference of the Czechoslovak Plant Virologists*, High Tatras, 1971. 397–403. p.
 113. Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004): MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5 (2): 150–163. p.
 114. Labonne, G., Lauriaut, F., Yvon, M., Quiot, J. B. (1994): Dissémination du plum pox potyvirus par les pucerons: analyse des vecteurs potentiels du virus dans un verger d'abricotiers. [Aphid transmission of plum pox potyvirus: analysis of potential vectors in an apricot orchard.] *EPPO Bulletin*, 24 (3): 681–690. p.
 115. Labonne, G., Quiot, J. B. (2001): Aphids can acquire *Plum pox virus* from infected fruits. *Acta Horticulturae*, 550: 79–83. p.
 116. Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J. B., Avinent, L., Llacer, G. (1995): Aphids as potential vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae*, 386: 207–218. p.
 117. Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680–685. p.
 118. Lai, M. M. C. (1992): RNA Recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews*, 56 (1): 61–79. p.

119. Lai, M. M. C. (1995): Recombination and its evolutionary effect on viruses with RNA genomes. 119–132. p. In: Gibbs A. J., Calisher C. H., García-Arenal F. (Szerk.): *Molecular Basis of Virus Evolution*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 603 p. <http://books.google.hu/books?id=GIfkRybsA7oC&printsec=frontcover#PPA119,M1>; 2009. 02. 07. 22:30.
120. Laimer, M., Mendonça, D., Arthofer, W., Hanzer, V., Myrta, A., Boscia, D. (2003): Occurrence of different *Plum pox virus* strains in several stone fruit species in Austria. 79–83. p. In: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. (Szerk.): *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region*. [Bari, Italy: CIHEAM-IAMB.] (Options Méditerranéenne: Series B. Studies and Research, 45) 172 p.
121. Laín, S., Riechmann, J. L., García, J. A. (1989): The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research*, 13 (2): 157–172. p.
122. Le Gall, O., Lanneau, M., Candresse, T., Dunez, J. (1995): The nucleotide sequence of the RNA-2 of an isolate of the English serotype of tomato black ring virus: RNA recombination in the history of nepoviruses. *Journal of General Virology*, 76 (5): 1279–1283. p.
123. Leclant, F. (1973): Aspect écologique de la transmission de la Sharka (Plum pox) dans le sud-est de la France. Mise en évidence de nouvelles espèces d'aphides. [Ecological aspect of sharka (plum pox) virus transmission in south-eastern France: Demonstration of new aphid vectors.] *Annales de Phytopathologie*, 5 (4): 431–439. p.
124. Levy, L., Damsteegt, V., Welliver, R. (2000): First Report of *Plum pox virus* (Sharka Disease) in *Prunus persica* in the United States. *Plant Disease*, 84 (2): 202. p.
125. Levy, L., Hadidi, A., Kolber, M., Tokes, G., Nemeth, M. (1995): 3' non-coding region RT-PCR detection and molecular hybridization of plum pox virus in anthers of infected stone fruit. *Acta Horticulturae*, 386: 331–339. p.
126. Llácer, G., Cambra, M. (1986): Occurrence of plum pox virus in Spain in Japanese plum, a new natural host. *Plant Disease*, 70 (2): 173. p.
127. Llácer, G., Cambra, M. (2006): Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: fruiting *Prunus* species. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 219–221. p.
128. Llácer, G., Cambra, M., Laviña, A. (1985): Detection of plum pox virus in Spain. *EPPO Bulletin*, 15 (3): 325–329. p.

129. López-Moya, J. J., López-Abella, D., Díaz-Rúiz, J.-R., Martínez-García, B., Gáborjányi, R. (1997): Serological characterization of Hungarian plum pox virus isolates. *Zeitschrift für Naturforschung C – A Journal of Biosciences*, 52c (5-6): 391–395. p.
130. López-Moya, J. J., Pirone, T. P. (1998): Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. *Journal of General Virology*, 79 (1): 161–165. p.
131. López-Moya, J. J., Sanz, A., Cambra, M., Gorris, M. T., Anaya, C., Miguët, J. G., Cortés, E., López-Abella, D. (1994): Production and characterization of monoclonal antibodies to plum pox virus and their use in differentiation of Mediterranean isolates. *Archives of Virology*, 135 (3-4): 293–304. p.
132. López-Moya, J. J., Wang, R. Y., Pirone, T. P. (1999): Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *Journal of General Virology*, 80 (12): 3281–3288. p.
133. MacFarlane, S. (1997): Natural recombination among plant virus genomes: Evidence from tobnaviruses. *Seminars in Virology*, 8 (1): 25–31. p.
134. Mahajan, S., Dolja, V. V., Carrington, J. C. (1996): Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: Requirements for the translation process and a *cis*-active element. *Journal of Virology*, 70 (7): 4370–4379. p.
135. Maiss, E., Casper, R., Deborré, G., Jelkmann, W. (1995): Complete nucleotide sequence of a plum pox potyvirus isolate (PPV-SC) deriving from sour cherries and influence of a coat protein sequence motif on aphid transmission. *Acta Horticulturae*, 386: 340–345. p.
136. Maiss, E., Timpe, U., Brisske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D., Katinger, H. W. D. (1989): The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *Journal of General Virology*, 70 (3): 513–524. p.
137. Malinowski, T. (2003): *Plum pox disease in Poland: the past and current situation*. 99–101. p. In: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. (Szerk.): *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region*. [Bari, Italy: CIHEAM-IAMB.] (Options Méditerranéennes: Series B. Studies and Research, 45) 172 p.

138. Matic, S., Al-Rwahnih, M., Myrta, A. (2006): Diversity of *Plum pox virus* isolates in Bosnia and Herzegovina. *Plant Pathology*, 55 (1): 11–17. p.
139. Mayo, M. A., Cooper, J. I. (1973): Partial degradation of the protein in tobacco rattle virus during storage. *Journal of General Virology*, 18 (3): 281–289. p.
140. Mayo, M. A., Jolly, C. A. (1991): The 5'-terminal sequence of potato leafroll virus RNA: evidence of recombination between virus and host RNA. *Journal of General Virology*, 72 (10): 2591–2595. p.
141. Mayo, M. A., Robinson, D. J., Pérombelon, M. C. M. (1974): Some properties of a bacterial protease with a specific effect on the protein in tobacco rattle virus particles. *Journal of General Microbiology*, 85 (1): 121–129. p.
142. Mikec, I., Kajić, V., Krajačić, M., Škorić, D. (2008): Occurrence and distribution of *Plum pox virus* in Croatia. *Acta Horticulturae*, 781: 193–197. p.
143. Mikec, I., Kajić, V., Križanac, I. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in Croatia. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 207. p.
144. Milius, S. (1999): First plum pox turns up in North America. *Sciences News*, 156 (21): 325. p.
145. Milusheva, S., Gercheva, P., Bozhkova, V., Kamenova, I. (2008): Experiments on transmission of *Plum pox virus* through *Prunus* seeds. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1S): S1.23–S1.26.
146. Milusheva, S., Rankova, Z. (2002): Plum pox potyvirus detection in weed species under field conditions. *Acta Horticulturae*, 577: 283–287. p.
147. Minoiu, N. (1973): Vectorii virusului varsatului la prun (*Prunus virus 7* Christ). [Vectors of the pox virus (*Prunus virus 7* Christ) to plum.] *Analele Institutului de Cercetari Pentru Protectia Plantelor*, 9: 49–56. p.
148. Mohay J. (1986): Rekombináció. 132. p. In: dr. Pesthy G. (Szerk.): *Genetika kislexikon*. H.n.: Natura Kiadó, 174 p.
149. Moonan, F., Molina, J., Mirkov, T. E. (2000): *Sugarcane yellow leaf virus*: An emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. *Virology*, 269 (1): 156–171. p.
150. Moreno, I. M., Malpica, J. M., Díaz-Pendón, J. A., Moriones, E., Fraile, A., García-Arenal, F. (2004): Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology*, 318 (1): 451–460. p.

151. Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335–350. p.
152. Mumford, R. A. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in the United Kingdom. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 217. p.
153. Myrta, A., Al Rwahnih, M., Savino, V. (2005): Presence of a recombinant isolate of *Plum pox virus* in Apulia. *Journal of Plant Pathology*, 87 (2): 127–130. p.
154. Myrta, A., Boscia, D. (2001): Plum pox virus: a risk for the Mediterranean fruit tree industry. 45–52. p. In: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. (Szerk.): *Production and exchange of virus-free plant propagating material in the Mediterranean region*. [Bari, Italy: CIHEAM-IAMB.] (Options Méditerranéennes: Serie B. Studies and Research, 35) 212 p.
155. Myrta, A., Boscia, D., Potere, O., Kölber, M., Németh, M., Di Terlizzi, B., Cambra, M., Savino V. (2001): Existence of two serological subclusters of *Plum pox virus*, strain M. *European Journal of Plant Pathology*, 107 (8): 845–848. p.
156. Myrta, A., Di Terlizzi, B., Boscia, D., Caglayan, K., Gavriel, I., Ghanem, G., Varveri, C., Savino, V. (1998a): Detection and serotyping of Mediterranean plum pox virus isolates by means of strain-specific monoclonal antibodies. *Acta Virologica*, 42 (4): 251–253. p.
157. Myrta, A., Potere, O., Boscia, D., Candresse, T., Cambra, M., Savino, V. (1998b): Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of plum pox virus. *Acta Virologica*, 42 (4): 248–250. p.
158. Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M., Boscia, D. (2000): Properties of two monoclonal antibodies specific to the cherry strain of *Plum pox virus*. *Journal of Plant Pathology*, 82 (2): 95–101. p.
159. Myrta, A., Varga, A., James, D. (2006): The complete genome sequence of an El Amar isolate of plum pox virus (PPV) and its phylogenetic relationship to other PPV strains. *Archives of Virology*, 151 (6): 1189–1198. p.
160. Nagy, P. D, Simon, A. E. (1997): New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology*, 235 (1): 1–9. p.
161. Navrátil, M., Cikánek, D., Hilgert, I., Křištofová, H., Karešová, R. (1992): Monoclonal antibodies against plum pox virus. *Acta Horticulturae*, 309: 169–174. p.

162. Navrátil, M., Šafařová, D., Crescenzi, A., Fanigliulo, A., Comes, S., Petrzik, K., Karešová, R. (2004): The occurrence of PPV in cherry trees in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 657: 237–244. p.
163. Navrátil, M., Šafařová, D., Gadiou, S., Fránová, J., Kučerová, J., Talacko, L. (2008): The partial molecular characterization of plum pox virus infecting sweet cherry trees in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 781: 203–208. p.
164. Navratil, M., Safarova, D., Karesova, R., Petrzik, K. (2005): First incidence of *Plum iox virus* on apricot trees in China. *Plant Disease*, 89 (3): 338. p.
165. Navrátil, M., Šimonová, V., Paprštejn, F., Karešová, R. (1998): Detection and serological identification of plum pox virus isolates in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 472 (2): 373–378. p.
166. Nemchinov, L., Hadidi, A. (1996): Characterization of the sour cherry strain of plum pox virus. *Phytopathology*, 86 (6): 575–580. p.
167. Nemchinov, L., Hadidi, A. (1998): Specific oligonucleotide primers for the direct detection of plum pox potyvirus-cherry subgroup. *Journal of Virological Methods*, 70 (2): 231–234. p.
168. Nemchinov, L., Hadidi, A., Kölber, M., Németh, M. (1998): Molecular evidence for the occurrence of plum pox virus - cherry subgroup in Hungary. *Acta Horticulturae*, 472 (2): 503–508. p.
169. Nemchinov, L., Hadidi, A., Maiss, E., Cambra, M., Candresse, T., Damsteegt, V. (1996): Sour cherry strain of plum pox potyvirus (PPV): Molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Phytopathology*, 86 (11): 1215–1221. p.
170. Nemchinov, L., Hadidi, A., Verderevskaya, T. (1995): Detection and partial characterization of a plum pox virus isolate from infected sour cherry. *Acta Horticulturae*, 386: 226–236. p.
171. Németh, M. (1963): Field and greenhouse experiments with plum pox virus. *Phytopathologia Mediterranea*, 2: 162–166. p.
172. Németh M. (1979): A csonthéjas termésűek vírusbetegségei. 199–422. p. In: *Gyümölcsfák vírusos, mikoplazmás és rikettsiás betegségei*. H.n.: Mezőgazdasági Kiadó, 630 p.
173. Németh, M. (1986): Plum pox (sharka). 463–479. p. In: *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 841 p.

174. Németh, M. (1994): History and importance of plum pox in stone-fruit production. *EPPO Bulletin*, 24 (3): 525–536. p.
175. Németh, M., Kölber, M. (1983): Additional evidence on seed transmission of plum pox virus in apricot, peach and plum proved by ELISA. *Acta Horticulturae*, 130: 293–300. p.
176. O'Dell, M., Beckman, B. (2006): USDA Laboratory confirms plum pox virus in Michigan. *USDA/APHIS News Release*. <http://www.aphis.usda.gov/newsroom/content/2006/08/ppvmich.shtml>; 2009. 02. 07. 22:20.
177. OEPP/EPPO [2004]: Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/32(1): *Plum pox potyvirus*. *EPPO Bulletin*, 34 (2): 247–256. p.
178. OEPP/EPPO [2006]: Distribution maps of quarantine pests for Europe: *Plum pox potyvirus*. <http://pqr.eppo.org/datas/PPV000/PPV000.pdf>; 2009. 02. 23. 20:10.
179. Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., Tan, Z., Sano, T., Azuhata, F., Walsh, J. A., Fletcher, J., Chen, J., Gera, A., Gibbs, A. (2002): Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology*, 83 (6): 1511–1521. p.
180. Olmos, A., Bertolini, E., Cambra, M. (2002): Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 106 (1): 51–59. p.
181. Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M., Cambra, M. (2004): Real-time RT-PCR for quantitative detection of *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae*, 657: 149–153. p.
182. Olmos, A., Cambra, M., Dasí, M. A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M. T., Asenio, M. (1997): Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by Heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 68 (2): 127–137. p.
183. Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M. T., Terrada, E. (1999): New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucleic Acids Research*, 27 (6): 1564–1565. p.
184. Olmos, A., Dasí, M. A., Candresse, T., Cambra, M. (1996): Print-capture PCR: A simple and highly sensitive method for the detection of *Plum pox virus* (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 24 (11): 2192–2193. p.

185. Page, R. D. M. (1996): TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12 (4): 357–358. p.
186. Palkovics, L., Burgyán, J., Balázs, E. (1993): Comparative sequence analysis of four complete primary structures of plum pox virus strains. *Virus Genes*, 7 (4): 339–347. p.
187. Papayiannis, L. C., Kyriakou, A., Kapari-Isaia, T. (2007): Typing of *Plum pox virus* (PPV) strains in Cyprus. *Australasian Plant Disease*, 2 (1): 29–30. p.
188. Pasquini, G., Barba, M. (1994): Serological characterization of Italian isolates of plum pox potyvirus. *EPPO Bulletin*, 24 (3): 615–624. p.
189. Pasquini, G., Barba, M. (2006): The question of seed transmissibility of *Plum pox virus*. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 287–292. p.
190. Pasquini, G., Mazzei, M., Pilotti, M., Barba, M. (1995): Characterization of PPV isolates using monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae*, 386: 346–353. p.
191. Pasquini, G., Simeone, A. M., Conte, L., Barba, M. (2000): RT-PCR evidence of the non-transmission through seed of *Plum pox virus* strains D and M. *Journal of Plant Pathology*, 82 (3): 221–226. p.
192. Pasquini, G., Simeone, A. M., Conte, L., Barba, M. (1998): Detection of plum pox virus in apricot seeds. *Acta Virologica*, 42 (4): 260–263. p.
193. Peng, Y. H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y., Raccach, B. (1998): Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *Journal of General Virology*, 79 (4): 897–904. p.
194. Pirone, T. P. (1991): Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. *Seminars in Virology*, 2 (2): 81–87. p.
195. Pirone, T. P., Blanc, S. (1996): Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 227–247. p.
196. Pocsai E. (1976): A hőmérséklet és a fotoperiódus hatása a *Chenopodium foetidum* Schrad. lokális érzékenységére a szilva himlő vírussal szemben. *Növényvédelmi Kutató Intézet Évkönyve*, 14: 107–117. p.
197. Pocsai E., Horváth J. (1997): Növénypatogén vírusok előfordulása a magyarországi folyók és tavak vizeiben. *Növényvédelem*, 33 (2): 69–76. p.

198. Polák, J. (2001): European spindle tree and common privet a new natural hosts of Plum pox virus. *Acta Horticulturae*, 550: 125–128. p.
199. Pribék D. (2001): A szilvahimlő vírus (plum pox *potyvirus*) terjedésének és izolátumainak vizsgálata, lehetőségek az integrált védekezés megvalósítására. Doktori (Phd) értekezés, Veszprémi Egyetem Georgikon, Mezőgazdaságtudományi Kar, Keszthely, 155 p.
200. Pribék D., Basky Zs., Gáborjányi R. (1997): Újabb adatok a szilvahimlő vírus levéltetű átviteléhez. 43. Növényvédelmi Tudományos Napok, 1997. február 24–25., 121. p.
201. Pribék, D., Gáborjányi, R. (1997): Hungarian plum pox virus isolates represent different serotypes. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 32 (3-4): 281–288. p.
202. Pribék D., Gáborjányi R. (1998): A hazai szilvahimlő vírus izolátumok eltérő szerotípusai. *Növényvédelem*, 34 (5): 243–249. p.
203. Pribék D., Palkovics L., Gáborjányi R. (1998): A hazai szilvahimlő vírus izolátumok genetikai polimorfizmusának bizonyítása a RT-PCR-módszerrel. *Növényvédelem*, 34 (11): 601–605. p.
204. Pribék, D., Palkovics, L., Gáborjányi, R. (2001): Molecular characterization of *Plum pox virus* almond isolate. *Acta Horticulturae*, 550: 91–95. p.
205. Quiot, J. B., Boeglin, M., Adamolle, C., Candresse, T., Labonne, G., Renaud, L. Y. (1995): Behaviour of two isolates of plum pox virus inoculated on peach and apricot trees: first results. *Acta Horticulturae*, 386: 290–297. p.
206. Rakitina, D. V., Kantidze, O. L., Leshchiner, A. D., Solovyev, A. G., Novikov, V. K., Morozov, S. Yu., Kalinina, N. O. (2005): Coat proteins of two filamentous plant viruses display NTPase activity in vitro. *FEBS Letters*, 579 (22): 4955–4960. p.
207. Ranković, M., Ogašanović, D., Paunović, S. (1994): Breeding of plum cultivars resistant to sharka (plum pox) disease. *Acta Horticulturae*, 359: 69–73. p.
208. Ranković, M., Paunović, S., Dulic-Markovic, I. (1995): Current situation and future trends in solving sharka problem in fr Yugoslavia. *Acta Horticulturae*, 386: 241–247. p.
209. Ravelonandro, M., Minoiu, N. (1998): Characterization of plum pox virus infecting plum trees in North Transylvania and North Moldova of Romania. *Acta Horticulturae*, 472 (2): 367–372. p.

210. Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Le Romancer, M., Dunez, J. (1996): Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology*, 77 (8): 1953–1965. p.
211. Rice, P., Longden, I., Bleasby, A. (2000): EMBOSS: The European Molecular Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16 (6): 276–277. p.
212. Riechmann, J. L., Laín, S., García, J. A. (1991): Identification of the initiation codon of plum pox potyvirus genomic RNA. *Virology*, 185 (2): 544–552. p.
213. Riechmann, J. L., Laín, S., García, J. A. (1992): Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*, 73 (1): 1–16. p.
214. Robinson, D. J. (1996): Environmental risk assessment of releases of transgenic plants containing virus-derived inserts. *Transgenic Research*, 5 (5): 359–362. p.
215. Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L., Lucas, W. J. (1997): Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*, 237 (2): 283–295. p.
216. Rosales, M., Hinrichsen, P., Herrera, G. (1998): Molecular characterization of plum pox virus isolated from apricots, plums and peaches in Chile. *Acta Horticulturae*, 472 (2): 401–405. p.
217. Roy, A. S., Smith, I. M. (1994): Plum pox situation in Europe. *EPPO Bulletin*, 24 (3): 515–523. p.
218. Rubio, L., Ayllón, M. A., Kong, P., Fernández, A., Polek, M., Guerri, J., Moreno, P., Falk, B. W. (2001): Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology*, 75 (17): 8054–8062. p.
219. Salamon P., Palkovics L. (1997): A *Plum pox virus* (PPV) természetes előfordulása kökényen (*Prunus spinosa* L.) és a törpemandula (*Amygdalus nana* L.) vonalas levélmintázottság betegsége. 43. Növényvédelmi Tudományos Napok, 1997. február 24–25., 125. p.
220. Salamon, P., Palkovics, L. (2002): Characterization of *Plum pox virus* PPV-BT-H isolated from naturally infected blackthorn (*Prunus spinosa* L.) in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 108 (9): 903–907. p.
221. Salamon P., Palkovics L. (2003): A szilvahimlő vírus (*Plum pox virus*) fertőzése kökényen (*Prunus spinosa* L.) és a törpemandula (*Amygdalus nana* L.) vonalas

- mintázottság betegségének előfordulása Magyarországon. *Növényvédelem*, 39 (8): 357–363. p.
222. Salomon, R., Bernardi, F. (1995): Inhibition of viral aphid transmission by the N-terminus of the maize dwarf mosaic virus coat protein. *Virology*, 213 (2): 676–679. p.
223. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. A. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
224. Sawyer, L., Tollin, P., Wilson, H. R. (1987): A comparison between the predicted secondary structures of potato virus X and papaya mosaic virus coat proteins. *Journal of General Virology*, 68 (4): 1229–1232. p.
225. Schoelz, J. E., Wintermantel, W. M. (1993): Expansion of viral host range through complementation and recombination in transgenic plants. *Plant Cell*, 5 (11): 1669–1679. p.
226. Sebestyén, D., Nemeth, M., Hangyal, R., Krizbai, L., Ember, I., Nyerges, K., Kolber, M., Kiss, E., Bese, G. (2008): Ornamental *Prunus* species as new natural hosts of *Plum pox virus* and their importance in the spread of the virus in Hungary. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1S): S1.57–S1.61.
227. Shalaby, A. A., Sahar, A. Y., Mazyad, H. (2003): Occurrence and molecular detection of *Plum pox virus* strains in Egypt. 89–93. p. In: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. (Szerk.): *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region*. [Bari, Italy: CIHEAM-IAMB.] (Options Méditerranéennes: Serie B, Studies and Research, 45), 172 p.
228. Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, S. L., Gough, K. H., Ward, C. W. (1988): The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology*, 69 (7): 1497–1508. p.
229. Shukla, D. D., Tribbick, G., Mason, T. J., Hewish, D. R., Geysen, H. M., Ward, C. W. (1989): Localization of virus-specific and group-specific epitopes of plant potyviruses by systematic immunochemical analysis of overlapping peptide fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86 (21): 8192–8196. p.
230. Shukla, D. D., Ward, C. W., Brunt, A. A. (1994): *The Potyviridae*. Cambridge, UK: University Press, CABI, 516 p.

231. Simon, A. E., Bujarski, J. J. (1994): RNA–RNA recombination and evolution in virus-infected plants. *Annual Reviews of Phytopathology*, 32: 337–362. p.
232. Snover-Clift, K. L., Clement, P. A., Jablonski, R., Mungari, R. J., Mavrodieva, V. A., Negi, S, Levy, L. (2007): First report of *Plum pox virus* on plum in New York state. *Plant Disease*, 91 (11): 1512. p.
233. Spiegel, S., Kovalenko, E. M., Varga, A., James, D. (2004): Detection and partial molecular characterization of two *Plum pox virus* isolates from plum and wild apricot in Southeast Kazakhstan. *Plant Disease*, 88 (9): 973–979. p.
234. Staniulis, J., Stankiene, J., Sasnauskas, K., Dargeviciute, A. (1998): First report of sharka disease caused by plum pox virus in Lithuania. *Plant Disease*, 82 (12): 1405. p.
235. Šubr, Z., Glasa, M. (1999): Plum pox virus capsid protein mobility in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Virologica*, 43 (4): 259–262. p.
236. Šubr, Z., Pittnerová, S., Glasa, M. (2004): A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta Virologica*, 48 (3): 173–176. p.
237. Šutić, D., Babović, M., Marković, S. (1976): Transmissibility of some sharka virus strains by *Myzus persicae* Sulz. depending on various infection sources. *Acta Horticulturae*, 67: 171–177. p.
238. Šutić, D., Jordović, M., Ranković, M., Festić, H. (1971): Comparative studies of some sharka (plum pox) virus isolates. *Annales de Phytopathologie*, H.S.: 185–195. p.
239. Swanson, M. M., MacFarlane, S. A. (1999): The E116 isolate of Dutch pea early-browning virus is a recombinant virus. *Virus Research*, 60 (1): 87–94. p.
240. Szathmáry, E., Dragoyski, K., Hristova, D., Stoev, A., Tóbiás, I., Palkovics, L. (2006): Molecular characterization of some *Plum pox virus* isolates originated from Troyan region, Bulgaria. *Plant Science*, 43 (5): 407–412. p.
241. Szathmáry, E., Novák Nádudvari, J., Szabó, L., Tóbiás, I., Balázs, E., Palkovics, L. (2009a): Characterization of a natural *Plum pox virus* isolate bearing truncated coat protein. *Archives of Virology*, 154 (1): 141–145. p.
242. Szathmáry, E., Tóbiás, I., Dragoyski, K., Palkovics, L. (2009b): Partial molecular characterization of an unusual, recombinant *Plum pox virus* isolate from Bulgaria. *Acta Virologica*, 53 (1): 65–67 p.

243. Szemes, M., Kálmán, M., Myrta, A., Boscia, D., Németh, M., Kölber, M., Dorgai, L. (2001): Integrated RT-PCR/nested PCR diagnosis for differentiating between subgroups of plum pox virus. *Journal of Virological Methods*, 92 (2): 165–175. p.
244. Szirmai J. (1948): A kajszi vírusbetegsége. *Magyar Bor és Gyümölcs*, 3 (17): 7–8. p.
245. Szirmai, J. (1961): Report on fruit-tree virus diseases in Hungary. *Tijds. Planteavl.*, 65: 220–229. p.
246. Tan, Z., Wada, Y., Chen, J., Ohshima, K. (2004): Inter- and intralineage recombinants are common in natural populations of *Turnip mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 85 (9): 2683–2696. p.
247. Tepfer, M., (2002): Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 467–491. p.
248. Teycheney, P. Y., Tavert, G., Delbos, R., Ravelonandro, M., Dunez, J. (1989): The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA (strain D). *Nucleic Acids Research*, 17 (23): 10115–10116. p.
249. Thakur, P. D., Bhardwaj, S. V., Garg, I. D., Khosla, K., Sharma, D. R. (1994): Plum pox virus on stone fruits from India – a new record. *Plant Disease Research*, 9 (1): 100–102. p.
250. Thompson, D. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in Canada. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 206. p.
251. Thompson, D., McCann, M., MacLeod, M., Lye, D., Green, M., James, D. (2001): First report of plum pox potyvirus in Ontario, Canada. *Plant Disease*, 85 (1): 97. p.
252. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. (1997): The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25 (24): 4876–4882. p.
253. Tóbiás I., Győző K., Barkaszi I., Szabó Z. (1992): A Szilva-himlővírus kimutatása őszibarackból és a fajták érzékenysége. *Kertgazdaság*, 24 (2): 70–77. p.
254. Tolay Arikan, E., Caglayan, K., Gazel, M. H. (2004): Identification of *Plum pox virus* and some ilarviruses of stone fruits in Kahramanmaras district of Turkey. *Acta Horticulturae*, 657: 269–273. p.
255. Tomimura, K., Gibbs, A. J., Jenner, C. E., Walsh, J. A., Ohshima, K. (2003): The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent ‘emergence’ in east Asia. *Molecular Ecology*, 12 (8): 2099–2111. p.

256. Topchiiska, M. (1994): Plum pox virus in sweet and sour cherry in Bulgaria. *Dokladi na Bolgarskata Akademiya na Naukite*, 47 (1): 85–87. p.
257. Trifonov, D. (1965): Plum pox infection rate of some varieties of plums in the heavily contaminated region of Bulgaria. *Zaštita Bilja*, 16: 375–378. p.
258. Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L., Bernardi, F. (2001): Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74 (1-2): 157–175. p.
259. van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., Wickner, R. B. (Szerk.) (2000): *Potyviridae*. 703–724. p. In: *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, USA: Academic Press, 1162 p.
260. Varga, A., James, D. (2005): Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods*, 123 (2): 213–220. p.
261. Varga, A., James, D. (2006): Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus*. *Journal of Virological Methods*, 138 (1-2): 184–190. p.
262. Varrelmann, M., Maiss, E. (2000): Mutations in the coat protein gene of *Plum pox virus* suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology*, 81 (3): 567–576. p.
263. Varrelmann, M., Palkovics, L., Maiss, E (2000): Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of *Plum pox virus*. *Journal of Virology*, 74 (16): 7462–7469. p.
264. Varveri, C. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in Greece. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 209–210. p.
265. Varveri, C., Candresse, T., Ravelonandro, M., Macquaire, G., Dunez, J. (1989): Use of *in vitro* transcribed RNAs for plum pox virus detection in a dot blot hybridization assay. *Acta Horticulturae*, 235: 319–324. p.
266. Verhoeven, J. Th. J., Roenhorst, J. W., Jongedijk, G. P. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in the Netherlands. *EPPO Bulletin*, 36 (2): 211–212. p.
267. Viršček Marn, M., Mavrič, I., Urbančič-Zemljič, M., Škerlavaj, V. (2004): Detection of *Plum pox potyvirus* in weeds. *Acta Horticulturae*, 657: 251–254. p.

268. Viršček Marn, M., Mavrič Pleško, I., Zindović, J. (2007): The discovery and characterisation of *Plum pox virus* (PPV) isolates in Montenegro. *New Disease Reports*, 15 (February-July 2007). <http://www.bspp.org.uk/publications/new-disease-reports/ndr.php?id=015053>; 2009. 02. 07. 22:25.
269. Voloudakis, A. E., Malpica, C. A., Aleman-Verdaguer, M.-E., Stark, D. M., Fauquet, C. M., Beachy, R. N. (2004): Structural characterization of tobacco etch virus coat protein mutants. *Archives of Virology*, 149 (4): 699–712. p.
270. Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M., Dunez, J. (1992): A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 39 (1-2): 27–37. p.
271. Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, R. P., Mazyad, H., Aboul-Ata, A. E., Dunez, J. (1991a): Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the El Amar strain of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology*, 72 (7): 1741–1746. p.
272. Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Dunez, J. (1991b): A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33 (3): 355–365. p.
273. White, J. L., Kaper, J. M. (1989): A simple method for detection of viral satellite RNAs in small tissue samples. *Journal of Virological Methods*, 23 (2): 83–93. p.
274. White, K. A., Morris, T. J. (1994): Nonhomologous RNA recombination in tombusviruses: Generation and evolution of defective interfering RNAs by stepwise deletions. *Journal of Virology*, 68 (1): 14–24. p.
275. Worobey, M., Holmes, E. C. (1999): Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, 80 (10): 2535–2543. p.
276. Zagrai, L., Zagrai, I., Ferencz, B., Gaboreanu, I., Kovacs, K., Petricele, I., Popescu, O., Pamfil, D., Capote, N. (2008): Serological and molecular typing of *Plum pox virus* isolates in the north of Romania. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1S): S1.41–S1.46.

M2. Az EMBL nemzetközi adatbázisba benyújtott szekvenciák

PPV-B1298 izolátum 3'NIb-CP-3'UTR régió

LOCUS AM184114 1691 bp RNA linear VRL 13-JAN-2009
DEFINITION Plum pox virus partial gene for polyprotein, genomic RNA, isolate B1298.
ACCESSION AM184114
VERSION AM184114.1 GI:86475541
KEYWORDS coat protein; CP; NIb; nuclear inclusion protein B; polyprotein.
SOURCE Plum pox virus
ORGANISM Plum pox virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Szathmary,E., Nadudvari,J.N., Szabo,L., Tobias,I., Balazs,E. and Palkovics,L.
TITLE Characterization of a natural Plum pox virus isolate bearing a truncated coat protein
JOURNAL Arch. Virol. 154 (1), 141-145 (2009)
PUBMED 19082685
REFERENCE 2 (bases 1 to 1691)
AUTHORS Palkovics,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (31-JAN-2006) Palkovics L., Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44., H-1118, HUNGARY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1691
/organism="Plum pox virus"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="B1298"
/host="Prunus domestica"
/db_xref="taxon:12211"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Hungary:Vilyvitany"
CDS <1..1474
/codon_start=2
/product="polyprotein"
/protein_id="CAJ75684.1"
/db_xref="GI:86475542"
/db_xref="GOA:Q2KTD0"
/db_xref="InterPro:IPR001205"
/db_xref="InterPro:IPR001592"
/db_xref="InterPro:IPR007094"
/db_xref="UniProtKB/TREMBL:Q2KTD0"

/translation="STVVDNTRLRVILAMTYSLKLGYPDTHDCICRYFVNGDDLVLAVHPAYESIYDELQEHFSQLGLNYTFATKTENKEELWFMSHKGVLVDGMYIPKLEPERIVSILEWDRSNEPIHRLEAICASMVEAWGYKELLREIRKFSWVLEQAPYNALSKDGKAPYIAETALKKLYTDSEASETEIERYLEAFYNDIDDSLDSNIVIHQADEKEDDEEVDAGKPPVVTAPAATVATTQPAPVIQPAIQTTTTLVNTGRDRDVDAGSIGTFAPRLKMTMSKLSLPKVKGKAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQTWYEGVKRDYDVTDEEMSII LNGLMVWCIENGTSPNINGMWVMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRNYEKAYMPRYGIQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAHIQMKAALRN VQNRLFGLDGNVGTQEEDTERPPAGDVNRNMHNLGVRGV"

mat_peptide <1..616
/product="nuclear inclusion protein B, NIb"
mat_peptide 617..1471


```

                                /product="coat protein, CP"
3'UTR                          1417..1691
ORIGIN
  1 ttcgacagtt gttgacaata cactcagggt tattttggca atgacatatt cactcctgaa
 61 gcttggatac catccggata cacacgattg ctttgcgg tacttcgtga atgggatga
121 cttgtcctt gcagtgcacc cagcatacga gagcatttat gatgagcttc aagagcactt
181 ttcccaactt ggattgaatt acacattcgc cacaaagact gaaaacaagg aagagctgtg
241 gtttatgtca cataaagggt ttctctacga tggcatgtac attccaagc tggagcctga
301 gaggattgta tcaatacttg aatgggacag atcaaatgag ccaatccatc gattggaggc
361 aatttggtgct tcaatggtgg aagcgtgggg ttataaggag ctgctgaggg agatccggaa
421 attttacagt tgggttcttg aacaagcacc atataatgct ctttcaaagc atggaaaagc
481 cccgtacata gcagagacgg cactcaagaa actctatact gattctgaag cgtctgagac
541 ggaaattgag agatatcttg aagcatttta caatgatatt gatgatagcc ttgactcaa
601 cattgttata caccaggctg atgaaaagga ggacgatgaa gaagtcgatg caggaaaacc
661 ccctgtagta actgcaccgg cagcaactgt ggcaacaact caaccagctc cagtataca
721 acctgcaatt caaaccacaa ctttggtgaa cacaggaagg gatagggacg tcgatgcagg
781 atcgattgga actttcgagc tgccacgctt aaaaacaatg acatcgaagt tatctctacc
841 gaaggtgaaa ggaaaagcaa ttatgaactt aaatcatttg gcacattaca gtcctgcaca
901 agttgattta tcaaacacac gagctccaca atcctgtttc cagacttggg atgaaggagt
961 taagcgtgat tacgatgtca cagatgagga aatgagcatc attttgaatg gcctgatggg
1021 ttggtgcatc gaaaacggaa cgtctcctaa catcaacgga atgtgggtga tgatggatgg
1081 ggagacacaa gtggagtatc caataaagcc attgttggat cacgcgaaac ccacttttag
1141 acaaattatg gcacatttca gtaacgtggc tgaagcgtat attgaaaaac ggaattacga
1201 gaaagcatac atgccaaggt atggaattca gcgcaacctg acagattaca gcctcgccag
1261 atacgccttt gatttttacg aaatgacttc aacaacgcct gtgctgcacac gtgaagctca
1321 tatacagatg aaggcagcag cattgagaaa tgttcagaat cgtttatgtg gcttggatgg
1381 aaacgtcgga acacaagaag aggacacaga gagaccccc cctggtgacg tgaatcgcaa
1441 catgcacaac ctctcggtg tgaggggagt gtagtgggtc cggtatctat cataaactct
1501 acttgggtga aagtctagtc acccaattgt ttttagattc ctgttagcat cttttctcc
1561 gctttaattg cggcacattc agtgagggtg tacctccaca tgtgttagtc ttttattgtc
1621 gaacacaggc cttgtatctc gatgtagcga gtgtttcact ccattcgggt tatagttctt
1681 gtgcaagaga c

```

//

PPV-Troy1 izolátum 3'NIB-CP-3'UTR régió

LOCUS AM260933 1799 bp RNA linear VRL 20-FEB-2008
DEFINITION Plum pox virus partial gene for polyprotein, genomic RNA, isolate PPV-Troy1.
ACCESSION AM260933
VERSION AM260933.1 GI:95108267
KEYWORDS coat protein; NIB; nuclear inclusion protein b; polyprotein.
SOURCE Plum pox virus
ORGANISM Plum pox virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Szathmary,E., Dragojszki,K., Hrisztova,D., Stoev,A., Tobias,I. and Palkovics,L.
TITLE Molecular characterization of some Plum pox virus isolates originated from Troyan region (Bulgaria)
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1799)
AUTHORS Palkovics,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-APR-2006) Palkovics L., Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44., H-1118, HUNGARY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1799
/organism="Plum pox virus"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="PPV-Troy1"
/host="Prunus domestica cv. Cacanska rodna"
/db_xref="taxon:12211"
/clone="B236.1.1"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Bulgaria:Troyan"
/collection_date="2004"
CDS <1..1582
/codon_start=2
/product="polyprotein"
/protein_id="CAJ98531.1"
/db_xref="GI:95108268"
/db_xref="GOA:Q1JRK0"
/db_xref="InterPro:IPR001205"
/db_xref="InterPro:IPR001592"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q1JRK0"

/translation="VILAMTYSLLKLGYPDTHDCICRYFVNGDDLVLAVHPAYESIY
DELQEHFSQLGLNYTFATKTENKEELWFMESHKGVLYDGMYPKLEPERIVSILEWDRS
NEPIHRLEAICASMVEAWGYKELLREIRKFYSWVLEQAPYNALSKDGKAPYIAETALK
KLYTDSEASETEIERYLEAFYNDTDDSLDSNFVIHQADEKEDDEVDAGKPTVVTAPA
ATVATTQPAPGIQPAIQTTTPMFPNPIFTPATTQPAIRPVSPIYRATPQSFQVYGNDDA
SPSTTNTSVNTGRDRDVDAGSIGTFVPRFKTMTSKLSLPKVKGKAIMNLNHLAHYSP
AQVDLSNTRAPQSCFQTWYEGVKRDYDVTDEEMSIILNGLMVVCIENGTSPNINGMWV
MMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRNYEKAYMPRYGIQRNLT
DYSLARYAFGFYEMTSATPVRAREAHIQMKAALRNQNRFLGGLDGNVGTQEEDTERH
TAGDVNRNMHNLGVRGV"
mat_peptide <1..589
/product="nuclear inclusion protein b"
/note="NIB"
mat_peptide 590..1579
/product="coat protein"
3'UTR 1583..1799
ORIGIN
1 ggttattttg gcaatgacat attcactcct gaagcttggga taccatccgg atacacacga
61 ctgcatttgt cggactcttcg tgaatgggtga tgatcttgtc cttgcagtgc acccagcata

121 cgagagcatt tatgatgagc ttcaagagca cttttcccaa cttggattga attacacatt
181 cgccacaaaag actgaaaaca aggaagagct gtggtttatg tcacataaag gtgttctcta
241 cgatggcatg tacattccca agctggagcc tgagaggatt gtatcaatac ttgaatggga
301 cagatcaaat gagccaatcc atcgattgga ggcaatttgt gcttcaatgg tggaagcgtg
361 gggttataag gagctgctga gggagatccg gaaatthttac agttgggttc ttgaacaagc
421 accatataat gctctttcaa aagatggaaa agccccgtac atagcagaga cggccctcaa
481 gaaactctat actgattctg aagcatctga gacggaaatt gagagatatac ttgaagcttt
541 ttacaatgat accgacgata gccttgactc caactttggtt atacaccagg ctgatgaaaa
601 ggaggatgat gaagaagtgt atgacaggaaa acccactgta gtaactgcac cggcagcaac
661 tgtggcaaca actcaaccag ctccagggat acaacctgca attcaaacca caacaccaat
721 gttcaacccc attttcactc cagcaacaac tcagcctgcg ataagaccag tttctcctat
781 ttatagggcc acaccgcagt cttttggagt ttatggaaat gatgatgcat cacctagcac
841 cacaaact tcggtgaaca caggaagggg tagggacgtc gatgcaggat cgatcggaac
901 tttcgcagtg ccacgattta aaacaatgac gtcgaagtta tctctaccga aggtgaaagg
961 aaaagcaatt atgaacttaa atcatttggc acattacagt cctgcacaag ttgatttatc
1021 aacacacga gctccacaat cctgtttcca gacttggtat gaaggagtta agcgtgatta
1081 cgatgtcaca gatgaggaaa tgagcatcat tttgaatggc ctgatgggtt ggtgcatcga
1141 aaacggaacg tctcctaaca tcaacggaat gtgggtgatg atggatgggg agacacaagt
1201 ggagtatcca ataaagccat tgttggatca cgcgaaacc acttttagac aaattatggc
1261 acatttcagt aacgtggctg aagcgtatat tgaaaaacgg aattacgaga aagcatacat
1321 gccaaggtat ggaattcagc gcaacctgac agattacagc ctcgccagat acgcctttgg
1381 tttttacgaa atgacttcag caacgcctgt gcgtgcacgt gaagctcata tacagatgaa
1441 ggcagcagca ttgagaaatg ttcagaatcg tttatttggc ttggatggaa acgtcggaac
1501 acaagaagag gacacagaga gacacaccgc tggtgacgtg aatcgcaaca tgcacaacct
1561 cctcgggtgtg aggggagtgt agtggctcctg gtatctatca taaactctac ttgggtgaga
1621 gtctagtcac ccaattgttt ttagattcct gttagcatcc ttttctccgc ttttaattgcg
1681 gcacattcag tgaggttata cctccacatg tgttagtctt ttattgtcga acacaggccc
1741 ttgtatctga tgtagcagct gtttactcc attcgggtta tagttcttgt gcaagagac

//

PPV-Troy2 izolátum 3'NIb-CP-3'UTR régió

LOCUS AM260934 1846 bp RNA linear VRL 04-JUN-2006
DEFINITION Plum pox virus partial gene for polyprotein, genomic RNA, isolate PPV-Troy2.
ACCESSION AM260934
VERSION AM260934.1 GI:95108269
KEYWORDS coat protein; NIb; nuclear inclusion protein b; polyprotein.
SOURCE Plum pox virus
ORGANISM Plum pox virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Szathmary,E., Dragojszki,K., Hrisztova,D., Stoev,A., Tobias,I. and Palkovics,L.
TITLE Molecular characterization of some Plum pox virus isolates originated from Troyan region (Bulgaria)
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1846)
AUTHORS Palkovics,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-APR-2006) Palkovics L., Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44., H-1118, HUNGARY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1846
/organism="Plum pox virus"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="PPV-Troy2"
/host="Prunus domestica cultivar Stanley"
/db_xref="taxon:12211"
/clone="B236.2.2"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Bulgaria:Troyan"
CDS <1..1629
/codon_start=1
/product="polyprotein"
/protein_id="CAJ98532.1"
/db_xref="GI:95108270"
/db_xref="GOA:Q1JRJ9"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q1JRJ9"

/translation="GNNSGQPSTVVDNTLMVILAMTYSLLLKLGYPDTHDCICRYFVN
GDDLVLAVHPAYESIYDELQEHFSQLGLNYTFATKTENKEELWFMSHKGVLVYDDMYIP
KLEPERIVSILEWDRSNEPIHRLEAICASMVEAWGYKELLREIRKFYSWVLEQAPYNA
LSKDGKAPYIAETALKKLYTDTEASETEIERYLEAFYDDINDDGEFNVVHQAADERED
EEEVDAGKPIVATAPAATSPILQPPPVIQAPRRTAPMLNPIFTSATTQPATKPVSRV
SGPQLQTFGTGYNEDASPSNSNALVNTNRDRDVDAGSIGTFTVPRLKAMTSKLSLPKV
KGKAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQTWYEGVKRDYDVTDDMSIILNGLMV
WCIENGTSPNINGMWMMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRN
YEKAYMPRYGIQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAHIQMKAALRNVQNRLF
GLDGNVGTQEEDTERHTAGDVNRNMHNLGVRGV"
mat_peptide <1..636
/product="nuclear inclusion protein b"
/note="NIb"
mat_peptide 637..1626
/product="coat protein"
3'UTR 1630..>1846
ORIGIN
1 ggaaacaata gcggtcagcc ttcgacagtt gttgacaata cactcatggt tattctggca
61 atgacatatt cactccttaa gcttggatat catccggata cacacgattg catttgctcg
121 tacttcgtga atgggtgatga tcttgtcctt gcagtgcacc cagcatatga gagcatttat
181 gatgagcttc aagaacactt ttcccaactt ggattgaatt acacattcgc cacaaagact
241 gaaaacaagg aagagctgtg gtttatgtca cataaaggcg ttctctacga tgacatgtac

301 attcctaagc tagagcctga gaggattgta tcaatacttg aatgggacag atcaaatgag
361 ccaatccatc gattggaggc aatttgtgca tcaatggtgg aagcgtgggg ttataaggag
421 ctgctgaggg agatccggaa attttacagt tgggttcttg aacaagcacc atacaatgct
481 ctttcaaaaag atggaaaagc cccgtacatt gcggagacag cactgaagaa gctttacact
541 gacactgaag catctgagac agaaattgag cgatatcttg aagcttttta cgacgacatt
601 aacgatgatg gtgagttcaa cgttgttggt caccaagctg acgaaagaga agacgaggag
661 gaagttgatg caggtaagcc gattgtagcc actgcaccgg cagcaactag cccaatactt
721 caaccacctc cagtcataca gcctgcacc cggactacgg cgccaatgct caacccatt
781 ttcacgtcag caacaactca accagcaaca aaaccagttt cacgggtgctc aggacctcaa
841 ctgcaaactt ttggaacata tggtaatgag gatgcatcac ctagcaactc aaacgcgcta
901 gtcaacacaa acagagacag ggacgtcgat gcaggatcaa ttggaacttt tacagtgcca
961 cgtttgaagg caatgacttc gaaactatct ctgccaaagg tgaaaggaaa ggctattatg
1021 aacttgaacc atttagcaca ttatagtcct gcacaggttg acttgtccaa cacgagagct
1081 ccgcagtctt gtttccaaac ttggtatgaa ggagttaagc gagattatga tgtcacggac
1141 gatgaaatga gcatcatttt aaatggtcct atggtttggg gcatagagaa tggaacatcc
1201 ccgaatatca atggaatgtg ggtgatgatg gatggggaaa cacaagtgga gtatccaata
1261 aagccattgt tggatcatgc gaaaccact tttagacaaa ttatggcaca tttcagtaac
1321 gtggctgaag cgtatattga aaaacgaaat tatgaaaaag catacatgcc aaggtatgga
1381 attcagcgca acctgacaga ctacagcctc gccagatatg ctttgattt ttacgaaatg
1441 acttcaacga caccgcgtacg ggcacgtgaa gctcatatcc agatgaaggc agcagcattg
1501 agaaatgttc aaaatcgttt atttggcttg gatggaaacg tcggaacaca agaagaggac
1561 acagagagac acaccgctgg tgatgttaat cgcaacatgc acaacctcct cgggtgtgagg
1621 ggagtgtagt ggtctcggtg tctatcataa actctacctg ggtgagagtc taaccatcca
1681 gttgttttta gattcctggt agcatccttt tctccgcttt aatagcagta cattcagtga
1741 ggttttacct ccatatgttc tagtctgtta ttgtcgaaca caggcccttg tatctgatgt
1801 agcgagtgct tcaactccatt cgggttatag ttcttgtgca agagac

//

PPV-Troy4 izolátum 3'NIb-CP-3'UTR régió

LOCUS AM260935 1657 bp RNA linear VRL 20-FEB-2008
DEFINITION Plum pox virus partial gene for polyprotein, genomic RNA, isolate PPV-Troy4.
ACCESSION AM260935
VERSION AM260935.1 GI:95108271
KEYWORDS coat protein; NIb; nuclear inclusion protein b; polyprotein.
SOURCE Plum pox virus
ORGANISM Plum pox virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Szathmary,E., Dragojszki,K., Hrisztova,D., Stoev,A., Tobias,I. and Palkovics,L.
TITLE Molecular characterization of some Plum pox virus isolates originated from Troyan region (Bulgaria)
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1657)
AUTHORS Palkovics,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-APR-2006) Palkovics L., Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44., H-1118, HUNGARY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1657
/organism="Plum pox virus"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="PPV-Troy4"
/host="Prunus domestica cv. Kjustendilska"
/db_xref="taxon:12211"
/clone="B236.4.1"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Bulgaria:Troyan"
/collection_date="2004"
CDS <1..1629
/codon_start=1
/product="polyprotein"
/protein_id="CAJ98533.1"
/db_xref="GI:95108272"
/db_xref="GOA:Q1JRJ8"
/db_xref="InterPro:IPR001205"
/db_xref="InterPro:IPR001592"
/db_xref="InterPro:IPR007094"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q1JRJ8"

/translation="GNNSGQPSTVVDNTLMVILAMTYSLLKLGYPDTHDCICRYFVN
GDDLVLAVHPAYERIYDELQEHFSQLGLNYTFATKTENKEELWFMSHKGVLVDGMYIP
KLEPERIVSILEWDRSNEPIHRLEAICASMVEAWGYKELLREIRKFSWVLEQAPYNA
LSKD GKAPYIAETALKKLYTDSEASETEIERYLEAFYNDTDDSLDSNIVIHQADEKED
DEEVDAGKPTVVTAPAATVATTQPAPVIQPAIQTTTPMFPNPIFTPATTQPAIRPVSP
SRATPQSFGVYGNE DASPSTSNTLVNTGRDRD VDAGSIGTFAPVRLKTM TSKLSLPKV
KGKAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQ TWYEGVKRDYDVTDEEMSIILNGLMV
WCIENGTSPNINGMWVMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRN
YEKAYMPRYGIQRNLT DYSLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAHIQMKAAALRNVQNRLF
GLDGNVGTQKEDTERHTAGDVNRNMHNLGVRGV"
mat_peptide <1..636
/product="nuclear inclusion protein b"
/note="NIb"
mat_peptide 637..1626
/product="coat protein"
3'UTR 1630..>1657
ORIGIN
1 g g g a a c a a t a g t g g g c a g c c t t c g a c a g t t g t t g a c a a c a c t c a t g g t t a t t t t g g c a

61 atgacatatt cactcctgaa gcttggatac catccggata cacacgattg catttgtcgg
121 tacttcgtga atggatgatga tcttgtcctt gcagtgcacc cagcatacga gagaatttat
181 gatgagcttc aagagcactt ttcccaactt ggattgaatt acacattcgc cacaaagact
241 gaaaacaagg aagagctgtg gttcatgtca cataaagggtg ttctctacga tggcatgtac
301 attcccaagc tggagcccga gaggattgta tcaatacttg aatgggacag atcaaagag
361 ccaatccatc gattggaggc aatttgtgct tcaatgggtg aagcgtgggg ttacaagag
421 ctgctgaggg agattcggaa attttacagt tgggttcttg aacaagcacc atataatgct
481 ctttcaaaag atggaaaagc cccgtacata gcagagacgg cactcaagaa actctatact
541 gattctgaag cgtctgagac ggaaatcgag agatatcttg aagcatttta caatgatact
601 gacgatagcc ttgactccaa cattgttata caccaggctg atgaaaagga ggacgatgaa
661 gaagttgatg caggaaaacc cactgtagta actgcaccgg cagcaactgt ggcaacaact
721 caaccagctc cagtataca acctgcaatt caaaccacaa caccaatggt caacccatt
781 ttactccag caacaactca acctgagata agaccagttt ctccaatttc aagggccaca
841 ccgcagtctt ttggagtta tggaaatgag gatgcatcac ctagcacctc aaacactttg
901 gtgaacacag gaaggatag ggacgtcgat gcaggatcga ttggaacttt cgctgtgcca
961 cgcttaaaaa caatgacatc gaagtatatct ctaccgaagg tgaaggaaa agcaattatg
1021 aacttaaatc atttggcaca ttacagtctt gcacaagttg atttatcaaa cacacgagct
1081 ccccaatcct gtttccagac ttggtatgaa ggagttaagc gtgattacga tgtcacagat
1141 gaggaaatga gcatcatttt gaatggcctg atggtttggg gcatcgaaaa cggaacgtct
1201 cctaacaatca acggaatgtg ggtgatgatg gatggggaga cacaagtgga gtatccaata
1261 aagccattgt tggatcacgc gaaaccact ttagacaaa ttatggcaca tttcagtaac
1321 gtggctgaag cgtatattga aaaacggaat tacgagaaa catacatgcc aaggtatgga
1381 attcagcgca acttgacaga ttacagctc gccagatag cttttgattt ttacgaaatg
1441 acttcaacaa cgcctgtgcg tgcacgtgaa gctcatatac agatgaaggc agcagcattg
1501 agaaatgttc agaatcgttt gtttggcttg gatggaaacg tcggaacaca aaaagaggc
1561 acagagagac acaccgctgg tgacgtgaat cgcaacatgc acaacctcct cgggtgtgag
1621 ggagtgtagt ggtctcggtg tctatcataa actctac

//

PPV-Troy5 izolátum 3'NIb-CP-3'UTR régió

LOCUS AM260936 1846 bp RNA linear VRL 20-FEB-2008
DEFINITION Plum pox virus partial gene for polyprotein, genomic RNA, isolate PPV-Troy5.
ACCESSION AM260936
VERSION AM260936.1 GI:95108273
KEYWORDS coat protein; NIb; nuclear inclusion protein b; polyprotein.
SOURCE Plum pox virus
ORGANISM Plum pox virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Szathmary,E., Dragojszki,K., Hrisztova,D., Stoev,A., Tobias,I. and Palkovics,L.
TITLE Molecular characterization of some Plum pox virus isolates originated from Troyan region (Bulgaria)
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1846)
AUTHORS Palkovics,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-APR-2006) Palkovics L., Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44., H-1118, HUNGARY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1846
/organism="Plum pox virus"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="PPV-Troy5"
/host="Prunus domestica cv. Gabrovska"
/db_xref="taxon:12211"
/clone="B236.5.2"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Bulgaria:Troyan"
/collection_date="2004"
CDS <1..1629
/codon_start=1
/product="polyprotein"
/protein_id="CAJ98534.1"
/db_xref="GI:95108274"
/db_xref="GOA:Q1JRJ7"
/db_xref="InterPro:IPR001205"
/db_xref="InterPro:IPR001592"
/db_xref="InterPro:IPR007094"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q1JRJ7"

/translation="GNNSGQPSTVVDNTLMVILAMTYSLLKLGYPDTHDCICRYFVN
GDDLVLAVHPAYESIYDELQEHFSQLGLNYTFATKTENKEELWFMSHGVLVDGMYIP
KLEPERIVSILEWDRSNEPIHRLEAICASMVEAWGYKELLREIRKFSWVLEQAPYNA
LSKD GKAPYIAETALKKLYTDSEASETEIERYLEAFYNDIDDSLDSNIVIHQADEKED
NEEVDAGKPTVVTAPAATVATTQPAPVIQPAIQTTTPMFPNPIFTPATTQPAIRPVSP
SRATPQSFGVYGNE DASPSTSN TLVNTGRDRD VDAGSIGTF AVPR LK TMTSKLSLPKV
KGKAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQ TWYEGVKRDYDVTDEEMSIILNGLMV
WCIENG TSPNINGMWMMDGETQGEYPIKPLLDPAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRN
YEKAYMPRYGIQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAHIQMKAAALRNVQNRFL
GLDGNVGTQEEDTERHPAGDVNRNMHNLGVRGV"
mat_peptide <1..636
/product="nuclear inclusion protein b"
/note="NIb"
mat_peptide 637..1626
/product="coat protein"
3'UTR 1630..1846
ORIGIN 1 ggaacaata gcgggcaacc ttcgacagtt gttgacaaca cactcatggt tattttggca


```

61 atgacatatt cactcctgaa gcttggatac catccggata cacacgattg catttgtcgg
121 tacttcgtga atggtgatga tcttgtcctt gcagtgcacc cagcatacga gagcatttat
181 gatgagcttc aagagcactt ttcccaactt ggattgaatt acacattcgc cacaaagact
241 gaaaacaagg aagagctgtg gtttatgtca cataaagggtg ttctctacga tggcatgtac
301 attcccaagc tggagcccga gaggattgta tcaatacttg aatgggacag atcaaagag
361 ccaatccatc gattggaggc aatttgtgct tcaatgggtg aagcgtgggg ttacaagag
421 ctgctgaggg agattcggaa attttacagt tgggttcttg aacaagcacc atataatgct
481 ctttcaaaag atggaaaagc cccgtacata gcagagacgg cactcaagaa actctatact
541 gattctgaag cgtctgagac ggaaatcgag agatatcttg aagcatttta caatgatatt
601 gatgatagcc ttgactccaa cattgttata caccaggctg atgaaaagga ggacaatgaa
661 gaagttgatg caggaaaacc cactgtagta actgcaccgg cagcaactgt ggcaacaact
721 caaccagctc cagtgataca acctgcaatt caaaccacaa caccaatggt caacccatt
781 ttactccag caacaactca gcctgcgata agaccagttt ctccaatttc aagggccaca
841 ccgcagtctt ttggagtta tggaaatgag gatgcatcac ctagcacctc aaacactttg
901 gtgaacacag gaagggatag ggacgtcgat gcaggatcga ttggaacttt cgctgtgcca
961 cgcttaaaaa caatgacatc gaagtatatct ctaccgaagg tgaaggaaa agcaattatg
1021 aacttaaatc atttggcaca ttacagtctt gcacaagttg atttatcaaa cacacgagct
1081 ccacaatcct gtttccagac ttggtatgaa ggagttaagc gtgattacga tgtcacagat
1141 gaggaaatga gcatcatttt gaatggcctg atggtttggt gcatcgaaaa cggaacgtct
1201 cctaacatca acggaatgtg ggtgatgatg gatggggaga cacaagggga gtatccaata
1261 aagccattgt tggatcccgc gaaaccact ttagacaaa ttatggcaca tttcagtaac
1321 gtggctgaag cgtatattga aaaacggaat tacgagaaag catacatgcc aaggtatgga
1381 attcagcgca acctgacaga ttacagctc gccagatag cctttgattt ttacgaaatg
1441 acttcaacaa cgcctgtgcg tgcacgtgaa gctcatattc agatgaaggc agcagattg
1501 agaaatgttc agaatcgttt gtttggcttg gatggaaacg tcggaacaca agaagaggc
1561 acagagagac acccgctgg tgacgtgaat cgcaacatgc acaacctcct cgggtgtgagg
1621 ggagtgtagt ggtctcggtt tctatcataa actctacttg ggtgagagtc tagtcacca
1681 attgttttta gattcctggt agcatccttt tctccgcttt aattgcggca cattcagtga
1741 ggtcgtacct ccacatgtgt tagtctttta ttgtcgaaca caggcccttg tatctgatgt
1801 agcgagtgtt tcaactccatt cgggttatag ttcttgtgca agagac

```

//

PPV-Troy6 izolátum 3'NIb-CP-3'UTR régió

LOCUS AM260937 1846 bp RNA linear VRL 04-JUN-2006
DEFINITION Plum pox virus partial gene for polyprotein, genomic RNA, isolate PPV-Troy6.
ACCESSION AM260937
VERSION AM260937.1 GI:95108275
KEYWORDS coat protein; NIb; nuclear inclusion protein b; polyprotein.
SOURCE Plum pox virus
ORGANISM Plum pox virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Szathmary,E., Dragojszki,K., Hrisztova,D., Stoev,A., Tobias,I. and Palkovics,L.
TITLE Molecular characterization of some Plum pox virus isolates originated from Troyan region (Bulgaria)
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1846)
AUTHORS Palkovics,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-APR-2006) Palkovics L., Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44., H-1118, HUNGARY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1846
/organism="Plum pox virus"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="PPV-Troy6"
/host="Prunus domestica cultivar Hanita"
/db_xref="taxon:12211"
/clone="B236.6.3"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Bulgaria:Troyan"
CDS <1..1629
/codon_start=1
/product="polyprotein"
/protein_id="CAJ98535.1"
/db_xref="GI:95108276"
/db_xref="GOA:Q1JRJ6"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q1JRJ6"

/translation="GNNSGQPSTVVDNTLMVILAMTYSLLLKLGYPDTHDCICRYFVN
GDDLVLAVHPAYESIYDELQEHFSQLGLNYTFATKTENKEELWFMSHKGVLVDGMYIP
KLEPERIVSILEWDRSNEPIHRLEAICASMVEAWGYKELLREIRKFYSWVLEQAPYNA
LSKDGKAPYIAETALKKLYTDSEASETEIERYLEAFYNDIDDSRDSNIVIHQADEKED
DEEVDAGKPTVVVTAPAATVATAQPAPVIQPAVQTTTPMFPNPIFTPATTQPAIRPVSP
SGATPQSFVYGNEDASPSTSNLTVNTRDRDQVDSIGTFVAVPRLKMTMSKLSLPKV
KGKAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQTWYEGVKRDYDVTDEEMSIILNGLMV
WCIENGTSPNINGMWMMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRN
YEKAYMPRYGIQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAHIQMKAAALRNVQNRLF
GLDGNVGTQEEDTERHTAGDVNRNMHLLGVRGV"
mat_peptide <1..636
/product="nuclear inclusion protein b"
/note="NIb"
mat_peptide 637..1626
/product="coat protein"
3'UTR 1630..1846
ORIGIN
1 ggcaataaca gtggccagcc ttcgacagtt gttgacaata cactcatggt tattttggca
61 atgacatatt cactcctgaa gcttggatac catccggata cacacgattg catttgctgg
121 tacttcgtga atgggtgatga tcttgtcctt gcagtgacc cagcatatga gagcatttat
181 gatgagcttc aagaacactt ttcccaactt ggattgaatt acacattcgc cacaaagact
241 gaaaacaagg aagagctgtg gtttatgtca cataaaggtg ttctctacga tggcatgtac

301 attcccaagc tggagcctga gagaattgta tcaatacttg aatgggatag atcaaatgag
361 ccaatccatc gattggaggc aatttgtgct tcaatgggtg aagcctgggg ttataaggag
421 ctgctgaggg agatccggaa attttacagt tgggttcttg aacaagcacc atataatgct
481 ctttcaaaaag atggaaaagc cccgtacata gcagagacgg cactcaagaa actctatact
541 gattctgaag cgtctgagac ggaaattgag agatatcttg aagcatttta caatgatatt
601 gatgatagcc gtgactccaa cattgttata caccaggctg atgaaaagga ggacgatgaa
661 gaagttgatg caggaaaacc cactgtggta actgcaccgg cagcaactgt ggcaacagct
721 caaccagctc cagtataca acctgcagtt caaaccacaa caccaatggt caaccccatt
781 ttcactccag caacaactca gcctgcgata agaccagttt ctccaatttc aggggccaca
841 ccgcagtctt ttggagttha tggaaatgag gatgcatcac cttagcactc aaacactttg
901 gtgaacacaa gaagggatag ggacgtcgat gcaggatcga ttggaacttt cgcagtgcca
961 cgcttaaaaa caatgacatc gaagttatct ctaccaaagg tgaaggaaa agcaattatg
1021 aacttaaatc atttggcaca ttacagtcct gcacaagttg atttatcaaa cacacgagct
1081 ccacaatcct gtttccagac ttggtatgaa ggagttaagc gtgattacga tgtcacggat
1141 gaggaaatga gcatcatttt gaatggcctg atggtttggg gcattgaaaa cggaacgtct
1201 cctaacaatca acggaatgtg ggtgatgatg gatggggaga cacaagtgga gtatccaata
1261 aagccattgt tggatcacgc gaaaccact tttagacaaa ttatggcaca tttcagtaac
1321 gtggctgaag cgtatattga aaaacggaat tacgagaaaag catacatgcc aaggtatgga
1381 attcagcgca acctgacaga ttacagcctc gccagatagc ctttgattt ttacgaaatg
1441 acttcaacaa cgcctgtgcy tgcacgtgaa gctcatatac agatgaaggc agcagcattg
1501 agaaatgttc agaatcgttt atttggcttg gatggaaacg tcggaacaca agaagaggac
1561 acagagaggg acaccgctgg tgacgtgaat cgcaacatgc acaacctct cgggtgtgagg
1621 ggagtgtagt ggtctcggtt tctatcataa acttacttg ggtgagagtc tagtcacca
1681 attgttttta gattcctggt agcatccttt tctccgcttt aattgcggca cattcagtga
1741 ggttgtacct ccacatgtgt tagtctttta ttgtcgacc caggcccttg tatctgatgt
1801 agcgagtgtt tcaactccatt cgggttatag ttcttgtgca agagac

//

PPV-Troy6 izolátum 3'HC-Pro-P3-6K1-5'CI régió

LOCUS AM933761 1356 bp RNA linear VRL 31-AUG-2008
DEFINITION Plum pox virus partial gene for polyprotein, genomic RNA, isolate Troy6.
ACCESSION AM933761
VERSION AM933761.1 GI:197670681
KEYWORDS .
SOURCE Plum pox virus
ORGANISM Plum pox virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Szathmary,E., Tobias,I., Dragojski,K. and Palkovics,L.
TITLE Partial molecular characterization of an unusual, naturally occurring recombinant Plum pox virus isolate originated from Bulgaria
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1356)
AUTHORS Palkovics,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (22-JAN-2008) Palkovics L., Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44, H-1118, HUNGARY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1356
/organism="Plum pox virus"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="Troy6"
/host="Prunus domestica cv. Hanita"
/db_xref="taxon:12211"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Bulgaria:Troyan"
/collection_date="2004"
/collected_by="Istvan Tobias, Kalin Dragojski"
CDS <1..>1356
/codon_start=3
/product="polyprotein"
/protein_id="CAP72056.1"
/db_xref="GI:197670682"

/translation="LSTGMHVLKANTINQLISFASDTLDSSMKTYLVGGLEVDKDEF
KNVKLLIRSIYKPQIMEQVLKEEPYLLLMSVLSPGVLMALFNNSGSLEKATQYWITRSH
SLAAITSMSTLAAKVSLASTLNAQMSVIDEHAAVLCDSVFDGTKPYASYMMAVK'TLE
RMKARTESDHTLNDLGFVLRQATPHLVEKSYLQELEQTWKELSWSEKFSAILSQRW
RKHIPKPFIPKDGADLGGRYDISVRSLLGNQYKRLRDVRRKRDDVVCYTHQSMGKLF
CKAIGISTSFLPSTLKMMLDMLIVFGLLLSIGATCNSMINEHKQLKQLAADREDKRRFK
RLQVLYTRLSEKVGCTPTADEFLEYVGGENPDLLKHAEDLIGDGQVVVHQSKRNSQAN
LERVVAFVALVMMLFDSERSDGVYKILNKLKMGIMGSVDQAVHHQSLDDIEDILDEKKL
T"
mat_peptide <1..104
/product="HC protein"
mat_peptide 105..1154
/product="P3 protein"
mat_peptide 1155..1310
/product="6K1 protein"
mat_peptide 1311..>1356
/product="CI protein"
ORIGIN
1 cactgtcaac tggaatgcat gttttgaaag cgaacacaat caatcaactt attagctttg
61 ctagtgatac attggattca agcatgaaaa catacctggt tggaggtcct gaagtggata
121 agtgtgatga attcaaaaaat gtcaagctct tgatcagaag catttacaag ccacaaatca
181 tggagcaggt gcttaaggaa gaaccatatt tactgctcat gagegcttttg tcacctggtg
241 tcttaatggc actgttcaat agtggttcat tggagaaagc cacacaatat tggatcacac

301 gatctcacag cttggcagcg atcacatcaa tgttatcaac acttgcagcc aaagtttcac
361 ttgcaagtac actgaatgca caaatgagtg tcattgacga acatgcagca gtcctatgtg
421 atagtgtttt tgatggaacg aagccatag catcttacat gatggcagtt aaaactttgg
481 aaaggatgaa agcacggacg gaatccgac acactttaa tgacttagga ttctcggtag
541 tcagacaggc aacaccccac ttggtggaaa aaagtatat ccaggaatta gagcaaactt
601 ggaaagagtt aagctggtcg gaaaaattct ctgcaatctt ggaatcgcaa cggtggcgaa
661 aacatatacc aaaacctttc atcccgaag acggcgcaga ttaggaggc aggtacgata
721 tctccgttcg gtcattactt ggcaaccagt acaaacgcct gcgagacgta gtccgccgga
781 aaagagacga tgtagtttgc tatacacacc agtcgatggg gaagctattc tgcaaagcca
841 tcggaatttc cacaagtttt cttccaagca ctcttaagat gcttgacatg ctcatcgtgt
901 ttggtctctt gctttcaata ggagccacat gtaactcaat gatcaatgag cataaacagc
961 ttaagcaact tgccgccgat cgggaagata agaaaagggt caaaagattg caagtcttat
1021 acacgagatt atcagagaag gttggttgca caccaacagc agatgaattc ctggagtatg
1081 tgggaggtga aaaccctgat ttactgaaac atgcagagga tctaattggg gatggtcaag
1141 ttgttgttca tcaaagcaag agaaactcac aagcaaattt ggaacgggtt gtagcatttg
1201 tagctcttgt tatgatgctg tttgactcgg agcgaagtga cggcgtgtac aagattctca
1261 acaaactcaa aggcatcatg gggagtgtcg accaggctgt tcatcatcag agcttgacg
1321 atatagaaga tatactggat gagaagaagc tcacag

//

PPV-Sóskút1 izolátum 3'Nib-CP-3'UTR régió

LOCUS FN179152 1826 bp RNA linear VRL 25-FEB-2009
DEFINITION Plum pox virus partial gene for polyprotein and 3'UTR, genomic RNA, strain D, isolate PPV-Soskut1.
ACCESSION FN179152
VERSION FN179152.1 GI:224174818
KEYWORDS .
SOURCE Plum pox virus
ORGANISM Plum pox virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Szathmary,E. and Palkovics,L.
TITLE Natural deletion is not unique in the coat protein (CP) of recombinant Plum pox virus (PPV) isolates in Hungary
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1826)
AUTHORS Palkovics,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Palkovics L., Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44., H-1118, HUNGARY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1826
/organism="Plum pox virus"
/mol_type="genomic RNA"
/strain="D"
/isolate="PPV-Soskut1"
/host="Prunus armeniaca cv. Bergeron"
/db_xref="taxon:12211"
/clone="B631.2.2"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Hungary:Soskut"
/collection_date="2008"
/identified_by="Erzsebet Szathmary"
/PCR_primers="fwd_name: Poty7941, fwd_seq: ggaattccccgcgnaayaayagyggncarcc, rev_name: PolyT2, rev_seq: cggggatcctcgagaagctttttttttttttttttt"
CDS <1..1609
/codon_start=2
/product="polyprotein"
/protein_id="CAX51129.1"
/db_xref="GI:224174819"

/translation="STVVDNTLMVILAMTYSLLKLGYPDTHDCICRYFVNGDDLVLVA
VHPAYESIYDELQEHFSQLGLNYTFATKTENKEELWFMSHKGVLVDGMYIPKLEPERI
VSILEWDRSNEPIHRLEAICASMVEAWGYKELLREIRKIFYSWVLEQAPYNALSKDGGKA
PYIAETALKKLYTDTEASETEIERYLEAFYNDINDDGESNVVVHQADEREDEEEVDAG
KPIVVTTAPAATSPILQPPPVIQAPRATAPMFNPIFTPATTQPATTPVSRVSGPQLQT
FGTHGNEDASPSNSNALVTTNRDRDVDAGSIGTFTVPRLKAMTSKLSLPKVKGKAIMN
LNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQTWYEGVKRDYDVTDDMSIILNGLMVWCIENGT
SPNINGMWVMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRNYEKAYMP
RYGIQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAHIQKAAAALRNQNRFLGGLDGNVG
TQEEDTERHTAGDVNRNMHNLGVRGV"
mat_peptide <1..616
/product="nuclear inclusion protein, NIB"
mat_peptide 617..1606
/product="coat protein, CP"
3'UTR 1610..1826
ORIGIN
1 ttcgacagtt gttgacaata cactcatggt tattttggca atgacatatt cactccttaa
61 gcttggatac catccggata cacacgattg catttgcgg tacttcgtga atgggtgatga
121 tcttgcctt gcagtgacc cagcatacga gagcatttac gatgagcttc aagaacactt

181 ttcccaactt ggattgaatt acacattcgc cacaaagact gaaaacaagg aagagctgtg
241 gtttatgtca cataaagggtg ttctctacga tggcatgtac attcccaagc tggagcccga
301 gaggattgta tcaatacttg aatgggacag atcaaatgag ccaattcatc gattggaggc
361 aatttgtgct tcaatggtgg aagcgtgggg ttataaggag ctgttgaggg agatccggaa
421 attttacagt tgggttcttg aacaagcacc atacaatgct ctttcaaaag atggaaaagc
481 cccgtacatt gcggagacag cactgaagaa gctttacact gacactgaag cgtccgagac
541 agaaattgag cgatatcttg aagcttttta caacgacatt aacgatgatg gtgagtccaa
601 cgttgttggt caccaagcgg acgaaagaga agacgaggag gaagttgacg caggaaagcc
661 gattgtagtt actgcaccgg cagcaactag cccaatactt caaccacccc cagtcataca
721 gcctgcacct cgggctacgg cgccaatggt caacccatt ttcacgccag caacaactca
781 accagcaaca acaccagttt cacgggtgtc aggacctcaa ctgcaaactt ttggaacaca
841 tggtaatgag gatgcctcac ctagcaactc aaacgcgcta gtcaccacaa acagagacag
901 ggacgttgat gcaggatcaa ttggaacttt cacagtgcca cgtttgaagg caatgacttc
961 gaaactatct ctgccaaagg tgaagggaaa ggccatcatg aacttgaacc atttggcaca
1021 ttatagtcct gcacaggttg acttgtcaaa cacgagagct cgcagtcctt gtttccaaac
1081 ttggtatgaa ggagttaagc gagattatga tgtcacggac gatgaaatga gcatcatttt
1141 aaatggtcct atggtttggt gcatagagaa tggaaatcc cgaatatca atggaatgtg
1201 ggtgatgatg gatggggaaa cacaagtgga gtatccaata aagccattgt tggatcatgc
1261 gaaacccact tttagacaaa ttatggcaca tttcagtaac gtggtgagag cgtatattga
1321 aaaacgaaat tatgaaaaag catacatgcc aaggatgga attcagcgca acctgacaga
1381 ctacagcctc gccagatatg cctttgattt ttacgaaatg acttcaacga caccgtagc
1441 ggcacgtgaa gctcatatcc agatgaaggc agcagcattg agaaatgttc aaaatcgttt
1501 atttggcttg gatggaaacg tcggaacaca agaagaggac acagagagac acaccgctgg
1561 tgatgttaat cgcaacatgc acaacctcct cgggtgtgagg ggagtgtagt ggtctcggtg
1621 tctatcataa actctacctg ggtgagagtc tagtcatcca gttgttttta gattcctggt
1681 agcatccttt tctccgcttt aatagcagta cattcagtga ggttttacct ccatatgttc
1741 tagtctgtta ttgtcgaaca caggcccttg tatctgatgt agcgagtgtc tcaactccatt
1801 cgggttatag ttcttgtgca agagcc

//

PPV-Sóskút1 izolátum 3'P3-6K1-5'CI régió

LOCUS FN179155 794 bp RNA linear VRL 25-FEB-2009
DEFINITION Plum pox virus partial gene for polyprotein, genomic RNA, strain D, isolate PPV-Soskut1.
ACCESSION FN179155
VERSION FN179155.1 GI:224174824
KEYWORDS .
SOURCE Plum pox virus
ORGANISM Plum pox virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Szathmary,E. and Palkovics,L.
TITLE Natural deletion is not unique in the coat protein (CP) of recombinant Plum pox virus (PPV) isolates in Hungary
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 794)
AUTHORS Palkovics,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Palkovics L., Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44., H-1118, HUNGARY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..794
/organism="Plum pox virus"
/mol_type="genomic RNA"
/strain="D"
/isolate="PPV-Soskut1"
/host="Prunus armeniaca cv. Bergeron"
/db_xref="taxon:12211"
/clone="B655.1"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Hungary:Soskut"
/collection_date="2008"
/identified_by="Erzsebet Szathmary"
CDS <1..>794
/codon_start=3
/product="polyprotein"
/protein_id="CAX51132.1"
/db_xref="GI:224174825"

/translation="AWKELSWSEKFSAILSEQRWRKHIPKPFIPKDGADLGGRYDISI
RSL LGNQYKRLRDIVRRKRDDVVCYTHQSMGKLFCKAIGISTSFLPSTLKM LDM L I V F
G L L L S I G A T C N S M I N E H K H L K Q L A A D R E D K K R F K R L Q V L Y T R L L E K V G C T P T A D E F L E
Y V G G E N P D L L K H A E D L I G D G Q V V V H Q S K R D S Q A N L E R V V A F V A L V M L M L F D S E R S D G V Y
K I L N K L K G I M G S V D Q T V H H Q S L D D I E D I L D E K K L T V D F V L Q S N E V A "
mat_peptide <1..560
/product="P3 protein"
mat_peptide 561..716
/product="6K1 protein"
mat_peptide 717..>794
/product="CI protein"
ORIGIN
1 aagcttgga agagttaagc tggtcgga aattctctgc aatcttgga tcgcagcgg
61 ggcgaaaaca tataccaaa cctttcatcc cgaaagacgg cgcagattta ggaggcaggt
121 acgacatctc cattcgtca ttacttgga accagtaca acgcctgaga gacatagtcc
181 gacggaaaag agacgatgtg gtttggtata cacaccagtc gatggggaag ctatcttgca
241 aagccatcgg aatttcaca agttttcttc caagcactct taaaatgctt gatatgctca
301 tcgtgttcgg tctcttgctt tcaataggag ccacatgcaa ctcgatgac aatgagcata
361 aacatcttaa gcaacttgcc gccgatcggg aagataagaa aaggttcaaa agattgcaag
421 tcttatacac gaggttatta gagaaggtcg gttgtacacc aacagcagat gaatttctgg
481 agtatgtggg aggtgaaaac cctgatttac tgaacatgc agaggatcta attggggatg
541 gtcaagttgt tgttcatcaa agcaagagag actcacaagc aaatttgga cgggttgtag

601 cattttagc tcttgttatg atgctgtttg actcggagcg aagtgacggc gtgtacaaga
661 ttctcaataa actcaaaggc atcatgggga gtggtgacca gactgttcat caccagagct
721 tggacgatat agaagatata ctggatgaga agaagctcac agtcgatttc gtgctgcaaa
781 gtaacgaagt tgca

//

PPV-Gödöllő2 izolátum 3'Nib-CP-3'UTR régió

LOCUS FN179153 1793 bp RNA linear VRL 25-FEB-2009
DEFINITION Plum pox virus partial gene for polyprotein and 3'UTR, genomic RNA, strain Rec, isolate PPV-Godollo2.
ACCESSION FN179153
VERSION FN179153.1 GI:224174820
KEYWORDS .
SOURCE Plum pox virus
ORGANISM Plum pox virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Szathmary,E. and Palkovics,L.
TITLE Natural deletion is not unique in the coat protein (CP) of recombinant Plum pox virus (PPV) isolates in Hungary
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1793)
AUTHORS Palkovics,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Palkovics L., Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44., H-1118, HUNGARY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1793
/organism="Plum pox virus"
/mol_type="genomic RNA"
/strain="Rec"
/isolate="PPV-Godollo2"
/host="Prunus armeniaca"
/db_xref="taxon:12211"
/clone="B631.1.1"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Hungary:Godollo"
/collection_date="2008"
/identified_by="Erzsebet Szathmary"
/PCR_primers="fwd_name: Poty7941, fwd_seq: ggaattccccgcgnaayaayagyggncarcc, rev_name: PolyT2, rev_seq: cggggatcctcgagaagctttttttttttttttttt"
CDS <1..1576
/codon_start=2
/product="polyprotein"
/protein_id="CAX51130.1"
/db_xref="GI:224174821"

/translation="STVVDNTLMVILAMTYSLLKLGYPDTHDCICRYFVNGDDLVLVA
VHPAYESIYDELQEHFSQLGLNYTFATKTENKEELWFMSHKGVLVDGMYIPKLEPERI
VSILEWDRSNEPIHRLEAICASMVEAWGYKELLREIRKFSWVLEQAPYNALSKDGGKA
PYIAETALKKLYTDSEASETEIERYLEAFYNDIDDSLDSNIVIHQADEKEDDEEVDAG
KPTVVTTAPAAATVATTQPAPVIQPAIQTTTPMFNPIFTPATTQPATQSFQVYGNEGASP
STSNTLVNTGRDRDVDAGSIGTFVAVPRLKTMKLSLQVKGKAIMNLNHLAHYSPAQ
VDLSNTRAPQSCFQTYEGVKRDYDVTDEEMSIILNGLMVWCIENGTSPTINGMMWMM
DGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRNYEKAYMPRYGIQRNLTDY
SLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAHIQMKAALRNQNRFLGGLDGNVGTQEEDTERHTA
GDVNRNMHNLGVRGV"
mat_peptide <1..616
/product="nuclear inclusion protein, NIB"
mat_peptide 617..1573
/product="coat protein, CP"
3'UTR 1577..1793
ORIGIN
1 ttcgacagtt gttgacaata cactcatggt tattttggca atgacatatt cactcctgaa
61 gcttggatac catccggata cacacgattg catttgcgg tacttcgtga atggatgatga
121 tcttgcctc gcagtgacc cagcatatca gagcattat gatgagcttc aagagcactt

181 ttcccaactt ggattgaatt acacattcgc cacaaagact gaaaacaagg aagagctgtg
241 gtttatgtca cataaagggtg ttctctacga tggcatgtac attcccaagc tggagcctga
301 gaggattgta tcaataacttg aatgggacag atcaaatgag ccaatccatc gattggaggc
361 aatttgtgct tcaatggtgg aagcgtgggg ttataaggag ctgctgaggg agatccggaa
421 attttacagt tgggttcttg aacaagcacc atataatgct ctttcaaaag atggaaaagc
481 cccgtacata gcagagacgg cactcaagaa actctatact gattctgaag cgtctgagac
541 ggaaattgag agatatcttg aagcatttta caatgatatt gatgatagcc ttgactccaa
601 cattgttata caccaggctg atgaaaagga ggacgatgaa gaagtcgatg caggaaaacc
661 cactgtagta actgcaccgg cagcaactgt ggcaacaact caaccagctc cagtataca
721 acctgcaatt caaaccacaa caccaatggt caacccatt ttcactccag caacaactca
781 gcctgcgacg cagtcttttg gagtttatgg aatgagggg gcatcaccta gcacatcaa
841 cactttggtg aacacaggaa gggatagggc cgtcgatgca ggatcgattg gaactttcgc
901 agtgccacgc ttaaaaacaa tgacatcgaa gttatctcta ccgaagggtg aaggaaaagc
961 aattatgaac ttaaatcatt tggcacatta cagtcctgca caagttgatt tatcaaacac
1021 acgagctcca caatcctggt tccagacctg gtatgaagga gtttagcgtg attacgatgt
1081 cacagatgag gaaatgagta tcattttgaa tggcctgatg gtttgggtgca tcgaaaacgg
1141 aacgtctcct aacatcaacg gaatgtgggt gatgatggat ggggagacac aagtggagta
1201 tccaataaag ccattgttgg atcacgcaa acccactttt agacaaatta tggcacattt
1261 cagtaacgtg gctgaagcgt atattgaaaa acggaattac gagaaagcat acatgccaag
1321 gtatggaatt cagcgcaacc tgacagatta cagcctcgcc agatacgctt ttgattttta
1381 cgaaatgact tcaacaacgc ctgtgctgac acgtgaagct catatacaga tgaaggcagc
1441 agcattgaga aatgttcaga atcgtttatt tggcttggat ggaaacgtcg gaacacaaga
1501 agaggacaca gagagacaca ccgctggtga cgtgaatcgc aacatgcaca acctcctcgg
1561 tgtgagggga gtgtagtggg ctcggtatct atcataaact ctacttgggt gagagtctag
1621 tcaccaatg gtttttagat tcctgtaagc atccttttct ccgctttaat tgcggcacat
1681 tcagtgaggt tgtacctcca catgtgttag tcttttattg tcgaacacag gcccttgtat
1741 ctgatgtagc gagtgtttca ctccattcgg gttatagttc ttgtgcaaga gac

//

PPV-Szigetcsép1 izolátum 3'Nib-CP-3'UTR régió

LOCUS FN179154 1826 bp RNA linear VRL 25-FEB-2009
DEFINITION Plum pox virus partial gene for polyprotein and 3'UTR, genomic RNA, strain D, isolate PPV-Szigetcsép1.
ACCESSION FN179154
VERSION FN179154.1 GI:224174822
KEYWORDS .
SOURCE Plum pox virus
ORGANISM Plum pox virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Potyviridae; Potyvirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Szathmary,E. and Palkovics,L.
TITLE Natural deletion is not unique in the coat protein (CP) of recombinant Plum pox virus (PPV) isolates in Hungary
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1826)
AUTHORS Palkovics,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Palkovics L., Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road 44., H-1118, HUNGARY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1826
/organism="Plum pox virus"
/mol_type="genomic RNA"
/strain="D"
/isolate="PPV-Szigetcsép1"
/host="Prunus armeniaca"
/db_xref="taxon:12211"
/clone="B641.1"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Hungary:Szigetcsép"
/collection_date="2008"
/identified_by="Erzsebet Szathmary"
/PCR_primers="fwd_name: Poty7941, fwd_seq: ggaattccccgcgnaayaayagyggncarcc, rev_name: PolyT2, rev_seq: cggggatcctcgagaagcttttttttttttttttt"
CDS <1..1609
/codon_start=2
/product="polyprotein"
/protein_id="CAX51131.1"
/db_xref="GI:224174823"

/translation="STVVDNTLMVILAMTYSLLKLGYPDTHDCICRYFVNGDDLVLAVHPAYESIYDELQEHFSQLGLNYTFATKTENKEELWFMSHKGVLVDDMYIPKLEPERIVSILEWDRSNPEIHRLEAICASMVEAWGYKELLREIRKFSWVLEQAPYNALSKGGKAPYIAETALKKLYSDTEASETEIERYLEAFYNDINDDGESNVVVHQADEREDEEEVDAGKPIVVTAPAATSPILQPPPVIQAPRRTAPMFNPIFTPATTQPATKPVPRVSGPQLQTFGTYGNEDASPSNSNALVNTNRDRDVDAGSIGTFTVPRLRAMTSKLSLPKVKGKAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQTWYEGVKRDYDVTDDMSIILNGLMVWCIENGTSPNINGMWVMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRNYEKAYMPRYGIQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAHIQMKAALRNQNRFLGGLDGNVGTQEEDTERHTAGDVNRNMHNLGVRGV"
mat_peptide <1..616
/product="nuclear inclusion protein, NIB"
mat_peptide 617..1606
/product="coat protein, CP"
3'UTR 1610..1826
ORIGIN
1 ttcgacagtt gttgacaaca cactcatggt tattttggca atgacatatt cactccttaa
61 gcttggatac catccggata cacacgattg catttgcgg tacttcgtga atgggtgatga
121 tcttgcctt gcagtgacc cagcgtacga gagcatctac gatgagcttc aagaacactt

181 ttcccaactt ggattgaatt acacattcgc cacaaagact gaaaacaagg aagagctgtg
241 gtttatgtca cataaagggtg ttctctacga tgacatgtac attcccaagc tggagcctga
301 gaggattgta tcaataacttg aatgggacag atcaaatgag ccaattcatc gattggaggc
361 aatttgtgct tcaatggtgg aagcgtgggg ttataaggag ctgttgaggg agatccggaa
421 attttacagt tgggttcttg aacaagcacc atacaatgct ctttcaaaag gtggaaaagc
481 cccgtacatt gcggagacag cactgaagaa gctttactct gacctgaag cgtccgagac
541 agaaattgag cgatatcttg aagcttttta caacgacatt aacgatgatg gcgagtccaa
601 cgttgttggt caccaagcgg acgaaagaga agacgaggag gaagttgacg cagggaagcc
661 gattgtagtt actgcaccgg cagcaactag cccaataactt caaccacccc cagtcataca
721 gcctgcaccc cggactacag cgccaatggt caacccattt ttcacgccag caacaactca
781 accagcaaca aaaccagttc cacgggtgtc aggacctcaa ctgcaaactt ttggaacata
841 tggtaatgag gatgcctcac ctagcaactc aaacgcgcta gtcaacacaa acagagatag
901 ggacgtcgat gcaggatcaa ttggaacttt cacagtgcca cgtttgaggg caatgacttc
961 gaaactatct ctgccaaagg tgaagggaaa ggccattatg aacttgaacc atttggcaca
1021 ttatagtcct gcccaggttg acttgtcaaa cacgagggct cgcagtcctt gtttccaaac
1081 ttggtatgaa ggagttaagc gagattatga tgtcacggac gatgaaatga gcatcatttt
1141 aaatggtcct atggtttggt gcatagagaa tggaaatcc cccaatca atggaatgtg
1201 ggtgatgatg gatggggaaa cacaagtgga gtatccaata aagccattgt tggatcatgc
1261 gaaacccact tttagacaaa ttatggcaca tttcagtaac gtggctgaag cgtatattga
1321 aaaacgaaat tatgaaaaag catacatgcc aaggatgga attcagcgca acctgacaga
1381 ctacagcctc gccagatatg cctttgattt ttacgaaatg acttcaacga caccgtagc
1441 ggcacgtgaa gctcatatcc agatgaaggc agcagcattg agaaatgttc aaaatcgttt
1501 atttggcttg gatggaaacg tcggaacca agaagaggac acagagagac acaccgctgg
1561 tgacgttaat cgcaacatgc acaacctcct cgggtgtgagg ggagtgtagt ggtctcggtg
1621 tctatcataa actctacctg ggtgagagtc tagtcatcca gttgttttta gattcctggt
1681 agcatccttt tctccgcttt aatagcagtg cattcagtgga ggttttacct ccatatggtc
1741 tagtctgtta ttgtcgaaca caggcccttg tatctgatgt agcgagtgtc tcaactccatt
1801 cgggttatag ttcttgtgca agagac

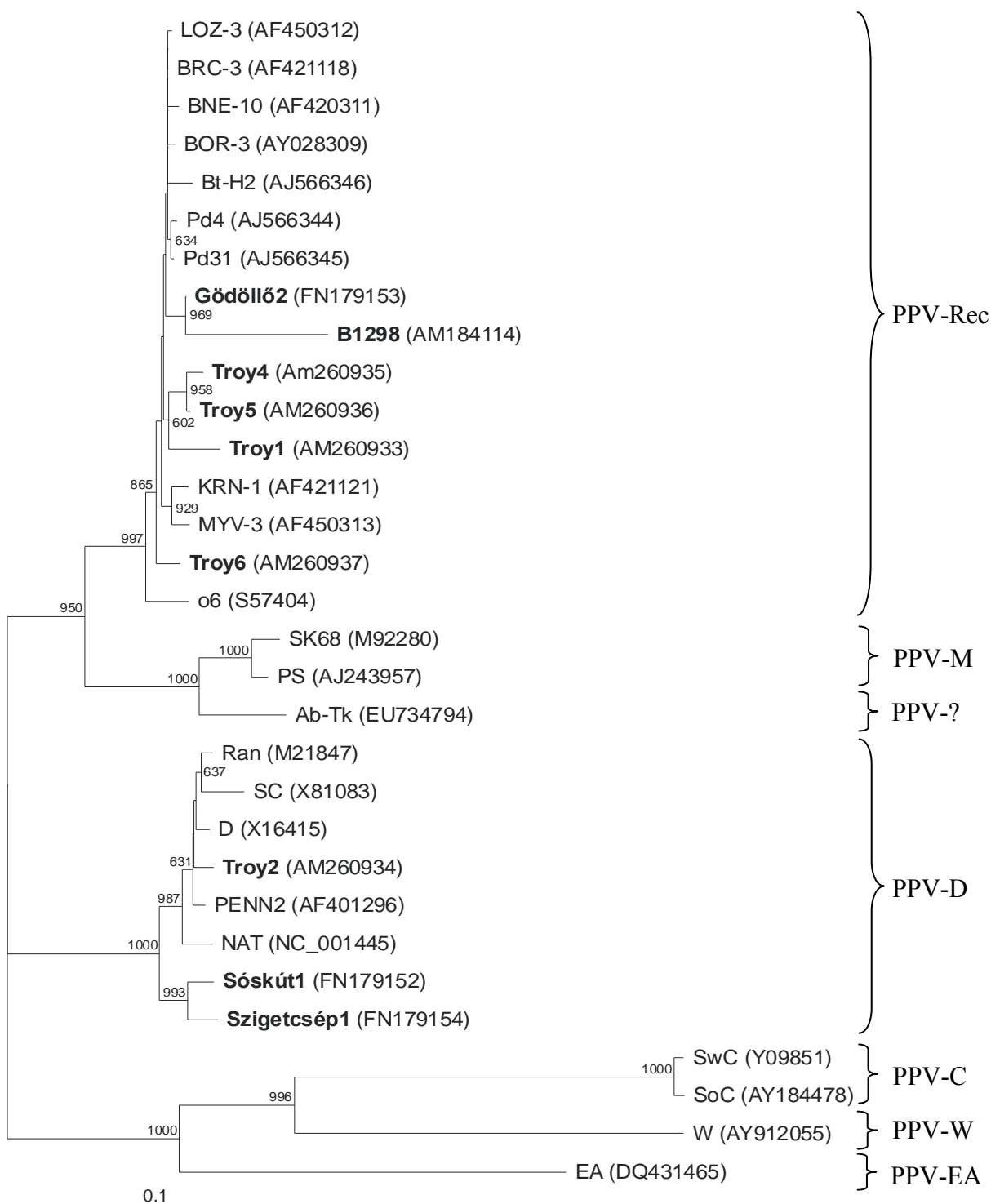
//

M3. PPV-izolátumok CP régiójának megfelelő cDNS nukleotid (átló felett) és abból származó aminosav sorrendjének (átló alatt) hasonlósága (%)

	PPV-M		PPV-?		PPV-Rec										PPV-D								PPV-C				PPV-EA		PPV-W
	SK68	PS	Ab-Tk	Pd4	Pd31	Bt-H (Bt-H12)	Bulgarian	o6	BOR-3	PA	Ran	D	PENN2	SC	Troy1	Troy2	Troy4	Troy5	Troy6	B1298	Sóskút1	Gödöllő2	Szigetsép1	SwC	SoC	EA	W		
SK68		98,3	95,9	96,9	97,0	96,7	96,5	96,5	96,8	87,5	87,9	87,4	88,2	87,1	95,7	87,6	96,4	96,3	96,8	83,8	87,3	93,5	87,9	79,1	80,1	81,0	76,8		
PS	99,4		95,4	96,4	96,5	96,2	96,1	96,1	96,3	87,4	87,8	88,0	88,1	87,2	95,4	87,5	96,0	95,9	96,4	83,4	87,2	93,1	87,8	78,7	79,7	81,6	77,1		
Ab-Tk	95,5	95,2		96,8	96,7	96,6	96,1	96,5	96,9	87,5	87,8	87,6	88,0	87,2	95,8	87,4	96,4	96,3	96,8	83,7	87,2	93,7	87,3	78,3	78,7	79,9	77,5		
Pd4	97,3	97,0	95,8		99,7	99,4	98,7	98,7	99,5	86,8	87,2	86,9	87,5	86,6	98,2	87,1	99,0	98,9	98,9	86,1	86,8	96,2	87,0	78,1	79,1	81,1	77,4		
Pd31	97,0	96,7	95,8	99,4		99,3	98,8	98,8	99,4	86,6	87,0	86,6	87,3	86,4	98,1	86,9	98,9	98,8	99,0	85,9	86,6	96,0	86,8	78,3	79,0	81,5	77,3		
Bt-H (Bt-H12)	97,3	97,0	96,1	99,1	99,1		98,5	98,5	99,3	87,0	87,4	87,0	87,7	86,8	98,0	87,3	98,8	98,7	98,7	85,7	87,0	95,9	87,2	78,1	78,9	81,6	77,4		
Bulgarian	96,4	96,1	95,2	98,2	98,2	98,5		98,2	98,6	86,2	86,6	86,2	86,9	86,2	97,5	86,5	98,3	98,2	98,4	84,9	86,2	95,2	86,4	78,3	78,7	81,5	77,2		
o6	96,4	96,1	95,5	98,2	98,2	98,5	97,6		98,8	87,1	87,5	87,0	87,8	86,9	97,6	87,4	98,3	98,2	98,6	85,3	87,1	95,4	87,3	79,1	79,3	80,4	77,5		
BOR-3	97,3	97,0	96,1	99,1	99,1	99,4	98,5	98,5		86,9	87,3	86,9	87,6	86,7	98,1	87,2	98,9	98,8	99,0	85,8	86,9	96,0	87,1	78,3	79,0	81,6	77,7		
PA	90,3	90,6	90,6	90,6	90,3	90,3	89,7	90,9	90,3		98,8	99,0	98,9	98,0	85,4	99,6	86,7	86,4	87,1	76,7	97,7	84,3	97,6	77,8	78,5	79,8	74,0		
Ran	90,9	91,2	90,9	91,2	90,9	90,9	90,3	91,5	90,9	97,9		99,4	99,3	98,7	85,8	98,8	87,1	86,8	87,5	77,0	98,1	84,7	98,0	77,9	78,5	79,8	75,0		
D	91,2	91,5	91,5	91,5	91,2	91,2	90,6	91,8	91,2	98,5	98,8		99,5	98,6	86,1	99,0	87,4	87,1	87,1	77,2	98,3	85,1	98,2	78,2	78,8	79,9	76,1		
PENN2	91,8	92,1	91,5	92,1	91,8	91,8	91,2	92,4	91,8	98,5	98,8	99,4		98,5	86,1	98,9	87,4	87,1	87,8	76,9	98,3	85,1	98,1	78,1	78,6	79,8	77,5		
SC	89,1	89,4	89,4	89,4	89,1	89,1	88,5	89,7	89,1	95,8	97,3	96,7	96,7		85,9	98,0	86,4	86,1	86,9	76,4	97,0	84,1	96,9	77,8	78,7	79,1	75,0		
Troy1	94,8	94,5	93,9	96,7	96,7	97,0	96,1	96,1	97,0	88,2	88,5	89,1	89,4	86,7		85,7	98,0	97,9	97,7	85,1	85,4	95,1	85,6	78,3	78,9	80,2	77,3		
Troy2	90,9	91,2	91,2	91,2	90,9	90,9	90,3	91,5	90,9	99,1	98,2	98,8	98,8	96,1	88,5		87,0	86,7	87,4	76,9	97,9	84,6	97,8	77,9	78,4	80,0	74,2		
Troy4	97,0	96,7	95,8	98,8	98,8	99,1	98,2	98,2	99,1	90,0	90,6	90,9	91,5	88,8	97,3	90,6		99,1	98,5	85,5	86,7	95,6	86,9	77,8	78,5	81,2	77,3		
Troy5	96,1	95,8	94,8	97,9	97,9	98,2	97,3	97,3	98,2	89,4	90,0	90,3	90,9	88,2	96,4	90,0	98,5		98,4	85,5	86,4	95,5	86,6	77,8	78,5	81,1	77,1		
Troy6	97,0	96,7	95,8	98,5	98,5	98,8	97,9	97,9	98,8	90,6	91,2	91,5	92,1	89,4	96,4	91,2	98,5	97,6		85,2	87,1	95,4	87,3	78,6	79,0	81,6	77,7		
B1298	84,5	84,5	84,2	85,5	85,2	85,2	84,2	84,8	85,2	80,6	80,9	81,2	81,2	79,1	83,9	80,9	85,2	84,8	84,5		77,1	88,8	76,9	72,5	73,2	75,1	72,0		
Sóskút1	90,9	91,2	90,9	90,9	90,6	90,9	90,3	91,5	90,9	97,0	97,3	97,9	98,2	95,2	88,5	97,9	90,6	90,0	91,2	80,6		84,3	98,5	78,7	78,8	79,8	76,7		
Gödöllő2	94,5	94,5	94,2	95,8	95,5	95,8	94,8	95,5	95,8	89,1	89,7	90,3	90,3	87,9	93,9	89,7	95,8	94,8	95,2	88,4	89,7		84,6	77,6	78,2	80,4	76,5		
Szigetsép1	91,8	92,1	91,5	91,2	90,9	91,2	90,6	91,8	91,2	97,6	97,9	98,5	98,5	95,8	88,8	98,5	90,9	90,3	91,5	80,9	98,2	90,3		78,4	78,7	79,2	75,3		
SwC	81,5	81,8	80,4	80,9	80,6	80,9	80,6	80,9	80,9	79,5	79,5	80,0	80,4	78,4	80,0	79,8	80,9	79,5	80,9	74,4	80,7	80,2	80,4		97,8	74,9	80,4		
SoC	82,7	83,0	81,2	82,1	81,8	82,1	81,5	82,1	82,1	81,0	81,0	81,5	81,8	79,9	80,9	81,2	82,1	80,7	82,7	75,3	81,5	81,4	81,8	94,6		75,0	81,1		
EA	85,3	85,6	83,8	84,7	84,7	85,0	84,4	85,3	85,3	82,6	83,2	83,5	83,8	81,7	83,8	83,2	85,0	84,1	84,7	78,0	84,1	84,1	83,8	77,5	78,4		76,8		
W	81,7	81,8	80,2	80,8	80,8	80,8	80,8	81,4	80,8	81,4	80,6	80,6	80,0	78,9	79,5	82,3	80,8	79,9	80,8	75,8	80,3	80,8	80,3	78,9	79,8	82,0			

Jelmagyarázat: A kapcsos zárójelekkel az adatbázisokból származó izolátumok csoportbeli hovatartozását jelöltük. A PPV-Ab-Tk izolátum típusa még nem ismert.

M4. PPV-izolátumok filogenetikai törzsfája



A törzsfá a 3'NIB–5'CP genomi régió (8050–8902. nt) megfelelő cDNS-szekvencia alapján készült. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményét mutatják; csak a 60%-nál nagyobb támogatottságú csoportokat jelöltük. Az SoC, SwC, EA és W izolátumok csoporton kívüli kontroll izolátumok. Az izolátumok neve mögött zárójelben a felhasznált nukleotid szekvenciák EMBL/NCBI/DDBJ adatbázisbeli azonosító száma szerepel. Jobb oldalt az izolátumok típusát jelöltük. A PPV-Ab-Tk izolátum típusa még nem ismert. A jellemezni kívánt izolátumokat kiemeltük (vastagítva).

M5. PPV-izolátumok 3'P3–6K₁–5'CI régiójának megfelelő cDNS nukleotid (átló felett) és abból származó aminosav sorrendjének (átló alatt) hasonlósága (%)

	PPV-M						PPV-?		PPV-Rec		PPV-D											PPV-C		PPV-EA	PPV-W		
	SK68	PS	91.003	91.006	94.061	VAR-2	Ab-Tk	BOR-3	KRN-1	MYV-1	D	PENN2	SC	NAT	85.001	92.011	93.080	94.055	BIII/2	BOJ-3	BOR-1	Troy6	Sóskútl	SwC	SoC	EA	W
SK68		98,5	99,6	99,6	99,3	98,6	95,6	87,1	86,5	86,4	86,3	86,8	86,3	85,2	86,7	86,6	86,7	86,3	86,4	86,4	86,4	86,4	86,5	74,7	73,8	78,1	74,1
PS	97,5		98,9	98,6	98,6	99,3	95,7	87,4	86,8	86,7	86,8	87,1	86,8	85,5	87,0	86,8	87,0	86,6	86,7	86,7	86,7	86,7	86,8	75,4	74,2	77,0	74,3
91.003	98,8	98,8		99,7	99,7	98,8	95,7	87,2	86,7	86,5	86,4	87,0	86,4	85,3	86,8	86,7	86,8	86,4	86,6	86,6	86,6	86,5	86,7	75,0	73,8	78,4	74,4
91.006	98,8	97,9	99,2		99,4	98,5	95,4	87,0	86,4	86,3	86,1	86,7	86,1	85,0	86,6	86,4	86,6	86,1	86,3	86,3	86,3	86,3	86,4	74,7	73,8	78,1	74,1
94.061	98,8	98,8	100,0	99,2		98,5	95,7	87,2	86,7	86,5	86,4	87,0	86,4	85,5	86,8	86,7	86,8	86,1	86,6	86,6	86,6	86,5	86,7	76,3	75,0	78,7	75,6
VAR-2	98,3	98,3	98,8	97,9	98,80		95,6	87,2	86,7	86,5	86,4	87,0	86,4	85,3	86,8	86,7	86,8	86,4	86,6	86,6	86,6	86,5	86,7	75,2	74,1	76,9	75,6
Ab-Tk	95,8	96,7	96,2	95,4	96,20	96,7		86,7	86,4	86,3	86,3	86,3	86,5	85,2	86,4	86,3	86,4	85,7	86,1	86,4	86,1	86,3	85,6	74,2	73,1	76,7	74,5
BOR-3	92,9	92,9	93,3	92,5	93,30	93,8	93,3		98,2	97,9	97,5	97,9	96,8	95,4	97,9	97,8	97,6	97,2	97,5	97,9	97,9	98,1	97,1	75,6	75,2	77,9	76,6
KRN-1	92,9	92,9	93,3	92,5	93,30	93,8	93,8	99,6		99,2	97,4	97,5	96,7	95,3	97,8	97,6	97,5	97,1	97,4	97,8	97,8	97,9	96,7	75,6	75,0	77,5	76,5
MYV-1	92,1	92,1	92,5	91,7	92,50	92,9	92,9	98,8	99,2		96,8	96,9	96,1	94,7	97,2	97,1	96,9	96,5	96,8	97,2	97,2	97,4	96,1	75,7	75,2	77,3	76,7
D	92,5	93,3	92,9	92,1	92,90	93,3	94,2	99,2	99,6	98,8		99,0	98,8	97,1	99,6	99,2	99,3	99,2	98,6	99,3	99,3	97,2	97,4	76,9	76,2	78,1	77,3
PENN2	92,9	92,9	93,3	92,5	93,30	93,8	93,8	99,6	100,0	99,2	99,6		98,3	96,9	99,4	99,3	99,2	98,8	98,5	99,2	99,2	97,4	97,8	77,2	76,5	77,5	77,7
SC	91,2	92,1	91,7	90,8	91,70	92,1	93,8	97,1	97,5	96,7	97,9	97,5		96,7	98,9	98,5	98,6	98,2	97,9	98,6	98,6	96,5	96,7	76,5	75,7	77,7	76,4
NAT	90,0	90,0	90,4	89,6	90,40	90,8	90,8	96,7	97,1	96,2	96,7	97,1	95,4		97,5	97,1	97,2	96,8	96,5	97,2	97,2	95,1	95,3	75,3	74,8	77,2	77,0
85.001	92,9	92,9	93,3	92,5	93,30	93,8	93,8	99,6	100,0	99,2	99,6	100,0	97,5	97,1		99,6	99,7	99,3	99,0	99,7	99,7	97,6	97,8	76,7	76,2	77,8	77,6
92.011	92,1	92,1	92,5	91,7	92,50	92,9	92,9	98,8	99,2	98,3	98,8	99,2	96,7	96,2	99,2		99,3	98,9	98,6	99,3	99,3	97,5	97,6	76,6	76,1	77,4	77,2
93.080	92,5	92,5	92,9	92,1	92,90	93,3	93,3	99,2	99,6	98,8	99,2	99,6	97,1	96,7	99,6	98,8		99,0	98,8	99,4	99,4	97,4	97,5	76,4	75,6	77,8	77,0
94.055	92,5	92,5	92,9	92,1	92,90	93,3	93,3	99,2	99,6	98,8	99,2	99,6	97,1	96,7	99,6	98,8	99,2		98,3	99,0	99,0	96,9	97,1	76,6	75,9	77,4	77,3
BIII/2	92,5	92,5	92,9	92,1	92,90	93,3	93,3	99,2	99,6	98,8	99,2	99,6	97,1	96,7	99,6	98,8	99,2	99,2		99,0	99,0	97,2	97,4	76,6	76,1	77,4	76,9
BOJ-3	92,9	92,9	93,3	92,5	93,30	93,8	93,8	99,6	100,0	99,2	99,6	100,0	97,5	97,1	100,0	99,2	99,6	99,6	99,6		99,7	97,6	97,8	76,7	76,2	77,5	77,4
BOR-1	92,9	92,9	93,3	92,5	93,30	93,8	93,8	99,6	100,0	99,2	99,6	100,0	99,2	97,1	100,0	99,2	99,6	99,6	99,6	100,0		97,6	97,8	76,7	76,2	77,5	77,4
Troy6	92,1	92,1	92,5	91,7	92,50	92,9	92,9	98,8	99,2	98,3	98,8	99,2	96,7	96,2	99,2	98,3	98,8	98,8	98,8	99,2	99,2		96,5	75,3	75,0	76,9	76,1
Sóskútl	92,9	93,3	93,8	92,9	93,80	93,8	92,9	97,9	98,3	97,5	97,9	98,3	95,8	95,4	98,3	97,5	97,9	97,9	97,9	98,3	98,3	97,5		77,0	76,4	78,1	76,3
SwC	78,8	78,8	79,6	79,2	79,60	79,2	78,8	78,8	78,8	78,8	78,3	78,8	77,5	76,7	78,8	77,9	78,8	78,3	78,3	78,8	78,8	79,2	78,8		99,0	74,4	79,4
SoC	79,6	78,8	79,6	80,0	79,60	79,2	78,8	77,5	77,5	77,5	77,1	77,5	76,2	75,4	77,5	76,7	77,5	77,1	77,1	77,5	77,5	77,5	77,9	97,5		73,8	79,0
EA	81,2	80,4	81,7	81,2	81,70	80,8	80,0	80,0	80,0	79,2	79,6	80,0	78,8	79,2	80,0	79,2	80,0	79,6	79,6	80,0	80,0	80,4	80,4	81,7	80,4		77,0
W	75,8	76,2	77,1	76,7	77,10	77,1	76,2	75,8	75,8	75,8	75,4	75,8	74,2	75,0	75,8	75,0	75,8	75,4	75,4	75,8	75,8	76,2	75,8	83,3	82,1	80,4	

Jelmagyarázat: A kapcsos zárójelekkel az adatbázisokból származó izolátumok csoportbeli hovatartozását jelöltük. A PPV-Ab-Tk izolátum típusa még nem ismert.

M6. PPV-izolátumok 3'P3-6K₁-5'CI régiójának megfelelő cDNS-szekvencia származtatott aminosav sorrendjének többszörös illesztése

	944		*		*	*
PS	I	L	E	S	Q	R
SK68	V
91.003
91.006	T
94.061
VAR-2	V
Ab-Tk	VI
BOR-3	.	G	.	N	.	R.V
KRN-1	.	G	.	N	.	R.V
MYV-1	.	R	.	G	.	N.R.V
D	.	G	.	N	.	R.V
PENN2	.	G	.	N	.	R.V
SC	.	G	.	N	.	R.V
NAT	.	G	.	N	.	R.V.W
85.001	.	G	.	N	.	R.V
92.011	.	G	.	N	.	R.V
93.080	.	G	.	N	.	RNV
94.055	.	G	.	N	.	R.V
BIII/2	.	Q	.	G	.	N.R.V
BOJ-3	.	G	.	N	.	R.V
BOR-1	.	G	.	N	.	R.V
Troy6	.	G	.	N	.	R.V
Sóskút1	.	G	.	I	.	N.R.I
SwC	M	.	R	.	R	.V.AAS
SoC	M	.	R	.	R	.V.AAS
EA	M	.	.	T	.	A
W	M	.	R	.	R	.V.VA

			*		*
PS	M	G	K	L	F
SK68	L
91.003	L
91.006	L
94.061	L
VAR-2	L
Ab-Tk	L
BOR-3	.	L	.	V	.
KRN-1	.	L	.	V	.
MYV-1	.	L	.	V	.
D	.	L	.	V	.
PENN2	.	L	.	V	.
SC	.	N	.	V	.
NAT	.	P	.	L	.
85.001	.	L	.	V	.
92.011	.	R	.	L	.
93.080	.	L	.	V	.
94.055	.	L	.	V	.
BIII/2	.	L	.	V	.
BOJ-3	.	L	.	V	.
BOR-1	.	L	.	V	.
Troy6	.	L	.	V	.
Sóskút1	.	L	.	V	.
SwC	.	V	.	L	.
SoC	.	V	.	L	.
EA	.	L	.	N	.
W	.	R	.	V	.

		*		*		*		◆	
PS	RFKRLQVLHTRLLEKIGCTPTADEFLEYVQGENPDLKLYAEDLIGDGQVVVHQSKRDSQA								
SK68Y.....S.....								
91.003Y.....S.....								
91.006Y.....S.....								
94.061Y.....S.....								
VAR-2Y.....								
Ab-TkS.RV.....N.....H.....								
BOR-3Y.S.A.....G.....H.....								
KRN-1Y.S.V.....G.....H.....								
MYV-1Y.S.V.....G.....H.....								
DS.V.....G.....H.....								
PENN2Y.S.V.....G.....H.....								
SCS.V.....N.....G.....H.....								
NATY.S.V.....GD.....H.....								
85.001Y.S.V.....G.....H.....								
92.011Y.S.V.....G.....H.....								
93.080Y.S.V.....G.....H.....								
94.055Y.S.V.....G.....H.....								
BIII/2Y.S.V.....G.....H.....								
BOJ-3Y.S.V.....G.....H.....								
BOR-1Y.S.V.....G.....H.....								
Troy6Y.S.V.....G.....H.....								N
Sóskút1Y.█.V.....G.....H.....								
SwCL.YA.VTD.L.M.E.....E.V.....E.....E.....								
SoCL.YA.VTD.L.YM.E.....E.V.....E.....E.....								
EAR.Y.V.LNG.....E.....S.A.....E.....N.E.....								
W	K.....I.YE.T.L.L.E.....HE.SE.R.H.....E.L.E.....								

		*	*	*	◆	*	1183
PS	NLERVAFVALVMMLFDSERSDGVYKILNKLKGVMSIDQTVVHHQSLDDIEDMLDEKKLT						
SK68A.....N.....						
91.003						
91.006N.....						
94.061						
VAR-2V.....						
Ab-Tk						
BOR-3I.V.A.....I.....						
KRN-1I.V.A.....I.....						
MYV-1I.V.A.....I.R.....						
DI.V.A.....I.....						
PENN2I.V.A.....I.....						
SCI.VE.A.....I.....						
NATI.V.RA.....I.....						
85.001I.V.A.....I.....						
92.011I.V.A.....G.....I.....						
93.080I.V.A.....I.....						
94.055SI.V.A.....I.....						
BIII/2I.V.A.....I.....						
BOJ-3I.V.A.....I.....						
BOR-1I.V.A.....I.....						
Troy6I.V.A.....I.....						
Sóskút1I.V.█.....I.....						
SwCT.I.P.....I.....						
SoCT.....N.....I.....						
EAI.....II.V.Q.....I.....						
WS.....S.I.H.....V.I.....						

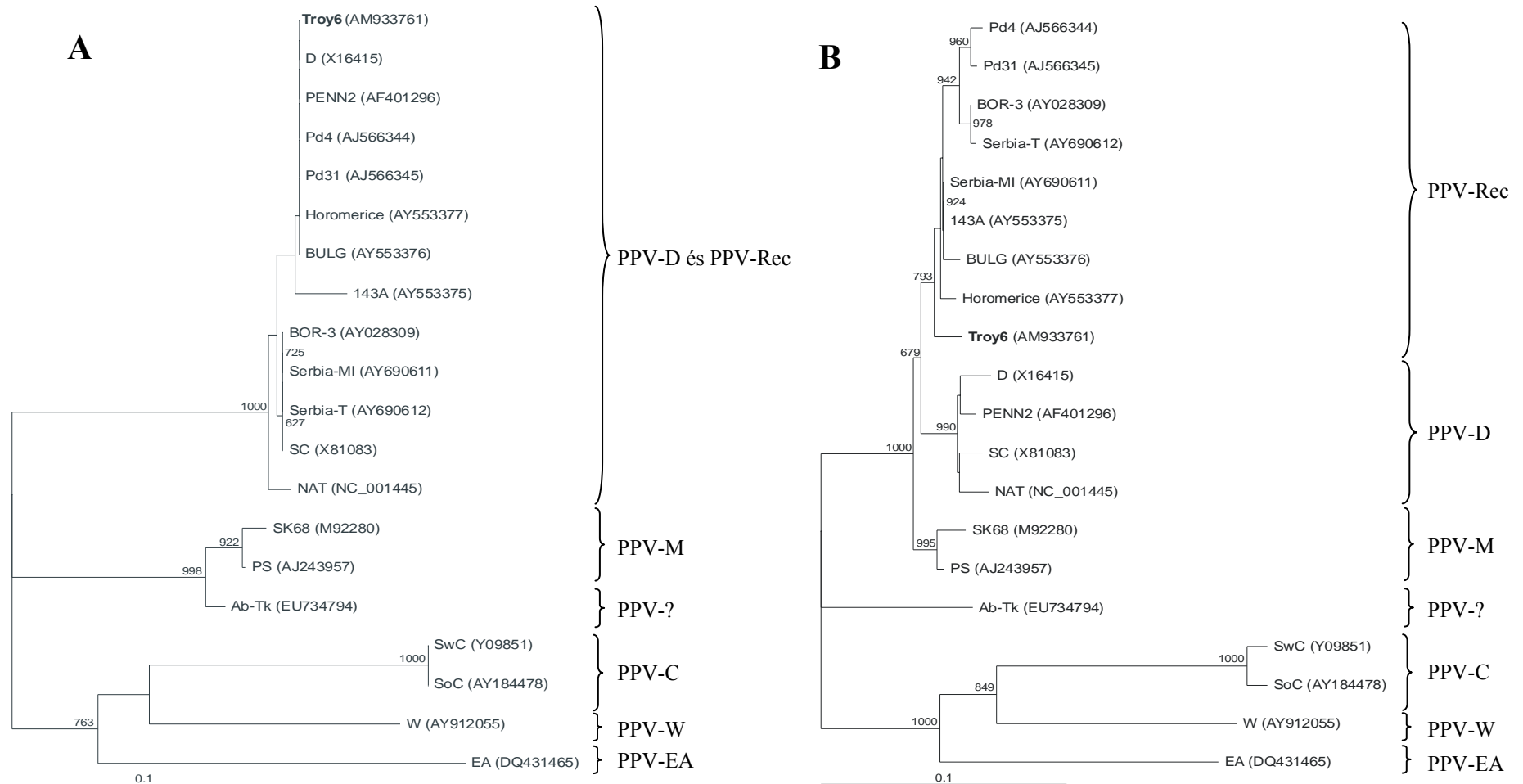
Jelmagyarázat: A “*” az adott régióban D-típusú genomú izolátumok származtatott aminosav szekvenciájában specifikusan konzervatív pozíciókat jelöli. A ◆ a vírus fő proteáza P3 és 6K₁, illetve 6K₁ és CI fehérjék közötti hasító helyeit jelöli. Csak a konszenzus szekvenciától eltérő aminosavakat jelöltük. A pontok azonos aminosavakat, a “-” aminosav hiányt jelöl. A PPV-Troy6 és PPV-Sóskút1 izolátumok származtatott 6K₁ és CI fehérjéiben lévő aminosav cseréket kiemeltük. Az aminosavak számozása a PPV-SK68 izolátum genomjáról keletkező polipeptid aminosav sorrendjének megfelelően történt.

M7. PPV-izolátumok 3'HC-Pro-5'P3 régiójának megfelelő cDNS nukleotid (átló felett) és abból származó aminosav sorrendjének (átló alatt) hasonlósága (%)

	PPV-M		PPV-?	PPV-Rec								PPV-D					PPV-C		PPV-EA	PPV-W
	SK68	PS	Ab-Tk	Pd4	Pd31	BULG	BOR-3	143A	Horomerice	Serbia-MI	Serbia-T	D	PENN2	SC	NAT	Troy6	SwC	SoC	EA	W
SK68		98,7	89,8	92,1	92,3	92,7	93,1	93,3	93,1	93,5	92,9	91,7	91,9	92,3	92,1	93,1	76,3	75,5	77,6	77,5
PS	98,8		91,0	93,1	93,3	93,7	94,0	94,2	94,0	94,4	93,9	92,7	92,9	93,3	93,1	93,7	76,3	76,0	78,0	78,1
Ab-Tk	97,7	98,8		86,0	86,2	86,6	86,9	86,9	86,9	87,3	86,9	86,8	86,9	86,2	86,0	86,6	76,5	76,2	77,2	77,5
Pd4	96,0	97,1	96,5		99,4	98,1	98,7	98,3	98,1	98,5	98,5	95,6	96,0	96,0	95,2	97,5	77,2	76,6	77,6	76,7
Pd31	96,5	97,7	97,1	98,8		98,3	98,8	98,5	98,3	98,7	98,7	95,8	96,2	95,8	95,8	97,7	76,3	76,0	77,5	76,2
BULG	97,1	98,3	98,3	96,0	96,5		98,3	99,0	98,8	99,2	98,1	96,7	97,1	96,7	96,4	98,3	77,1	76,8	77,4	77,5
BOR-3	97,1	98,3	98,3	98,3	98,8	97,7		98,5	98,3	99,0	99,8	95,8	96,2	96,2	95,8	97,7	77,4	76,8	77,2	77,5
143A	98,3	99,4	99,4	97,1	97,7	98,8	98,8		99,0	99,4	98,3	96,5	96,9	96,5	96,2	98,5	76,9	76,6	77,4	77,5
Horomerice	98,3	99,4	99,4	97,1	97,7	98,8	98,8	100,0		99,2	98,1	96,7	97,1	96,7	96,4	98,3	76,7	76,4	77,5	77,6
Serbia-MI	98,3	99,4	99,4	97,1	97,7	98,8	98,8	100,0	100,0		98,8	96,7	97,1	97,1	96,7	98,7	77,3	77,0	77,4	77,7
Serbia-T	97,1	98,3	98,3	98,3	98,8	97,7	100,0	98,8	98,8	98,8		95,6	96,0	96,0	95,6	97,5	77,2	76,6	77,0	77,5
D	96,5	97,7	97,7	95,4	96,0	98,3	97,1	98,3	98,3	98,3	97,1		98,5	97,7	97,3	96,0	75,3	75,1	75,8	77,4
PENN2	97,7	98,8	98,8	96,5	97,1	99,4	98,3	99,4	99,4	99,4	98,3	98,8		98,5	98,1	96,9	75,8	75,8	76,8	78,1
SC	96,5	97,7	96,5	96,0	96,0	97,1	96,0	97,1	97,1	97,1	96,0	96,5	97,7		98,1	96,5	74,8	74,9	75,9	77,7
NAT	97,1	98,3	97,1	96,0	97,1	97,7	96,5	97,7	97,7	97,7	96,5	97,1	98,3	97,7		95,8	75,8	75,8	75,9	77,5
Troy6	97,7	98,8	98,8	96,5	97,1	98,3	98,3	99,4	99,4	99,4	98,3	97,7	98,8	97,7	97,1		77,3	77,0	77,8	77,7
SwC	89,0	89,0	89,0	88,4	89,0	87,9	89,0	89,0	89,0	89,0	89,0	87,3	88,4	87,3	88,4	88,4		99,0	76,1	79,5
SoC	88,4	89,6	89,6	89,0	89,6	88,4	89,6	89,6	89,6	89,6	89,6	87,9	89,0	87,9	88,4	89,0	97,1		76,1	79,3
EA	90,2	91,3	91,3	89,6	90,2	90,2	90,8	91,3	91,3	91,3	90,8	89,6	90,8	89,0	89,6	90,8	88,4	89,0		76,1
W	89,6	90,8	90,8	89,0	89,6	89,6	90,2	90,8	90,8	90,8	90,2	89,0	90,2	89,0	90,2	90,2	92,5	92,5	91,3	

Jelmagyarázat: A kapcsos zárójelekkel az adatbázisokból származó izolátumok csoportbeli hovatartozását jelöltük. A PPV-Ab-Tk izolátum típusa még nem ismert.

M8. PPV-izolátumok filogenetikai törzsfája



A törzsfá (A) az 5' végi rekombinációs ponttól 3' irányban található 95 bázisnak (2813–2907. nt) és (B) az attól 5' irányban elhelyezkedő 426 nukleotidnak (2387–2812. nt) megfelelő cDNS-szekvencia alapján készült. A elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményét mutatják; csak a 60%-nál nagyobb támogatottságú csoportokat jelöltük. Az SoC, SwC, EA és W izolátumok csoporton kívüli kontroll izolátumok. Az izolátumok neve mögött zárójelben a felhasznált nukleotid szekvenciák nemzetközi EMBL/NCBI/DDBJ adatbázisbeli azonosító száma szerepel. Jobb oldalt az izolátumok típusát jelöltük. A PPV-Ab-Tk izolátum típusa még nem ismert. A PPV-Troy6 izolátumot kiemeltük (vastagítva).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, **Dr. Palkovics László** egyetemi tanárnak, az MTA doktorának, aki nagy türelemmel és önzetlenül tanított a molekuláris virológia tudományára. Megteremtette a kutatáshoz szükséges anyagi és technikai feltételeket, valamint a nyugodt háttérrel. Széleskörű szakmai ismereteivel, gyakorlati tapasztalataival és hasznos tanácsaival mindvégig segítette munkámat, és biztosította a disszertáció elkészítésének feltételeit. Remélem támogatására és iránymutatására a továbbiakban is számíthatok.

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Balázs Ervinnek**, aki befogadott a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont akkori Virologia csoportjába, valamint **Dr. Salánki Katalinnak**, aki lehetővé tette, hogy vizsgálataimat később is az MKB-ban folytathassam, és munkám során rengeteg hasznos elméleti és gyakorlati tanáccsal látott el.

Hálásan köszönöm **Nádudvariné Novák Júliának** a molekuláris biológiai módszerek elsajátításában, valamint a PPV-B1298 izolátum vizsgálata során nyújtott felbecsülhetetlen értékű gyakorlati segítségét.

Köszönöm **Dr. Tóbiás Istvánnak** a PPV-vel fertőzött szilváról származó növényanyag rendelkezésünkre bocsátását, **Dr. Basky Zsuzsának** a levéltetű-átviteli kísérletben, valamint **Dr. Szabó Lászlónak** az elektronmikroszkópos vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Külön köszönöm **Kiss Lászlónak**, **Dr. Halász Júliának**, a BCE Növénykórtani Tanszék, valamint az MBK Virologiai Csoport valamennyi volt és jelenlegi munkatársának segítőkészségét és kedvességét.

Végül pedig szeretnék köszönetet mondani szüleimnek és férjemnek, **Koós Sándornak**, akik a hosszú munka során mindvégig mellettem voltak.