

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A csonthéjasok gazdaságos termesztését világszerte számos tényező befolyásolja, melyek közül a legfontosabbak a folyamatosan erősödő növényvédelmi problémák, különösen a súlyos károkat okozó vírusfertőzések.

Európában a csonthéjasokat fertőző vírusok közül a szilva himlő vírus (*Plum pox virus*, PPV, sharka vírus) jelentősége a legnagyobb. Hazánkban is a csonthéjas gyümölcsfajok termesztésében a PPV okozza a legjelentősebb virológiai problémát. A PPV által okozott betegségekre először Bulgáriában figyeltek fel 1917–1918 táján, azóta a szaporítóanyagok nemzetközi kereskedelme révén gyorsan elterjedt Európában. Jelenleg szinte az egész világon előfordul, és súlyosan veszélyezteti a szilva, a kajszi és az őszibarack termesztését. A PPV fertőzése következtében a beteg fák termése jelentősen csökken, a gyümölcsök minősége romlik. A termésen megjelenő elváltozások miatt a gyümölcsök értékesíthetlenné válnak, valamint ipari felhasználhatóságuk is nagymértékben csökken a megváltozott cukor-sav arány következtében. A terméshullás érzékeny szilvafajtáknál elérheti a 100%-ot is.

A vírusos betegségek, így a PPV elleni védekezés leghatékonyabb módja a megelőzés. A megelőzés érdekében alapvető fontosságú a súlyos járványokat kialakító vírus izolátumok megfelelő detektálása a növényi szövetekben, különösen a szaporító anyagokban. 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, illetve típusát különítették el, melyek patogenitásukban, gazdanövénykörükben, levéltetvekkal való átviteli hatékonyságukban és földrajzi elterjedésükben különböznek egymástól. Ezen felül a természetben lejátszódó rekombinációs és mutációs események következtében megváltozott biológiai, szerológiai, molekuláris és járványtani tulajdonságokkal rendelkező vírus izolátumok alakulhatnak ki, melyek megghiúsíthatják a biztonságos detektálást. Ezért a rekombinációval és/vagy mutációval létrejövő izolátumok molekuláris és szerológiai meghatározása, jellemzése, valamint a vírusgenom változékonyságának ismerete a PPV leküzdéséhez szükséges védekezési stratégiák kidolgozásának és a diagnosztikának alapvetően fontos eszköze.

A PPV gazdasági jelentőségére és a virológiai ellenőrzés fontosságára való tekintettel munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. Bulgáriából szilváról származó, valamint hazánkból kajsziról és szilváról származó PPV-izolátumok molekuláris jellemzése, a vírusgenom változékonyságának és az izolátumok csoportbeli hovatartozásának megállapítása;

2. A vizsgált bulgáriai és hazai izolátumok egymással és más PPV-izolátumokkal való rokonsági viszonyainak feltárása;
3. Természetes mutáció következtében kialakult új, rövidebb köpenyfehérje (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 tesztelése, 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 megállapítása.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Vizsgálatok helye és ideje

Vizsgálatainkat 2003 és 2008 között a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban és a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar Növénykórtani Tanszékén végeztük.

2.2. Vizsgálatok anyaga

Munkánk során különböző szilva- és kajszifajtákról 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 kajszii ültetvényéből, valamint Bulgáriából: Trojánból, a RIMSA (Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture) kísérleti szilvaültetvényéből származtak.

2.3. Vizsgálatok módszere

2.3.1. Mechanikai vírusátvitel és össznukleinsav-kivonás

A fertőzött levelekből készített présnedvvel *Nicotiana benthamiana* Domin és *N. clevelandii* Gray. tesztnövényeket mechanikailag inokuláltunk. Az össznukleinsav-kivonást *N. benthamiana* növények szisztemikus tüneteket mutató leveleiből White és Kaper (1989) módszere szerint végeztük kisebb módosításokkal.

2.3.2. RT-PCR

Az össznukleinsav-kivonatból a megfelelő antiszensz primer felhasználásával reverz transzkripció (RT) során állítottuk elő a vírus nukleinsavval komplementer DNS (cDNS) első szálát, melyről a vírus szekvenciának megfelelő nukleinsav szakaszok megsokszorozását polimeráz láncreakció (PCR) során végeztük. A PCR-hez felhasznált primerek szekvenciáit az 1. táblázat tartalmazza. RT-PCR során a genom három különböző régióját szaporítottunk fel DNS formában. A nagy sejtmagi zárványfehérje (N1b) gén 3' végének, a teljes CP génnek és a 3' nem-kódoló régió (3'UTR) (3'N1b-CP-3'UTR) megfelelő szakaszt, mely a 3' végi rekombinációs pontot is magában foglalta, a PolyT₂ és a Poty7941 primerekkel sokszoroztuk meg. A P3 gén 3' végének, a teljes 6K₁ génnek és a henger alakú zárványfehérje (CI) gén 5' végének (3'P3-6K₁-5'CI) megfelelő régió felszaporításához a PCI és a PP3 primereket használtuk. A vírusgenom 5' végén található rekombinációs pont vizsgálatához a segítő fehérje és proteáz (HC-Pro) gén 3' végétől a P3 gén 5' végéig terjedő genom régió (3'HC-Pro-5'P3) a PPV-P3-RC és PPV-HC-RC primerek felhasználásával szaporítottuk fel.

1. táblázat. A felhasznált primerek neve, nukleotid szekvenciája és orientációja, a felhasználási cél megjelölésével

Primer neve	Szekvencia 5'–3'	Orientáció	Felhasználási cél
PPV-P3-RC	CAAGGATCCTGCGATTCCAAGATTGCA	antiszensz	RT-PCR, szekvenálás
PPV-HC-RC	ATACCGCGGATCACTGTCAACTGGAATGC'	szensz	RT-PCR, szekvenálás
PCI	TTGAGTCAAATGG(AG)ACAGTTGG	antiszensz	RT-PCR, szekvenálás
PP3	TTATCTCCAGGA(AG)TTGGAGC	szensz	RT-PCR, szekvenálás
PolyT ₂	CGGGGATCCTCGAGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	antiszensz	RT-PCR, szekvenálás
Poty7941	GGAATTCCCGCGG(AGCT)AA(CT)AA(CT)AG(CT)GG(AGCT)CA(AG)CC	szensz	RT-PCR, szekvenálás
Unipoty	GGAATTCCCGCGGAAAAGCCCCGTACATTGC	szensz	szekvenálás
PPV-CP5	CACTACACTCCCCTCACACCGAGG	antiszensz	szekvenálás
PPV-CP4	CTACATCAGATACAAGGGCCTGTG	antiszensz	szekvenálás

2.3.3. A PCR-termékek restriktions analízise

A 3'P3–6K₁–5'CI genomi régióról készült cDNS-szakaszokat olyan restriktions endonukleázokkal [*DdeI* (*HpyF3I*), *EcoRI*] hasítottuk, melyek csak a vizsgált régióban D-típusú genommal rendelkező izolátumokról (PPV-D és PPV-Rec csoport tagjai) készült cDNS-szekvenciákat ismerik fel.

2.3.4. A PCR-termékek klónozása és szekvencia analízis

A megfelelő méretű PCR-fragmentumokat pBluescript II SK (+) (Stratagene) plazmidba vagy pGEM-T Easy Vektorba (Promega) kapcsoltuk (ligálás), majd a genetikailag megváltoztatott (rekombináns) plazmidot *Escherichia coli* DH5 α kompetens sejtekbe jutattuk (transzformálás). A baktérium sejtekből a rekombináns plazmid DNS izolálását alkalikus lízisen alapuló minipreparálással végeztük.

A rekombináns plazmidok által hordozott klónozott szakasz nukleotid (nt) sorrendjének meghatározása ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer automata DNS-szekvenátorral történt. A nukleotid és aminosav szekvenciák vizsgálatát az EMBL/NCBI/DDBJ nemzetközi adatbázisok megfelelő adatainak felhasználásával a Genetic Computer Group (GCG) Wisconsin programcsomag 10.0 verziója (Devereux és mtsai, 1984) és az EMBOSS-Align (Rice és mtsai, 2000) programok segítségével végeztük. A szekvenciák illesztését a CLUSTAL X programmal (Thompson és mtsai, 1997) és a MEGA 3.1 szoftverrel (Kumar és mtsai, 2004) hoztuk létre, a filogenetikai vizsgálatokhoz a CLUSTAL X programot használtuk. A filogenetikai törzsfákat a TREEVIEW program 1.6.6 verziója (Page, 1996) segítségével rajzoltuk meg.

2.3.5. A B1298 rövidebb CP gént hordozó cDNS klón előállítás és a fertőzőképesség megállapítása

A PPV-B1298 izolátum CP génjének megfelelő cDNS-szakaszt beépítettük a pPPV-SK68 teljes hosszúságú fertőzőképes klónba. Az így kapott klón (pPPV-SK68CPB1298) a karfiol mozaik vírusból (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) származó 35S promóter mögött tartalmazta a PPV teljes szekvenciáját DNS formában, de a CP génben a PPV-B1298 izolátumot reprezentálta. A pPPV-SK68CPB1298 klónnal *N. benthamiana* növényeket mechanikailag inokuláltunk. A fertőzőképességet a szisztemikus tünetek megjelenésével, valamint a PolyT₂ és a Poty7941 primerekkel végzett RT-PCR analízissel igazoltuk.

2.3.6. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus virionjainak vizsgálata

A vírus partikulumok kialakulását és morfológiai vizsgálatát Zeiss EM910 típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal, negatív festéses módszerrel végeztük. Kontrollként a pPPV-SK68 klónból származó virionokat is vizsgáltuk.

2.3.7. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus átvitele levéltetvekkel

A levéltetű-átviteli teszthez nem-vírushordozó *Myzus persicae* Sulz. egyedeket használtunk. A levéltetvek 2 órás éheztesítés után 5 percig táplálkozhattak a pPPV-SK68CPB1298 fertőzőképes klónból származó vírussal szisztemikusan fertőzött *N. benthamiana* növényen, majd 10 egyed fiatal, vírusmentes *N. benthamiana* növényekre áthelyeztünk. Az átvitel eredményességét 3 hetes inkubációs idő után a szisztemikus tünetek megjelenésével, valamint a PolyT₂ és a Poty7941 primerekkel végzett RT-PCR analízissel vizsgáltuk.

2.3.8. A B1298 rövidebb CP szerkezetének vizsgálata

A származtatott B1298 CP jóslható harmadlagos szerkezetét számítógépes analízissel, a GCG Wisconsin programcsomag 10.0 verziója Plotstructure és Peptidestructure programjai segítségével vizsgáltuk.

2.3.9. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus szerológiai (Western blot) kimutathatóságának tesztelése

A PPV-B1298 izolátum szerológiai kimutathatóságának megbízhatóságát a PPV-SK68 (PPV-M típusú) és a PPV-Pd4 (PPV-Rec típusú) izolátumokhoz viszonyítva kereskedelmi forgalomból beszerezhető, különböző gyártóktól származó poliklonális és monoklonális ellenanyagok felhasználásával végzett Western blot során teszteltük.

A vizsgálathoz a következő kiteket alkalmaztuk: Bioreba PPV ELISA Kit, DSMZ PPV ELISA Kit, Real Durviz PPV ELISA Kit, Sanofi Planttest PPV ELISA Kit.

2.3.10. Kompetíciós kísérletek

A PPV-B1298 izolátum CP génjében történt természetes deléció lehetséges szelekciós előnyének vagy hátrányának vizsgálatához kompetíciós kísérleteket végeztünk, melyek során a vírus akkumulációját vizsgáltuk. *N. benthamiana* tesztnövényeket a B1298 rövidebb CP gént hordozó, mutáns vírussal és a teljes hosszúságú CP gént hordozó, vad típusú vírussal együttesen mechanikailag inokuláltunk. Két héttel az inokulációt követően a két vírussal együttesen fertőzött indikátor növényekből készített szövetnedvvel egészséges *N. benthamiana* növényeket fertőztünk. Ezt az első passzálást két hetes időközökkel még további 5 sorozatban végzett passzálás követte. Minden egyes passzálás alkalmával Western blot módszerrel – a Real Durviz 5B jelű, PPV-specifikus monoklonális ellenanyag felhasználásával – vizsgáltuk a vad típusú és a kiméra vírus akkumulációját.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Bulgáriai és hazai PPV-izolátumok molekuláris jellemzése

Munkánk során nukleotid és aminosav szinten 9 izolátumot, 5 Bulgáriából szilváról származó (PPV-Troy1, PPV-Troy2, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6), valamint 3 hazánkból kajsziról (PPV-Sóskút1, PPV-Gödöllő2, PPV-Szigetcsép1) és 1 hazánkból szilváról (PPV-B1298) származó izolátumot jellemeztünk.

A cDNS 3'NIB–CP–3'UTR genomi régiónak megfelelő szakaszát mind a 9 izolátum esetében megsokszoroztuk és megvizsgáltuk. A származtatott CP N-terminális végén a levéltetű-átvitelben nélkülözhetetlen szerepet játszó DAG motívum mindegyik szekvenciában jelen volt. A vizsgált izolátumok közül 7 (PPV-Troy1, PPV-Troy2, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6, PPV-Sóskút1, PPV-Szigetcsép1) származtatott CP-je azonos méretű, 330 aminosav hosszú volt, míg 2 hazai izolátum (PPV-B1298, PPV-Gödöllő2) esetében a CP rövidebbnek bizonyult. A PPV-B1298 szilváról izolált és a PPV-Gödöllő2 kajsziról származó izolátumok esetében a szekvencia analízis során a cDNS CP génnek megfelelő szakaszán kereteltolódást nem okozó deléció mutattunk ki. A PPV-B1298 izolátum CP génje 135 nukleotiddal, a PPV-Gödöllő2 izolátumé 33 bázissal volt rövidebb, mely 45, illetve 11 aminosav hiánynak felel meg a származtatott CP N-terminális részén.

A CP génnek (8577–9566. nt pozíció) megfelelő nukleotid és abból származó aminosav szekvenciák hasonlóság-, illetve filogenetikai vizsgálata alapján a 9 izolátum közül 6 (PPV-Troy1, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6, PPV-B1298, PPV-Gödöllő2) a PPV-Rec típusú izolátumokhoz, a fennmaradó 3 (PPV-Troy2, PPV-Sóskút1, PPV-Szigetcsép1) pedig a PPV-D csoportba tartozott. A rekombinációs esemény bizonyítékeként a 3'NIB–5'CP régió (8050–8902. nt pozíció) megfelelő nukleotid sorrend felhasználásával is filogenetikai analízist végeztünk, valamint a rekombináns PPV izolátumok genomjában korábban már azonosított 3' végi rekombinációs ponttól 5' (upstream) (8050–8449. nt pozíció), illetve 3' (downstream) (8450–8902. nt pozíció) irányban elhelyezkedő régióknak megfelelő nukleotid szekvenciákat külön-külön is elemeztük. A PPV-Troy1, a PPV-Troy4, a PPV-Troy5, a PPV-Troy6, a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumok – az elvártaknak megfelelően – más rekombináns izolátumokhoz hasonlóan a rekombinációs pontot megelőző szekvencia alapján a filogenetikai törzsfán a PPV-D izolátumokkal, míg a rekombinációs pontot követő nukleotid sorrendet tekintve a PPV-M csoport tagjaival egy fő ágon helyezkedtek el. Ez utóbbi régió alapján a PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumok a vizsgált rekombináns izolátumoktól elkülönülő mellékágon csoportosultak. A PPV-Troy2, a PPV-Sóskút1 és a PPV-Szigetcsép1 izolátumok a rekombinációs pontot megelőző és azt követő nukleotid sorrendet tekintve is a törzsfán PPV-D izolátumok által képviselt fő ágon helyezkedtek el, de a PPV-Sóskút1 és a PPV-Szigetcsép1 izolátumok a rekombinációs ponttól 5' irányban lévő

szekvencia alapján a PPV-Rec izolátumok alkotta mellékágon, a rekombináns és a tipikus PPV-D izolátumok között, egy átmeneti pozícióban foglaltak helyet. A rekombinánsnak bizonyult izolátumok 3'NIB–5'CP (8466–8795. nt pozíció) régiójának megfelelő nukleotid sorrend, valamint a nemzetközi adatbázisokban hozzáférhető valamennyi PPV-Rec izolátum ugyanezen régiója felhasználásával készült filogenetikai törzsfán a PPV-Troy6 bolgár rekombináns izolátum – igaz csak alacsony bootstrap érték mellett – a többi Bulgáriából származó rekombináns izolátumtól elkülönülve helyezkedett el.

A 3'P3–6K₁–5'CI régió (2976–3696. nt pozíció) típusának meghatározása céljából 8 vizsgált izolátum (PPV-Troy1, PPV-Troy2, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6, PPV-Sóskút1, PPV-Gödöllő2, PPV-Szigetcsép1) esetében RT-PCR során ezt a régiót is felszaporítottuk. A PCR-termékeket olyan restriktív endonukleázokkal hasítottuk (*EcoRI*, illetve *DdeI*), melyek a vizsgált régióban D-típusú genomú izolátumokról (PPV-D és PPV-Rec izolátumok) készült cDNS-szakaszokat hasítják, az M-típusú szekvenciákról (PPV-M csoport tagjai) származókat azonban nem. A PPV-Troy6 és a PPV-Sóskút1 izolátumok esetében a D-típusú szekvencia-specifikus enzimekkel végzett restriktív analízis során atipikus mintázatot kaptunk. A 3'NIB–CP régió alapján rekombinánsnak bizonyult PPV-Troy6 izolátum ezen régiójáról készült cDNS-t csak az *EcoRI* hasította, a *DdeI* nem, míg a PPV-D csoportba tartozó PPV-Sóskút1 izolátumról készült PCR-terméket csak a *DdeI* vágta, az *EcoRI* nem. Ez az ellentmondás fakadhat egyrészt a restriktív helyeket érintő pontmutációkból, másrészt azonban, a PPV-D és a PPV-M csoportok közötti rekombinációs eseményre is utalhat. Ennek tisztázása érdekében a PCR-termékek nukleotid sorrendjét meghatároztuk, és a *DdeI*, illetve *EcoRI* hasító helyeket megvizsgáltuk. A szekvencia analízis során kimutattuk, hogy a hasító helyek hiánya ellenére is mindkét izolátum genomja a vizsgált régióban D-típusú. A felismerő helyek hiányát a hasító helyekben bekövetkezett pontmutációk okozták a D-típusú szekvenciákon és nem egy a régiót érintő rekombinációs esemény játszott abban szerepet. 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>GAATTT) változott meg.

A bulgáriai PPV-Troy6 izolátum további jellemzése céljából a vírusgenomról készült cDNS 3'HC-Pro–5'P3 (2387–2907. nt pozíció) régióinak megfelelő szakaszát is felszaporítottuk, mely a genom 5' végén elhelyezkedő rekombinációs pontot is magában foglalta. A vizsgált régió nukleotid sorrendje alapján készített filogenetikai törzsfán a PPV-Troy6 izolátum az adatbázisokból származó PPV-Rec típusú izolátumokkal csoportosult.

3.2. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus vizsgálata

A PPV-B1298 izolátum részletesebb jellemzése céljából, valamint annak igazolásaképpen, hogy a B1298 CP gén valóban rövidebb, és nem csak PCR-műtermékről van szó, a PPV-B1298 izolátum rövidebb CP génjének megfelelő cDNS-szakaszt beépítettük a pPPV-SK68 fertőzőképes klónba. A CP gén cseréje nem okozott változást az eredeti klón fertőzőképességében és a tünetek megjelenésében. A *N. benthamiana* tesztnövényeken a pPPV-SK68CPB1298 klónból származó vírus és az eredeti PPV-B1298 izolátum is hasonló erős tüneteket mutatott, mint a kontroll pPPV-SK68 klónból származó vírus.

A deléció nem befolyásolta a vírusrészecskék kialakulását vírusfertőzött *N. benthamiana* növényekben. A rövidebb CP gént hordozó kiméra vírus partikulumai, más PPV-izolátumokhoz hasonló morfológiai tulajdonságokkal rendelkeztek. A vírusrészecskék átlagos átmérője azonban kisebbnek bizonyult a teljes hosszúságú CP gént hordozó pPPV-SK68 klónból származó virionhoz képest.

A PPV-B1298 a természetes deléciós folyamatok következtében a teljes hosszúságú CP 13,64%-át, csupán az N-terminális részt vizsgálva annak 48,91%-át veszítette el, mely azonban nem okozott strukturális változást a CP szerkezetében.

A B1298 CP gént hordozó vírus levéltetvekkel *N. benthamiana* növényekre kísérletileg átvihető volt. A fogadó növényként használt *N. benthamiana* növényeken 3 hét elteltével a PPV fertőzésére jellemző szisztemikus mozaik tünetek jelentek meg. A tesztnövények az RT-PCR analízis során is fertőzöttek bizonyultak a vírussal.

A rövidebb CP génnel rendelkező vírust a felhasznált, kereskedelmi forgalomból beszerezhető PPV CP-specifikus ellenanyagok eltérő hatékonysággal ismerték fel. A Real Durviz AL jelű, PPV-M csoport-specifikus monoklonális ellenanyaga nem ismerte fel a PPV-B1298 izolátum CP-jét, és a Sanofi PPV-M és PPV-D csoport-specifikus, AP-konjugált monoklonális ellenanyag sem volt túl hatékony a PPV-B1298 rekombináns izolátum detektálásában. Ezzel ellentétben az 5B jelű, általános, PPV-specifikus monoklonális antitest a nem deléciós vírusokhoz hasonlóan igen hatékonyan felismerte a deléciós rekombináns PPV-B1298 izolátumot is.

A kompetíciós kísérletek eredményei azt mutatták, hogy ez a természetes deléció kompetitív előnyt jelent a vírus számára. A rövidebb CP gént hordozó vírus *N. benthamiana* növényeken nagyobb mértékű akkumulációra képes, mint a vad típusú vírus anélkül, hogy bármiféle változás történne a tünetek kifejeződésében.

3.3. Új tudományos eredmények

1. Elvégeztük 9 (5 bulgáriai és 4 hazai) 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 olyan PPV-Rec, illetve PPV-D típusú izolátumokat, melyek a 3'P3–6K₁–5'CI régiónak megfelelő cDNS-szakaszon konzervatív *DdeI*, illetve *EcoRI* hasító helyekben pontmutációval rendelkeznek. Eredményünk a 3'P3–6K₁–5'CI régiónak megfelelő cDNS *DdeI* és *EcoRI* restriktációs 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 (PPV-B1298 és PPV-Gödöllő2), meghatároztuk a deléciók pontos hosszát és helyét. A PPV-B1298 izolátum CP-je 45, a PPV-Gödöllő2 izolátumé 11 aminosavval rövidebbnek bizonyult az N-terminális részen. 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, levéltetűvel való átvihetőségét *N. benthamiana* növényeken nem befolyásolta és nem okozott változást a CP struktúrájában sem. A partikulumok átmérője azonban csökkent a teljes hosszúságú CP gént hordozó vad típusú virionhoz képest.
6. Meghatároztuk a rövidebb CP gént hordozó vírus szerológiai 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 természetes deléció hatását a vírus-akkumulációra. Kimutattuk, hogy a rövidebb CP gént hordozó vírus nagyobb mértékű akkumulációra képes, mint a vad típusú vírus *N. benthamiana* tesztnövényen.

4. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1. Bulgáriai és hazai PPV-izolátumok molekuláris jellemzése

A vírusgenom vizsgált régióinak (3'N1b-CP, 3'P3-6K₁-5'CI, 3'HC-Pro-5'P3) megfelelő, RT-PCR során felszaporított cDNS nukleotid és abból származtatott aminosav szekvenciák hasonlóság-, illetve filogenetikai vizsgálata, valamint a 3'P3-6K₁-5'CI régióról készült PCR-termékek RFLP analízise azt mutatja, hogy a jellemezni kívánt 9 izolátum közül 6 (PPV-Troy1, PPV-Troy4, PPV-Troy5, PPV-Troy6, PPV-B1298, PPV-Gödöllő2), a minták 2/3-a, a PPV-D és PPV-M csoportok közötti rekombináns izolátum. A fennmaradó 3 (PPV-Troy2, PPV-Sóskút1, PPV-Szigetcsép1) pedig a PPV-D csoport tagja. 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 relatív kis számú megvizsgált minta ellenére eredményeink alátámasztják azt az előzetes megfigyelést miszerint a rekombináns PPV-izolátumok Európában a PPV populációk jelentős hányadát képviselik (Glasa és mtsai, 2004).

A cDNS CP génnek megfelelő szakaszának szekvencia analízise során a jellemezni kívánt izolátumok közül 2 hazai rekombináns izolátum (PPV-B1298 és PPV-Gödöllő2) esetében kereteltolódást nem okozó deléció mutattunk ki. Ezidáig a szakirodalomból mindösszesen három, a CP régióban deléció hordozó természetes mutáns PPV-izolátum ismert (PPV-NAT, PPV-SH, PPV-KAZ) (Maiss és mtsai, 1989; Deborré és mtsai, 1995; Spiegel és mtsai, 2004). Mindhárom eddig jellemzett PPV-izolátumnál a deléció, a PPV-B1298 és PPV-Gödöllő2 izolátumokhoz hasonlóan, a CP N-terminális, hipervariábilis régiójában következett be, de mindegyik a PPV-B1298 izolátumban lévénél jóval rövidebb szakaszt érintett. Ismert, hogy PPV-NAT és PPV-SH izolátumok esetében a deléció következtében a levéltetű-átvitelben nélkülözhetetlen szerepet játszó DAG aminosav motívum is sérült. A PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumokban, a PPV-KAZ izolátumhoz hasonlóan, a deléció a motívumot nem érinti.

A jellemezni kívánt PPV-izolátumok 3'P3-6K₁-5'CI régiója típusának meghatározása érdekében az *EcoRI*, illetve a *DdeI* D-típusú szekvencia-specifikus endonukleázokkal végzett restriktív hasítás során a rekombinánsnak bizonyult PPV-Troy6 és a PPV-D csoportba tartozó PPV-Sóskút1 izolátumok esetében atipikus mintázatot kaptunk. Ezeket az izolátumokat csak az egyik enzim hasította. Kapott eredményeink azt jelzik, hogy a restriktív analízis a PPV-izolátumok csoportbeli hovatartozásának megbízható meghatározására csak korlátozottan alkalmazható. 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* restrikciós helyben pontmutációval rendelkező PPV-D, illetve PPV-Rec izolátumról eddig csak mi számoltunk be.

4.2. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus vizsgálata

A PPV-B1298 és a PPV-Gödöllő2 izolátumok esetében megfigyelt deléció a CP vírus-specifikus epitópokat tartalmazó N-terminális részén történt. 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 tesztnövényekben. Eredményünk összhangban van a dohány karcolatossá válással (*Tobacco etch virus*, TEV) 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).

A CP N-terminális részének a vírus mozgásában betöltött szerepe még nem kellő mértékben tisztázott. A különböző potyvírusokkal végzett deléciós és mutációs kísérletek ellentmondásos eredményeket adtak. A B1298 CP N-terminális régiójának közel fele hiányzik, mégis a vírus képes *in vivo* dohánynövényekben 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 domén 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 cukkini sárga mozaik vírus (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) esetében kimutatták (Kimalov és mtsai, 2004).

A növényi vírusok detektálására évtizedek óta szinte kivétel nélkül világszerte minden karantén laboratóriumban az ELISA-technika különböző formáit alkalmazzák. A módszer a vírus CP kimutatásán alapul. A vizsgálatok során általában a CP N-terminális része ellen készült ellenanyagokat alkalmaznak, így az N-terminális részt érintő deléciónak meghatározó szerepe lehet a vírus kimutathatóságában. A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírust az alkalmazott ellenanyagok eltérő hatékonysággal ismerték fel. A PPV-M típusú izolátumok specifikus azonosítására használt AL jelű monoklonális antitest nem volt alkalmas a PPV-B1298 izolátum detektálására. A PPV-B1298 egy rekombináns izolátum. Ismert, hogy a PPV-Rec izolátumok CP-je M-típusú, mivel a rekombinációs pont a CP géntől 5' irányban, az NIB gén 3' végén található (Glasa és mtsai, 2004). Bár a rekombináció következtében változások történtek a CP aminosav sorrendjében. Az antitest érzéketlensége azonban nem magyarázható a CP aminosav szekvenciájában bekövetkezett változásokkal, mert 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 szakaszán helyezkedik el. Így egy vírus-specifikus epitópokat tartalmazó, erősen immunogén régiót érintő deléció, még a növényi vírusok kimutatására szélkörűen használt és jól jellemzett diagnosztikai reagensek alkalmazása esetén is megakadályozhatja a megbízható detektálást, és a vizsgálatok során vírusmentesnek talált szaporítóanyagok valójában vírushordozók lehetnek.

A B1298 rövidebb CP gént hordozó vírus *N. benthamiana* növényekben a teljes hosszúságú CP gént hordozó vírushoz képest nagyobb mértékű akkumulációra képes, szelekciós előnnyel rendelkezik. 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.

5. FELHASZNÁLT IRODALOM

- 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.
- Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O. (1984): A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX. *Nucleic Acids Research*, 12 (1/1): 387–395. p.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A. (2000): EMBOSS: The European Molecular Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16 (6): 276–277. p.
- 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.
- 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.
- 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.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

1. FOLYÓIRATCIKKEK

IF-es folyóiratcikkek

Szathmáry, E., Novák Nádudvari, J., Szabó, L., Tóbiás, I., Balázs, E., Palkovics, L. (2009): Characterization of a natural Plum pox virus isolate bearing truncated coat protein. *Archives of Virology*, 154: 141–145. p. IF:1,839 (2007).

Szathmáry, E., Tóbiás, I., Dragoyski, K., Palkovics, L. (2009): Partial molecular characterization of an unusual, recombinant Plum pox virus isolate from Bulgaria. *Acta Virologica*, 53 (1): 65–67. p. IF: 0,56 (2007).

Nem IF-es folyóiratcikkek

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.

Szathmáry E., Tóbiás I., Palkovics L. (2007): Bulgáriai szilva himlő vírus (*Plum pox virus*) izolátumok jellemzése. *Növényvédelem*, 43 (12): 583–589. p.

Egyéb értékelhető cikkek

Palkovics L., **Szathmáry E.** (2006): Szilva himlő vírus – a csonthéjasok legfontosabb víruseredetű kórokozója. *Agroinform*, 15 (10): 16. p.

2. KONFERENCIA KIADVÁNYOK

Magyar nyelvű összefoglalók

Szathmáry E., Tóbiás I., Palkovics L. (2004): Egy rövidebb köpenyfehérjét tartalmazó természetes szilvahimlő vírus (*Plum pox virus*) izolátum jellemzése. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium, 2004. október 7-9., Keszthely, Előadás kivonatok, 115–116. p.

Szathmáry E., Nádudvariné Novák J., Tóbiás I., Palkovics L. (2005): Egy rekombináns és köpenyfehérjében deléciót hordozó szilva himlő vírus izolátum jellemzése. 51. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2005. február 22-23., Budapest, Növényvédelmi Tudományos Napok 2005, 36. p.

Szathmáry E., Tóbiás I., Palkovics L. (2007): Egy különös, Bulgáriából származó rekombináns szilva himlő vírus (*Plum pox virus*) izolátum jellemzése. 53. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2007. február 20-21., Budapest, Növényvédelmi Tudományos Napok 2007, 27. p.

Szathmáry E., Palkovics L. (2009): Magyarországi, kajsziról származó szilva himlő vírus (*Plum pox virus*) izolátumok jellemzése. 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2009. február 23-24., Budapest, Növényvédelmi Tudományos Napok 2009, 34. p.

Nemzetközi konferencia full paper

Szathmáry, E., Tóbiás, I., Palkovics, L. (2006): Analysis of some recombinant *Plum pox virus* (PPV) isolates from Bulgaria, the country where PPV was first recorded. 4th International Plant Protection Symposium at Debrecen University (11th Trans-Tisza Plant Protection Forum), Recent developments of IPM, 18-19 October, 2006, Debrecen, Hungary, Proceedings, 70–77. p.

Nemzetközi konferencia összefoglalók

Palkovics, L., Novák Nádudvari, J., **Szathmáry, E.**, Tóbiás, I., Balázs, E. (2004): Characterization of an altered isolate of *Plum pox virus* containing shorter coat protein gene. European Meeting '04 on Plum Pox, 1-4 September, 2004, Rogów-Skierniewice, Poland, Programme, Book of Abstracts and List of Participants, 20. p.

Palkovics, L., Nádudvari Novák, J., **Szathmáry, E.**, Balázs, E. (2004): *Plum pox virus*, the devastating disease agent in the European stone fruit orchards. 6th Annual Meeting of Research Centre for Plant Growth and Development, 18-19 November, 2004, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, South Africa, 39–40. p.

Palkovics, L., Novák Nádudvari, J., Szabó, L., **Szathmáry, E.**, Tóbiás, I., Balázs, E. (2005): Characterization of a *Plum pox virus* isolate with truncated coat protein. Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2005, XIII International Congress of Virology, 23-27 July, 2005, San Francisco, California, USA, Abstracts of the International Congress of Virology, V-486.

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

1. FOLYÓIRATCIKKEK

Nem IF-es folyóiratcikkek

Karsa, D., Haltrich, A., **Szathmáry, E.** (2004): Two new species in the Hungarian fauna: *Stomaphis mordvilkoii* Hille Ris Lambers and *Stomaphis juglandis* Petrovič (Lachnidae, Homoptera). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 39 (4): 405–407. p.

Szathmáry, E., Haltrich, A., Tartally, A. (2005): Data to the knowledge of the lachnid fauna (*Homoptera: Lachnidae*) of Hungary. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 40 (3-4): 403–408. p.

Szathmáry E., Salamon P., Palkovics L. (2008): Egy hazai tarlórépa mozaik vírus (Turnip mosaic virus, TuMV) izolátum molekuláris jellemzése. *Növényvédelem*, 44 (11): 553–557. p.

2. KONFERENCIA KIADVÁNYOK

Magyar nyelvű full paper

Szathmáry E. (2003): A kéregtetvek (*Lachnidae, Homoptera*) hazai kutatottsága és a jövő tennivalói. Magyar Biológiai Társaság, III. Kárpát-medencei Biológiai Szimpózium, 2003. október 28-30., Budapest, Előadások összefoglalói, 167–171. p.

Magyar nyelvű összefoglalók

Szathmáry E. (2003): Magyarországi kéregtetvek (*Homoptera, Lachnidae*) elterjedésének és populációdinamikájának vizsgálata. 49. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2003. február 25-26., Budapest, Növényvédelmi Tudományos Napok 2003, 74. p.

Szathmáry E., Haltrich A. (2003): A magyarországi fásszárú növényeken élő kéregtetvek (*Lachnidae, Homoptera*) revíziója. [Revision of Lachnidae species (*Lachnidae, Homoptera*) feeding on woody plants in Hungary.] Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak, 2003. november 6-7., Budapest, Összefoglalók kertészettudomány, 452–453. p.

Salamon P., **Szathmáry E.**, Paksi A. M., Palkovics L. (2008): Potyvirus járvány görögdinnyén (*Citrullus lanatus*), sárgadinnyén (*Cucumis melon*) és kiwanon (*Cucumis metuliferus*): A *Watermelon mosaic virus* (WMV) újra előtérben? 54. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2008. február 27-28., Budapest, Növényvédelmi Tudományos Napok 2008, 44. p.

Nemzetközi konferencia összefoglalók

Szathmáry, E., Tóbiás, I., Palkovics, L., (2008): Only one amino acid change responsible for an interspecific hybrid potyvirus viability. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2008, XIV International Congress of Virology, 10-15 August, 2008, Istanbul, Turkey, Abstract Book, VP-321.

Szathmáry, E., Salamon, P., Paksy A. M., Palkovics, L., (2008): Characterization of some *Watermelon mosaic virus* (WMV) isolates originated from Hungary. 3rd Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (IWGLVV), 20-23 August, 2008, Ljubjana, Slovenia, Book of Abstract, 69. p.