

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A KRIPTIKUS ÉS ENDORNAVÍRUSOK ELTERJEDTSÉGE,
PERZISZTENCIÁJA ÉS MOLEKULÁRIS JELLEMZÉSE**

SZEGŐ ANITA

Témavezető: Dr. Lukács Noémi, PhD

Budapesti Corvinus Egyetem
Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék

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. Lukács Noémi
egyetemi tanár, PhD
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Növényélettan és Növényi Biokémia 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. Lukács Noémi
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2009. december 8-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Balázs Ervin, MHAS

Tagjai

Palkovics László, DSc

Kucsera Judit, PhD

Gáborjányi Richard, DSc

Opponensek

Barna Balázs, DSc

Maráz Anna, CSc

Titkár

Halász Krisztián, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. BEVEZETÉS.....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. <i>A Partitiviridae család vírusai</i>	<i>6</i>
2.1.1. A kriptikus vírusok rendszertana és molekuláris jellemzői	6
2.1.2. A <i>Beta</i> nemzetség kriptikus vírusai	11
2.1.3. <i>Carnation cryptic virus</i> jellemzése	12
2.1.4. A <i>Partivirus</i> nemzetség néhány tagjának jellemzése.....	12
2.2. <i>Az endornavírusok rendszertana és molekuláris jellemzői.....</i>	<i>13</i>
2.2.1. Endornavírusok, enigmatikus dsRNS-ek.....	13
2.2.2. Az endornavírusok törzsfajlódése.....	16
3. CÉLKITŰZÉS.....	21
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
4.1. <i>Növényanyag</i>	<i>23</i>
4.1.1. Paprika.....	23
4.1.2. Cukorrépa	23
4.1.3. Szegfű.....	24
4.2. <i>Reagensek.....</i>	<i>25</i>
4.3. <i>Nukleinsav izolálás.....</i>	<i>25</i>
4.3.1. Össznukleinsav izolálás	25
4.3.2. Teljes RNS tartalom izolálása	25
4.3.3. dsRNS-izolálás CF-11 oszlopkromatográfiával	25
4.4. <i>Nukleinsavak elválasztása.....</i>	<i>26</i>
4.4.1. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE).....	26
4.4.2. dsRNS-immunoblot	26
4.5. <i>RT-PCR</i>	<i>27</i>
4.5.1. cDNS szintézis és klónozás	27
4.5.2. Szekvencaanalízis.....	29
4.5.3. Filogramok készítése	29
4.6. <i>Virion izolálás</i>	<i>30</i>
5. EREDMÉNYEK.....	32
5.1. <i>Kriptikus vírusok mikroszaporított és in vitro fenntartott kultúrákban</i>	<i>32</i>
5.1.1. BCV-vírusok genomi dsRNS-einek azonosítása <i>in vitro</i> tenyészetekben	32
5.1.2. <i>Carnation cryptic virus</i> (CarCV) azonosítása szegfű <i>in vitro</i> tenyészetekben	34
5.1.3. CarCV eliminálását célzó kísérletek szegfű <i>in vitro</i> tenyészetekben.....	36
5.2. <i>Putatív endogén dsRNS-vírusok elterjedésének vizsgálata Capsicum fajokban.....</i>	<i>37</i>
5.3. <i>Kriptikus vírusok előfordulása a jelenleg termesztett cukorrépa- fajtákban.....</i>	<i>44</i>
5.4. <i>Beta vulgaris cv. Mars növényekből izolált dsRNS-k jellemzése.....</i>	<i>45</i>
5.5. <i>BCV1 és BCV2 virionok elektronmikroszkópos vizsgálata.....</i>	<i>47</i>
5.6. <i>Beet cryptic virus 1 (BCV1) molekuláris jellemzése.....</i>	<i>47</i>
5.6.1. BCV1 dsRNS1 (RdRp) szekvencia meghatározása.....	47
5.6.2. A putatív RdRp jellemzése	51
5.6.3. BCV1 dsRNS2 (CP) szekvencia meghatározása	55

5.6.4. A putatív köpenyfehérje (CP) jellemzése	58
5.6.4.1. <i>In silico</i> analízis	58
5.6.4.2. BCV1 köpenyfehérje tömegspektrometriás analízise	61
5.6.5. BCV1 dsRNS1 és dsRNS2 5' és 3' nem transzlálódó régióinak analízise	63
5.6.5.1. Az 5' nem transzlálódó régiók	63
5.6.5.2. A 3' nem transzlálódó régió.....	64
5.7. <i>Beet cryptic virus 2</i> molekuláris jellemzése.....	65
5.7.1. BCV2 dsRNS1 (CP1) szekvencia meghatározása	65
5.7.2. BCV2 dsRNS3 (CP2) szekvencia meghatározása	67
5.7.3. A putatív virális köpenyfehérjék (CP1 és CP2) jellemzése	69
5.7.4. BCV2 dsRNS2 (RdRp) szekvencia meghatározása.....	71
5.7.5. Putatív RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp) jellemzése.....	73
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	77
6.1. A kriptikus- és endornavírusok elterjedése és kapcsolatuk a gazdanö-vénnyel.....	77
6.1.1. A kriptikus- és endornavírusok fajfüggő előfordulás <i>Capsicum</i> fajokban.....	77
6.1.2. A <i>Beet cryptic virus</i> -ok megváltozott gyakorisága cukorrépában	79
6.1.3. A kriptikus vírusok <i>in vitro</i> fennmaradása	80
6.2. <i>Beet cryptic virus 1 (BCV1)</i> molekuláris jellemzése.....	81
6.3. <i>Beet cryptic virus 2 (BCV2)</i> molekuláris jellemzése.....	83
6.4. A kriptikus vírusok eredete és lehetséges szerepe a növényben.....	85
6.5. Kitekintés.....	86
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	88
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	90
9. SUMMARY	93
10. MELLÉKLETEK	96
M1. Irodalomjegyzék.....	96
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	104

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A	Adenin
AA	Aminosav
ACD-PV	<i>Amasya cherry disease-associated partitivirus</i>
BCV1	<i>Beet cryptic virus 1</i>
BCV2	<i>Beet cryptic virus 2</i>
BCV3	<i>Beet cryptic virus 3</i>
bp	Bázispár
C	Citozin
CarCV	<i>Carnation cryptic virus</i>
CCRS-PV	<i>Cherry chlorotic rusty spot-associated partitivirus</i>
cDNS	Komplementer (complenter) DNS
contig	Contiguous, olyan folyamatos DNS szekvenciát jelöl, amit sok, kisebb-nagyobb mértékben átfedő, klón egymáshoz illesztésével kapunk.
CThTV	<i>Curvularia thermal tolerance virus</i>
CP	Köpenyfehérje (coat protein)
dsRNS	Duplaszálú (double-stranded) RNS
G	Guanin
kDa	Kilodalton
kbp	Kilobázispár
MW	Molekulatömeg (Molecular Weight)
nt	Nukleotid
ORF	Nyílt leolvasási keret (Open Reading Frame)
PAA	Poliakrilamid
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis
PCR	Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
RdRp	RNS-függő RNS-polimeráz (RNA-dependent RNA polymerase)
RsCV1	<i>Raphanus sativus cryptic virus 1</i>
RT	Reverz-transzkripció
ssRNS	Egyszálú (single-stranded) RNS
U	Uracil
UTR	Nem transzlálódó régió (Untranslated region)
VCV	<i>Vicia cryptic virus</i>
WCCV1	<i>White clover cryptic virus 1</i>

1. BEVEZETÉS

A víruskutatás hagyományosan olyan vírusok vizsgálatára koncentrált, amelyek a kultúrnövényekben szembeötlő tüneteket és termésveszteségeket okoztak. Napjainkra világossá vált, hogy a növényekben számos endofita mikroorganizmus fordul elő, és a gazdában tünetmentesen élősködő vírusok elterjedtsége is alighanem messze meghaladja a tüneteket kiváltó fertőzések gyakoriságát. A legújabb kísérleti eredmények az mutatják, hogy nemcsak egyes endofitáknak, hanem a vírusoknak is lehet a növény számára előnyös, pl. a stressztűrést fokozó hatásai (Xu és mtsai, 2008). Kísérleteinkben a vírusok két, a növényvilágban rendkívül elterjedt, de tüneteket nem okozó és mindmáig alig karakterizált csoportját vizsgáltuk: a kriptikus vírusokat és az endornavírusokat.

A kriptikus- és endornavírusoknak több olyan különleges tulajdonságuk van (pollennel és maggal terjednek, nem okoznak tüneteket, hagyományos virológiai módszerekkel és oltással nem vihetők át, stb.) ami vizsgálatukat rendkívül megnehezíti (Boccardo és mtsai., 1987; Fukuhara és mtsai., 2006). E tulajdonságok és a jellegzetesen alacsony víruskoncentráció miatt a gazdanövényekben történő kimutatásuk nehézkes. Jelenleg még csak nem is becsülhető, hányféle különböző kriptikus vírus fordul elő a természetben, ezért a kutatók elsődleges feladata mindenképpen e vírusok elterjedtségének feltárása. A kriptikus- és endornavírusok detektálására hatékony megoldást jelenthet a dsRNS-specifikus monoklonális ellenanyag és a dsRNS-immunoblot technika alkalmazása, amivel a vírus genomra jellemző hosszúságú dsRNS kimutatása minden specifikus szekvencia információ hiányában is lehetséges (Lukács, 1994).

A kriptikus- és endornavírus genom teljes, nukleotid szintű leírása a molekuláris jellemzés szerves részét képezi. A genom által kódolt fehérjék funkciójának meghatározása segíthet abban, hogy megértsük a vírusok terjedését, valamint a vírusok és a gazdaszervezetek között kialakuló kölcsönhatásokat. A virális genommal végzett összehasonlító kísérletekkel pedig tisztább és átfogóbb képet kaphatunk a vírus családok/nemzetségek rokonsági köreiről és evolúciós eredetükről (Ghabrial, 1998). Általánosan elfogadott vélemény, hogy a *Partitiviridae* család jelenlegi, morfológia jegyeken alapuló rendszertana felülvizsgálatra szorul. A revízió legfőbb akadályát a szekvencia adatok korlátozott hozzáférhetősége jelenti, így minden egyes közzétett szekvenciának fontos szerepe van a tudományosan megalapozott törzsfa kialakításában.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A növényi vírusok döntő többsége RNS-vírus (Dodds és mtsai., 1984). Genomjuk alapján a növényi RNS-vírusok három csoportba sorolhatók: a duplaszálú-RNS (dsRNS), a pozitív egyszálú-RNS ((+)ssRNS) és a negatív egyszálú-RNS ((-)ssRNS) vírusok csoportjába. A (+)ssRNS vírusok genomi RNS-e közvetlenül mRNS-ként funkcionálhat, míg a másik két esetben az mRNS-nek újonnan kell szintetizálnia. Pozitív egyszálú RNS-vírusok esetében is keletkeznek dsRNS-ek a vírusreplikáció során, és egyes szatellit RNS-ek duplaszálú formái (pl. *Cucumber mosaic virus satellite RNA* és *Peanut stunt virus satellite RNA*) is igen magas koncentrációt érhetnek el.

A kettőszálú RNS-vírusok rendkívül elterjedtek a természetben, hiszen a baktériumoktól kezdve, a gombákon át, a növény- és állatvilágig mindenhol előfordulnak (1. táblázat). A dsRNS vírusokat tulajdonságaik alapján hét családba, valamint két, családot nem alkotó nemzetségbe sorolták, melyekbe számos egészségügyileg, állatorvosilag és mezőgazdaságilag fontos vírus tartozik (Mertens, 2004). Többségük ikozaéderez kapszid struktúrát képez, és genomjuk általában szegmentált. Csoportunk olyan növényekben előforduló dsRNS-vírusok vizsgálatával foglalkozik, amelyek nem idéznek elő tüneteket, és egyes növényfajok/fajták egyedeiben feltehetőleg azok egész élete folyamán fennmaradnak és replikálódnak. Ezek közé tartoznak a *Partitiviridae* családba sorolt, szegmentált genommal rendelkező kriptikus vírusok (Ghabrial és mtsai., 2005), illetőleg az *Endornavirus* nemzetségbe tartozó, egyetlen, 14-17 kbp hosszúságú genomi dsRNS-sel rendelkező endornavírusok (Fukuhara és mtsai., 2006).

1. táblázat: dsRNS-vírus családok és nemzetségek

Család / nemzetség	Genom szegmensek száma	Vírus partikulum típusa	Gazda
<i>Bimaviridae</i>	2	60 nm, izometrikus	hal, rovar, madár, puhatestű
<i>Chrysoviridae</i>	4	30–40 nm, izometrikus	gomba
<i>Cystoviridae</i>	3	85 nm, izometrikus, hármas fehérjeburok, lipid burok	baktérium
<i>Hypoviridae</i>	1	nem képez viriont	gomba
<i>Partitiviridae</i> **	2 vagy 3	30–40 nm, izometrikus	gomba és növény
<i>Reoviridae</i>	10, 11 vagy 12	70–90 nm, izometrikus kettős fehérjeburok	növény, gomba, héjasállatok, magasabb rendű állatok
<i>Totiviridae</i>	1	30–40 nm, izometrikus	gomba
<i>Endornavirus</i> (nemzetség)*	1	nem képez viriont	növény, gomba
<i>Varicosavirus</i> (nemzetség)	2	18 × 320–360 nm, pálca alakú	növény

(Mertens, 2004; *Fukuhara és mtsai., 2006; **Tzanetakis és mtsai., 2008 nyomán)

2.1. A *Partitiviridae* család vírusai

2.1.1. A kriptikus vírusok rendszertana és molekuláris jellemzői

A növényi vírusok egyik elterjedt, de mindmáig alig karakterizált csoportját kriptikus vírusoknak nevezték el. Elnevezésük onnan ered, hogy fertőzött növényben nem okoznak tüneteket, ezért jelenlétük rejtve marad és felfedezésük általában a véletlennek köszönhető. Patogén vírusok vagy ismeretlen kórokozók után folytatott szisztematikus kutatások során tűntek fel a jellegzetes, 32-34 nm átmérőjű izometrikus vírusrészecskék, ill. a két vagy három, egyenként 1-3 kbp hosszúságú genomi dsRNS-szegmensek. Ezek a vírusok azért keltették fel az érdeklődésünket, mert a vírusperzisztenciát olyan tökélyre vitték, hogy a gazdaszervezetben, annak teljes életciklusa során fennmaradnak és hatékonyan kerülnek át az utódnemzedékekbe is, de tüneteket nem váltanak ki, és feltehetőleg termésveszteségeket sem okoznak. Ezért a szigorú értelemben vett vírusdefiníciónak (Hull, 2002) tulajdonképpen nem is felelnek meg, hiszen nem ismerünk olyan organizmust, amelyben megbetegedést okoznának.

A növényi kriptikus vírusokat a *Partitiviridae* családba, azon belül az *Alphacryptovirus* és a *Betacryptovirus* nemzetségbe soroljuk (Ghabrial és mtsai., 2005). A család harmadik nemzetségébe, a *Partitivirus* nemzetségbe kizárólag gombavírusok tartoznak. Ismeretes, hogy a kriptovírusok egyes növényfajokban, így számos mezőgazdasági és kertészeti növényben rendkívül elterjedtek, s például cukorrépánál, lóherénél, mángoldnál, céklánál, reteknel, szegfűnél és lucernánál az adott faj/fajta szinte minden egyedében kimutathatók (Boccardo és mtsai., 1987). Egy gazdanövényben egyidejűleg több kriptikus vírus is jelen lehet. Ilyen együttélésre találtak példát a cukorrépánál, ahol háromféle kriptikus vírus (*Beet cryptic virus 1, -2 és -3*), a fehérherében, ahol szintén három (*White clover cryptic virus 1-3*) és a sárgarépában, ahol öt (*Carrot cryptic virus 1-5*) kriptikus vírus is előfordulhat egyszerre (Ghabrial és mtsai., 2005). Ezek a vírusok genomi szegmenseik méretén túl, a szerológiaiilag különböző köpenyfehérjéjük alapján is megkülönböztethetők egymástól.

A kriptovírusokról - gyakoriságuk ellenére - keveset tudunk. A klasszikus vírusátviteli módszerek nem bizonyultak eredményesnek, tehát mesterséges fertőzés vagy teszt növényeken való vizsgálat mindmáig nem lehetséges. Az átvitelük átoltással sem valósítható meg, ami arra enged következtetni, hogy a kriptikus vírusok nem rendelkeznek a sejtközötti transzportot lehetővé tevő transzportfehérjével. Transzmissziójuk jelenlegi ismereteink szerint maggal és pollennel lehetséges. A gazdanövényben alacsony, $\leq 1 \mu\text{g/g}$ levélszövet koncentrációban fordulnak elő (Boccardo és mtsai., 1987). A felsorolt tulajdonságok a kriptovírusok kutatását

rendkívül megnehezítik, és jelenleg teljesen lehetetlen megbecsülni az élővilágban előforduló különböző kriptikus vírusfajok számát.

Bár koncentrációjuk alacsony a növényben, eliminációjuk korántsem egyszerű. Korábbi kísérletekben több kutatócsoport is megpróbálkozott azzal, hogy a kriptikus vírusokat eliminálja a növényekből. Ezek a kísérletek egyes kivételes esetekben valószínűleg sikerrel jártak, de az akkoriban rendelkezésre álló módszerek alacsony érzékenysége miatt nehéz megállapítani, hogy a negatívnak vélt növényekben csak a víruskoncentráció csökkent a kimutathatósági határ alá, vagy véglegesen vírusmentesek maradtak (Stanarius és mtsai., 1989). Általánosságban azt kell megállapítanunk, hogy a kriptikus vírusok kiválóan alkalmazkodtak a gazdanövényhez, és az eliminálásukra irányuló eljárások általában sikertelenek maradtak.

A kriptovírusok genomja szegmentált, és két vagy három, egyenként 1-3 kbp hosszúságú genomi dsRNS-szegmens alkotja. Korábban néhány publikáció utalt arra, hogy a genomot felépítő szegmensek között előfordulhatnak szatellit RNS-ek vagy értelmetlen szekvenciákat tartalmazó defektív dsRNS-ek is (Chen és mtsai., 2006a). A legújabb irodalmi adatok és a következő fejezetekben ismertetett saját eredményeink ennek a feltevésnek ellentmondanak, és azt valószínűsítik, hogy bizonyos kriptovírusoknál a genom a virális RdRp-t kódoló szegmens mellett nem egy, hanem két köpenyfehérjét kódoló szegmenssel rendelkezik (Boccardo és Candresse, 2005a és b; Salem és mtsai., 2008). Fontosnak tartom megjegyezni azt is, hogy eddig még egyetlen kriptikus vírus esetében sem határozták meg közvetlenül, fizikai vagy proteinkémiai módszerekkel a virionfehérjék teljes vagy részleges szekvenciáját, azaz nem nyertek közvetlen bizonyítékot arról, hogy a dsRNS genom adott szegmensén kódolt szekvencia megfeleltethető a virion köpenyfehérjéjének. Az RdRp és a köpenyfehérje mellett más kódolt fehérjét eddig nem azonosítottak, de alaposabb vizsgálatok még fényt deríthetnek további fehérjék jelenlétére is, ugyanis a vírusok esetében nem szokványos a kódoló kapacitás ilyen kevéssé hatékony kihasználása (Hull, 2002).

Az első részleges kriptovírus szekvenciát, a *Beet cryptic virus 3*-t (BCV3) - amely kutatási témánk szempontjából is fontos - 1993-ban publikálták (Xie és mtsai., 1993). A téma egy évtizedes mellőzését követően az elmúlt néhány évben több kriptikus vírus teljes szekvenciáját is nyilvánosságra hozták: a *White clover cryptic virus 1*-t (Boccardo és Candresse, 2005a és b) 2005-ben, a *Raphanus sativus cryptic virus 1*-t és -2-t 2006-ban (Chen és mtsai., 2006a és b), a *Vicia cryptic virus*-t (Blawid és mtsai., 2007) 2007-ben, a *Fragaria chiloensis cryptic virus*-t (Tzanetakis és mtsai., 2008), a *Rosa multiflora cryptic virus*-t (Salem és mtsai., 2008) pedig 2008-ban. Korábban főként bipartita genomokat azonosítottak, de a *Raphanus sativus*

cryptic virus 2, a *Fragaria chiloensis cryptic virus* és a *Rosa multiflora cryptic virus* esetében a genom három szegmensből áll. Ezeknél a kriptovírusoknál is azt feltételezik, hogy a dsRNS-ek monocisztronosak, a genomjukat az RdRp-t kódoló szegmens mellett két köpenyfehérjét kódoló dsRNS alkotja (Chen és mtsai., 2006a, Tzanetakis és mtsai., 2008; Salem és mtsai., 2008). Érdekes, hogy az irodalomban főként zárvatermő növényeket vizsgáltak, és a nyitvatermő fajokra csak néhány kísérlet irányult. Flachmann és munkatársai (1990) jegenyefenyőben és erdei fenyőben azonosítottak putatív kriptovírusokat, Veliceasa és munkatársai (2005) pedig meghatározták az erdei fenyőből izolált vírus (*Pinus sylvestris partitivirus*) RdRp-jének parciális szekvenciáját, ami a növényi kriptikus vírusokkal mutat hasonlóságot. Más putatív kriptikus vírusok vizsgálata pedig meglepő eredményt hozott: A mikulásvirágban (*Euphorbia pulcherrima*) előforduló *Poinsettia cryptic virus* részleges szekvenciájának összehasonlításakor azt találták, hogy ez a vírus a polemovírusokkal és a sobemovírusokkal rokon, így ezt a vírust már nem sorolják a kriptikus vírusok közé (Siepen és mtsai., 2005).

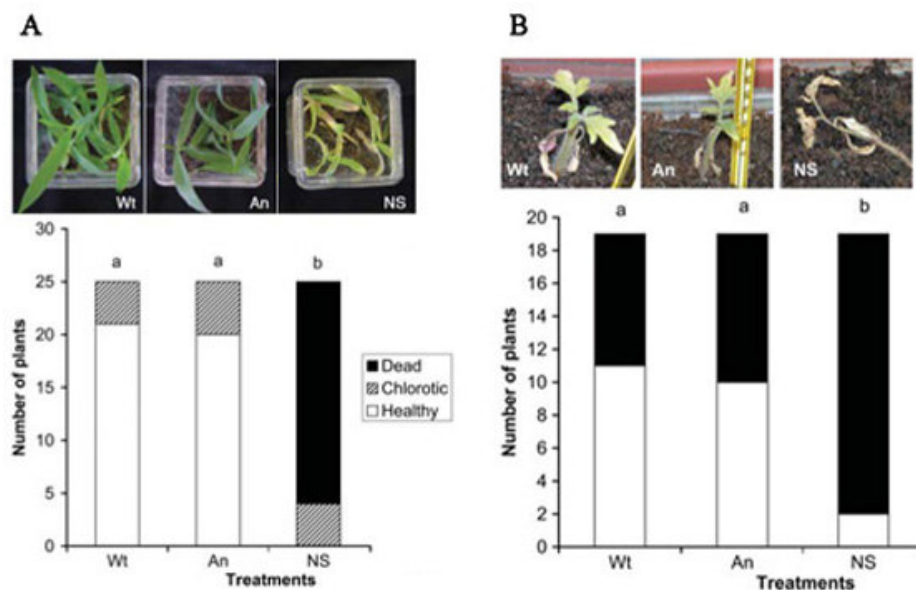
A kriptikus növényi vírusok eredetéről összehasonlító szekvencia vizsgálatokból nyerhetünk felvilágosítást. Korábbi, egyetlen kriptikus vírus RdRp-jének részleges szekvenciájára építő analízisek alapján azt a hipotézist állították fel, hogy a kriptikus vírusok a gazdanövényt fertőző endofita gombákból származhatnak, vagy fordítva, a gombák a gazdanövényből vehettek fel az infekció során olyan vírusokat, illetve genom szakaszokat, amelyek a gombákban is képesek replikálódni (Oh és Hillman, 1995). Az újabban publikált szekvenciaadatok is egyértelműen ezt a hipotézist támasztják alá. Ma már tudjuk, hogy a kriptovírusok kivétel nélkül viszonylag nagy hasonlóságot mutatnak a *Partitiviridae* családba tartozó gombavírusokhoz, és gyakran ez a hasonlóság jóval nagyobb, mint a család növényi vírusaihoz való hasonlósága, így van ez pl. a *Vicia cryptic virus* vagy a *Raphanus sativus cryptic virus 1* esetében is (Blawid és mtsai., 2007; Chen és mtsai., 2006b). Az egyszálú növényi RNS-vírusokra azonban kevésbé hasonlítanak. Az összehasonlító szekvencia analízisek eredménye azt valószínűsíti, hogy a kriptikus növényi vírusok és bizonyos gombavírusok közötti hasonlóság inkább horizontális géntranszfer, mint konvergens evolúció következménye lehet, bár eddig még nem sikerült ilyen gombavektort kellő tudományos bizonyossággal azonosítani (Salem és mtsai., 2008).

Ezt a feltételezést látszanak alátámasztani egy ukrán kutatócsoport 2005-ben, ukrán és orosz nyelven publikált eredményei. A kutatók, állításuk szerint, egy cukorrépat fertőző endofita gombából, a *Helicobasidium purpureum*-ből klónoztak egy 486 nt hosszúságú dsRNS-szakaszt, amit a *Partitiviridae* családhoz mutatott hasonlósága miatt *Helicobasidium*

purpureum partitivirus-nak nevezték el (Melnychuk és Spyridonov, 2005). Ez a szekvencia a BCV1 RdRp csoportunkban meghatározott szekvenciájának megfelelő szakaszával szinte teljesen azonos volt. A kriptikus vírusokra jellemző morfológiájú virionokat a cukorrépa levelekből izolált endofita gombákban is sikerült kimutatniuk az ukrán kutatóknak, és PCR-rel a részleges RdRp szekvenciát amplifikálni tudták a gombákban (Melnychuk és mtsai., 2005). Az eddig publikált eredmények nem képeznek egy tudományosan hiánytalanul meggyőző bizonyítási láncolatot, ha azonban a későbbiekben megerősítést nyernek, mindenképp levonható lesz belőlük az a következtetés, hogy a növényi kriptovírusok mind gombákban, mind növényben képesek fennmaradni. Ez esetben azonnal felmerül a kérdés, hogy vajon nem terjedhetnek-e mégis ezek a vírusok gombavektorok segítségével horizontálisan, és további indikációt nyerünk a partitivirusok közös eredetéről.

A kriptikus vírusok gazdaszervezettel való viszonya sem tisztázott még. Nem tudni, hogy származik-e valamilyen előnye a növénynek ezen dsRNS-vírusok jelenlétéből, betölt-e valamilyen funkciót a vírus a sejten belül, vagy csupán parazitálja azt. Nemrégiben japán kutatók egy olyan eredményt publikáltak, melynek alapján feltételezhető, hogy a kriptikus vírusok jelenlétéből a növény profitálhat. Vizsgálataik során a *Trifolium repens* cDNS könyvtárában egy olyan a növényi kromoszómáról átíródó fehérjét, a *TrEnodDRI*-t találtak, amely a gyökérgümők nodulációs mechanizmusában vesz részt. Ennek a fehérjének a szekvenciája teljesen azonos volt a WCCV1 kriptikus vírus köpenyfehérjéjével. A WCCV1 köpenyfehérjéjét a pillangósvirágúak modellnövényében, a *Lotus japonicus*-ban túlexpresszáltatva megfigyelték, hogy az gátolja a nodulációt, és ugyanakkor fokozott védelmet biztosít a növénynek a fertőzések ellen. A szerzők feltételezik, hogy a *TrEnodDRI* fehérje a növény veleszületett immunválaszát aktiválja, és ezen keresztül az abszcizinsav koncentrációját befolyásolja (Nakatsukasa-Akune és mtsai., 2005). Ez az első olyan eredmény, aminek alapján arra lehet következtetni, hogy a kriptikus vírusok, ill. géntermékek befolyásolhatják a növények életfolyamatait, s a növénynek előnye származhat a jelenlétükből. Ez egyben megmagyarázhatná, hogy miért maradnak fenn, és miért olyan gyakoriak a növényvilágban a kriptovírusok.

Azt már régóta tudjuk, hogy léteznek olyan dsRNS-mikovírusok, amelyek képesek befolyásolni egy adott kórokozó virulenciáját (Hansen és mtsai., 1985). Jó példa erre a *Cryphonectria parasitica*, vagyis a szelídgesztenye-kéreggrák hipovirulens törzsei, amelyek citoplazmája egy dsRNS-vírust, a *Cryphonectria hypovirus 1*-t (CHV-1) tartalmaz. Amennyiben a hipovirulens törzsek elvesztik sejteikből (vagy mesterségesen blokkolják bennük) ezeket a vírusokat, akkor minden esetben újra virulensekké válnak (Dawe és Nuss, 2001).



1. ábra: A *Curvularia thermal tolerance virus* (CThTV) hatására kialakuló hőmérséklet tolerancia vizsgálata *Dichanthelium lanuginosum* (A) és *Solanum lycopersicon* (B) növényekben (Márquez és mtsai., 2007 nyomán). A vizsgálatot 14 napon keresztül folytatták 65°C-os (10 óra) és 37°C-os (14 óra) talajhőmérsékleten. Jól látható, hogy a vírus jelenléte a gombában a gazda fokozott hőtűréséhez vezet. Wt, szimbiózis CThTV vírust tartalmazó *C. protuberata*-val; An, CThTV vírus reinfekció hifa-asztozmózison keresztül; Ns, nincs szimbiózis.

Nemrégiben napvilágot látott azonban egy olyan publikáció is, amelyekben a mikovírus jelenléte a gazda számára előnyös tulajdonságokat eredményezett. Márquez és munkatársai (2007) azonosítottak egy olyan gombavírust, a *Curvularia thermal tolerance virus*-t (CThTV), amelynek szerepe van a Yellowstone Nemzeti Park magas talajhőmérsékletű régióiban élő *Dichanthelium lanuginosum* és a *Curvularia protuberata* endofita gomba között kialakuló és mindkét fél számára előnyös kölcsönhatásban. A szimbiózis során mind a növény, mind a gomba partner toleránssá válik a növény gyökérszónájában jelentkező magas hőmérséklettel szemben. A hőmérséklet-tolerancia összefügg a CThTV vírus jelenlétével, és nem alakul ki abban az esetben, amikor a *C. protuberata* nem tartalmazza a CThTV-t. A mikovírustal történő reinfekció hatására azonban újra megjelennek a hőtolerancia jelei. A *C. protuberata* nem fajspecifikus, így paradicsom növényeket fertőzve is ki tudtak - bár gyengébb hatékonysággal - hőtoleranciát alakítani (Izd. 1. ábra; Márquez és mtsai., 2007 nyomán).

2.1.2. A *Beta* nemzetség kriptikus vírusai

A *Beta* nemzetségben eddig háromféle kriptikus vírust írtak le, valamennyit *Beet cryptic virus*-nak (BCV) nevezték el, és számozással különítették el egymástól: BCV1, -2 és -3 (Kassanis és mtsai., 1977). E kriptikus vírusok rendkívül elterjedtek a nemzetség különböző fajaiban, így a cukorrépában, a mángoldban, a céklában és a takarmányrépában, valamint vad őseikben a *Beta maritimá*-ban és a *Beta macrocarpá*-ban (Boccardo és mtsai., 1987). A *Beet cryptic virus*-okra is jellemző, hogy egy növényegyedben egyszerre többféle kriptikus vírus is előfordulhat, melyek a genom szegmenseik mérete, valamint a köpenyfehérjéjük immunológiai tulajdonságai alapján biztosan elkülöníthetők egymástól (Antoniw és mtsai., 1986).

A *Beet cryptic virus 1* virionokban két dsRNS molekula van jelen. A dsRNS1 ($M_r 1,36 \cdot 10^6$) *in vitro* transzlációja során egy 67 kDa, a dsRNS2 ($M_r 1,15 \cdot 10^6$) transzlációja során pedig egy 52 kDa becsült molekulaméretű fehérje szintetizálható. A szintetizált fehérjék reaktivitását BCV1-specifikus ellenanyaggal vizsgálták meg, és azt találták, hogy a BCV1-specifikus antiszérummal a kisebb protein mutat immunológiai reakciót. Ezen adatok alapján feltételezték, hogy a BCV1 genom nagyobb szegmense az RNS-függő RNS-polimerázt (RdRp), a kisebb pedig a virális köpenyfehérjét (CP) kódolja (Accotto és mtsai., 1987).

A *Beet cryptic virus 2*-ről kevesebb adat áll a rendelkezésünkre, és a legtöbb vizsgálatot BCV1 és BCV2 vírusokat együttesen tartalmazó mintákkal végezték. Kühne és munkatársai (1986) BCV 1+2 virionokban három köpenyfehérje jelenlétét írták le: 55, 36 és 33 kDa méretben. Mivel Accotto és munkatársai (1987) a BCV1 dsRNS2 *in vitro* transzlációja során 52 kDa becsült molekulaméretű proteint szintetizáltak, feltételezték, hogy a 33 és 36 kDa méretű fehérjék a BCV2 vírus köpenyfehérjéi. A BCV2 dsRNS genom méretét is meghatározták: a BCV2 virionokban két, $0,94 \cdot 10^6$ és $0,87 \cdot 10^6$ molekulatömegű dsRNS szegmenst azonosítottak, ami közel 1320 és 1420 bp hosszúságnak feleltethető meg (Antoniw és mtsai., 1986).

A *Beet cryptic virus 3* vírus genomját szintén két dsRNS molekula alkotja, melyek ~1740 és ~1600 bp hosszúságúak (Xie, 1992). A BCV1 vírustól eltérően a BCV3 virionokban a dsRNS2 szegmens kódolja a virális replikázt és a dsRNS1 a köpenyfehérjét. Xie és munkatársai klónozták és szekvenálták a BCV3 RdRp-jét kódoló dsRNS2 jelentős részét, amelyen egy 1431 nukleotid hosszúságú, 478 aminosavat kódoló nyílt leolvasási keretet és több RdRp motívumot is azonosítottak (Xie és mtsai., 1993).

2.1.3. *Carnation cryptic virus* jellemzése

A *Dianthus caryophyllus*-ban előforduló, szegmentált genommal rendelkező dsRNS-vírust *Carnation cryptic virus*-nak (CarCV) nevezték el. Az egészséges szegfű levelekből izolált CarCV virionokban három "major" (MW $1,04 \cdot 10^6$, $0,95 \cdot 10^6$ és $0,84 \cdot 10^6$ Da) és egy "minor" (MW $0,88 \cdot 10^6$ Da) dsRNS molekulát azonosítottak (Lisa és mtsai., 1981a). A kis molekulatömegű dsRNS nem volt jelen minden izolátumban (Lisa és mtsai., 1981b).

2.1.4. A *Partitivirus* nemzetség néhány tagjának jellemzése

A növényi kriptikus vírusok általános jellemzése során fent leírt valamennyi tulajdonság, azaz a dsRNS genom mérete, szegmentáltsága, a virionok struktúrája *Partitivirus* nemzetségbe tartozó mikovírusokra is igaz (Tuomivirta és Hantula, 2003), azzal az eltéréssel, hogy a vírusok transzmissziója spórakon (Ihrmark és mtsai., 2002) és hifa-amasztomózisokon keresztül (Nogawa és mtsai., 1996) zajlik.

A *Partitivirus* nemzetségen belül két vírus jellemzésére szeretnék részletesebben kitérni. A *Cherry chlorotic rusty spot-associated partitivirus* (CCRS-PV), valamint az *Amasya cherry disease-associated partitivirus* (ACD-PV) azért keltette fel az érdeklődésünket, mert e vírusok genom szegmensei rendkívül hasonlónak bizonyultak a csoportunk által meghatározott *Beet cryptic virus I* szekvenciáihoz. A fertőzött cseresznye szövetekben minden esetben egy komplex dsRNS mintázat figyelhető meg, amely tíz lineáris dsRNS molekulából, melyek mérete 1700 és 5500 bp között változik, valamint két kis cirkuláris RNS-ből áll. Ezek a dsRNS-ek az egészséges növényekben nem mutatható ki (Di Serio és mtsai., 1996; Coutts és mtsai., 2004). A lineáris dsRNS-ek közül kettő a *Partitivirus*, négy pedig a *Chrysoviridae* család, *Chrysovirus* nemzetségébe tartozó vírus genomját építi fel. A többi lineáris dsRNS molekula eredete még nem ismert (Coutts és mtsai., 2004; Covelli és mtsai., 2004).

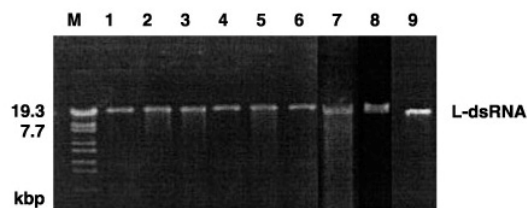
A fertőzés természetes vektorát sem tudták azonosítani. Fény- és elektronmikroszkópos kísérletek során ugyan megfigyeltek gomba-szerű micéliumokat a fertőzött levél szöveteiben, azonban azonosítani vagy izolálni ezt az endofita gombát mindmáig nem sikerült. (Alioto és mtsai., 2003). Újabb ismeretek szerint úgy tűnik, hogy az ACD és a CCRS elnevezések csak geográfiai különbségeket jelölnek, ugyanis a két fertőzés a tünetek, valamint a vele asszociáltan jelentkező dsRNS molekulák molekuláris jellemzői alapján azonosak tekinthető (Covelli és mtsai., 2004).

2.2. Az endornavírusok rendszertana és molekuláris jellemzői

2.2.1. Endornavírusok, enigmatikus dsRNS-ek

Az ICTV (International Committee of Taxonomy of Viruses) 2004-ben sorolta be a nagy molekulatömegű dsRNS genommal rendelkező és virionokat nem képező vírusokat a növényi vírusok közé, és megalkotta az *Endornavirus* nemzetségnevet (Gibbs és mtsai., 2004). E bejelentést megelőzően a nemzetközi irodalomban RNS-plazmidként vagy enigmatikus dsRNS-ként találkozhattunk az endornavírusokkal (Moriyama és mtsai., 1995; Brown és Finnegan, 1989).

Az első nagyméretű endogén dsRNS-molekulákat az 1980-as években azonosították növényi szövetekben (Dodds és mtsai., 1984). Ezt követően számos egészséges növényben kimutatták ezeket a feltűnően nagyméretű dsRNS molekulákat, így pl. termesztett rizsben (*Oryza sativa* ssp. *japonica*; Moriyama és mtsai., 1995), vad rizsben (*Oryza rufipogon*; Moriyama és mtsai., 1999), paprikában és sárgadinnyében (*Capsicum annuum* és *Cucumis melo*; Valverde és mtsai., 1990), lóbabban (*Vicia faba* cv. '447'; Dulieu és mtsai., 1988), veteménybabban (*Phaseolus vulgaris* cv. 'Black turtle soup'; Wakarchuk és Hamilton, 1985) és árpában (*Hordeum vulgare* cv. 'Barsoy'; Zabalgoceazcoa és Gildow, 1992; lsd. 2. ábra).



2. ábra: Az endornavírusok elterjedtségének vizsgálata különböző tünetmentes növény fajokban és az ibolya gyökérrothadását okozó gombában (Fukuhara és mtsai., 2006 nyomán). M, molekulásúly marker; 1, *Cucumis melo* dsRNS; 2, *Basella alba* dsRNS; 3, *Capsicum annuum* dsRNS; 4, *Zostera marina* dsRNS; 5, *Lagenaria siceraria* dsRNS; 6, *Oryza sativa* dsRNS; 7, *Phaseolus vulgaris* dsRNS; 8, *Hordeum vulgare* dsRNS; 9, *Helicobasidium mompa* dsRNS.

Az endornavírusok jelenléte a gazdanövényben gyakran rejtve marad, mivel jelenlegi ismereteink szerint tüneteket nem okoznak. Genomi dsRNS-ük nem szegmentált és mindig nagyobb, mint 10 kbp (Fukuhara és mtsai., 1993), virionokat nem képeznek. Lineáris dsRNS genomjuk egyetlen, szokatlanul hosszú, folyamatos nyílt leolvasási keretet (ORF) tartalmaz, melyről ezidáig csak egy RNS-függő RNS-polimeráz-szerű, egy helikáz-szerű és egy

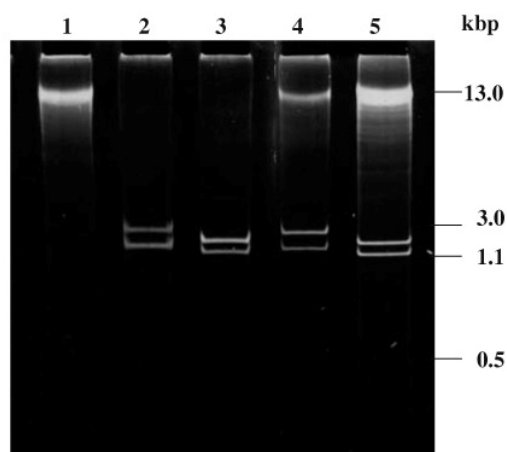
glikoziltranszferáz-szerű régiót sikerült azonosítani (Fukuhara és mtsai., 1995; Osaki és mtsai., 2006). Abból a tényből, hogy nem fordulnak elő minden növényben, arra következtethetünk, hogy jelenlétük nem esszenciálisan fontos a növény számára. A rizsben talált dsRNS-ekről kimutatták, hogy a gazda kromoszomális DNS-e nem tartalmazza a virális szekvenciát, így itt joggal beszélhetünk nemcsak enigmatikus dsRNS-ről, hanem egy új vírusszalád, az endornavírusok jelenlétéről (Moriyama és mtsai., 1995). A 12 kbp hosszúságú dsRNS-ek a paprika növények többféle szövetében - levél, virág, gyökérszövet és kalluszkultúra - is kimutathatók voltak. Jelentős mennyiséget találtak kloroplasztisz kivonatokban, de keveset, illetve semennyit sem a sejtmagban és a mitokondriumban (Valverde és mtsai., 1990). A paprikában talált dsRNS hasonló méretű volt, mint a lóbabban és a sárgadinnyében kimutatott dsRNS, de a szekvencia oly mértékben eltérőnek bizonyult, hogy a jelölt cDNS nem mutatott kereszthibridizációt más faj dsRNS-ével (Valverde és mtsai., 1994).

A dsRNS-ek horizontális átvitelét több esetben is megkísérelték. A rizsben talált endornavírusok esetében többféle átviteli módot is kipróbáltak: pl.: mechanikai fertőzés dörzsölés, gyökéralanyba oltás, levéltetvek és aranka segítségével történő átvitel, magvetés (Dodds, 1984). A hagyományos virológiai módszerek egyik esetben sem bizonyultak eredményesnek, az endornavírusokat egyik növényről a másikra nem sikerült átvinniük, maggal és pollennel azonban hatékonyan terjednek (Moriyama és mtsai., 1999). A vírusok átvitelét vizsgáló magvetési kísérletek minden esetben 100 %-osan pozitív eredményt hoztak (Horiuchi és mtsai., 2003).

Valverde és Gutierrez (2007) *Capsicum annuum* fajtáknál (cv. 'Yolo Wonder', 'Jalapeno M' és 'Hungarian Wax') irányított keresztezési kísérletekben vizsgálták a dsRNS-vírusok átvitelének hatékonyságát (3. ábra). A reciprok keresztezési kísérletek F1 generációjában 20 növényt analizáltak, és ők is azt találták, hogy a nagy molekulatömegű BP-dsRNS (Bell pepper dsRNS, putatív endornavírus dsRNS) anyai és apai úton is átvihető, bár az átvitel a petesejttel hatékonyabb volt, mint a pollennel. A Yolo Wonder és a Hungarian Wax fajták keresztezése során a pollenátvitel az utódnövények 35 %-ánál bizonyult eredményesnek, míg a vírus petesejttel történő öröklődése az utódok 75 %-ában volt kimutatható.

Úgy tűnik, hogy az endornavírusok replikációja oly módon szabályozott, hogy a dsRNS állandó, alacsony koncentrációban legyen jelen a gazda minden sejtjében, kivéve a pollent, ahol ez a koncentráció jóval magasabb (Fukuhara és mtsai., 1993; Moriyama és mtsai., 1995; Moriyama és mtsai., 1999). Általában sejtenként húsz kópiát mutattak ki, míg a pollenben 2000 kópiát találtak. Más fajokban is hasonlóan alacsony szinteket detektáltak (Gabriel és

mtsai., 1987; Valverde és mtsai., 1990). Ez a szabályozás és a nem-fertőző jelleg mind arra utal, hogy ezek a dsRNS-ek, hasonlóan a bakteriális DNS-plazmidokhoz, a sejtciklustól függetlenül önállóan replikálódni képes RNS-replikonok.



3. ábra: Paprika (*Capsicum annuum*) reciprok keresztezési kísérlet eredménye (Valverde és Gutierrez, 2007 nyomán). 1, *C. annuum* cv. Yolo Wonder (YW); 2, *C. annuum* cv. Jalapeno M (JM); 3, *C. annuum* cv. Hungarian Wax (HW) dsRNS kivonata; 4 YW és JM fajták keresztezéséből származó F1 növények dsRNS kivonata; 5, YW és HW fajták keresztezéséből származó F1 növények dsRNS kivonata.

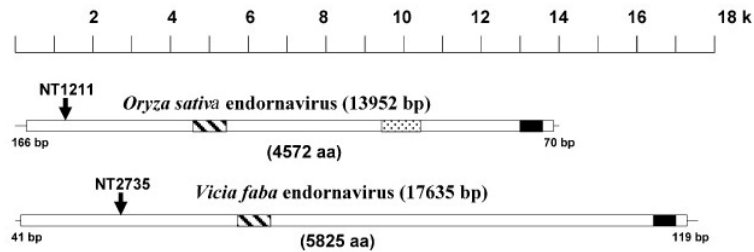
Az *Oryza sativa* ssp. *japonica*-ban talált endornavírussal végezték el az első, teljes szekvencia analízist. Ennek a vírusnak több mint 50 független cDNS klónjából határozták meg a teljes, 13952 nukleotidból álló szekvenciáját (Fukuhara és mtsai., 1995). A cDNS klónok vizsgálata során azt találták, hogy a dsRNS egyetlen hosszú ORF-et tartalmaz. A nukleinsav sorrend meghatározása során feltárták, hogy a dsRNS molekula három szerkezeti egységre tagolható. A kódoló szál 5' végénél található nem kódoló régió 166 nukleotidból áll, ezt követi a nagy, 13716 nukleotidot tartalmazó ORF, ami vélhetően egyetlen, 4572 aminosavból álló polipeptidot kódol. A dsRNS molekula az ORF-et követően, egy 70 nukleotidból álló nem-kódoló régióban végződik, polyA-véget nem azonosítottak (4. ábra). A párhuzamosan nyert cDNS klónok között számos eltérést azonosítottak a nyílt leolvasási keretben (ORF) és a terminális régióban, ez inszerciók és szubsztitúciók jelenlétére vezethető vissza, és ez a dsRNS populáció heterogenitását jelzi. Az ORF elején található nukleotidok (5' AAGAAUGGA) megegyeznek a növények translációjának kezdetét kódoló nukleotid sorral. Adatbázisokban található különféle, ismert RNS vírusok által kódolt proteinek aminosav szekvenciáinak összehasonlítása alapján kiderült, hogy ez a nagy polipeptid egy RNS-helikáz-szerű és egy

RNS-függő RNS-polimeráz-szerű (RdRp) régiót tartalmaz (Fukuhara és mtsai., 1995; Horiuchi és mtsai., 2001). A dsRNS valószínűleg nem kódol kapszid fehérjét. Későbbi vizsgálatok során az RdRp szekvenciája alapján végezték el a vírusok pontos rendszertani besorolását (Gibbs és mtsai., 2000).

Feltehetően az összes dsRNS molekulában megtalálható egy törés, ami két részre osztja a kódoló szálat: egy 1,2 kbp hosszú, és egy 12,6 kbp hosszú szakaszra (Fukuhara és mtsai., 1995). A kódoló szálon elhelyezkedő törés pontos helyét oligonukleotid primerek segítségével határozták meg. Két lehetséges ok adódik a diszkontinuitás magyarázatára. Vagy az RNS saját ribozim aktivitása vágta el a kódoló szálat, vagy pedig egy speciális, a gazdanövény által kódolt ribonukleáz hasította ketté. Az először rizsben és babban megtalált (Pfeiffer és mtsai., 1993) törés biológiai jelentősége ismeretlen, mivel azóta számos, különböző dsRNS-ben megtalálták, feltételezhető, hogy fontos szerepet tölt be az endornavírusok dsRNS-ének életciklusában. A törés minden bizonnyal hatással van a dsRNS molekula replikációjára, a kódoló szál transzkripciójára és a hosszú ORF transzlációjára.

2.2.2. Az endornavírusok törzsfejlődése

Ezidáig három növényi endornavírus teljes nukleinsav szekvenciáját határozták meg: a termesztett rizsben (*Oryza sativa* ssp. *japonica*; Moriyama és mtsai., 1995), a vad rizsben (*Oryza rufipogon*; Moriyama és mtsai., 1999), és a lóbabban (*Vicia faba* convar. *447*; Dulieu és mtsai., 1988; Pfeiffer, 1998) előforduló endornavírusokét. Bebizonyosodott, hogy mindhárom endogén vírusban jelen van a különlegesen hosszú ORF. Az *O. sativa* és a *V. faba* dsRNS-ének aminosav szekvenciájának összehasonlítása során kiderült, hogy hasonló helikáz-, RdRp- és glikoziltranszferáz-szerű kódoló régiót tartalmaznak (4. ábra). Fukuhara és munkatársai (2006) a rizs, ill. lóbab endornavírus RdRp szekvenciái alapján primereket terveztek és meghatároztak egy-egy szekvencia részletet az árpa, hínárfű, malabári spenót és a sárgadinnye endornavírusok RdRp-eiből.



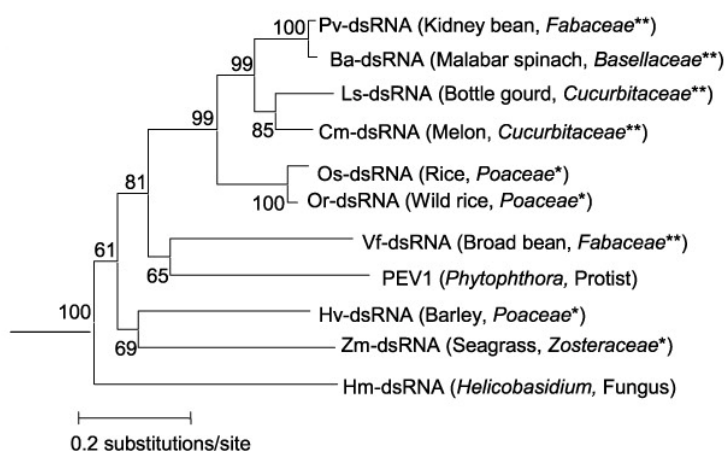
4. ábra: Az *Oryza sativa* endornavírus és a *Vicia faba* endornavírus genomszerveződése (Osaki és mtsai., 2006 nyomán). Az ORF-en belül bejelölték a helikáz-szerű (csíkos), az glikoziltranszferáz-szerű (pöttyös) és az RdRp-szerű (fekete) régiók elhelyezkedését. Az NT a törés pontos helyét adja meg. A 3' és 5' nem kódoló régió az ORF-et megelőzően, ill. azt követően helyezkedik el.

Újabb kutatások során fitopatogén gombákban is kimutattak endornavírusokat. Duglász-fenyőből származó *Phytophthora*-ból izoláltak egy 13883 bp hosszúságú dsRNS-t, amely egyetlen nagy ORF-et tartalmaz, és 4548 aminosavból álló polipeptidot kódol. Ennek C-terminális régiójában a vírusok RdRp szekvenciájára jellemző szekvencia motívumot, az N-terminális régióban pedig RNS-helikáz motívumot találtak (Hacker és mtsai., 2005). Ez az első olyan publikáció, ahol nem-növényi dsRNS-t, mint endornavírust írnak le. Ugyancsak növénypatogén gombából, az ibolya gyökérrothadását okozó *Helicobasidium mompa*-ban azonosítottak egy 16614 nukleotid hosszú dsRNS-t, melynek a nyílt leolvasási kerete 5373 aminosavból álló fehérjét kódol. (Osaki és mtsai., 2006).

Az *Endornavirus* nemzetség vírusainak egymáshoz való viszonyát a putatív RNS-függő RNS-polimeráz szekvenciák összehasonlításával (5. ábra) lehet a legjobban jellemezni. Bár a rendelkezésre álló vírusszekvenciák száma még kevés, Fukuhara és munkatársai (2006) az irodalomban található és az általuk meghatározott részleges RdRp szekvenciákból elkészítettek egy filogenetikai fát. Kezdetben a horizontális vírusátvitel hiánya miatt azt gondolták, hogy az endornavírusok fajspecifikusak. Ezért volt váratlan eredmény, hogy olyan gazdanövényekben találtak egymáshoz nagyon hasonló szekvenciájú endornavírusokat, amelyek rendszertanilag nagyon távol állnak egymástól. Az 5. ábrán az is jól látható, hogy a veteménybab dsRNS (Pv-dsRNS) és a lóbab dsRNS (Vf-dsRNS) a filogram különböző ágain helyezkedik el annak ellenére, hogy gazdanövényeik a *Fabaceae* család tagjai. Az RdRp szekvenciák analízise során bizonyosságot nyert az is, hogy a növényi endornavírusok mellett a *Helicobasidium mompa*-ból és a *Phytophthora*-ból izolált dsRNS-ek is az *Edornavirus* nemzetség tagjai. A *Helicobasidium mompa* endornavírus RdRp-t kódoló szekvenciája a *Phytophthora endornavirus 1*-el 43,3 %-os, növényi endornavírusok RdRp-t kódoló szekvenciájával közel

ugyanekkor, 36,2 – 40,7 % hasonlóságot mutat (Osaki. és mtsai., 2006; Hacker és mtsai., 2005). Az *Endornavirus* nemzetség tehát immáron a növényi vírusok mellett gomba gazdából származó tagokkal is kibővült.

Az *Endornavirus* nemzetség RdRp-inek összehasonlító analízise során nyert eredmények alapján egyértelműen megállapítható, hogy nincs kapcsolat az endornavírusok szekvenciája és a gazdaszervezetek filogenetikai besorolása között. A gazdaszervezetek nagyfokú heterogenitása azt valószínűsíti, hogy az RNS horizontális transzferrel cserélődhetett ki a növény és a patogén gombák között (Fukuhara és mtsai., 2006).



5. ábra: Az *Endornavirus* nemzetségbe tartozó vírusok filogramja, amit parciális RNS-függő RNS-polimeráz (~90 AA) szekvenciák alapján szerkesztettek (Fukuhara és mtsai., 2006 nyomán). Az összehasonlításban szereplő vírusok neveinek rövidítésjegyzéke: Pv-dsRNA, *Phaseolus vulgaris* dsRNS; Ba-dsRNA, *Basella alba* dsRNS; Ls-dsRNA, *Lagenaria siceraria* dsRNS; Cm-dsRNA, *Cucumis melo* dsRNS; Os-dsRNA; *Oryza sativa* dsRNS; Or-dsRNA; *Oryza rufipogon* dsRNS; Vf-dsRNA, *Vicia faba* dsRNS; PEV1, *Phytophthora* dsRNS; Hv-dsRNA, *Hordeum vulgare* dsRNS; Zm-dsRNA, *Zostera marina* dsRNS; Hm-dsRNA, *Helicobasidium mompa* dsRNS. * egyszikű, ** kétszikű növények.

A rizsben talált endornavírus RdRp-t, a helikáz enzimet kódoló doménjét és teljes nukleinsav szekvenciáját összehasonlították más vírusokkal is: a potyvírus egyszálú, 10 kbp hosszú RNS-ével (Allison és mtsai., 1986), valamint a *Cryphonectria* hypovírus 12,7 kbp hosszú dsRNS-ével (Hillmann és mtsai., 1995). A kapott eredmények alapján a rizs endornavírus fejlődéstörténeti helye e két vírusfaj között található (Gibbs és mtsai., 2000). Az RdRp további vizsgálata során az is kiderült, hogy ez a régió hasonlít számos egyszálú RNS RdRp-t kódoló szakaszához, főleg az alfavírusokéhoz. Az erősen konzervált domének az RdRp szek-

venciák mintegy 20 %-át teszik ki. Rokonsági törzsfát készítettek az RdRp aminosav szekvenciái alapján, és arra az eredményre jutottak, hogy az endornavírusok mellett két víruscsoport is tartalmazza ezeket a konzervált RdRp szekvenciákat. A két csoportba a következő vírusok tartoznak: (1) alfamovírusok, bromovírusok, closterovírusok, crinivírusok, cucumovírusok, furovírusok, hordeivírusok, idaeovírusok, ilarvírusok, pecluvírusok, pomovírusok, tobamovírusok, tobravírusok; (2) capillovírusok, carlavírusok, marafivírusok, potexvírusok, trichovírusok, tymovírusok és vitivírusok.

Zanotto és munkatársai (1996) nemcsak az enigmatikus dsRNS-eknek az alfavírusokhoz való hasonlóságát fedezték fel, hanem azt is alátámasztották, hogy fejlődéstanilag egységes eredetűek, származásuk azonos ősrre vezethető vissza. Az endornavírusok által kódolt RdRp és helikáz enzim funkcionálisan megegyezik az alfavírusok által kódolt enzimekkel, de a két vírus replikációjának módjában eltérések figyelhetők meg. Az alfavírusok genomi RNS-e a gazdasejtben elsődlegesen pozitív, egyszálú RNS-ként ((+)ssRNS)) van jelen, míg az endornavírusok dsRNS-ei sohasem képeznek teljes hosszúságú, pozitív szálú ssRNS-t (Wakarchuk és Hamilton, 1985). Még nagyobb eltérés, hogy a három ismert szekvenciájú növényi endornavírus genomi dsRNS kódoló szálainak mindegyike tartalmazott egy törést, ami nem volt megtalálható a negatív szálon (Fukuhara és mtsai., 1995). A törés két részre osztja a teljes molekulát, és mindig közel ugyanazon a helyen találták meg. Az endogén dsRNS-vírusok és az ssRNS-vírusok közötti hasonlóság oka az lehet, hogy vagy a dsRNS-vírusok váltak ki az ősi ssRNS-vírusokból, vagy fordítva. Az RdRp és a helikáz enzim analízisének segítségével készített törzsfá az első alternatívát valószínűsíti, és azt mutatja, hogy az alfavírusok sokkal diverzebbek, mint a dsRNS-vírusok. Az összes alfavírus kódolja a saját köpenyfehérjéjét, amely a dsRNS ősében szintén meglehetősen. E tulajdonságok azt támasztják alá, hogy az ssRNS-vírus az ősi forma. Az endornavírusok szekvenciájának más ismert vírusszekvenciákkal való összehasonlítása során nem találtak köpenyfehérjét kódoló részt. Ez a tény kapcsolatban van azzal, hogy a dsRNS nem képez vírus-partikulumokat. Ez a szokatlan tulajdonság összefüggésben állhat a vírus evolúciójával, és feltételezhető, hogy az alfa ssRNS- és az endogén dsRNS-vírusvonalak akkor válhattak el egymástól, mikor a pozitív szálú RNS növényi vírusok elvesztették köpenyfehérjét kódoló génjüket. A dsRNS formába való átalakulás visszafordíthatatlanná vált, amikor a dsRNS pozitív szálában törés következett be (Hayes és Buck, 1993).

Mivel az endogén dsRNS-vírusok igen elérő csoportot képeznek, egy új nemzetségbe, az *Endornavirus* nemzetségbe sorolták be őket. Megőrizve a nevezéktani szabályokat, a fajokat a gazdanövényről nevezték el. Így a megszekvenált dsRNS fajok nevei a következők lettek: *Phaseolus vulgaris endornavirus* (PVuV), *Oryza rufipogon endornavirus* (ORV), *Oryza sativa endornavirus* (OSV) és *Vicia faba endornavirus* (VFV) (Gibbs és mtsai., 2000), *Bell pepper endornavirus* (Valverde és Gutierrez, 2007).

3. CÉLKITŰZÉS

A doktori munkám során elsődleges céloom két kriptikus növényi vírus, a *Beet cryptic virus 1* és -2 molekuláris jellemzése, valamint a kriptikus- és endornavírusok elterjedésének és a gazdaszervezettel való tartós együttélésének vizsgálata volt.

A kriptikus vírusok azért keltették fel az érdeklődésünket, mert a növényvilágban rendkívül elterjedtek, evolúciós eredetük ugyanakkor nem ismert. Kísérleteim kezdetén ráadásul egyetlen kriptovírus teljes szekvenciája sem volt ismeretes, és a gazdaszervezettel való kölcsönhatásokról is igen kevés adat állt a rendelkezésünkre. A gazdanövényvel kialakult, annak teljes életciklusában érvényesülő harmonikus együttélés megértésének első lépéseként azt kívántuk megvizsgálni, hogy a növényben perzisztáló kriptikus vírusok képesek-e a szövete-nyésztés természetestől nagyban eltérő körülményei mellett hosszabb ideig fennmaradni az *in vitro* tenyészetekben, valamint hogy vírusmentesítésre szokásosan használt merisztéma hőkezeléssel eliminálhatók-e e vírusok a növényekből.

A kriptikus- és endornavírusok elterjedésének vizsgálata azon túlmenően, hogy információt nyerhetünk a sokféleségükről, evolúciójuk megértéséhez is feltétlenül szükséges. Annak kiderítésére, hogy e vírusok megjelenése a közel rokon fajok elválása előtt történt vagy későbbi időpontra tehető, nyolc különböző *Capsicum* fajból és számos fajtából álló génbanki gyűjteményben vizsgáljuk meg a feltehetőleg kriptovírusok ill. endornavírusok genomi RNS-ét reprezentáló dsRNS-ek előfordulását. A megfigyelt dsRNS-mintázatot a vizsgált fajok mikroszatellit markerek alapján összeállított törzsfájával (Nagy és mtsai., 2007) összehasonlítva következtethetünk arra, hogy a mintázat változása követi-e a rokonsági kapcsolatokat.

A kriptikus vírusok eredetének és biológiájának megértéséhez elengedhetetlen a genom pontos ismerete. A molekuláris szintű jellemzésre a *Beta* nemzetségben előforduló *Beet cryptic virus 1*-t (BCV1) és *Beet cryptic virus 2*-t (BCV2) választottuk ki. A genomikus szekvencia teljes meghatározása nemcsak a putatív kódolt fehérjék predikciója szempontjából fontos, hanem azért is, hogy megállapítsuk, hogy milyen közös szekvencia-, ill. szerkezeti tulajdonságok teszik lehetővé a dsRNS-eknek a replikáz által történő felismerését és az intakt genom megőrzését. A klónozás során nyert szekvencia adatokat összehasonlító szekvencia vizsgálatokra használhatók fel, hogy további megerősítést és a jelenleginél pontosabb információkat szerezzünk a kriptikus vírusok eredetéről, a gombavírusokhoz való hasonlóságáról és a gazdaszervezetben betöltött esetleges szerepéről. A kriptikus vírusok, mivel jelenlétük tünetek hiányában gyakran rejtve marad, diagnosztikai szempontból is problémát jelenthet-

nek. Ezért tűztük ki célul azt is, hogy részleteiben kidolgozunk és bevezetünk egy olyan PCR-en alapuló kimutatási módszert, amivel a *Beta* nemzetségben előforduló mindhárom kriptikus vírus szelektíven és érzékenyen kimutatható.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Növényanyag

4.1.1. Paprika

A paprika növényanyagot Csilléry Gábor paprika génbanki gyűjteménye alkotta, melyet Nagy István és munkatársai gondoztak a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban. A gyűjtemény 8 paprika faj (*Capsicum annum*, *C. baccatum* var. *baccatum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chacoense*, *C. chinense*, *C. eximium*, *C. frutescens*, *C. praetermissum*, *C. pubescens*) 63 fajtájából áll. A minták megjelölésénél az adott génbankban (MBK, Gödöllő) szokásos jelöléseket vettük át. A levélmintákat növényházi körülmények között nevelt, egészséges, rovarmentes paprikanövényekről szedtük. Ahol lehetett, igyekeztünk fiatal leveleket szedni, hogy a magasabb RNáz-tartalmú öregedő leveleket elkerüljük.

4.1.2. Cukorrépa

A 28 cukorrépa fajtát tartalmazó fajtasor a Sopronhorpácsi Beta Kutató Intézet Kht. telepéről származik, a mintákat Potyondi László és munkatársai bocsátották rendelkezésünkre (2. táblázat). Immunológiai tesztek alapján a 28 fajtából - a későbbi kísérletekhez - két fajtát (Mars, Apolló) választottunk ki, melyekből Sopronhorpácsról magokat kaptunk, és Soroksáron a Budapesti Corvinus Egyetem Kísérleti Üzemében, valamint a tanszéki növényházban neveltük őket. Kísérleteinkhez mindig egészséges, fertőzésre vagy rovarkórokozó jelenlétére utaló tüneteket nem mutató növényeket használtunk.

Vizsgálataink során felhasználtunk *in vitro* kultúrából származó növényanyagot is, amely szintén Sopronhorpácsról származott. Cukorrépa és takarmányrépa kéttípusú, *in vitro* kultúráit vizsgáltuk meg. Az egyik estében, eredetileg zöld, ovulum kultúrákat indítottak, s az azokból származó piros (0-25, 0-27) és fehér levelű (0-48) mutánsokat nevelték tovább, míg a másik esetben sterilizett magról indított kultúrákat neveltek tartósan *in vitro* körülmények között (Potyondi és Heszky, 1992). Az 1., 6/1., 4.48h. és 5. jelű kultúrákat az USA-ból kapott, a BETA-Aranymono takarmányrépa és a cikória kultúrákat pedig Sopronhorpács környékéről 1998-ben begyűjtött magokból indították. Vizsgálataink megkezdéséig hormonmentes Murashige-Skoog táptalajon, 5-7 éven keresztül nevelték a növényeket *in vitro* körülmények között (Murashige és Skoog, 1962).

2. táblázat: A dolgozatban vizsgált cukorrépa fajták és rezisztencia típusaik.

No.	Fajta név	Rezisztencia	No.	Fajta név	Rezisztencia
1.	Goldorak	Rz/Cr	15.	Apollo	Rz/Cr
2.	Triplex	Rz	16.	Cronos	Rz/Cr
3.	Canaria	Rz/Cr	17.	Picasso	Rz/Cr
4.	Federica	Rz/Cr	18.	Baltika	Rz/Cr
5.	Chellabeta	Rz/Cr	19.	Mondial	Rz
6.	Franklin	Rz/Cr	20.	Casino	Rz
7.	Brigitta	Rz	21.	Canasta	Rz/Cr
8.	Evelina	Rz/Cr	22.	Bounty	Rz/Cr
9.	Clementina	Rz/Rc/Cr	23.	Gábor	Cr
10.	Oregon	Rz/Cr	24.	Flair	Rz
11.	Belinda	Rz	25.	Ruist	Rz
12.	Georgina	Rz	26.	Mars	Rz
13.	Lolita	Rz	27.	Libero	Rz/Cr
14.	Gazeta	Rz/Rc/Cr	28.	Delphina	Rz

Rz/Cr: rizománia toleráns és cercospóra rezisztens; **Rz:** rizománia toleráns; **Rz/Rc/Cr:** rizománia, rizoktónia toleráns és cercospóra rezisztens

A begyűjtött mintákat a szedés után legkésőbb 2 órával lefagyasztottuk. A nagyobb ereket kivágtuk, lemértük a levél tömegét, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és -80 °C-on tároltuk nukleinsav izolálásig.

4.1.3. Szegfű

A 16 éve *in vitro* körülmények között nevelt 17 különböző *Dianthus* fajt (*D. giganteus*, *D. armeria*, *D. sylvaticus*, *D. ponederae*, *D. fischeri*, *D. serotinus* ssp. *regis-stephani*, *D. superbus*, *D. anatolicus*, *D. giganteiformis*, *D. chinensis*, *D. deltoides*, *D. knapii*, *D. carthusianorum*, *D. gratianopolitanus*, *D. plumarius* ssp. *praecox*, *D. gallicus*, *D. monspessulanus*), a két *D. caryophyllus* fajtát (*D. caryophyllus* 'Chabaud', *D. caryophyllus* 'Grenadin') és a *Silene vulgaris* növényeket tartalmazó gyűjteményt Tóth Endre (Óbuda Kertészeti Kft., Budapest) bocsátotta rendelkezésünkre. Valamennyi kultúrát steril magvetéssel indították és hormonmentes Murashige-Skoog táptalajon nevelték (Murashige és Skoog, 1962).

A vírusmentesítés céljából elvégzett merisztéma hőkezelést Tóth Endre és munkatársai végezték el. A kriptikus vírust tartalmazó növényekből 0,2-2 mm átmérőjű merisztémát izoláltak, melyet α -naftil-ecetsav és kinetin tartalmú MS táptalajon 6 hétig regeneráltak. A hőkezelés $7,0 \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$ fotonfluxus mellett folyamatos megvilágítással zajlott, 5 napig 30 °C-os, majd 5 hétig 36 °C-os hőmérsékleten.

4.2. Reagensek

A kísérlet során használt legtöbb molekuláris biológiai reagensünk a Fermentas International Inc., Lithuania terméke, az eltéréseket a megfelelő helyen külön jelöljük.

4.3. Nukleinsav izolálás

4.3.1. Össznukleinsav izolálás

2 g levelet dörzsmozsárban folyékony N₂ segítségével homogén porrá törtünk. Az így keletkezett örleményt 2 ml TNE-puffer (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)), 400 µl 10 % nátrium-dodecil-szulfát (SDS) és 4 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) oldattal telített fenol tartalmú oldatban szuszpendáltuk és 10000 g-n 10 percig centrifugáltuk (Sambrook és mtsai., 1989). A centrifugálást követően a fenolos fázist ismételtén 1 térfogat TNE pufferrel extraháltuk, majd a vizes fázist 1 térfogat fenol-kloroformos és kloroformos tisztításnak vetettük alá. A nukleinsavat Na-acetátos – etanolos kicsapás után, 100 µl milli-Q vízben oldottuk vissza és további felhasználásig -20 °C-on tároltuk (Ziegenhagen és mtsai., 1993). A koncentrációt 260 nm-nél mért abszorbanciából számítottunk, amit spektrofotométerrel (UV-160A, Shimadzu) mértünk. Számításainknál A_{260nm}=1 oldatot, 40 µg/ml nukleinsav-koncentrációnak feleltettünk meg.

4.3.2. Teljes RNS tartalom izolálása

A növény teljes RNS-kivonatát RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) és Plant Total RNA miniprep kit (Viogene) felhasználásával készítettük, követve a gyártó utasításait.

4.3.3. dsRNS-izolálás CF-11 oszlopkromatográfiával

A virális dsRNS-t a növény teljes nukleinsav kivonatából CF-11 oszlopkromatográfiával tisztítottuk (Dodds és mtsai., 1984). 1 g CF-11 oszloptöltet 20 µg dsRNS elválasztására használható. Az 1xSTE/15% EtOH-ban duzzasztott és ekvilibrált CF-11 töltetet a minta felvitele után 15 %-os etil-alkohol tartalmú 1x STE-oldattal (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,0), 1 mM EDTA) mostuk addig, amíg az átfolyó abszorbanciája el nem érte az alapvonalat. A dsRNS eluálásához 1x STE-oldatot használtunk. Mind mosáskor, mind eluáláskor 500 µl-es frakciókat szedtünk és folyamatosan mértük a koncentráció változását 260 nm-nél spektrofotométerrel. A dsRNS-t tartalmazó frakciókat DE 52 anioncserélő oszlopon koncentráltuk és 2 M NaCl oldattal eluáltuk. A nukleinsavat Na-acetátos – etanolos ki-

csapás után milli-Q vízben oldottuk vissza, majd a tisztítás eredményét nem-denaturáló gélelektroforézissel ellenőriztük.

A tisztított dsRNS-oldatban előforduló DNS szennyezéseket RNáz-mentes DNáz I enzim kezelésével bontottuk le MgCl₂ tartalmú pufferben (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂). 1 µg dsRNS tisztításához 0,2 U RNáz-mentes DNáz I enzimet használtunk, 37 °C-on egy órán keresztül inkubáltuk. Ezt kloroformos tisztítás és alkoholos kicsapás követte az enzim fehérje és egyéb szennyeződések eltávolítására.

A ssRNS maradványok eltávolítására RNáz A (Sigma) enzim emésztést is végeztük. Ez az enzim magas sókoncentráció (3x SSC, azaz 450 mM NaCl, 45 mM Na-citrát (pH 7,2)) mellett csak az egyszálú RNS-eket emészt, a duplaszálúakat nem. 1 µg dsRNS kezeléséhez 25 ng RNáz A enzimet használtunk, az emésztést 37 °C-on végeztük, 30 percen keresztül. Az RNáz A enzimet proteináz K enzimmel bontottuk le (55 °C, 60 perc). Az emésztések után kloroformos extrakciót, majd alkoholos kicsapást végeztünk. A tisztított dsRNS-t dietilpirocarbonáttal (DEPC)-kezelt vízben oldottuk vissza.

Egyes kísérletekben szükségessé vált a mintában jelenlevő dsRNS-fragmentek szétválasztása is, ezért a mintát 1%-os ethidium-bromidot tartalmazó TAE (40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA (pH 8,0)) agaróz gélen futtattuk meg. A visszaizolálható sávokat UV-megvilágítás mellett vágtuk ki a gélből. A visszaizolálást RNaid-kittel (BIO 101) a gyártó utasításait követve végeztük el. A minták ellenőrzése ebben az esetben is PAGE-vel történt.

4.4. Nukleinsavak elválasztása

4.4.1. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A nukleinsav-kivonatokat 5 % nem-denaturáló poliakrilamid (PAA) gélben (30:0,8 akrilamid-biszakrilamid arány), 1xTBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM bórsav, 2,5 mM EDTA (pH 8,3)) elektroforézis-puffer jelenlétében választottuk el. A futtatást követően a nukleinsavakat Sammons-Schumacher-féle ezüst-festéssel tettük láthatóvá (Sammons és mtsai., 1981; Schumacher és mtsai., 1983) vagy dsRNS-specifikus immunoblotot készítettünk.

4.4.2. dsRNS-immunoblot

Az immunológiai eljárás olyan monoklonális ellenanyagok használatán alapul, amelyek a dsRNS-ek szerkezetét specifikusan, szekvenciától és nukleotid összetételtől függetlenül ismerik fel. A poliakrilamid gélre 25-50 µg/zseb teljes nukleinsav kivonatot vittünk fel. A

nagy molekulatömegű (>12 kbp) dsRNS-k kimutatásánál szükség volt a teljes nukleinsav kivonat DNázos kezelésére is (1 U RNáz-mentes DNáz I / 3 µg teljes nukleinsav kivonat, 37 °C, 30 perc), mivel a nagy mennyiségű növényi DNS és az egyéb szennyeződések zavarták az azonos elektroforetikus mobilitású dsRNS-ek membránhoz való kötődését, és elmosódottabbá tették a jelet. A gélt viszonylag alacsony feszültségnél, 80 V-on (8 V/cm), 4 °C futtattuk, hogy elkerüljük a gél felmelegedését és a dsRNS-ek esetleges részleges denaturációját. Az elektroforézist követően a nukleinsavakat pozitív töltésű Zeta-probe membránra (Bio-Rad) blottoltuk át, majd a szabad kötőhelyeket 0,5 %-os blocking reagenssel (Boehringer Mannheim) telítettük. A dsRNS-eket szelektíven, a J2 monoklonális ellenanyag (anti-dsRNS Mab) segítségével mutattuk ki. Másodlagos antitestként alkalikus foszfatázzal konjugált kecske-anti-egér IgG-t (GAM-IgG (H+L), Jackson Immunoresearch) használtunk nitroblue tetrazolium (NBT) és 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) szubsztrátokkal. A módszerrel 40-60 pg dsRNS mutatható ki egy maximum 50 µg nukleinsavat tartalmazó mintában (Schönborn és mtsai., 1991).

4.5. RT-PCR

4.5.1. cDNS szintézis és klónozás

A dsRNS molekulák végeinek pontos meghatározásához a dsRNS molekula 3' végeire polyA-polimeráz enzim segítségével adenzin farkat szintetizáltunk, követve a gyártó (Amersham Biosciences Co.) utasításait (Compel és mtsai., 1999). 100 ng tisztított dsRNS-t 99 °C-on, 5 percig denaturáltuk 1,5 % dimetil-szulfoxid és 0,2 µM primer (oligo dT: 5' GCTCTGCAGAATTCTTTTTTTTTTTT, UMRH: 5' GCCGGAGCTCTGCAGAATTCNNNNN; a szekvencia-specifikus primereket a 3. táblázat tartalmazza) jelenlétében, majd 3 percre jégbe helyeztük (Cheng és mtsai., 2003). Ezt 1 órán keresztül tartó reverz transzkripció követte 50 °C-on. A reakcióelegy 1x reakciópuffert, 200 µM dNTP-t, 5 mM DL-dithiothreitol (DTT) és 0,75 U Thermoscript reverz transzkriptázt (Invitrogen) tartalmazott, 20 µl végső térfogatban (Choi és mtsai., 1999). Ezt követően a második szál szintézisét végeztük el. Ehhez 0,2 µM dNTP-t, 1x Klenow-puffert, 0,3 U Klenow-fragmentet és 0,01 U RNáz H enzimet használtunk. Az RNS-DNS hibridek RNS részének lebontásához a reakció első órájában az RNáz H enzim számára optimális 15 °C-os hőmérsékletet állítottunk be, majd a Klenow-polimeráz működéséhez 37 °C-os inkubációt alkalmaztunk (Tzanetakis és mtsai., 2005). A reakciót 30 mM EDTA-val állítottuk le, amitől később, Na-acetátos, etanolos kicsapással illetve tisztító kittel (E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit, Omega Bio-Tek) tisztítottuk meg a mintát.

3. táblázat: A klónozáshoz használt BCV1 és -2 szekvencia-specifikus és degenerált primerek nukleotid sorrendje.

	Forward primerek (5'-3')		Reverse primerek (5'-3')	
BCV1	NP05	TCCCGAAATCTCTCTTGAACA	NP04	ATGCCAGAGCGGGCGATAGTC
RNS1	NP26	CGACCCCAAACTGCATA	NP68	GAAACAAACAAAGCGATCGGC
	NP66	AACCGAATCACTCACTGGTTC		
	NP67	CAATCAAAATAGAACGCGAATC		
BCV1	NP67	CAATCAAAATAGAACGCGAATC	NP69	CGRCGTTGYTCGGGTGACAT ^a
RNS2	NP70	GCHTAYCCIATGTACACCGA ^a	NP71	CATAACATTCCAVAGIACAG ^a
	NP72	CARCTTTACRTCTCTGTICT ^a	NP73	CTATCCAGTCAAAAGGGCCA
	NP74	GTCCTTYYTTCCAATCCYT ^a	NP75	GAGDTGAAIAGIGAGCCACA ^a
	NP76	CCCATICCTGCCATCYTBC ^a	NP77	AGGGGIACDGAACCATGAA ^a
	NP78	TTCAATGGTTCHGTICCCCT ^a	NP79	ATDGMRTACTGTTGAGCTTG ^a
	NP80	GTCCGYGACTGGCTCTAYCC ^a	NP81	TGGTGRTAGCGDGAAGCGAT ^a
	NP83	GTTAACACCTTTGTCCCTGA	NP84	CCGATGAGGTCATTGATAAG
	NP85	TGGCGCTTTCTACACTTATG	NP86	GCATGGGAGAAGATCATACC
	NP88	TGGATCATGATGAACACTACC	NP97	GGCACAGTGTACATAGGAAG
BCV2	NP12	aaaactgcagCAATGATCCCCCTCTAAGCA ^b	NP13	gggaagcttTTCGTTGAGATGCTGTTTGC ^c
RNS1	NP60	aaaactgcagTACCTCAACACAAGCGAAGA ^b	NP59	gggaagcttCCAATTGGTTCTCCTCTTG ^c
	NP82	GATGCTGAGATGTCTACTGAAG	NP61	AAAGGGCACGTCGTTGCATA
	NP89	AACGCTTTATTGTTTCGTACA	NP90	TCCAAGAAATGTAAGGTGCT
	NP91	CTACTCGACTTCAAGCAAGG	NP92	AGGGCTGTATAGTCCCTCAG
BCV2	NP37	aaaactgcagCGGATCAGTCGTGAATAGATTG ^b	NP38	gggaagcttGATCTCTCCTGGACCCCTGT ^c
RNS2	NP41	ACAGGGGTCCAGGAGAGATC	NP42	CGGACCAAAGTACTGCCTTG
	NP43	CCAGACTGTGAGGGCATTCA	NP44	TCGGTACGCTAACTCGTTCG
	NP45	CTTCTAGAAGGAACTTCAGCGG	NP46	CGTCGCCTTGAGTGAACAT
	NP52	aaaactgcagTTCTAGAAAGACGGGAGTCA ^b	NP53	gggaagcttGTGCTGGATACCTGCTTAAC ^c
	NP54	aaaactgcagTCGGATCAGTCGTGAATAGA ^b	NP55	gggaagcttATGCTGATTAGGCTTTCCAG ^c
	NP58	aaaactgcagGAGTACCCGGTTACATCTGG ^b	NP93	CCCTTGGTGTACGAAATTAG
			NP94	ATTGAGGTATGGATGCTGAT
BCV2	NP98	TCATTTAGCCGACTACAGA	NP99	TGGTGTCTCAGTTCGTTG
RNS3	NP104	GCTCTGCActgcagAGAATTAT	NP102	TCTGTAGTCGGCTGAAATGA

^a H: T/C/A, Y: C/T, R: A/G, V: C/A/G, B: G/T/C, D: G/A/T, M: A/C, I: C/G/A/T; ^b PstI restrikciós hasítóhely: ctgcag; ^c HindIII restrikciós hasítóhely: aagctt

A PCR reakciót PalmCycler (Corbett) típusú készülékben végeztük. A reakcióhoz 1x *Taq* polimeráz puffert használtunk, 200 μ M dNTP-vel, 1,5 mM $MgCl_2$ -dal, 300 ng UN-primerrel ill. 0,2 μ M szekvencia-specifikus indítószekvenciával, 0,04 U *Taq* polimerázzal és 5 μ l cDNS-sel kiegészítve, 25 μ l végső térfogatban. A PCR reakciót 5 perces, 95 °C-on történő denaturációs lépéssel kezdtük, majd az alábbi lépéseket ismételtük 40 cikluson keresztül: denaturáció 95 °C-on, primerkötődés a primerek T_M értékének megfelelő hőmérsékleten és átírás 72 °C-on 30-30 másodpercig. A reakciót egy 72 °C-on történő 30 perces lépéssel zártuk, amely elősegíti a klónozáshoz szükséges adenilát farok kialakítását. Az így kapott DNS szakaszokat 1%-os agaróz gélben választottuk el és ethidium-bromidos festéssel tettük láthatóvá.

A mintákat tisztító kittel (E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit, Omega Bio-Tek) tisztítottuk meg, majd klónozó vektorba (pGEM3z, pGEM7zf (Promega); pCR2.1-TOPO (Invitrogen) illetve pTZ57R/T (Fermentas)) ligáltuk, a gyártó által mellékelt protokollt követve. A konstrukciót

transzformáltuk *Escherichia coli* XL1 Blue vagy JM109 kompetens sejtekbe (Inoue és mtsai., 1990). A transzformálás 42 °C-on 30 másodpercig történt, ezután a sejteket rögtön jégbe tettük, majd SOC (20 g/l Bacto-tripton, 5 g/l Bacto-élesztőkivonat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 5 mM MgCl₂·6H₂O, 5 mM MgSO₄·7H₂O, 20 mM glükóz) oldatban 37 °C-on 1 órán keresztül 250 rpm-en rázatva inkubáltuk. A transzformált sejteket 100 mg/l ampicillin tartalmú LB táptalajon (10 g/l Bacto-tripton, 5 g/l Bacto-élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, 7 g/l agar (pH 7,4)) neveltük 37 °C-on egy éjszakán keresztül.

A transzformánsokat „blue-white” teszt alapján (Sambrook és mtsai., 1989) előszelektáltuk, majd az inzertek meglétét kolónia PCR-rel vizsgáltuk. A fehér kolóniákat 30 µl milliQ vízben szuszpendáltuk és 99 °C-on denaturáltuk 5 percen keresztül. Az így kapott oldatot 12000 g-n 2 percig centrifugáltuk és a felülúszó 2,5 µl-jét használtuk a kolónia PCR templátjaként. A reakcióelegyet a fent említett módon állítottuk össze M13/pUC forward (5' GTTTTCCCAGTCACGAC) és M13/pUC reverse (5' CAGGAAACAGCTATGAC) szekvenáló primerekkel és 42 °C primerkötődési hőmérséklettel. A plazmid izolálást GenoPrep gyöngyökkel végeztük a gyártó utasításait követve (GenoVision).

4.5.2. Szekvenciaanalízis

A beépült inzert nukleotid sorrendjét ABI 3100 Genetic Analyzer szekvenáló készülékkel (Applied Biosystems, USA), a MTA Szegedi Biológiai Központjában határozták meg. A szekvenciákat Chromas – lite version 2.01 (Technelysium Pty Ltd) és a Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Co.; Lu és Moriyama, 2004) programmal analizáltuk. A DNS- és aminosav-szekvenciák homológia vizsgálatához az NCBI BLAST szoftverét (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Altschul és mtsai., 1990) használtuk.

A szekvenancia-specifikus primereket a Primer3 (URL:http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi; Rozen és Skaletsky, 2000) és az Integrated DNA Technologies (URL: <http://www.idtdna.com>) oldalon található szoftverek segítségével terveztünk.

4.5.3. Filogramok készítése

A szekvenciák illesztése CLUSTALW2 (Larkin és mtsai., 2007) program segítségével történt, az alapbeállítások alkalmazásával. Az illesztéseket a MEGA4 programcsomag (Tamura és mtsai., 2007) felhasználásával végeztük, ahol a filogenetikai fa a *Neighbour-Joining* módszerrel (Saitou és Nei, 1987) készült, a nukleotidokat a Kimura-2 paraméter modellel (Kimura, 1980) kezeltük, és a *gap*-ek definiálásához a *pairwise-deletion* opciót választottuk.

tottuk. Az egyes ágak jóságának becslésére 1000 ismétlésből álló *bootstrap* analízist (Felsenstein, 1985) végeztünk, melynek százalékban kifejezett értékeit a nóduszok mellett feltüntettük. *Outgroup*-ot nem jelöltünk ki.

4.6. Virion izolálás

375 g cukorrépa levelet 600 ml hideg NaCP-pufferben (0,1 M Na-citrát (pH 5,2), 1% tioglikolsav, 1 mM EDTA, 0,02 % Na-azid, 0,1 % celluláz, 0,02 % maceráz) homogenizáltunk. A homogenizátumot 10 °C-os inkubátorban 1 éjszakán keresztül 50 rpm-en rázattuk. Másnap reggel 1,5 térfogat% Triton X-100-at adtunk a levél-homogenátumhoz és 30 perces rázatást követően, 30 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk 5000 g-én. A felülúszót Miracloth szűrőn (Calbiochem) szűrtük át és 2½ órán keresztül 80000 g-én centrifugáltuk 10 °C-ra előhűtött ultracentrifugában (L8-55M, Beckman). A csapadékot 45 ml 50 mM kálium-foszfát (pH 7,0) + 1 % Triton X-100 oldatban szuszpendáltuk fel, és hagytuk állni 4 °C-n 1 éjszakán keresztül. A nem oldódó törmelékot 10 perces szobahőmérsékletű centrifugálással választottuk le 10000 g-én. A tiszta felülúszót 20 ml 20 % szaharóz párnára rétegeztük és 10 °C-ra előhűtött ultracentrifugában 110000 g-én 3 óráig centrifugáltuk. A csapadékot 2,5 ml 50 mM kálium-foszfát (pH 7,0) pufferben szuszpendáltuk újra és 1 éjszakára a hűtőben hagytuk. A nem oldódó üledéket ismételten 10000 g-és centrifugálással távolítottuk el. A tiszta, virion tartalmú oldatot lineáris szaharóz gradiensre (10-50 % szaharóz koncentráció) rétegeztük rá, 15 °C-n 2½ órán keresztül 65000 g-én üleptítettük. A különböző koncentrációjú cukorrétegben elhelyezkedő virionokat fecskendővel leszívtuk, majd 50 mM káliumfoszfát (pH 7,0) oldattal kihígítva 2½ órás, 80000 g-én végrehajtott ultracentrifugálással üleptítettük ki. A virionokat milliQ vízben szuszpendáltuk (Kühne és Stanarius, 1989).

Az izolált virionok ellenőrzését három különböző módszerrel végeztük el. A virionokról negatív festést követően, elektronmikroszkópos felvételek készültek (Crawford és mtsai., 2006). A nukleinsav-tartalmat a köpenyfehérje proteináz K-val 55 °C-n történő emésztése után dsRNS-specifikus immunobloton vizsgáltuk (Sambrook és mtsai., 1989; Lukács, 1994). A köpenyfehérjéket 12,5 %-os Laemmli gélben (Laemmli, 1970) megfuttatva Coomassie Brilliant Blue (G-250) festéssel tettük láthatóvá (Neuhoff és mtsai., 1985). A gélből kivágott fehérjéket tömegspektrometriás analízisnek (MALDI-TOF és LC-MS/MS) vetettük alá, hogy így módon bizonyosságot szerezzünk arról, hogy a cDNS szekvenciájából levezetett putatív köpenyfehérjék valóban a virionban lokalizálódnak-e (Beavis és Chait, 1996; Mueller és mtsai., 2007; Zachertowska és mtsai, 2006). A tömegspektrometriai vizsgálatokat Hunyadi-

Gulyás Éva, MTA SZBK Tömegspektrometriai Labor, végezte. A virionban előforduló fehérjék reaktivitását BCV1-, ill. BCV2-specifikus poliklonális szérummal vizsgáltuk, a szérumok Thomas Kühne, BBA Aschersleben nagylelkű ajándékai voltak.

5. EREDMÉNYEK

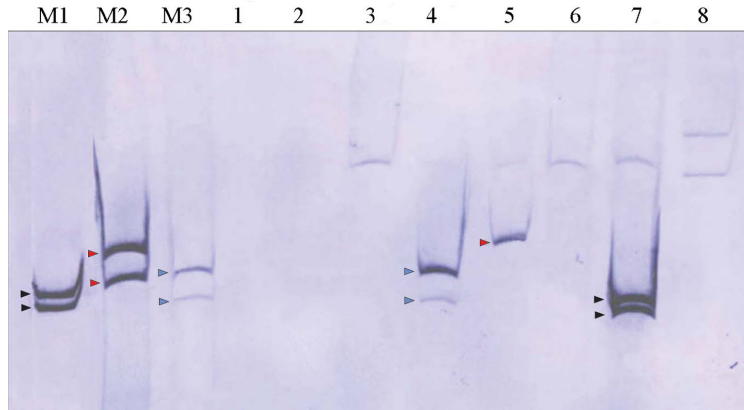
5.1. Kriptikus vírusok mikroszaporított és *in vitro* fenntartott kultúrákban

5.1.1. BCV-vírusok genomi dsRNS-einek azonosítása *in vitro* tenyészetekben

A kriptikus vírusok kódoló kapacitása kicsi, és eddigi adatok alapján úgy tűnik, hogy az RdRp-n és a CP-n kívül legfeljebb rövid peptideket kódolnak (Boccardo és mtsai., 1987). Ezért feltehetőleg a replikációjukhoz és fennmaradásukhoz gazdafehérjéket is igénybe kell venniük. Ez a gazdához való nagyfokú alkalmazkodást feltételezi. Felmerül a kérdés, hogy a természetes körülmények között megbízhatóan működő adaptáció vajon az *in vitro* szaporítás és tenyésztés természetestől nagyban eltérő körülményei mellett is biztosítja-e a kriptikus vírusok tartós fennmaradását?

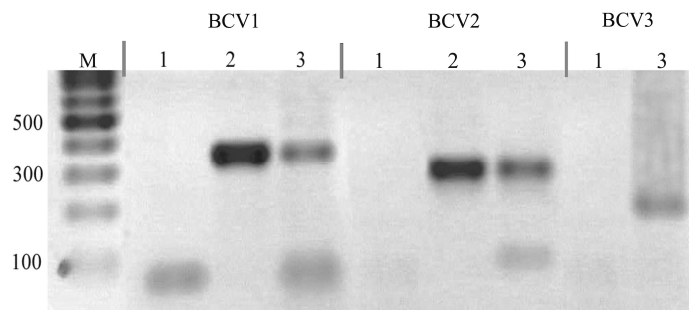
Ezért megvizsgáltuk, hogy cukorrépa, ill. takarmányrépa mikroszaporított és 5-7 évig folyamatosan *in vitro* kultúrában fenntartott egyedeiben kimutathatók-e a BCV1, -2 és -3 vírusokra jellemző genomi dsRNS-ek. Mivel nincs információnk arról, hogy az eredeti egyedek, amelyekből az *in vitro* kultúrákat indították, tartalmaztak-e kriptikus vírusokat, sajnos nem tudjuk megállapítani, hogy eliminálódnak-e, s ha igen, milyen gyakorisággal a kriptikus vírusok a tenyészetekből. Vizsgálataink kizárólag arra adnak választ, hogy fellelhetők-e a BCV1, BCV2, ill. BCV3 vírus jelenlétére utaló dsRNS-ek 5-7 évig tartó *in vitro* tenyésztés után. A növényekből először teljes nukleinsav kivonatot készítettünk, és ebben dsRNS-immunoblot eljárással vizsgáltuk a dsRNS-ek jelenlétét (6. ábra).

Az 1-3 sávba felvitt, haploid ovulum kultúrából származó mintákban nem detektáltunk dsRNS-eket. A diploid cukorrépa minták (6. ábra, 4-6., valamint a 8. sávok) közül a 4. számú BCV3-t, az 5. számú pedig feltehetőleg BCV1-t tartalmazhat, mert ezekben megjelennek az e vírusokra jellemző molekulatömegű dsRNS-ek. A takarmányrépa mintában (6. ábra, 7. sáv) feltehetőleg BCV2 fordul elő. A vizsgált minták közül hatban a kriptikus vírusok genomi dsRNS-einél hosszabb (≥ 3 kbp) dsRNS molekulákat is megfigyeltünk (6. ábra, 3-8. sávok), melyek eredete nem ismert.



6. ábra: Mikroszaporított *Beta vulgaris* növények dsRNS mintázatának vizsgálata immunoblot technikával. Az első három sávban a markerek láthatók: M1, BCV2; M2, BCV1; M3, BCV3. 1-3: 0-27, 0-25 és 0-48 jelű haploid cukorrépa vonalak; 4, 5, 6 és 8: 4.48h, 5., 1. és 6/1. jelű diploid cukorrépa fajták; 7: BETA-Aranymono tarmányrépa; 8, cikória.

Bár a dsRNS-immunoblot eljárással ki tudtuk mutatni a BCV-vírusok genomi szegmenseinek megfelelő dsRNS-eket, és eltérő hosszúságuk alapján azonosítani is tudtuk őket, egyértelmű azonosításuk és virális eredetük igazolásának érdekében PCR segítségével szekvencia-specifikus kimutatásukat is elvégeztük. A BCV1-3 vírusok biztonságos és specifikus azonosítására, Ilyés Pál és Neer Zsuzsanna közreműködésével, bevezettünk egy olyan PCR-en alapuló eljárást (7. ábra), amely segítségével a *Beta* nemzetség különböző fajaiban jelenlévő kriptikus vírusok könnyen, gyorsan, érzékenyen és specifikusan detektálhatók (Ilyés és mtsai., 2007).



7. ábra: A BCV1,-2,-3 vírusok azonosítása cukorrépa minták teljes RNS kivonatából PCR-rel. M, DNS molekulaméret marker; Az 1. sávban minden vírus esetében (BCV1, -2, -3) a templát nélküli negatív kontroll, a 2. sávban a megfelelő cDNS-klónnal, mint templáttal nyert pozitív kontrollok láthatók. A 3. sáv RT-PCR termékeinek előállításához cukorrépából kinyert RNS-kivonatokat használtunk templátként. A felhasznált vírus-specifikus primerpárok szekvenciája és az ampliconok hossza az 4. táblázatban található.

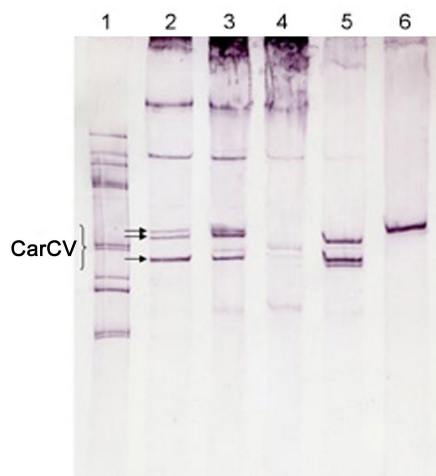
A mikroszaporított növényekben található dsRNS-vírusok azonosítására a 4. táblázatban bemutatott BCV1-, BCV2- és BCV3-specifikus indítószekvenciákat használtuk fel. Ezeket a szekvenciákat a BCV1 és BCV2 esetén az 5.6. és 5.7. fejezetben bemutatott genomi klónok szekvenciájából, a BCV3-nál pedig irodalmi adatok (Xie és mtsai., 1993) alapján vezettük le. A 6. ábra 4-es, 5-ös és 7-es sávjában bemutatott növények leveleiből teljes RNS-kivonatot készítettünk, majd vírus-specifikus primerek felhasználásával reverz transzkripciót végeztünk (4-es minta: NP32-NP33; 5-ös minta: NP28-NP29 és 7-es minta: NP13-NP22 primerek), és PCR-reakció segítségével amplifikáltuk a virális cDNS-eket. A felsokszorozott termékeknek meghatároztuk a nukleinsav sorrendjét, és a szekvencia eredményeket az általunk meghatározott BCV1 és BCV2, ill. a GenBank adatbázisban található BCV3 (S63913) szekvenciáival hasonlítottuk össze. A 4. sz. mintában található dsRNS szekvenciája 100 %-ban megegyezett a BCV3 RdRp-t kódoló dsRNS2-ével. Az 5. sz. minta szintén csaknem teljesen azonos volt a BCV1 RdRp-t kódoló dsRNS1-el, mindössze 3 nukleotid cserét tartalmazott, amelyek közül csak egy eredményezett aminosav cserét is. A 7. sz. minta esetén 99 %-os azonosságot (3 nukleotid eltérést) mutattunk ki a BCV2 putatív köpenyfehérjét kódoló szálával összehasonlítva. Kísérleteink tehát azt mutatták, hogy mindhárom kriptikus vírus fennmaradt az 5-7 évnyi *in vitro* kultúra során, sőt, szekvenciájuk sem változott jelentősen.

4. táblázat: BCV1, -2 és -3 vírus-specifikus kimutatására alkalmas indítószekvenciák és a PCR termékek várt hossza.

	Primer	Szekvencia	T_m	Amplikon hossza
1.	BCV1/NP28	5' ttcagcacctacctcctc	57°C	344 bp
2.	BCV1/NP29	5' ttgacagcaagtggacgag	55°C	
3.	BCV2/NP13	5' ttcgttgagatgctgtttgc	54°C	264 bp
4.	BCV2/NP22	5' ctcatcgaagcgacaagttcac	57°C	
5.	BCV3/NP32	5' actccagcgtgacgagattt	56°C	178 bp
6.	BCV3/NP33	5' ccggatggtattcctttgtg	53°C	

5.1.2. *Carnation cryptic virus* (CarCV) azonosítása szegfű *in vitro* tenyészetekben

Vizsgálatainkat kiterjesztettük tizennyolc *Dianthus*-fajból, ill. fajtából álló, 16 eszten-dőn keresztül fenntartott *in vitro* génbanki gyűjteményre is. A növényekből teljes nukleinsav kivonatot készítettünk, és dsRNS-immunoblot eljárással vizsgáltuk a mintákat. Az eredményeket a 8. ábrán és az 5. összefoglaló táblázatban mutatjuk be.



8. ábra: Kriptikus vírusok mérettartományába eső dsRNS molekulák azonosítása mikroszaporított *Dianthus* fajokban immunoblot technikával. Az első két sávban kontroll minták láthatók: 1, Rizstörpülés vírus molekulásúly marker; 2, nem mikroszaporított, tünetmentes *D. caryophyllus*-ban kimutatható dsRNS-ek (CarCV). A 3-6 sávokban 16 éve *in vitro* körülmények között tartott szegfű növények dsRNS mintázata figyelhető meg: 3, *D. caryophyllus* 'Grenadin'; 4, *D. caryophyllus* 'Chabaud'; 5, *D. gratianopolitanus*; 6, *Silene vulgaris*.

A szegfű fajták közül csak a *D. caryophyllus* 'Grenadin'-ban találtuk meg a CarCV jellegzetes három "major" és egy "minor" dsRNS-szegmensből álló motívumát (8. ábra, 3. sáv). A *D. caryophyllus* 'Chabaud'-ban a dsRNS szegmensek közül csak a két kisebb ($0,95 \cdot 10^6$ és $0,84 \cdot 10^6$ Da) molekulatömegűt tudtuk detektálni (8. ábra, 4. sáv).

5. táblázat: A különböző szegfűfajok dsRNS-mintázatának összefoglaló táblázata.

Szegfű fajok/fajták	dsRNS	Szegfű fajok/fajták	dsRNS
<i>D. caryophyllus</i>	+	<i>D. sylvaticus</i>	—
<i>D. caryophyllus</i> 'Grenadin'	+	<i>D. armeria</i>	—
<i>D. caryophyllus</i> 'Chabaud'	+	<i>D. giganteus</i>	+
<i>D. chinensis</i>	+	<i>D. deltoides</i>	—
<i>D. giganteiformis</i>	—	<i>D. knapii</i>	—
<i>D. anatolicus</i>	—	<i>D. carthusianorum</i>	—
<i>D. serotinus</i> ssp. <i>regis-stephani</i>	—	<i>D. gratianopolitanus</i>	+
<i>D. fischeri</i>	—	<i>D. plumarius</i> ssp. <i>praecox</i>	+
<i>D. pontederiae</i>	—	<i>D. gallicus</i>	—
<i>D. superbus</i>	+	<i>D. monspessulanus</i>	—
<i>Silene vulgaris</i>	+		

Jelmagyarázat: (+) tartalmaz, (-) nem tartalmaz

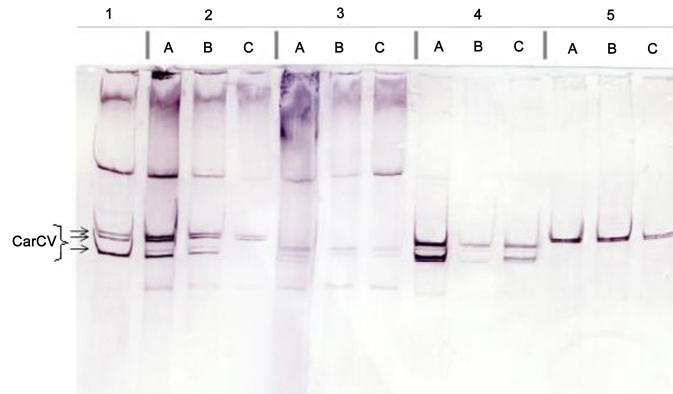
A *D. caryophyllus* mellett további hat fajban azonosítottunk dsRNS molekulákat. Négyben (*D. gratianopolitanus*, *Silene vulgaris* (8. ábra, 5. és 6. sáv), *D. superbus* és *D. giganteus*) a kriptikus vírusok mérettartományába eső dsRNS mintázat azonosítható, ami eddig még nem jellemzett kriptikus vírus (vagy vírusok) jelenlétére is utalhat. Négy fajban (*D. plumarius*, *D. chinensis*, *D. gratianopolitanus* és *D. caryophyllus*) pedig a CarCV-nál nagyobb méretű dsRNS molekulákat azonosítottunk, melyek eredete ismeretlen.

5.1.3. CarCV eliminálását célzó kísérletek szegfű *in vitro* tényészetekben

A hőkezeléssel kiegészített merisztéma szaporítás a tenyésanyagok vírusmentesítésére általánosan használt hatékony eljárás. Megvizsgáltuk, hogy a merisztéma hőkezelés eredményezi-e szegfűben a kriptikus vírusok eliminálását. A kriptikus vírusok jelenlétét dsRNS-immunoblot eljárással vizsgáltam a regenerált növények teljes nukleinsav kivonatában.

A víruselimináció hatékonysági kontrolljaként párhuzamosan egy carmovírussal, azaz szegfű foltosság vírussal (*Carnation mottle virus*, CarMV) fertőzött *D. caryophyllus* cv. 'Leopardi' fajta vírusmentesítését is elvégezték azonos körülmények között. A CarMV vírust a minták 40 %-ában sikerült eliminálni (nem bemutatott eredmény). Ez a hatékonyság a nehezen eliminálható vírusok esetében szokványosnak mondható.

A kriptikus vírus eliminációját egyetlen esetben sem figyeltük meg. Mind a CarCV-t a *D. caryophyllus* 'Grenadin' és 'Chabaud' mintákban (9. ábra, 2. panel), mind a putatív kriptovírusok jelenlétére utaló, az azokra jellemző mérettartományban megjelenő dsRNS-eket (9. ábra, 3-5. panel) azonosítottuk a kontroll (A sáv) és a hőkezelésen átesett (B és C sáv) szegfű egyedekben is. A virális dsRNS mennyisége azonban a kezelés hatására csökkenni látszik és azokban a hajtásokban, amelyeket kisebb méretű merisztémából regeneráltunk, kevesebb dsRNS detektálható. További vizsgálatok szükségesek azonban, annak megállapítására, hogy a koncentráció-csökkenés tartós és minden sejtre kiterjed, vagy az egyes fejlődési vonalakban előidézett heterogén eloszlásnak tudható be.

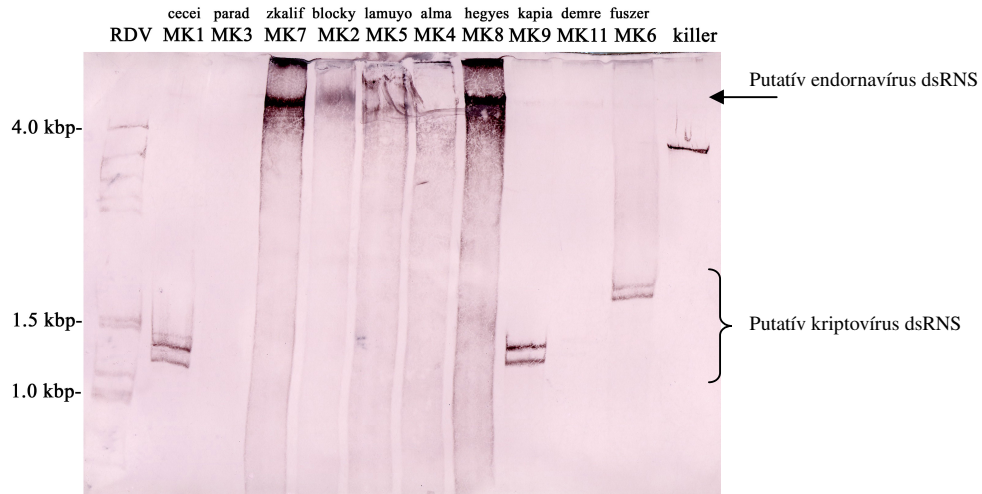


9. ábra: Merisztéma hőkezelés hatásának vizsgálata *Dianthus* fajokban és *Silene vulgaris*-ban. A hőkezelés után regenerált növényeket az izolált merisztéma mérete alapján 2 csoportra osztva (B és C) vizsgáltuk és a kezeletlen kontrollal (A) összehasonlítva mutatjuk be. A 0,8 mm-nél nagyobb merisztémából regenerált mintákat B-vel, a 0,8 mm-nél kisebb merisztémából nyerteket C-vel jelöltük. 1, nem mikroszaporított *D. caryophyllus*, mint marker; 2, *D. caryophyllus* 'Grenadin'; 3, *D. caryophyllus* 'Chabaud'; 4, *D. gratianopolitanus*; 5, *Silene vulgaris*.

5.2. Putatív endogén dsRNS-vírusok elterjedésének vizsgálata *Capsicum* fajokban

A vizsgálat alapvető célja annak tisztázása volt, hogy a különböző *Capsicum* fajokba tartozó fajták tartalmazznak-e dsRNS-vírusokat, s ha igen, valószínűsíthető-e ezeknek egy közös „ősvírusból” való leszármazása, vagy a vírusok megjelenését a fajok szétválását követő időre kell tennünk. Vizsgálataink során 63 különböző *Capsicum* faj, ill. -fajta egy-egy egyedének dsRNS-mintázatát vizsgáltuk meg három független kísérletsorozatban. Egyfelől a nagy molekulatömegű, putatív endornavírusok jelenlétét indikáló dsRNS-eket, másfelől a kriptikus vírusok jelenlétére utaló 1-3 kbp méretű dsRNS-párosokat, ill. tripletteket kerestünk. Eredményeinket az 6. táblázatban foglaltuk össze. A második és harmadik ismétléseknél a mikroszatellit markerezésre épülő törzsfá már ismert volt, így ekkor a törzsfá adta rokonsági viszonyok szerint csoportosítottuk a mintákat (Nagy és mtsai., 2007).

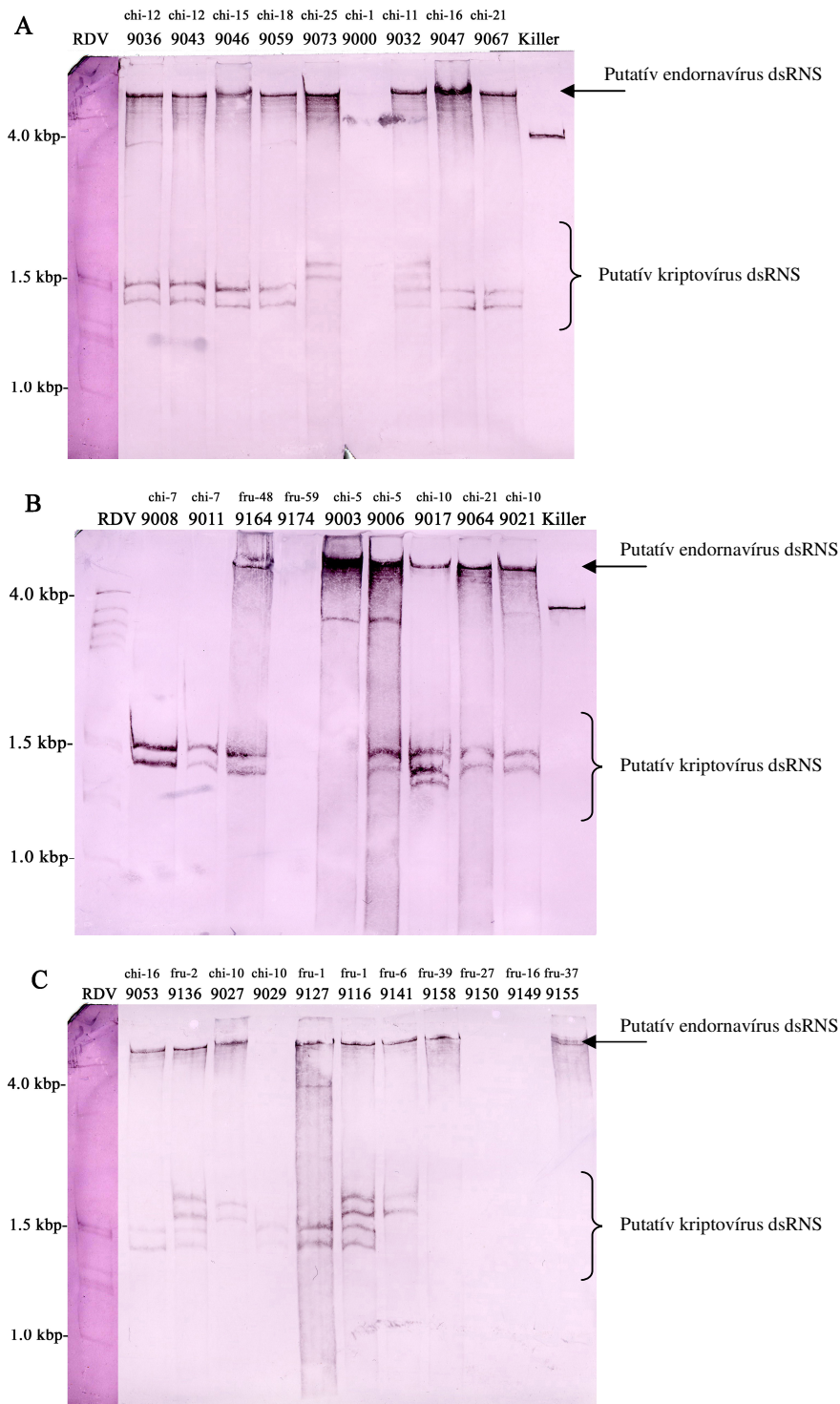
Valamennyi paprikafaj közül a *C. annuum* fajok vizsgálata hozta a legheterogénebb eredményeket. Három dsRNS-típust figyeltünk meg: egy nagy molekulatömegű (12-14 kbp) dsRNS-t (10. ábra, MK2, -5, -7 és -8) és két dsRNS párost a kriptikus vírusokra jellemző mérettartományban (10. ábra, MK1 és -9: 1,2-1,3 kbp; MK6: 1,6-1,7 kbp). Több minta dsRNS-negatívnak bizonyult.



10. ábra: A *C. annuum* fajtákban előforduló dsRNS-ek kimutatása immunobloton. Három fajta esetében nem mutattunk ki dsRNS-t, a többinél egymástól eltérő mintázatokat figyeltünk meg, amelyek nem korreláltak az 15. ábrán bemutatott csoportokkal. Az immunobloton rizstörpülés vírus (RDV) dsRNS-eket és élesztő L-A dsRNS-t (killer) használtunk molekulásúly markerként.

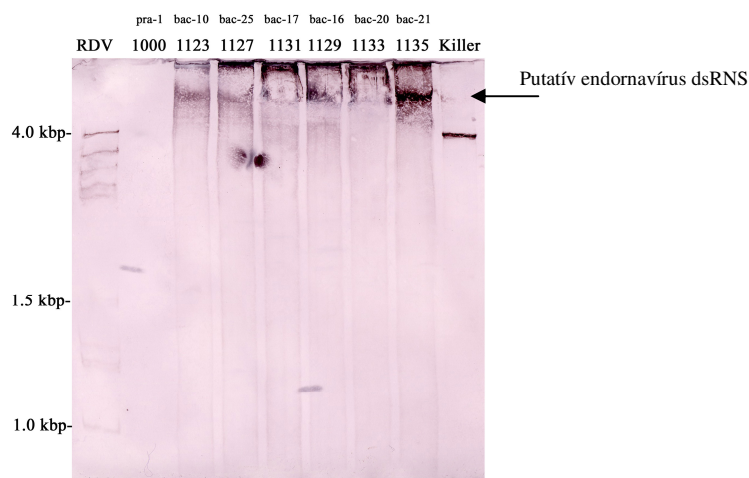
Az SSR markerezéssel készített *Capsicum* törzsfán a *C. chinense* és *C. frutescens* fajok azonos ágon helyezkednek el (Nagy és mtsai., 2007), ezért a dsRNS mintázat vizsgálatánál is egymás mellett – a törzsfán szereplő besorolást követve – vizsgáltuk ezeket a fajokat. Valamennyi *Capsicum*-faj közül a *C. chinense* és *C. frutescens* fajokban figyeltük meg a leggazdagabb dsRNS mintázatot. A legtöbb fajta mind a 12-14 kbp dsRNS-t, mind az 1-3 kbp tartományban előforduló dsRNS-párosokat tartalmazta, az utóbbit legalább háromféle mintázatban (11. ábra). Egy 1,4-1,5 kbp párost figyeltünk meg a 9036, 9043, 9046, 9059, 9047, 9067, 9008, 9011, 9164, 9006, 9064, 9021, 9053, 9029, 9127 mintákban; 1,6-1,7 kbp dsRNS-ek voltak jelen a 9073, 9027, 9141; 1,4-1,6 kbp dsRNS-ek a 9032, 9136, 9116 mintákban.

Egyes esetekben (pl. 9000, 9174 minták) csak nagyon gyenge jelet láttunk az enigmatikus dsRNS-ek és kisebb molekulásúlyú dsRNS-k tartományában, itt csak további ismétlések után lehetséges egyértelmű következtetéseket levonni a putatív vírusok jelenlétéről. A 9003, 9036, 9021, 9127, 9006 mintáknál egy 4 kbp-nál kisebb dsRNS jel is megjelent, ami azonban nem tűnik párosnak (11. ábra).

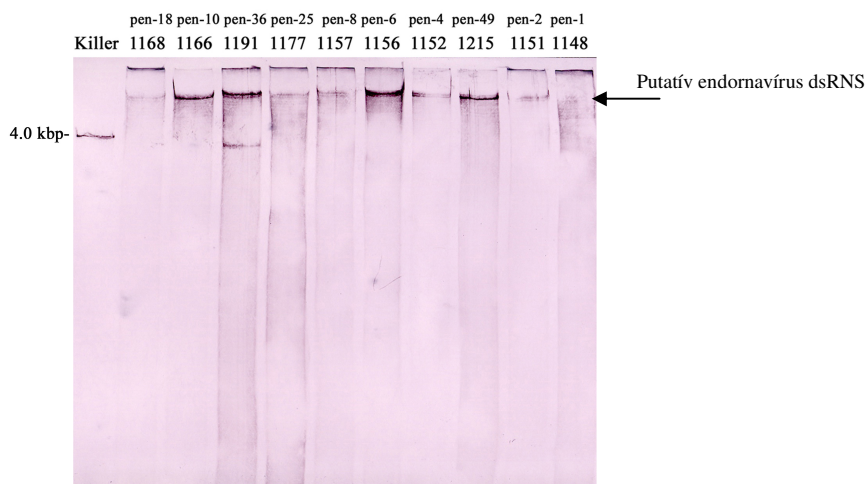


11. ábra: A különböző *C. chinense* és *C. frutescens* fajták immunoblotjai gazdag dsRNS-mintázatot mutatnak (A, B és C blotok). A 12-14 kbp dsRNS-en kívül legalább háromféle mintázatban fordulnak elő a dsRNS-párosok a kriptikus vírusok mérettartományában. A 9003, 9036, 9021, 9127, 9006 mintáknál megjelent egy 4 kbp-nál kisebb dsRNS csík is, amely azonban nem tűnik párosnak. Az immunoblotokon rizstörpülés vírus (RDV) dsRNS-eket és/vagy élesztő L-A dsRNS-t (Killer) használtunk molekulásúly markerként.

A *C. baccatum* var. *baccatum* különböző fajtáinál igen egyöntetű eredményt kaptunk: az enigmatikus dsRNS-ek mindegyik mintában előfordultak, míg az 1-3 kbp hosszúságú dsRNS-párosok egyik mintában sem voltak kimutathatók (12. ábra).



12. ábra: A *C. baccatum* var. *baccatum* minden fajtájában kimutathatók a nagy molekulatömegű enigmatikus dsRNS-ek, míg a kis molekulatömegű dsRNS-párosok hiányoznak. Az immunobloton rizstörpülés vírus (RDV) dsRNS-eket és élesztő L-A dsRNS-t (Killer) használtunk molekulásúly markerként.



13. ábra: A *C. baccatum* var. *pendulum* fajtakör nukleinsav-kivonataira az enigmatikus dsRNS-ek jelenléte és a dsRNS-párosok hiánya jellemző. Az 1191 mintáknál megjelent egy 4 kbp-nál kisebb dsRNS csík is, ami azonban nem tűnik párosnak. Az immunobloton élesztő L-A dsRNS-t (Killer) használtunk molekulásúly markerként.

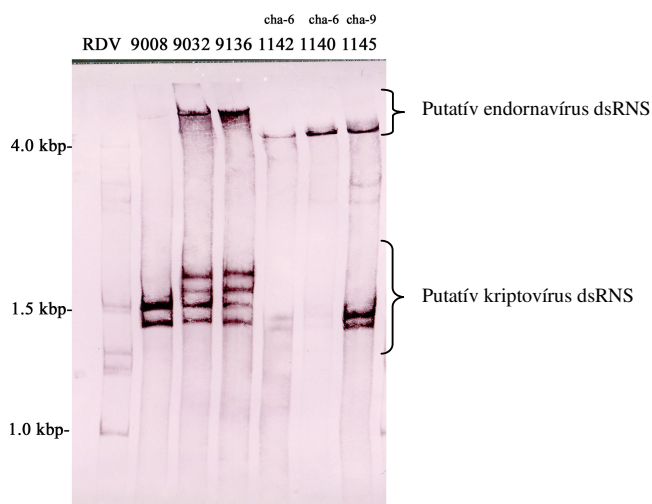
A *C. baccatum* var. *pendulum* minták immunoblot vizsgálata során is azonosítottunk enigmatikus dsRNS-eket, de kriptikus vírusok jelenlétére utaló dsRNS-párosokat nem talál-

tunk (13. ábra), azaz a faj *baccatum* változatánál is megfigyelt eredményt kaptuk. Az 1191-es fajtánál megjelent egy erős, 4 kbp-nál kisebb dsRNS sáv is (13. ábra).

A *C. praetermissum* esetében egyetlen fajtát tudtunk megvizsgálni, abban nem detektáltunk dsRNS-t, de ebből az eredményből az egész fajra vonatkozóan nem lehet általános következtetéseket levonni.

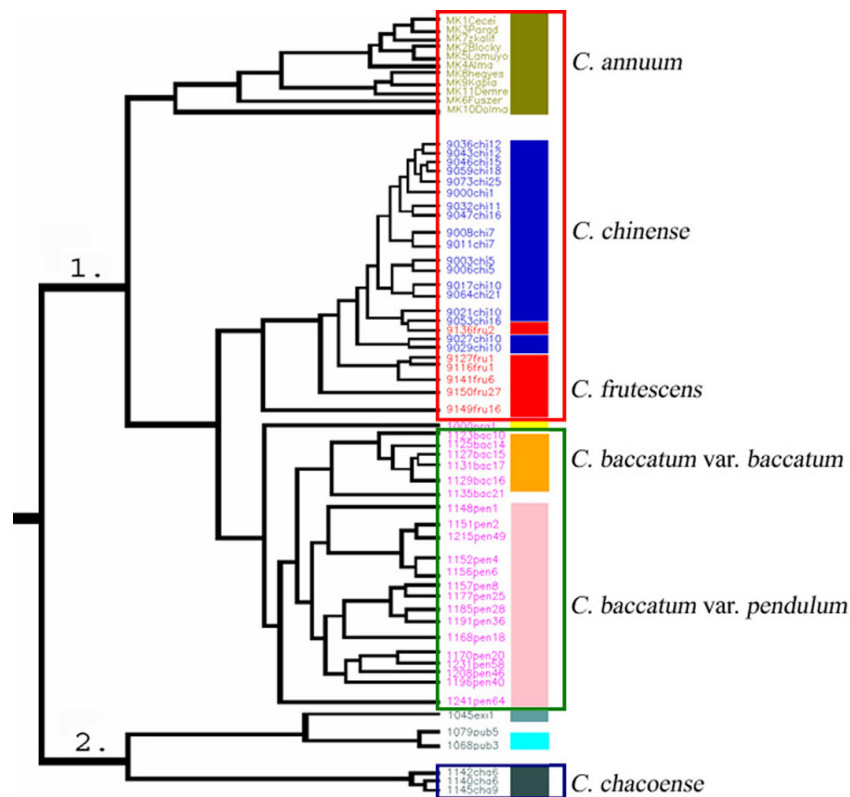
A *C. pubescens* két fajtáját vizsgáltuk meg, és sem ezekben, sem a közeli rokon *C. eximium* két példányában nem detektáltunk dsRNS-eket. Mindkét faj a *Capsicum*-ok második rokonsági köréhez tartozik, s azon belül külön ágat alkot (15. ábra), tehát itt is jól kimutatható a kapcsolat a növények származása és a dsRNS-ek jelenléte között.

A vizsgált *C. chacoense* fajtájában mind a nagy molekulatömegű enigmatikus dsRNS-t, mind az 1,3-1,5 kbp becsült molekulaméretű dsRNS-párost kimutattuk (14. ábra). A második rokonsági körbe tartozó fajok (Nagy és mtsai., 2007) közül ez az egyetlen faj, amelyben dsRNS-eket detektáltunk, de a *C. chacoense* az SSR-markerek alapján is erősen elkülönül a rokonsági kör másik két fajtától, a *C. eximium*-tól és a *C. pubescens*-től. Bár szekvencia- adatok nem állnak rendelkezésünkre, az eltérő molekulatömegek alapján feltételezzük, hogy a *C. chacoense*-k enigmatikus dsRNS-e az első rokonsági körben előforduló dsRNS-ekkel nem azonos (14. ábra, összevethető a 9008, 9032, 9136-os *C. chinense* mintákkal).



14. ábra: A *C. chacoense* fajták blotján megfigyelhető a nagy molekulatömegű enigmatikus dsRNS, melynek mérete a *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* és *C. baccatum* fajokban azonosított dsRNS-től jóval kisebb. Azonosítottunk egy a kriptikus vírusok mérettartományába eső dsRNS-párost is, 1,4-1,3 kbp becsült molekulamérettel. Az 1140 és 1145 mintákban megfigyelhető egy 2,5-3 kbp méretű dsRNS páros is. Az immunobloton rizstörpülés vírus (RDV) dsRNS-eket használtunk molekulasúly markerként.

A megfigyelt mintázatot a vizsgált fajok mikroszatellit markerek alapján összeállított törzsfájával (Nagy és mtsai., 2007) összehasonlítva azt látjuk, hogy a mintázat változása a rokonsági köröket követi (15. ábra). A nagy molekulatömegű enigmatikus dsRNS jelenléte a törzsfá első fajkörének minden fajára - *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. praetermissum*, *C. baccatum* var. *baccatum* és var. *pendulum* - jellemző. A második fajkörben csak a *C. chacoense*-ben mutattunk ki enigmatikus dsRNS-t, ami azonban jóval kisebbnek tűnik, mint az előző fajokban előforduló spéciesz. A kisebb dsRNS-eknél is megfigyelhető a korreláció a paprika fajtacsoportok és a dsRNS-páros előfordulása között. A *C. chinensis*, *C. frutescens* és a *C. chacoense* szinte minden fajtájában kimutathatók voltak 1-3 kbp hosszúságú dsRNS-párosok, és egyes *C. annuum* fajtákban is jelen voltak.



15. ábra: A *Capsicum* nemzetségben megfigyelt dsRNS-mintázat jellemző az adott fajokra és rokonsági körökre. A piros négyszögbe összefogott fajokban mind endorna-, mind kriptikus vírusokra jellemző dsRNS-ek, a *C. baccatum* alfajokban és fajtákban (zöld négyszög) csak putatív endornavírusok dsRNS-ei mutathatók ki. A *C. chacoense*-ben (kék négyszög) előforduló, putatív endornavírus jelenlétére utaló dsRNS molekulaméretében jelentősen különbözik a többi fajtól. Egyes fajokban nem mutattuk ki dsRNS-ek jelenlétét. Ezt a részletes filogenetikai fát Nagy István bocsátotta rendelkezésünkre (Nagy és mtsai., 2007).

6. táblázat: Putatív endornavírusok és kriptikus vírusok előfordulása paprika fajtákban.

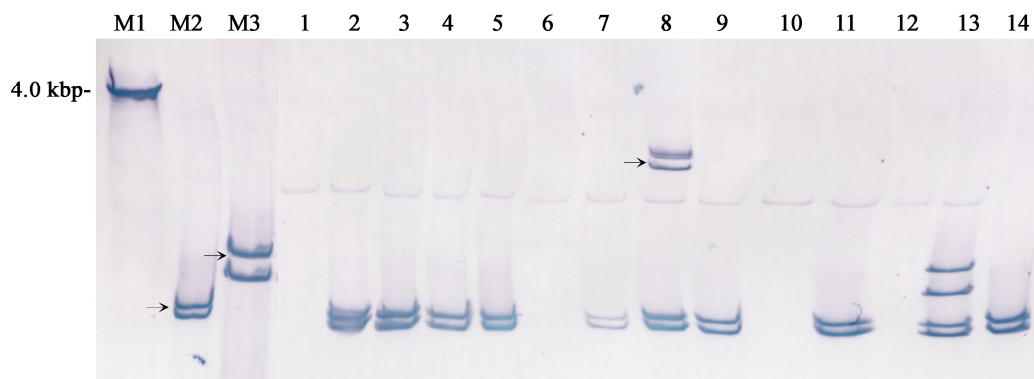
Faj	Fajta jelölés (MBK saját jelölése)	Nagy molekulasúlyú dsRNS	Kis molekulasúlyú dsRNS
<i>Capsicum annuum</i>	MK-1	-	+
	MK-2	+	-
	MK-3	-	-
	MK-4	-	-
	MK-5	+	-
	MK-6	-	+
	MK-7	+	-
	MK-8	+	-
	MK-9	-	+
	MK-11	-	+
	<i>Capsicum baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	1123 bac-10	+
1127 bac-15		+	-
1129 bac-16		+	-
1131 bac-17		+	-
1135 bac-20		+	-
1135 bac-21		+	-
<i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	1148 pen-1	+	-
	1151 pen-2	+	-
	1152 pen-4	+	-
	1156 pen-6	+	-
	1157 pen-8	+	-
	1166 pen-10	+	-
	1168 pen-18	+	-
	1177 pen-25	+	-
	1191 pen-36	+	-
	1196 pen-40	+	-
	1215 pen-49	+	-
<i>Capsicum praetermissum</i>	1000 pra-1	-	-
<i>Capsicum chacoense</i>	1140 cha-6	+	+
	1142 cha-6	+	+
	1145 cha-9	+	+
<i>Capsicum pubescens</i>	1068 pub-3	-	-
	1079 pub-5	-	-

Faj	Fajta jelölés (MBK saját jelölése)	Nagy molekulasúlyú dsRNS	Kis molekulasúlyú dsRNS
<i>Capsicum chinense</i>	9000 chi-1	+	-
	9003 chi-5	+	-
	9006 chi-5	+	+
	9008 chi-7	-	+
	9011 chi-7	-	+
	9017 chi-10	+	+
	9021 chi-10	+	+
	9027 chi-10	+	+
	9029 chi-10	-	+
	9032 chi-11	+	+
	9036 chi-12	+	+
	9043 chi-12	+	+
	9046 chi-15	+	+
	9047 chi-16	+	+
	9053 chi-16	+	+
	9059 chi-18	+	+
	9064 chi-21	+	+
9073 chi-25	+	+	
<i>Capsicum frutescens</i>	9116 fru-1	+	+
	9127 fru-1	+	+
	9136 fru-2	+	+
	9141 fru-6	+	+
	9149 fru-16	-	-
	9150 fru-27	-	-
	9155 fru-37	+	-
	9158 fru-39	+	-
	9164 fru-48	+	+
	9174 fru-59	-	-
	<i>Capsicum eximium</i>	1045 exi-1	-
1053 exi-5		-	-

Jelmagyarázat: (+) tartalmaz, (-) nem tartalmaz

5.3. Kriptikus vírusok előfordulása a jelenleg termesztett cukorrépa-fajtákban

A sopronhorpácsi Beta Kutató Intézet Kht. 2004. évi teljes fajtasorát - 28 cukorrépa-fajtát - vizsgáltuk meg dsRNS-specifikus immunoblottal, hogy átfogó képet nyerjünk a BCV vírusok jelenlegi elterjedéséről. Ez a fajtagyűjtemény jól reprezentálja a ma Magyarországon termesztésben lévő fajtákat. Erre a vizsgálatra azért volt szükség, mert míg csoportunk korábbi kutatásai során a véletlenszerűen kiválasztott cukorrépa-fajtáknál és egyedeknél mindig azonosítani tudtuk BCV1-t tartalmazó növényeket, a megváltozott fajtahasználat miatt másfél-két éven keresztül nem sikerült BCV1-t kimutatnunk a begyűjtött mintákban. Kísérleteink eredményét a 16. ábrán demonstráljuk, az összefoglaló áttekintés a 7. táblázatban látható. A bemutatott ábrán azonnal szembe ötlük, hogy a vizsgált cukorrépa-fajtákban leggyakrabban a BCV2 vírusra jellemző (*Beet cryptic virus 2*) genomi dsRNS-ek fordulnak elő, amelyeket 28 fajtából 14-ben tudtuk kimutatni. A *Beta* nemzetségben leírt másik két kriptovírus közül a BCV3 egyáltalán nem fordult elő ezekben a fajtákban, és a BCV1-t (*Beet cryptic virus 1*) csak egy mintában detektáltuk. Az irodalmi adatoktól eltérően hét mintában megjelent egy megközelítőleg 3–3,5 kbp hosszúságú dsRNS páros is.



16. ábra: A cukorrépa kriptikus vírusok elterjedtségének vizsgálata a 2004. évben termesztésben lévő cukorrépa-fajtákban immunoblottal. Az első három sorban a markerek láthatók: M1, élesztő killer vírus L-A dsRNS; M2, BCV2; M3, BCV1. Az 1-14 sávokban a vizsgált cukorrépa-fajtákban talált dsRNS mintázatot figyelhetjük meg, a számozás a 7. táblázatban megadottnak megfelelő. A BCV2 vírus a bemutatott fajták zömében kimutatható, BCV1 csak a Mars fajtában (13), az ismeretlen eredetű, 3-3,5 kbp becsült méretű dsRNS páros pedig a Canastában (8).

Szeretném hangsúlyozni, hogy mivel a kriptovírusok előfordulása egyedről egyedre eltérő lehet, ezért csak a pozitív eredményeink bizonyító értékűek. A 7. táblázat alapjául szolgáló kísérleteket szűrőpróbaszerűen végeztük, és csak néhány egyedet vizsgáltunk meg. A ké-

sőbbi analízisekre kiválasztott fajtáknál szisztematikus vizsgálatokat is végeztünk. Az Apolló fajtánál a BCV2-re jellemző dsRNS-ek gyakorlatilag minden egyedben előfordultak, míg a Mars fajtánál a BCV2 az egyedek kb. 90 %-ában, míg a BCV1 az egyedek 10 %-ában volt jelen.

7. táblázat: A különböző cukorrépa-fajtákban előforduló dsRNS-ek és putatív kriptikus vírusok összefoglaló táblázata.

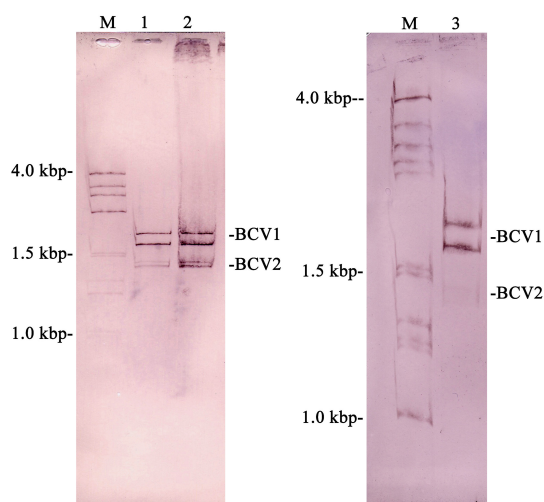
No.	Cukorrépa fajták	BCV1	BCV2	Ismeretlen dsRNS	No.	Cukorrépa fajták	BCV1	BCV2	Ismeretlen dsRNS
1	Gazeta	—	—	—	15	Delphina	—	—	—
2	Apollo	—	+	—	16	Goldorak	—	+	—
3	Cronos	—	+	—	17	Triplex	—	+	—
4	Picasso	—	+	—	18	Canaria	—	+	+
5	Baltika	—	+	—	19	Federica	—	+	+
6	Mondial	—	—	—	20	Chellabeta	—	—	—
7	Casino	—	+	—	21	Franklin	—	—	+
8	Canasta	—	+	+	22	Brigitta	—	—	—
9	Bounty	—	+	—	23	Evelina	—	—	+
10	Gábor	—	—	—	24	Clementina	—	—	—
11	Flair	—	+	—	25	Oregon	—	—	+
12	Ruist	—	—	—	26	Belinda	—	—	+
13	Mars	+	+	—	27	Georgina	—	—	—
14	Libero	—	+	—	28	Lolita	—	—	—

5.4. *Beta vulgaris* cv. Mars növényekből izolált dsRNS-k jellemzése

A *Beta vulgaris* cv. 'Mars'-ban előforduló putatív virális dsRNS-ek molekuláris vizsgálatához használt dsRNS-eket a teljes nukleinsav kivonatból először CF-11 oszlopkromatográfiával tisztítottuk meg. A csoportunkban végzett korábbi vizsgálatokból tudjuk, hogy a CF-11 cellulóz kromatográfiás tisztítás nem szolgáltat cDNS-szintézisre és klónozásra alkalmas tisztaságú dsRNS-eket (Veliceasa és mtsai., 2006). Mivel szekvencia információ híján a cDNS-szintézis és a későbbi PCR-amplifikáció során random primerekkel kényszerültünk dolgozni, mind a DNS-, mind a ssRNS-szennyeződések nagyon veszélyesek, mert a dsRNS-nél hatékonyabban amplifikálódnak. Éppen ezért a dsRNS-frakciókat további tisztításoknak vetettük alá, első lépésben DNáz I emésztésnek. Ezt követően a ssRNS szennyezők eltávolítására RNáz A enzimmel kezeltük a mintát, ugyanis az RNáz A magas só koncentrációjú oldatban (3x SSC; 450 mM NaCl, 45 mM Na-citrát (pH 7,2)) csak az egyszálú RNS-eket bontja, a duplaszálúakat nem. Ez a módszer (CF-11 oszlopkromatográfia, DNáz I kezelés és RNáz A emésztés magas

só koncentráció mellett) egyben alkalmas a nukleinsav minta dsRNS voltának megerősítésére is (Valverde és mtsai., 1990). A tisztítást eredményét 5 % poliakrilamid-1xTBE gélen való futtatással, illetve dsRNS-specifikus immunoblottal ellenőriztük (17. ábra). Az izolálási és tisztítási procedúrát követően 1g *Beta vulgaris* cv. Mars levélből 5 ng dsRNS-t tudtunk izolálni.

A tisztított dsRNS kivonatban négy, a kriptikus vírusok mérettartományában migráló dsRNS fragmentumot figyeltünk meg, melyek molekulamérete 1300 és 2000 bp közé esett (17. ábra, 1. sáv). Az izolált dsRNS-k becsült molekulamérete a *Beta* nemzetségben már korábban leírt *Beet cryptic virus 1* és -2 kriptovírusok genom méretével egyezik meg (Accotto és Boccardo, 1986). Mind a négy dsRNS molekula kimutatható volt a *Beta vulgaris* cv. 'Mars' teljes nukleinsav kivonatában és a *Beta vulgaris* cv. 'Mars'-ból izolált virionokban is (17. ábra, 2. és 3. sáv).

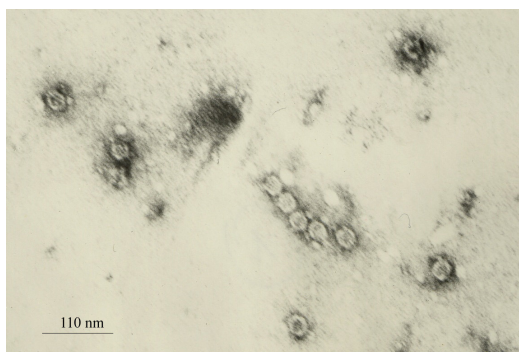


17. ábra: *B. vulgaris* cv. 'Mars' növények dsRNS tartalmának vizsgálata dsRNS-specifikus immunoblottal. M, Rizstörpülés vírus dsRNS molekulaszúlya marker 1, *B. vulgaris* cv. Mars teljes nukleinsav kivonatából CF-11 oszlopkromatográfiával izolált dsRNS; 2, *B. vulgaris* cv. Mars teljes nukleinsav kivonata; 3, *B. vulgaris* cv. Mars leveleiből izolált virionokból kivont dsRNS.

A további kísérletek szempontjából célszerűnek látszott az egyes dsRNS molekulák (vagy legalább a BCV1 és BCV2 vírus genom) szétválasztása is, ami gélelektroforézissel történt. Ezt a *B. vulgaris* cv. 'Mars' növényekből izolált, CF-11 oszlopkromatográfiával tisztított, DNáz I és RNáz A enzimekkel kezelt és gélből visszaizolált dsRNS-t használtuk a BCV1 és BCV2 vírusok klónozási kísérleteihez.

5.5. BCV1 és BCV2 virionok elektronmikroszkópos vizsgálata

Mars fajtájú cukorrépák leveleiből több lépéses ultracentrifugálással vírusrészecskéket izoláltunk (4.6. fejezet), majd negatív festést követően a BCE Központi Laboratóriumában elektronmikroszkóppal megvizsgáltuk a virionok morfológiai tulajdonságait. A preparátumokban a kriptovírusokra jellemző vírusrészecskéket figyeltünk meg. A virionok 32-35 nm átmérőjűek és izometrikus felépítésűek voltak, és nem vette őket körül lipid burok (18. ábra). Az 5.4. fejezetben leírtakkal együtt eredményeink alátámasztják, hogy a nukleinsav-kivonatból tisztított dsRNS-ek a kriptovírusok genomi dsRNS-ének felelhetnek meg, tehát felhasználhatók a genomi szekvenciák meghatározására.



18. ábra: *B. vulgaris* cv. Mars növényekből izolált virionok elektronmikroszkópos felvétele. A virionok 32-35 nm átmérőjűek és izometrikus felépítésűek.

5.6. Beet cryptic virus 1 (BCV1) molekuláris jellemzése

5.6.1. BCV1 dsRNS1 (RdRp) szekvencia meghatározása

A BCV1 RdRp-t kódoló szegmenséről Natalya Enünlü kísérleteiből már álltak rendelkezésemre szekvenciaadatok. Mivel a szekvencia 5'- és 3'-végei hiányoztak, és más fajtából izoláltuk a BCV1 dsRNS-eket, a teljes szekvencia klónozását és jellemzését elvégeztük.

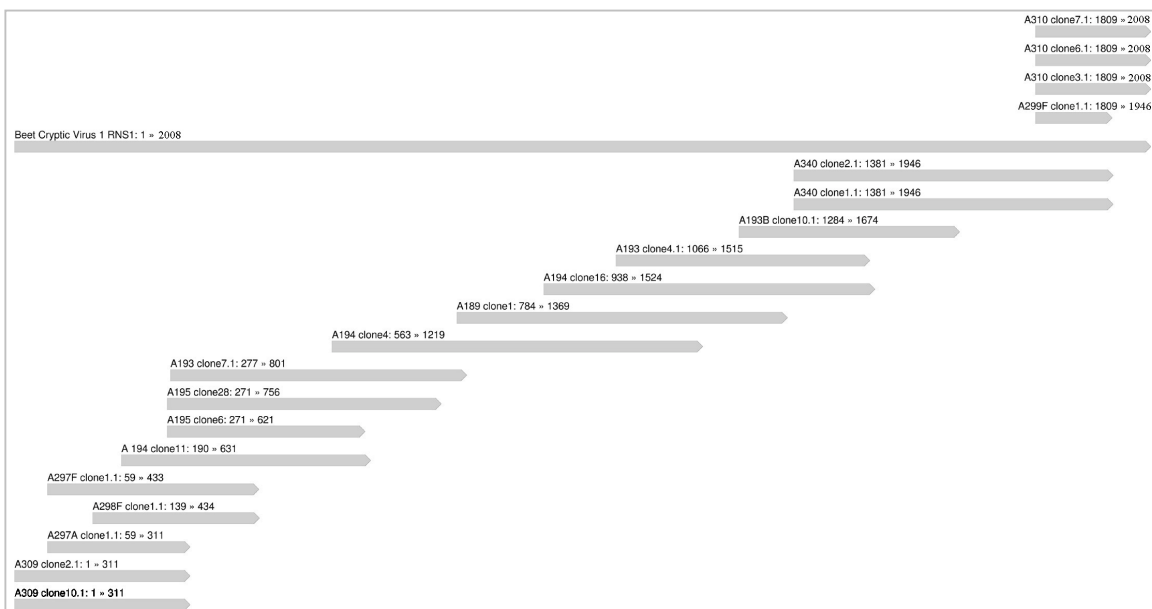
Az iniciális cDNS szintézist random primerekkel (UNRH) indítottuk (Choi és mtsai., 1999), melyhez CF-11 oszlopkromatográfiával tisztított és DNáz I és RNáz A enzimekkel kezelt ~2000 bp nagyságú dsRNS1 molekulát használtunk templátként (17. ábra). A random primerekkel nyert klónok (A194/11, A195/6, A195/28, A193/7/1, A194/4, A189/1, A194/16, A193/4/1 és A193B/10/1) összeillesztéséből egy 1484 nt hosszúságú contigot hoztunk létre (19. ábra), amely 99 %-ban azonosnak bizonyult a Natalya Enünlü által meghatározott szekvenciareészlettel. Az újonnan meghatározott szekvencia mindössze 12 nukleotid eltérést

tartalmazott, amely hat esetben aminosavak cseréjét is eredményezte, az egyik aminosav csere az RNS-függő RNS-polimeráz 5. konzervált motívumát is érintette.

Az 1484 bp hosszúságú contiggal elvégzett szekvencia összehasonlítások rendkívül érdekes eredményt hoztak. Azt találtuk ugyanis, hogy a BCV1 dsRNS1 parciális szekvenciája feltűnően hasonló (78 és 75 %) a pillangós virágú növényekből izolált *White clover cryptic virus* (AY705784), valamint és *Vicia cryptic virus* RNS-függő RNS-polimeráz kódoló dsRNS1 szegmenseihez (Boccardo és Candresse, 2005a; Blawid és mtsai., 2007). A Natalya Enünlü kísérleteiből szárazó részleges eredmények több évvel megelőzik a WCCV1 és VCV dsRNS1 szekvenciák publikálását, ez az oka annak, hogy csak a kísérletes munka folytatása közben derült fény e vírusok közötti fennálló hasonlóságokra (Enünlü és mtsai., 2003).

A BCV1, VCV és WCCV1 dsRNS1-ek között meglévő nagyfokú hasonlóságot felhasználtuk a klónozási munka folytatásához. Arra a feltételezésre alapoztunk ugyanis, hogy a dsRNS1 5', illetve 3' nem transzlálódó végei esetében is a belső régióknál már megfigyelt mértékű hasonlóságot találjuk. Az adatbázisban elérhető VCV és WCCV1 homológ dsRNS1 szekvenciái alapján primereket terveztünk az 5' és 3' nem transzlálódó régiókra, valamint az ORF kezdeti szakaszaira (5' UTR forward primer: NP66; 3' UTR reverz primer: NP68 és az ORF kezdeti szakaszaira NP67 forward primer). A VCV és WCCV1 dsRNS1-specifikus primerek mellett BCV1 dsRNS1-specifikus primereket is használtunk a cDNS szintézis és a PCR (A297 [NP67-NP04]; A298 [NP68-NP04]; A299 [NP05-NP68] és A340 [NP26-NP68] jelöléssel) során. A klónozott PCR termékek szekvenálását követően egy 1949 bp hosszúságú contigot alakítottunk ki.

A dsRNS1 5'-, ill. 3'-végek pontos meghatározása nem bizonyult egyszerű feladatnak, és csak a dsRNS molekulák 3' végeinek polyA-polimerázzal való jelölésével tudtuk elérni a kívánt eredményt. Ugyanezt a jelölést használták Xie és munkatársai a BCV3 dsRNS2 szekvencia meghatározásánál (Xie és mtsai, 1993) is. A cDNS szintézist és a PCR-t a polyA szakaszra tervezett oligo(dT) primerrel és dsRNS1-specifikus belső primerekkel hajtottuk végre (A309 [oligo(dT)-NP04]; A310 [NP05- oligo(dT)] jelöléssel).



19. ábra: A BCV1 dsRNS1 szekvenciájának meghatározására szolgáló független cDNS-klónok elhelyezkedése. A cDNS-klónok zömét a *UNRH* random primereket használva nyertük. A hiányzó 1674–1809 bp közötti régiót BCV1-specifikus primerek, az 5'- illetve 3'-végeket oligo(dT), valamint a VCV és WCCV1 dsRNS1-ből levezetett primerek segítségével előállított klónokból határoztuk meg. Az ábrán a klón jelölésén kívül a lefedett szekvencia régiót is megadtuk. Minden levezetett szekvencia legalább két független klón szekvenciáján alapul és a klónok átfednek.

A BCV1 dsRNS1 teljes szekvenciáját húsz egymással átfedő, független cDNS-klónból határoztuk meg (19. ábra). A dsRNS1 szekvencia minden részletét legalább két egymástól független klónnal erősítettük meg. Azokban az esetekben, ahol a párhuzamos klónok szekvenciái eltértek egymástól (ez huszonöt nukleotid esetében fordult elő) további független klónokat szekvenáltattunk és használtunk fel a végleges nukleotid sorrend kialakításához.

A BCV1 dsRNS1 2008 nt hosszúságú (20. ábra), a molekulát felépítő nukleotidok guanin-citozin (GC) tartalma 46 %-os. A szekvencia számítógépes analízise során a dsRNS1 pozitív szálán egy 1851 nt hosszúságú ORF-t azonosítottunk. A negatív szálon nem találtunk nyílt leolvasási keretet. Az azonosított ORF start kodonja, az AUG a 94-96, az UAA stop kodon pedig az 1942-1944 pozícióban helyezkedik el (20. ábra).

1 GAUCAAAGA GUAACAGCUC UUGCCCAUUAUUUUCAAGAU CAAAUAAGAA AUUGAAUCUU AGCUGCUCUA CCUCAACUUG UUAUCUACU
M D Y L T S A F N R I T H W F N V P S N L E Y I G T F S L
91 UAAAUUGGAU ACCUUAACCC CGCAUUAAC AGAUACACAC ACUGGUUCAA CGUCCCUUCC AACUUGGAU ACAUCGGAAC CUUUUCGUC
P P G I L R V N E V A I S N H K K T L E H S F N K Y L Y A H
181 CCCCCGGGA UUCUACGUGU CAACGAAGUU GCUUUUUAU AUCACAAGAA AACGUUGGAA CACUCUUUA ACAAGUACCU UUAUGCACAU
E I K L I T Q D Y R R S D I D E E S I L A D F F S G D V E K
271 GAAUCAAAU UAAUCACCCA AGACUAUCGC CGCUCUGACA UAGAUGAAGA AUCUAUACUA GCCGAUUUCU UUUCCGUGA CGUCGAAAAG
F E V P F D E H V E T G L R C M A D T F R P P R L C R P A H
361 UUCGAAGUAC CCUUUGACGA ACACGUCGAA ACCGUCUAC GUGUAGUGG AGACACUUUC CGUCCGCCUA GACUUUGCCG CCUCGUCAC
I L D V K H G Y P Y K W N V N A E P P F S T D E Y F L N Q R
451 AUCUAGAUG UCAAGCACGG AUUCCUUAU AAGUGGAAG UCAACGUGA ACCCCCGUUC UCCACUGAGC AAUACUUCU CAACCAACGU
K T F G E F I R M H E Y E H I D K A D F F R R H P N T E S H
541 AAGACAUUUG GCGAAUUAU ACGAUGCAC GAAUACGAAC ACAUAGUAU AGCUGACUUU UUCGCGGUC ACCCAACAC UGAUACAC
D L I R T I V P P K F G Y L K S M I F S W T R R W H H I T K
631 GAUUUGAUA GGACAAUUGU UCCACCAAAA UUCGCUUAU UAAAAUGAU GAUUAUUUCU UGGACACGUC GCUGGUAUA CAUACAAAA
E G F T E S T G L H T T T G Y F Y N R F I F P M L L H T K T A
721 GAAGGAUCA CUGAAUACAC UGGAUACAC ACCACCGGAU ACUUCUACAA CCGUUUUUUC UUCGCCAUGC UACUACACAC CAAAACUGCU
I V K Q D D P N K M R T I W G A S K P W I I A E T M L Y W E
811 AUUGUAAAC AGGACGACCC UAACAAGAU CGCACCAUUAU GGGGCGCCUC UAAACCAUGG AUCAUCGCCG AACAGGACCU CUACUGGAA
Y I A W I K L N P S V T P M L W G Y E T F T G G W F R L N R
901 UACAUUGCUU GGAUAAAACU CAACCCUAGC GUCACUCCA UGCUUUGGG UUACGAAAC UUCACAGGUG GCUGGUUCAG ACUGAACCGA
D L F C G F L O R S F L T L D W S R F D K R A Y F P L L R R
991 GACUUAUUU GCGUUUUCU CCAACGUCUC UUCUCUACU UGGAUUGGUC ACGUUUUGAC AAGCGUGUCU ACUUCGCCUC CUUGCGCCG
I L Y T A R T F L T F D E G Y V P T H S A P T H P Q W D H T
1081 AUUUUAUACA CUGCCCGCAC CUUCCUACU UUCGACGAAG GAUACGUCC UACACAUUA GCACCUACCC AUCCUUAACU GGACCAACU
K A I R L E R L W L W T L E N L F E A P I I L P D G R M Y R
1171 AAAGCAUCA GACUUGAACG ACUAUGGCUA UGGACCUUG AAAACCUUUU CGAGGCACCU AUCAUCCUAC CUGACGUGAU AAUGUACAGA
R H F A G I P S G L F I T Q L L D S W Y N Y T M L A T L L S
1261 CGCCAUUCG CCGGAUACU UUCGCGACUG UUAUCACCC AAUUGCUGCA CUCUUGGUAC AACUAUACA UGUUGGCCAC UCUCUGGAA
A L G F D P K H C I I K V Q G D D S I I R L N V L V P Q D Q
1351 GCACUUGGCU UCGACCCCAA ACACUGCAUA AUUAAAGUAC AAGGCGAUGA UUCAUAUAC CGACUUAACG UACUAGUAC ACAAGAUCAG
H Q N L M D N L V Q L A V N Y F N A V V N V K K S E F G N S
1441 CACCAAAAUU UAAUGGACAA CCUCGUCCAA CUUGCUGUCA ACUACUCAA UGCAGUGUUA AUUGCAAGA AGUCCGAUUA CGGCAACUCA
L N G R E V L S Y R N H N G F P H R D E I M M L A Q F Y H T
1531 CUCAAUGGUC GUGAAGUCCU AUCCUACCGC AUACACAAGU GGUUCCCCCA CCGUGACGAG AUCAUGAUGU UGGCCAGAU UUAACACAU
K A R D P T P E I T M A Q A I G F A Y A S C A N N K R V L W
1621 AAAGCUAGG ACCCAACACC UGAGAUACCC AUGGCACAAG CCAUAGGCUU CGCCUUAUGCU AGUUGCGCUA ACAUAAACG UGUCCUCUGG
A L K D V Y D Y Y K D L G Y T P N R A G L T L T F G D S P D
1711 GCACUUUAGG AUGUUUUGA CUACUACAAA GACUUGGGAU ACACCCCAA CCGAGCAGGC CUAACCCUGA CAUUCGUGA CUCGCCUGAU
L F V P E I S L E H F P T E T E I R R Y L T S T S Y L N E A
1801 CUUUUUGUUC CCGAAUUCU UCUGAACAU UUCGCCACCG AGACUGAGAU ACUGGUUAU UUAACGAGUA CCUCUUAUC CAAUGAAGA
Q N A R T W P R T L F I N A P A Q
1891 CAGAAGCUC GCACUGGCC GAGAAGUUG UUCAUCAACG CUCCGUCUA GAAAAGCCG AUCGUUUUGU UUGUUUAAA GAAAAA

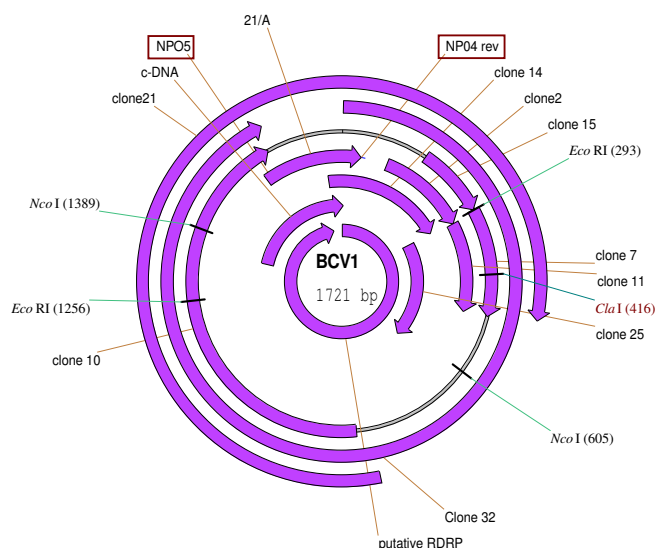
1981 AAAAAAAAAA AACAAAUAU AUUUGUC

20. ábra: A BCV1 dsRNS1 pozitív szálának nukleotid szekvenciája és az ebből levezetett fehérje szekvencia. A BCV1 dsRNS1 2008 nt, egyetlen nyílt leolvasási kerete egy 616 aminosav hosszúságú fehérjét kódol. Az 5' (93 nt) ill. 3' (64 nt) nem transzlálódó régiók ezt az ORF-t szegélyezik.

Az 5' nem transzlálódó régió (5' UTR) 93 nukleotid hosszú és az 5'-GAU CAA AAG AGU AAC AGC UC...-3' szekvencia-részlettel kezdődik. Tartalmazza a partitívirusok 5' UTR-jeire jellemző CAA és CAAA ismétlődő szekvenciákat (Strauss és mtsai., 2000). Az adozinban és uracilban gazdag, 64 nt hosszúságú 3' nem transzlálódó régió (3' UTR) az ORF-t követően helyezkedik el. A dsRNS1 molekulát egy 22 nt hosszúságú adozin véget is tartalmazó szekvencia zárja. A BCV1 dsRNS1 szekvenciát a GenBank nemzetközi adatbázisban az EU489061 azonosító szám alatt helyeztük el.

Natalya Enünlü a BCV1 cDNS-klónok analízise során meglepetésre azt találta, hogy azok egy gyűrű mentén is elrendezhetők, vagyis a genomi dsRNS1 valószínűleg cirkuláris formát is felvehet (Enünlü és mtsai., 2003). A cirkuláris dsRNS molekulát 1721 bp alkotja, az 1677 bp hosszúságú nyílt leolvasási kerete, mely a lineáris dsRNS1 molekulával megegyező

frame-ben helyezkedik el, 559 aminosavból álló RNS-függő RNS-polimerázt kódol (21. ábra). A cirkularizáció meglétét egy független kísérletben, Mars fajtájú cukorrépából izolált teljes nukleinsav kivonatban is ellenőriztük. Az intergénikus régió amplifikálásához a részleges RDRP-szekvencia N- és C-terminális végeihez kötődő primereket (NP04 és NP05) használtunk és sikerült az elvárt, 225 bp méretű terméket amplifikálnunk, ami kizárólag cirkularizáció esetén lehetséges (Ilyés, 2006). Annak az eldöntéséhez, hogy a cirkuláris szerkezet a különböző mintákban domináns vagy csak a molekulák kis hányadában fordul elő, további kísérletek elvégzése szükséges. Az irodalomból viszont ismeretes, hogy a cirkularizációt számos vírus alkalmazza RNS-einek stabilitásának, és ezáltal fennmaradásának nagyban fokozására (Jian és mtsai., 1998).



21. ábra: A BCV1 RdRp-t kódoló dsRNS1 szegmenséből a N. Enünlü által előállított cDNS-klónok cirkulárisan rendezhetők el. Az ábrán nem kódoló régió amplifikációjára alkalmas NP04-NP05 primerpár helyét, néhány restrikciós helyet és a cirkuláris cDNS kialakításához használt klónok elhelyezkedését jelöltünk be (N. Enünlü kísérletei és ábrája szerint).

5.6.2. A putatív RdRp jellemzése

A BCV1 dsRNS1 nyílt leolvasási kerete 616 aminosavból (AA) álló fehérjét kódol, melynek számított molekulamérete 72,5 kDa. Ez a protein az NCBI adatbázisban található szekvenciák közül a *Partitiviridae* család vírusainak RNS-függő RNS-polimerázaival mutatja a legnagyobb hasonlóságot. A *Partitiviridae* családon belül 88,1 %-ban bizonyult hasonlóknak az *Alphacryptovirus* nemzetségbe tartozó WCCV1 RdRp-jével (AAU14888) és 86 %-ban a

VCV RdRp-jével (AAX39023). Mindhárom polimeráz szekvencia azonos hosszúságú, 616 aminosavból áll és folytonossági hiány engedélyezése nélkül egymás alá rendezhetők (22. ábra).

BCV1 RDRP	1	MDYLTSAFNRITHWFLNVPSNLEYIGTFSLPPGILRVNEVAISNHHKTLEHSPNKYLVAHEIKLIHQDYRRSDI
VCV RDRP	1	MDYLTSAFNRITHWFLITPTNFYFYGIFSLPPGILRVNDVAIANHRCLETSFHTYLFDEHEIKRIMIDHRRSDI
WCCV1 RDRP	1	MDYLITAFNRITHWFLITPTNLEYIGSYSLPPGILRVNDVAVANHRATLDRSFDKYLVEHEINLIKEYRRSPIT
		*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BCV1 RDRP	74	DEESTLADFFSGDVEKFEVPPFDEHVEITGLRCMADAFRPPRLCRPAHILDVKHGYPKWNVNAEPFSTDEYFL
VCV RDRP	74	TEDSILEDFAGDFPYFEVPPFDEHVEYGLQCMADAFRPPRCRPAHILDVKHGYPKWNVNAEPFSTDEYFL
WCCV1 RDRP	74	DEDSILEDFSGDLPYFEIPFDEHVERGLICMAAFRPPRCRPAHILDVKHGYPKWNVNAEPFSTDEYFL
		* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BCV1 RDRP	147	NQRKTFGEFIRMHEYEHIDKADFFRRHPNIESHDLIRTIIVPPKFGYLKSMIFSWTRRWHHIKEGFTESITGLH
VCV RDRP	147	TQRKTFGEFIRMHEYEHIDKDDFFRRHPNLESHDFLRTIIVPPKFGYLKSTIFSWTRRWHHIKLGFTDTITGLD
WCCV1 RDRP	147	SQRKTFGEFIRMHEYEHIDKEDFFRRHPNIESHDFLRTIIVPPKFGFLKSMIFSWTRRWHHIKSGEQDSTIDLE
		***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BCV1 RDRP	220	TITGYFNRFIFPMLLHTKTAIVKQDPNKMRTIIGWASKPWIIEATMLYWEYIAWIKLNPVTPMLWGYETFTG
VCV RDRP	220	NNGYLYNRFIFPMLLHTKTAIVKQDPNKMRTIIGWASKPWIIEADTMFYWEYQAWVKHNPVTPMLWGFETFTG
WCCV1 RDRP	220	QITGYFNRFIFPMLLHTKTAIVKQDPNKMRTIIGWASKPWIIEATMFIWEYLAWIKHNPVTPMLWGYETFTG
		** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BCV1 RDRP	293	GWFRLNRLFCGFLQRSFLTLDWSRFDKRAYFPLLRILYIARTFLTFDEGYVPTHSAPTHPQWDHTKAIRLE
VCV RDRP	293	GWFRLNQLFCGLIRRSFILTLDWSRFDKRAYFPLLRIMYTVKSFITFEGYVPTHAAPNHPQWNQDKTDKLE
WCCV1 RDRP	293	GWFRLNHEFCGLIORSFLTLDWSRFDKRAYFPLLRILYIVKTFITFEGYVPTHAAPTTPQWQGENIDRLE
		***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BCV1 RDRP	366	RLWLWTLENLFEAPIILPDGRMYRRHFAGIPSGLFIQQLDSWYNYTMLATLILSALGFDPKHCIIKVQGDDSI
VCV RDRP	366	RLWLWTLENLFEAPIILPDGRMYRRHFAGIPSGLFIQQLDSWYNYTMLATILHALGFNPSNCIIKVQGDDSI
WCCV1 RDRP	366	RLWLWTLENLFEAPIILPDGRMYRRHFAGIPSGLFIQQLDSWYNYTMLATILSALHFDPLHCIIKVQGDDSI
		***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BCV1 RDRP	439	IRLNVLVPODQHONLMDNLVQLAVNYFNAVVNVKKSEFGNSLNGREVLSYRNHNGPFRDEIMMLAQFYHTKA
VCV RDRP	439	IRLNVLVPSERHDHLSRIVELAEYFNYSIVNVKKSEIRNRLNGCEVLSYRNHNGLFRDEIAMLAQFYHTKA
WCCV1 RDRP	439	LRITLIVVDQHTNFMHIVRLADTYFNSIVNVKKSEVRNSLNGCEVLSYRNHNGLFRDEITMLAQFYHTKA
		** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BCV1 RDRP	512	RDPTPEITMAQAIGFAYASCANNKRVLWALKDVIYDYKDLGYTPNRAGLTLTFGDSPLTFVPEISLEHFPTET
VCV RDRP	512	RDPTPEITMAQAIGFAYASCATHTRVLWLEDIYNYRDQGYTPNRAGLTLTFGDSPLTFPEMLDHFPTKS
WCCV1 RDRP	512	RDPTPEITMAQAIGFAYASCANHNRVLWLEDVYNYRDLGYRPNRAGLTLTFGDSPLTFPEMLDHFPTKS
		***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BCV1 RDRP	585	EIRRYLTSTSYLNEAQNARTWPRTLFINAPAQ
VCV RDRP	585	EIVRYLTCINRYRNEAQNARTWPRTLFINAPAE
WCCV1 RDRP	585	EIRRYHTEHYQNEAQNARTWPRTLFINAPGE
		** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

22. ábra: *Beet cryptic virus 1*, *Vicia cryptic virus* (AAX39023) és *White clover cryptic virus 1* (AAU14888) RNS-függő RNS-polimerázainak összehasonlító analízise. A BCV1 dsRNS1 által kódolt fehérje 80,6 %-os azonosságot mutat a VCV és 82,3 %-os azonosságot a WCCV1 RdRp-jével. Mindhárom fehérje 616 AA hosszúságú és az összehasonlításánál nem figyelhető meg egyetlen szekvencia folytonossági hiány sem. Az aminosavak teljes egyezését sárga alapon piros színnel és az oszlop alá helyezett csillaggal jelöltük, a részleges egyezést pedig szürke alapon kék színnel jelöltük.

Szintén jelentős, 68 %-os hasonlóság figyelhető meg a *Partitivirus* nemzetségbe tartozó *Amasya cherry disease-associated partitivirus* (CAG77604) és a *Cherry chlorotic rusty spot-associated partitivirus* (YP138538) polimerázaival is. Azonban amíg a BCV1, VCV és WCCV1 valamennyien növényi vírusok, addig az *Amasya cherry disease-associated*

partitivirus és a *Cherry chlorotic rusty spot-associated partitivirus* a cseresznye klorotikus fertőzésével asszociáltan jelentkező gombavírusok. Jelenlegi ismereteink szerint úgy tűnik, hogy az ACD és a CCRS elnevezések csak földrajzi elkülönülést jelentenek, ugyanis a betegségek tünetei, illetve a vele asszociáltan jelentkező vírusok molekuláris jellemzői alapján e két fertőzés azonosak tekinthető (Covelli és mtsai, 2004). Azt azonban mindenképpen meg kell jegyeznünk velük kapcsolatban, hogy e vírusok gombavírus-természete jelenleg még nem teljesen tisztázott.

A többi növényi kriptikus vírus RdRp-jével az előbbieknél kisebb mértékű hasonlóság figyelhető meg: *Raphanus sativus cryptic virus 1*: 40,8 % (AAX51289); *Fragaria chiloensis cryptic virus*: 24,5 % (YP001274391); *Raphanus sativus cryptic virus 2*: 23,0 % (ABB04855); *Beet cryptic virus 2*: 23,5 %; *Beet cryptic virus 3*: 22,4 % (AAB27624).

A dsRNS1 egyetlen nyílt leolvasási kerete által kódolt fehérjén azonosíthatók a kriptikus vírusok replikázára jellemző motívumok, mely régiók fontos szerepet játszanak a fehérje polimeráz funkciójának betöltésében. Az eukarióta ssRNS és dsRNS vírusok RdRp motívumai - ellentétben a polimeráz motívumon kívül eső részeivel - rendkívül konzerváltak. A konzervált aminosav régiókat a ssRNS és dsRNS vírusok RdRp szekvenciával végzett összehasonlítások, ill. szerkezeti analízisek során határozták meg, és nyolc konzervált aminosav motívumot azonosítottak, melyeket számokkal jelöltek (Bruenn, 1993). A *Partitiviridae* családba tartozó növényi- és gombavírusok RdRp-iben az 1-es, illetve 2-es motívumok kevésbé konzerváltak (Ghabrial, 1998), így a *Partitiviridae* család virális RdRp-inek összehasonlítását mi is csak a 3-tól 8-ig terjedő motívumokra végeztük el (Crawford és mtsai., 2006).

Ezen konzervált régiók azonosíthatók valamennyi *Partitiviridae* családba tartozó növényi- és gombavírusok RdRp-jében is (23. ábra). A konzervált szekvencia részletek összehasonlító analíziséből kitűnik, hogy a BCV1, VCV és WCCV1 motívumai csaknem azonosak (98 %-ban), mindössze egy aminosav eltérés figyelhető meg a 8. motívumban. Az összehasonlításban szembetűnő az is, hogy a BCV1 motívumaival az ACD-PV és a CCRS-PV RdRp-i 90,4 % -ban azonosak. Öt aminosav esetében figyelhető meg eltérés a 4., 5. és 8. motívumokban. Az ötből azonban két esetben leucin - izoleucin, egyszer pedig lizin - arginin szubsztitúció, azaz konzervatív aminosav csere következett be.

Az 23. ábrán a BCV1, VCV, WCCV1, ACD-PV és CCRS-PV csoport egy a többiektől jól elkülönülő alcsoportot alkot a *Partitiviridae* családon belül. Különösen éles határvonal figyelhető meg a BCV1, VCV és WCCV1 hármast és az *Alphacryptovirus* nemzetség többi

kriptikus vírusa között. Itt nemcsak az aminosav szekvenciákban találtunk eltéréseket, hanem az egyes konzervált szekvencia motívumok egymástól való távolsága is jelentősen különbözött.

RDRP	3	4	5	6	7	8					
OPV1	PKTRLVW	54	DFSFDTKVP	61	GVPSSWWTQIMDSVVN	19	VLGDDS	38	KLLGVK	7	RPTLEW
DdV1	PKTRLVW	54	DFSFDKSKVP	61	GVPSSWWTQIIDSVVN	19	VLGDDS	38	KLLGTK	7	RSTDEW
AoV	PKTRLVW	55	DFSFDKSKVP	61	GVPSSWWTQMVDSVVN	19	VLGDDS	38	KLLGTT	7	RDTDEW
FpV1	LKQRPVY	54	DWSGFDQRLP	72	GVPSSMLNTQFLDSFGN	24	IMGDDN	44	EITLSYQ	7	RPIGKL
CPV	LKVRPVN	55	DWSKFDQTVP	93	GVPSSILCTQLIDSFVN	24	LMGDDN	44	EILGYT	7	RSLSKL
OMV2	PKVRLVF	55	DWSGFDARYAR	74	GIYSGYMQTQLIDSLYN	21	VOGDDS	39	EVLKYR	7	RDPIAL
RsCV1	PKIRTVF	60	DWSEFDMRVY	66	GMPSSGIFCTQFWDSEFYN	22	VLGDDV	46	QVLSYI	7	RDSNQL
HmV12	DKVRTVF	61	DWSEFDMRVY	79	GMPSSGIFCTQFYDSFYN	21	LMGDDA	46	TVLSYT	7	RSADV
ACD-PV	NKMRTIW	60	DWKRFDKKAY	71	GIPSSGLFITQLIDSWYN	21	VOGDDS	46	EVLSYR	7	RDELAM
CCRS-PV	NKMRTIW	60	DWKRFDKKAY	71	GIPSSGLFITQLIDSWYN	21	VOGDDS	46	EVLSYR	7	RDELAM
BCV1	NKMRTIW	60	DWSRFDKRAY	70	GIPSSGLFITQLLDWSYN	21	VOGDDS	46	EVLSYR	7	RDEITM
VCV	NKMRTIW	60	DWSRFDKRAY	70	GIPSSGLFITQLLDWSYN	21	VOGDDS	46	EVLSYR	7	RDEIAM
WCCV1	NKMRTIW	60	DWSRFDKRAY	70	GIPSSGLFITQLLDWSYN	21	VOGDDS	46	EVLSYR	7	RDEITM
FcCV	RKIRNVW	55	DWSGFDAVSQ	50	GIPSSGSCFTNIIGSIVN	19	THGDDS	40	SFLSRK	7	RDELIC
RmCV	RKIRNVW	55	DWSGFDAVSQ	50	GIPSSGSCFTNIIGSIVN	19	THGDDS	40	SFLSRK	7	RDELIC
RsCV2	TKVRNVW	55	DWSGFDAVSQ	50	GIPSSGSCFTNMIGSVVN	19	THGDDS	40	TFLSRS	7	RDEFVC
BCV3	TKVRGVW	55	DWSFDSSVT	50	GIPSSGYYSYTSIVGSVVN	20	TQGDDS	38	TFLGRT	7	RSLDKC
BCV2	MKVRGVW	55	DWQAFDATVS	50	GIPSSGYYSYTSIIGSVVN	19	TQGDDS	38	TFLGRT	7	RDLKRC
BrCV	TKVRGVW	55	DWSFDATVS	50	GIPSSGYYSYTSIIGSVVN	20	TQGDDS	-	-----	-	-----
PCV1	TKVRQVW	55	DWSQFDATVS	50	GIPSSGYYSYTSIVGSIIN	20	TLGDDS	-	-----	-	-----
PpV	TKIRNVW	54	DWKQFDATVS	50	GIPSSGYYSYTSIIGSIIN	20	TQGDDS	38	HFLGRT	7	REIKRC
PsPV	MKIRNVW	54	DWSGFDAVS	50	GIPSSGYYSYTMIVDTIIN	19	COGDDS	40	EYLGRT	7	BERQKV
	* *		* **		* ** *		***		*		*

23. ábra: Néhány *Partitiviridae* családba tartozó vírus RNS-függő RNS-polimeráz motívumának összehasonlító analízise. Az összehasonlításban szereplő vírusok neveinek rövidítésjegyzéke a GenBank-i azonosítószámokkal: **OPV1**, *Ophiostoma partitivirus 1* (CAJ31886); **DdV1**, *Discula destructiva virus 1* (NP116716); **AoV**, *Aspergillus ochraceus virus* (ABV30675); **FpV1**, *Fusarium poae virus 1* (AAC98734); **CPV**, *Ceratocystis polonica partitivirus* (AAP86639); **OMV2**, *Oyster mushroom isometric virus II* (AAP74192); **RsCV1**, *Raphanus sativus cryptic virus 1* (YP6565069); **HmV12**, *Helicobasidium mompa partitivirus VI-2* (BAD32678); **ACD-PV**, *Amasya cherry disease-associated partitivirus* (CAG77604); **CCRS-PV**, *Cherry chlorotic rusty spot-associated partitivirus* (YP138538); **BCV1**, *Beet cryptic virus 1*; **VCV**, *Vicia cryptic virus* (AAX39023); **WCCV1**, *White clover cryptic virus 1* (AAU14888); **FcCV**, *Fragaria chiloensis cryptic virus* (YP001274391); **RmCV**, *Rosa multiflora cryptic virus* (ABV89762); **RsCV2**, *Raphanus sativus cryptic virus 2* (ABB04855); **PsPV**, *Pinus sylvestris partitivirus* (AAY51483); **BCV3**, *Beet cryptic virus 3* (AAB27624); **BCV2**, *Beet cryptic virus 2*; **BrCV**, *Black raspberry cryptic virus* (ABU55400); **PCV1**, *Pepper cryptic virus 1* (ABC96789); **PpV**, *Pyrus pirifolia partitivirus* (BAA34783). Az egyes oszlopok fölött található számok megegyeznek RdRp motívumok szokásos jelölésével (Bruenn, 1993). Az aminosavak teljes egyezését sárga alapon piros színnel és az oszlop alá helyezett csillaggal jelöltük. A BCV1 RdRp motívum aminosavaival mutatott részleges egyezést szürke alapon kék színnel jelöltük.

5.6.3. BCV1 dsRNS2 (CP) szekvencia meghatározása

A BCV1 dsRNS1-gyel és az ebből levezetett fehérjével végzett szekvencia összehasonlítások fényt derítettek a BCV1, VCV és WCCV1 vírusok közötti nagyfokú – és nem várt – hasonlóságra. Bár a putatív köpenyfehérjét kódoló dsRNS2-k közötti hasonlóság a VCV (NC007242) és a WCCV1 (NC006276) esetében alacsonyabb volt, mint a dsRNS1 szekvenciák hasonlósága, a dsRNS2-ből levezetett fehérjék aminosav összetétele így is 65 %-ban azonos. Munkahipotézisként feltételeztük, hogy a nagyfokú hasonlóság a BCV1 dsRNS2-nél is fennáll, ezért az ismert VCV és WCCV1 dsRNS2 szekvenciák alapján degenerált primereket terveztünk a BCV1 dsRNS2 cDNS-szintéziséhez. Ehhez a homológ köpenyfehérjeszekvenciákban megkerestük azokat a régiókat, amelyek alkalmasak voltak a 18-20 nukleotid hosszúságú primerek tervezéséhez. Ezt követően a szekvencia-régiók egyezését nukleinsav szinten is ellenőriztük. Jellemzően az aminosavakat kódoló tripletek harmadik nukleotidjai között találtunk különbségeket. Ilyenkor figyelembe vettük ezen nukleotidok előfordulási gyakoriságát a kétszikű növényekben (Murray és mtsai., 1989), és ennek alapján választottuk ki a degenerált nukleotidot. Kizárólag olyan primereket terveztünk, szám szerint tizenháromat, amelyekben maximum három degenerált nukleotid fordul elő (8. táblázat).

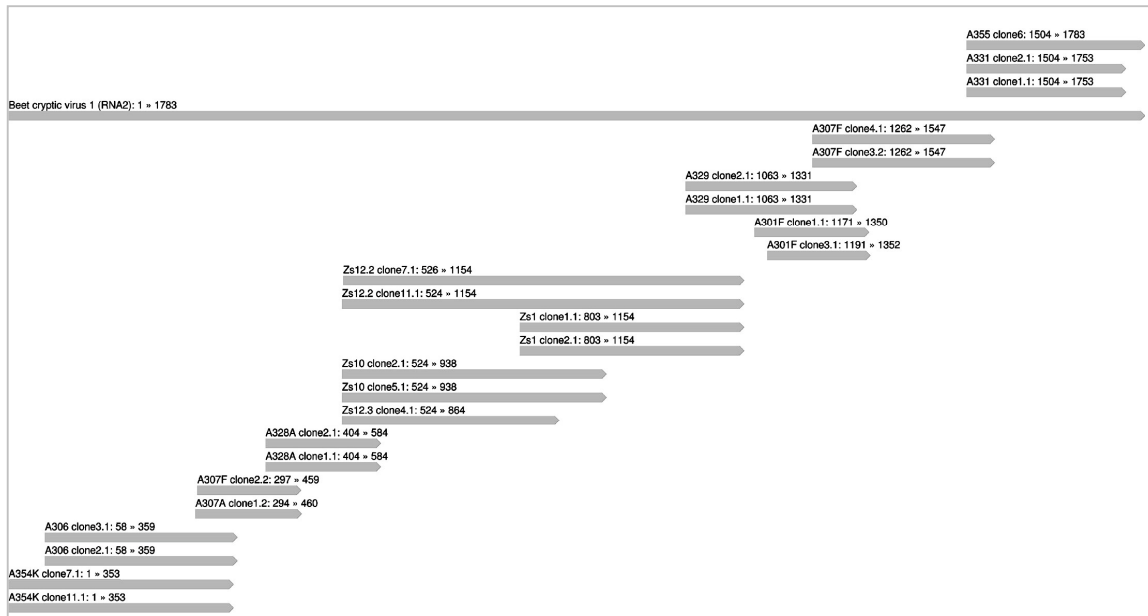
A dsRNS2 molekula cDNS szintézisét a 8. táblázatban bemutatott degenerált primerekkel kezdtük el. Ehhez a CF-11 oszlopkromatográfiával tisztított és DNáz I és RNáz A enzimekkel kezelt ~1700 bp nagyságú dsRNS2 molekulát használtuk templátként (17. ábra). Az A306/2/1, A306/3/1, A307F/1/2, A307F/2/2, Zs12/3/4/1, Zs10/5/1, Zs10/2/1, Zs1/2/1, Zs1/1/1, Zs12/2/11/1, Zs12/2/7/1, A301F/3/1, A301F/1/1, A307F/4/1 és A307F/3/2 klónok (elhelyezkedésüket lsd. a 24. ábrán) szekvenciája alapján három rövid contigot (401 bp, 630 bp és 372 bp) tudtunk kialakítani. A klónok pontos elhelyezkedését a VCV és WCCV1 dsRNS2-vel végzett szekvencia összehasonlítások segítségével állapítottuk meg. A hiányzó belső régiókat (360 bp – 524 bp és 1154 bp – 1171 bp között) szekvencia specifikus primerekkel (NP83-NP84 és NP85-NP86 primerpárok) végzett RT-PCR-rel és a klónozott PCR termékek szekvenálásával határoztuk meg. Az eredményeket felhasználva létrehoztunk egy 1489 bp hosszúságú egységes contigot.

8. táblázat: A VCV és WCCV1 köpenyfehérje szekvenciák alapján tervezett degenerált primerek listája.

Forward degenerált primerek			Reverz degenerált primerek		
VCV CP	347	GCT TAA CCC ATG TAC ACC GA A P A L L E L	VCV CP	356	ATG TAC ACC GAG CAA CCG CG M Y T E Q R R
WCCV1 CP	333	GCC TAC CCT ATG TAC ACC GA A P A L L E L	WCCV1 CP	342	ATG TAC ACC GAA CAA CGT CG M Y T E Q R R
NP70	5'	GCH TAY CCI ATG TAC ACC GA 3'	NP69	3'	TAC ATG TGG CTY GTT GCR GC 5'
VCV CP	450	CAA CTT TAC ATC TCT GTA CT Q L Y I S V L	VCV CP	513	CTG TAC TGT GGA ATG TTA TG S V L W N V M
WCCV1 CP	486	CAG CTT TAC GTC TCT GTC CT Q L Y V S V L	WCCV1 CP	499	CTG TCC TTT GGA ATG TTA TG S V L W N V M
NP72	5'	CAE CTT TAC RTC TCT GTI CT 3'	NP71	3'	GAC AIG AVA CCT TAC AAT AC 5'
VCV CP	641	GTC CCC TTC TTC CAA TCC TT V P F F Q S L	VCV CP	673	T GGC CCT TTT GAC TGG ATA G N G P F D W I G
WCCV1 CP	627	GTC CCC TTC TTC CAA TCC GT V P F F Q S L	WCCV1 CP	659	T GGC CCT TTT GAC TGG ATA G N G P F D W I G
NP74	5'	GTC CCC TTC TTC CAA TCC YT 3'	NP73	3'	ACC GGG AAA ACT GAC CTA TC 5'
VCV CP	779	CCC ATC CCT GCC ATC TTC CT P I P A L L I	VCV CP	935	TGT GGC TCA CTI TTC ACC AC C G S L F T T
WCCV1 CP	762	CCC ATA CCT GCC ATC TTC CT P I P A L L I	WCCV1 CP	921	TGT GGC TCA CTG TTC ACC AC C G S L F T T
NP76	5'	CCC ATC CCT GCC ATC YTB CT 3'	NP75	3'	ACA CCG AGI GAI AAG TIG AG 5'
VCV CP	1145	TTC AAT GGT TCC GTI CCC CT F N G S V P L	VCV CP	1145	TTC AAT GGT TCC GTI CCC CT F N G S V P L
WCCV1 CP	1131	TTC AAT GGT TCT GTA CCC CT F N G S V P L	WCCV1 CP	1131	TTC AAT GGT TCT GTA CCC CT F N G S V P L
NP78	5'	TTC AAT GGT TCH GTI CCC CT 3'	NP77	3'	AAG TTA CCA AGD CAL GGG GA 5'
VCV CP	1232	GTC CGC GAC TGG CTC TAT CC V R D W L Y P	VCV CP	1361	CAA GCT GAA CAG TAC GCT AT Q A E Q Y A I
WCCV1 CP	1218	GTC CGC GAC TGG CTC TAT CC V R D W L Y P	WCCV1 CP	1347	CAA GCT GAA CAG TAT TCC AT Q A E Q Y S I
NP80	5'	GTC CGY GAC TGG CTC TAY CC 3'	NP79	3'	GTT CGA CTT GTC ATR MGD TA 3'
			VCV CP	1538	ATC GCT TCC CGC TAA CAC CA I A S R Y H Q
			WCCV1 CP	1524	ATC GCT TCC CGC TAC CAC CA I A S R Y H Q
			NP81	3'	TAG CGA AGD GCG ATR GTG GT 5'

A végék korrekt meghatározása során a cDNS szintézis templátja a 3' végein adenilált dsRNS2 molekula volt. Az RT-PCR-hez oligo(dT) és szekvencia-specifikus primereket használtunk (A331 [oligo(dT)-NP88] és A354 [oligo(dT)-NP97] jelöléssel). Az elvégzett kísérletekből az derült ki, hogy a dsRNS2 3' vége önmagában is adenilált, ennek az ellenőrzésére újabb RT-PCR-t állítottunk össze oligo(dT) és szekvencia-specifikus primerekkel (A355 [oligo(dT)-NP88] jelöléssel). Az így létrehozott A355/6 jelölésű klónt is felhasználtuk a contig végleges kialakításában.

A BCV1 dsRNS2 teljes szekvenciáját huszonöt egymással átfedő, független cDNS-klónból határoztuk meg (24. ábra). A dsRNS1 szekvencia minden részletét legalább két egymástól független klónnal erősítettük meg. Azokban az esetekben, ahol a párhuzamos klónok szekvenciái eltértek egymástól (ez tizenkét nukleotid esetében fordult elő) további független klónokat szekvenáltattunk és használtunk fel a végleges nukleotid sorrend kialakításához.



24. ábra: A BCV1 dsRNS2 szekvenciájának meghatározására szolgáló független cDNS-klónok elhelyezkedése. A cDNS-klónok zömét a VCV és WCCV1 dsRNS2-ből levezetett degenerált primereket (8. táblázat) használva nyertük. A hiányzó 360 bp – 524 bp és 1154 bp – 1171 bp régiókat BCV1-specifikus primerek, az 5’- illetve 3’-végeket oligo(dT) primerek segítségével előállított klónokból határoztuk meg. Az ábrán a klón jelölésén kívül a lefedett szekvencia régiót is megadtuk. Jól látható, hogy minden levezetett szekvencia legalább két független klón szekvenciáján alapul és a klónok átfednek.

A BCV1 dsRNS2 1783 nt hosszúságú (25. ábra), a molekulát felépítő nukleotidok guanin-citozin (GC) tartalma 50 %-os. A szekvencia számítógépes analízise során a dsRNS2 pozitív szálán egy nagy 1470 nt (ORF1) hosszúságú és két kisebb (ORF2: 163 - 444 nt, ORF3: 910 - 1104 nt) ORF-t azonosítottunk. A negatív szálon szintén két kisebb leolvasási keret (ORF4: 608 - 799 nt, ORF5: 1188 - 1400 nt) található. Az ORF1 start kodonja, az AUG a 123-125, az UAG stop kodon pedig az 1590-1592 pozícióban helyezkedik el (25. ábra). Az 5’ nem transzlálódó régió (5’ UTR) 122 nukleotid hosszú és az 5’-GAU CAA AAG AGC AAC AGC UC...-3’ szekvencia részlettel kezdődik. Itt is felfedezhetők a partitívirusok 5’ UTR-jeire jellemző CAA és CAAAA ismétlődő szekvenciák (Strauss és mtsai., 2000). Az adozinban és uracilban gazdag, 191 nt hosszúságú 3’ nem transzlálódó régió (3’ UTR) az ORF1-t követően helyezkedik el. A dsRNS2 molekulát egy 27 nt hosszúságú poliadenilált véget is tartalmazó szekvencia zárja. A BCV1 dsRNS2 szekvenciát a GenBank nemzetközi adatbázisban EU489062 azonosító számon helyeztük el.

```

1 GAUCAAAGA UCAACAGCUC UUGUCCAAG CUUUCGUAA UCAAAAAGA ACACAGAUCU CAGCUGUCUC GACUCAACUU GUUACCUACU
M E N N T P L A N P S G P N V P S A A A
91 CUAAGAUACU CAUAUAGCCG CCUCUCGAUA AGAUGGAAA CAACACUCCU CUGGCUAACC CUAGCGGCC CAUUGUACCC UCCGUCUGUC
A P P T P A P P A I P Q A T P T P G A V S Q P P A P P A R R S
181 CCCCCCCAC CCCC GCCCUU CCGCGAUAC CUCAGGCUAC CCCACUCCU GGUCUGUCU CUCAGCCCC UGCCUCCU CCCC GCCGAA
S R T P R G P V P Q A T P G S T S G A P A L L E L S A G L P M
271 GCCGUACCC GCGUGGCCU GUUCCCCAG CUACUCUGG CUCCACUUCU GGUGCCCCU CUUUGCUGGA ACUCUCAGCC GCCUUCUUA
M Y T V P R R G V N T F V P D A Q M L F H V L G I C D Q M M L
361 UGUACACUGU GCCCGUCG GGUUUAACA CCUUGUCCU UGAUGCUCAG AUGCUAUUCC AUGUCUUGG AAUCUGUGAU CAAUAGUCC
L S T D R F T R S S P A W I P I V S O L Y I S V L W M V A I L
451 UUUCAACUGA UCGCUUUACG CGUUCUUCU CUGCUUGGAU CCCC AUGCUC UCACAGCUUU ACAUCUCUGU ACUCUGGAUG GUUGCUAUCC
L R V F V A S G Y G A L Y S S L I N D L I G H L R I D E C M I
541 UCAGAGUCUU UGUUGCCUCC GGUUACGGAG CACUCUACUC UUCUCUUAUC AAUGACUCA UCGGUCACCU UCGUUAUGAU GAGUGCAUGA
I P G P L V P F F Q S L G A V C G P Y E W I G D I V A A F P D
631 UUUCCCGACC UCUGGUCUCC UUUUCCAAU CUCUUGGUC CGUUUGCGG CCAUAUGAAU GGAUUGCGA CAUCUGUCU GCAUUCUCCU
D F L T L W D A E N F C P T A D L A R T C P V P A I M L D Q L
721 ACUUCUUGAC UCUUUGGAC GCAGAAAACU UCUGCCCCAC UGCUAGCCUU GCCAGGACCU GCCCGUCCU CGCCAUCAUG CUUGACCAAC
L H Y F A T W T I P A E Q I L Y T N F Q W Y R N I F S L G L G
811 UUCACUAUUU UGUUACUCCG ACCAUUCUCC UGAACAAAU UCUCUACACC AACUUCAAU GGAUAGAAA CAUCUUGAU UAGGCAUGU
G A G N A N N R I G P Q L C G S L Y S P R A Q V D S A R A F W
901 GCGUCGCCAA UGCAACAAC AGAAUUGGUC CUCUACUUU CCGUCUCUU UACUCACCCA GAGCGCAGU UGAUUCGCC CGUGCUUUU
W N A A L S S G I T R T N A A E A N G A F Y T Y A Q L L G F I
991 GGAACGUCG ACUCUCUUCU GGUUACCA GACUUAUGC UGCCGAAGCC AAUGGCGCUU UCUCACUUA UGCCCAACUG CUUGGAUUUA
I S O N G T L Q L D W F Q Q V A V V M Q K Y T Q Y F N G S T P
1081 UCAGUCAGAA UGGAACUCUC CAUCUAGACU GGUUUAACA GGUUGCCGUU GUCAUGCAGA AGUACACACA GUACUUAUU GGUCCACAC
P L K S I S T I G I G A V A V I G A P T P D P A T R D W F Y P
1171 CCCC AAAUC CAUAUCAUC AUUGGCAUC GAGCGUCG UCUCUAGCC GCUCCGACC CCGACCCUGC UACUAGGGAU UGUUUCUACC
P A A T G I E P F L C S R F A P R R E I P N T L G M I F S H A
1261 CUGCUGCCAC UGUUAUUGAA CCGUUCUUU GCAGCCGUU CCGCCAAAGA AGAGAAUCC CGAAUACUCU CCGUUAUGAU UUCUCCUAG
A D H E L E E Q A E Q Y A I L T H T N I R W S P S V V A Q N A
1351 CUGCAUGA ACUCGAGGAA CAAGCAGAAC AAUUGCUAU CCUCACCAU ACCAACAUCC GUUGGUCUC UCCGUGGUC GCUCAAAUG
A W T A V N D G A S R N G D Y W I M M N Y R F S T R I S L K T
1441 CGUGGACCG UGUCAUAGC GGCGGUCUC GCAUUGGUA CUAUUGGAUC AUGAUGAACU ACCGUUUUUC AACGCGUAU UCACUCAAGA
T Q F A Q V I A S R Y H Q Q A A N R V D * T V T P L L I S S P
1531 CCCAGUUGC UCAAGUGAU GCCUCAGUU AUCAUCAACA AGCAGCAAAC CCGUUGACU AGACUGUCAC GCCUUGGUA AUUUCUGCC
P S S L L F A A F L I R
1621 CCUCUCACU GCUUUUGCA GCCUUCUGA UCAGAUAGGG UUUUUUUUG UUUUAUCUCA UUUUAUUUA AAUUUCACCU CCUCUAGA
1711 CUUUUUUUU AGGGAAUUC GUUUCGUUUU GUUUUGAGCU UCGAAGAAA AAAAAAAGA AAAAAA AAA

```

25. ábra: A BCV1 dsRNS2 pozitív szálának nukleotid szekvenciája és az ebből levezetett fehérje szekvencia. A BCV1 dsRNS2 1783 nt, amelyen egy nagyobb, 1470 nt hosszúságú nyílt leolvasási keret (ORF1) azonosítható. Az ORF1 489 aminosavat kódol és az 5' ill. 3' nem transzlálódó régiók határolják.

5.6.4. A putatív köpenyfehérje (CP) jellemzése

5.6.4.1. *In silico* analízis

A BCV1 dsRNS2 pozitív szálán azonosított, 1470 nt hosszúságú nyílt leolvasási keret (ORF1) 489 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek a számított molekulamérete 53,4 kDa. Ez a protein az NCBI adatbázisban található szekvenciák közül a *Partitiviridae* család vírusainak putatív köpenyfehérjéivel mutatja a legnagyobb hasonlóságot, bár ez a hasonlóság az RdRp-nél megfigyelt értékeknél mindenképpen kisebb mértékű. Várakozásainknak megfelelően a hasonlóság ugyanazoknál a vírusoknál a legnagyobb, amelyeknél már a dsRNS1-nél is kiemelkedően nagy hasonlóságot figyeltünk meg. Az *Alphacryptovirus* nemzetségbe tartozó WCCV1 köpenyfehérjével (YP086755) 69,6 %-os hasonlóságot, a VCV CP-vel (YP272125) pedig 65,6 %-os hasonlóságot állapítottunk meg. A szekvenciák összehasonlítása során mindössze négy esetben figyelhető meg aminosav folytonossági hiány (26. ábra). Annak ellenére

tehát, hogy a BCV1, VCV és WCCV1 putatív köpenyfehérjéi közötti hasonlóság alacsonyabb, mint az RdRp szekvenciák hasonlósága, a VCV és WCCV1 dsRNS2 szekvenciák alapján tervezett degenerált primereket mégis sikeresen tudtuk alkalmazni a BCV1 dsRNS2 cDNS-szintézise során.

Mintegy 36 %-os a hasonlóság figyelhető meg a *Partitivirus* nemzetségbe sorolt *Amasya cherry disease-associated partitivirus* (YP138536) és *Cherry chlorotic rusty spot-associated partitivirus* (CAH03669) köpenyfehérjéjével is. A VCV és WCCV1 mellett csak egy további kriptovírus, a *Raphanus sativus cryptic virus 1* köpenyfehérjéjével (ABA46819) mutatható ki viszonylag nagyobb, 31,8 %-os hasonlóság. A WCCV1, VCV, ACD-PV, CCRS-PV és RsCV1 vírusok köpenyfehérjéiben több olyan konzervált aminosav régiót is leírtak (Chen és mtsai., 2006b), amelyek a többi kriptikus vírus köpenyfehérjéjében nem vagy csak részlegesen mutathatók ki (26. ábra). A WCCV1, VCV, ACD-PV, CCRS-PV és RsCV1 vírusok alkotta csoportba a BCV1 köpenyfehérjéje is kiválóan beleillik, ugyanis tartalmazza az erre a vírus csoportra jellemző konzervált aminosav szakaszokat, ilyenek például a ¹²⁶VSQLYISVL¹³³, ¹⁷²MIPGPLVPPFQSLG¹⁸⁵, ³³⁶VMQKYTQYFNGSTPL³⁵⁰ és a ⁴¹⁸AEQYAI⁴²³ régiók. Az is érdekes, hogy a konzervált régiókban főként konzervatív aminosav szubsztitúciók történnek, gyakoriak például a leucin – izoleucin vagy a glicin – alanin – szerin cserék.

Az *Alphacryptovirus* nemzetség többi vírusának köpenyfehérjéjével jóval alacsonyabb hasonlóság állapítható meg; *Beet cryptic virus 2* dsRNS1-el: 21,3 %; *Raphanus sativus cryptic virus 2* dsRNS2-vel (ABB04856): 19,0 %; *Raphanus sativus cryptic virus 2* dsRNS3-mal (ABB04857): 16,8 %.

BCV1 CP	(1)	MENNTPLANP SGPNVPSA -AAPFT PA FP AI PQ AT PT PGAVSQPFAPPAR-RSRTPRGVPQATPGSTSG-
WCCV1 CP	(1)	MNQD T PLANLNG PEVPSG -N V PPAN P GRTNV APP A Q GA V QQ P P A PA AR - R ARN PHG VP EP AG PS RS AG -
VCV CP	(1)	MEAH T PAADVNG PNIPSG -AVSQ E IA PHNQ AA P N V S GAA QA I I APT PA -R K RT PH GP I F A AT SSG NTS -
ACDPV CP	(1)	--MSAP ATTG ST T ST AAV -P ATE QT AP AT V A APP T AP AT D V KYV AP AK Q K S F AP REP T ASS AG PK NP G -
CCRSVP CP	(1)	--MSAP ATTG ST T ST ASV -P ATE QT AP AS V AV P T AP AT D V KYV AP AK Q K S F AP REP T AT SG GP KN PG -
RsCV1 CP	(1)	MAHR T PT N AP AL P Q VDG IN P N L F P N D F GT V AA AP N ARN L H L ERE Q EA R Q D R AAAA FV P N TR F AV RR PT IR
RsCV2 CP1	(1)	-----MA F ES K TS A SE S T V N K DA AP -----AP S SA SV K SP V K SS S GL G RA K T ET PH L FA S NY E I P RY T
RsCV2 CP2	(1)	--MD T A Q T D AD K A A G K R G AT V PE G E P -----AA K T M RF S DA I V PA GP S K D AS T V T AT AA L F K D L I Q W P IER
BCV1 CP	(68)	-----AP AL L EL SA GL PM Y TP RR GV NT F VP DA Q ML F H V L G IC D Q M ML S T DR F T RS S PA W I F I V S
WCCV1 CP	(68)	-----AP AM L EL SA AY PM Y TE Q RR AP N Y VP DA Q LL F H T L GV CD Q L MT T DR F L R SM P S W L P I V S
VCV CP	(68)	-----AP AL L EL AA AY PM Y TE Q RR S F N FF I P D S Q MM F H S L G IC D S M M N S T DR F L R SS PA W L P I V S
ACDPV CP	(67)	-----L S MM L SG V SD L PF FG IK H ND I S V VP D T T Q L F Y V L S I MD T Q M VR T K R F T AN P D W H F V S
CCRSVP CP	(67)	-----L S MM L SG V SD L PF FG IK H ND I S V VP D T T Q L F Y V L S I MD T Q M AR T K R F T AN P D W H F V S
RsCV1 CP	(71)	P S PA H S A P D LE T AL F D S AV N H P TP V SP S PT S SY I PN F TS A F Y LN K MD S LM V Q L LN W LN N CS G W V PP YS
RsCV2 CP1	(60)	R-----D T Q P V V GN K NY E FL R MD G RL G H S MD R SK T AR PE V N CS L N R AN F H E GV L K-----
RsCV2 CP2	(55)	-----L A T Q V N -Q V FL D TT I Q NG EG G Y E VP D D Q IV P TL R V Y E I N V T N L R NA F R-----

BCV1 CP (128) QLYISVLMVAILRVFVAGGYGALYSSLINDLIG---HLRIDECMIPGPLVPPFFQSLGAVCGFY-EWIGD
WCCV1 CP (128) QLYVSVLWNVMIKVVYVNTGYGAAAYHLDVLLN---HLQINECMIPGPLVPPFFQSLAAVNGPF-DWIGD
VCV CP (128) QLYISVLLWVMIRILSHTGYAPFTDLLNTLTT---DLQIECMVPGPLVPPFFQSLASTNGPF-DWIGD
ACDPV CP (127) QLYIAVLFYYQVLKNQSHGGMITNDQRLFVEFLDS--QFKAHLKIPGPIAIFQSLAANAGPN-ENFGN
CCRSFV CP (127) QLYIAVLFYYQVLKNQTHGGMISNDQRLFVDFLDT--QFKAHLKIPGPIAIFQSLAANAGPN-ENFGN
RsCV1 CP (141) QIYISMILYLQVMRAMKKAGVLRPNSELISHLFNEMSTIFPFEISLMVPGPLVNLFEINTAFRPLQTDSEFGN
RsCV2 CP1 (105) -----VLRQILSEMARLKQDLSDAEIQERVEVSVS-----LTLAYG-VATMAYLKLRAINLFR-----
RsCV2 CP2 (101) -----SVLYTILRAKFIERGDRVTVAATTLATNVS-----NLTADA--CMAALYAKLRSLSHRQI-----

BCV1 CP (194) IVAAFDFLTLWDAENFCPTADLARTCFVPAIMLDQLHYFATWTIPAEQIL-YTNFQWYRNIFSLGLGAG
WCCV1 CP (194) IIPAMPSTFTELWDE-FAPHAAYARQIPIPAILLDQLYRFATLAFDAQLQTNATFEWYSNIFNQDWNTH
VCV CP (194) ITPALPFGFDSLWDA TNFTPHASYTRFVPIPAILLDQLYYCATYVGVNQGD-LYPTTWYRNIFTRTGANT
ACDPV CP (194) LVFGIPNAHDINCTS-FLWQDKVHTILPNVIFILDQFMRILISLISPVNSGVPVQANASHDTDVYITIFGAP
CCRSFV CP (194) LVFGIPNAHDINCTS-YLWQDKVHTILPNVIFILDQFMRILISLISPVNSGVPVQANASHDTDVYITIFGAP
RsCV1 CP (211) VTPFLPAEPGWSNATFFAFNGSLVRHLPHIPALISRLRICETASENGLNDISFSAHHHGPEIISELFGH
RsCV2 CP1 (164) -----PNEASKFLTKPKVPDFEIPTPFAFAISQLGVVEVSSLSRMICYPTADLADASNHLVGG-
RsCV2 CP2 (157) -----YTHKGRFTDQPTYTKDVELLPFFVAVIDGIGMFRSAMSSTR--FNVVPVYPENIKNEG--

BCV1 CP (263) NANNRIGPOLCGSLYSPRAQVDSARAFWNAALSSGITRINAEEANG-----AFYTYAQLLGFIS
WCCV1 CP (263) NARLRIGPOLCGSLFTTQAQCD SARAFWNPFAANGFTRIDAANG-----PLMAFPQLLGFIS
VCV CP (263) PALLRMGPNLCGSLFTTSNQFDAARTYWRACFGTGFTRVNVTA-----AFTNYLQLLGLRS
ACDPV CP (264) ASKDEATRFAMLTSPARSDFQTVGLENGLATSSNVWRNTLPEFANDGDSQYVISDDDTLDDLQVFGFRG
CCRSFV CP (264) ASKDEATRFAMLTSPARSDFQTVGLENGLSTSSNVWRNTLPEFANDGDSQYVITEDDELDDLQVFGFRG
RsCV1 CP (275) ICDNDLPEQLLLLTPLGATSYSYGTLYLWRQAR-SQLQRSLSLPEA-----LTVNDVVPNTWT
RsCV2 CP1 (220) -----NKRNSQTAYAEAVRYAKYLGMSFS-----
RsCV2 CP2 (219) ---R-----SHDSINFLEYKSYLAFYAEIGIPTR-----T

BCV1 CP (322) Q--NGTLQLDWFQAVVMQKYTOYFNGSTPLKSTITIGAVAVICAPTDPATRDFWYPAATGIEFFL
WCCV1 CP (320) Q--DQALQSNFMHISLIMHKYQYFNGSVPLKSTISPVGIGASVIYGTPLEDTNVRDWLYPAAAAIAFFR
VCV CP (320) Q--TGEPTAFQFQVIMVMQKYAQHFNQSVPLKSIDLTGIGAVALTCTPVNNTAVRDWLYPPNANIEFFT
ACDPV CP (334) IGNHADRYPYGFQVIRVMQPYSDFFKDTVSLGSVTTTCTGISYVRTKYVATRQNKNILVHAVTRKRVY
CCRSFV CP (334) IGPYADRYPYGFQVIRVMQPYSDFFKDTVSLGSVTTTCTGISYIRTKYVDTKQNKNILVHAVTRKRVY
RsCV1 CP (246) SFCLDNDDSSWSPLAAMNKYQYWHGSAPLSSIPADGSAAGSMICNELNGSSIRLQWTAIPIMDEPA
RsCV2 CP1 (246) VLDLIKVGSSWLFKPDVTDGLLSIRCLPEDNYTLAGATVFMFLFYHDVGSDDPAIDLFDNIDSLGNDDYGS
RsCV2 CP2 (239) IDTRVTPGNAWTYRTSYDGDVYDLKINFPLHFNHDLANLAIMFLNNSGADRNNASITTKTDDQDYGW

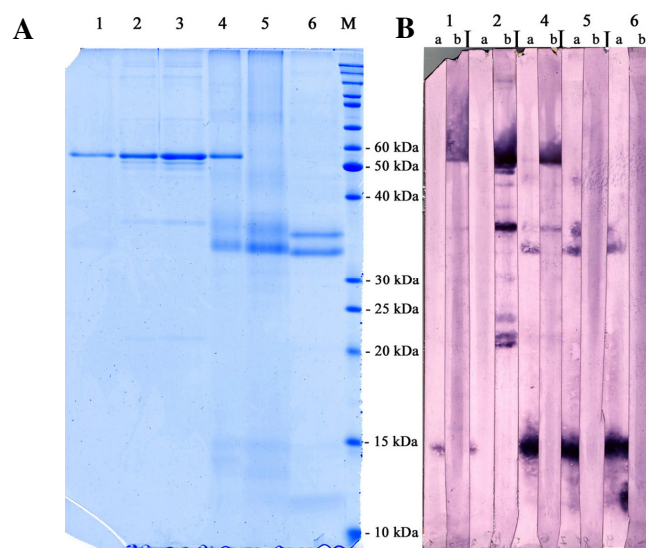
BCV1 CP (390) CSRFAPRELEPNTLGMII--FSHADHELEEQAEQYAILTHTNIRWSPSVVAQNAWTA VNDGASRNGDYWIM
WCCV1 CP (388) STRFLPRELEPATLAVR--FAHADHELEEQAEQYSILCHTNMKWYVNNATQNNHTAIEGNYIHOGEYWNF
VCV CP (388) TGRFNPRELEPAQLRIR--FSHADHELEEQAEQYIAAHTNIRWAANIATQHERTA INPAHLHQGDYWNM
ACDPV CP (404) QTGSTLRDIPFEFTGITTIHLHAEFFLDLVTEQAGILTQLNSDWDTDINKDVTDTSNPDKSTHVGPIFSI
CCRSFV CP (404) QTGSTLRDIPFEFTGITTIHLHAEFFLDLVTEQAGILTQLNSDWDTDINKDVTDTSGPDYTSHTVGPIFSI
RsCV1 CP (401) DEDAPVIAEPGYYPN---PNPVLIFDARTCIEDISSAHMF SAMTFHPNLIPYGANRANFLKGFWNC
RsCV2 CP1 (316) FIRNPR-----DGFN---ASSYVAISSEGTDEMWKSSA-----
RsCV2 CP2 (316) YVKDIR-----E-----GEQ---ARAFALCQWDPRYWNEKNNV-----

BCV1 CP (458) MNYRFST-RISLKTQFAQVILASRYHQAAANRVD-
WCCV1 CP (457) TPFRRYSP-PVSLKTQFAQVILASRYHQAAANRAE-
VCV CP (457) TPFRRHTG-HLGLKTQYAQVILASRYHQAAANRVD-
ACDPV CP (474) PDSRRTS-QYNVSNITIAPLISGYHHTPSALRFE-
CCRSFV CP (474) PDSGRTS-QYKVSNTIAPLISGYHHTPSALRFE-
RsCV1 CP (466) HPPSYSAPAHQVYPAVSALIAREYHSETNLSDDK
RsCV2 CP1 (-) -----
RsCV2 CP2 (-) -----

26. ábra: *Beet cryptic virus 1*, *Vicia cryptic virus* (YP272125), *White clover cryptic virus 1* (YP086755), *Amasya cherry disease-associated partitivirus* (YP138536), *Cherry chlorotic rusty spot-associated partitivirus* (CAH03669), *Raphanus sativus cryptic virus 1* (ABA46819) és *Raphanus sativus cryptic virus 2* (ABB04856 és ABB04857) köpenyfehérjék összehasonlító analízise. Az aminosavak teljes egyezését sárga alapon piros színnel, a részleges egyezést szürke alapon kék színnel, a kémiailag hasonló aminosavakat, pedig zöld betűszínnel jelöltük.

5.6.4.2. BCV1 köpenyfehérje tömegspektrometriás analízise

Annak bizonyítására, hogy a BCV1 dsRNS2 valóban a köpenyfehérjét kódolja, analizáltuk a BCV1 virionokban előforduló fehérjét (27. ábra). A vizsgálatokat a BCV1 és BCV2 vírusoknál egyidejűleg végeztük el, és közös ábrán mutatjuk be, de a BCV2-re vonatkozó eredmények értékelésére később, az 5.7.2. fejezetben térek ki. Az izolált virionokat denaturáló 12,5 %-os SDS-PAA géltre vittük fel, majd Coomassie festéssel kimutattuk a bennük előforduló fehérjét (27. ábra). A gélből kivágott fehérjét tömegspektrometriás analízisnek vetettük alá, hogy ily módon bizonyosságot szerezzünk arról, hogy a cDNS ORF1 szekvenciájából levezetett putatív köpenyfehérje valóban a virionban lokalizálódik. Az MALDI-TOF és LC-MS/MS vizsgálatokat Hunyadi-Gulyás Éva, MTA Szegedi Biológiai Központ végezte el. A virionban előforduló fehérjék reaktivitását BCV1-, ill. BCV2-specifikus poliklonális szérummal is megvizsgáltuk.



27. ábra: A BCV1 és BCV2 virionok fehérjemintázata. A: 12,5 %-os Laemmli gél, CBB G250-nel festve. 1, 2 és 3 - BCV1 minták; 4 - BCV1 és BCV2 virionokat együttesen tartalmazó minta, 5 és 6 - BCV2 minták. B: A virionban előforduló fehérjék reaktivitása BCV1-, ill. BCV2-specifikus poliklonális szérummal. (A szérum Thomas Kühne, BBA Aschersleben nagylelkű ajándéka.) A minták számozása megegyezik az A ábrán megadottal. a, Kimutatás BCV2-specifikus ellenanyaggal; b, Kimutatás BCV1-specifikus ellenanyaggal.

A BCV1 virionokban egy domináns virionfehérje jelenik meg ~55 kDa körüli molekulatömeggel, ami jó egyezést mutat a dsRNS2 ORF1-ből levezetett 53,4 kDa molekulatömeggel (27. ábra, 1-4 sáv), ez a molekula BCV1-specifikus antiszérummal is erős reakciót mutatott.

A MALDI-TOF és LC-MS/MS analízisek alapján egyértelműen megállapítható, hogy ez a fehérje az ORF1-ből levezetett szekvenciának felel meg kiemelkedően jó, 32,5 %-os szekven-
 cia lefedettség (28.A ábra) mellett. A meghatározott peptid szekvenciák a fehérje különböző
 részeiről származnak, tehát feltehetően a teljes molekula jelen van a virionban. A 27. ábra 3.
 sávjában különösen jól látható, hogy gyengébben festődő fehérjék is előfordulnak a virion
 preparátumokban. Közülük különösen érdekesnek találtuk a ~38 kDa látszólagos molekula-
 tömegű, a BCV2 köpenyfehérjéjénél kevéssel nagyobb proteint, ami a BCV1-specifikus
 antiszérummal is erős reakciót mutatott (28.B ábra). A tömegspektrometriás analízis szerint
 ez a fehérje az eredeti CP proteolitikus hasításából származik (12 % szekven-
 cia lefedettség). Az erős immunreakció alapján feltételezzük, hogy ez a szekvenciarégió, ill. immunodomináns
 epitópjai a virion felszínén exponáltan helyezkednek el.

A

1	MENNTPLANP	SGPNVPSAAA	PPTPAPPAIP	QATPTPGAVS	QPPAPPARRS
51	RTPR GPVPQA	TPGSTSGAPA	LLELSAGLPM	YTVPR RGVNT	FVPDAQMLFH
101	VLGICDQMLL	STDRFTRSSP	AWIPIVSQLY	ISVLWMVAIL	RVFVASGYGA
151	LYSSLINDLI	GHLRIDECEMI	PGPLVPPFFQS	LGAVCGPYEW	IGDIVAAFPD
201	FTTLWDAENF	CPTADLARTC	PVPAIMLDQL	HYFATWTIPA	EQILYTNFQW
251	YR NIFSLGLG	AGNANNRIGP	QLCGSLYSR	AQVDSAR AFW	NAALSSGITR
301	TNAAEANGAF	YTQAQLLGFY	SQNGTLQLDW	FQQVAVVMQK	YTQYFNGSTP
351	LKSISTIGIG	AVAVIGAPTP	DPATR DWFYF	AATGIEPFLC	SRFAPPREIP
401	NTLGMIFSHA	DHELEEQAEQ	YAILTHTNIR	WSPSVVAQNA	WTAVNDGASR
451	NGDYWIMMNY	RFSTRISLKT	QFAQVIASRY	HQQAANRVD	

B

1	MENNTPLANP	SGPNVPSAAA	PPTPAPPAIP	QATPTPGAVS	QPPAPPARRS
51	RTPR GPVPQA	TPGSTSGAPA	LLELSAGLPM	YTVPR RGVNT	FVPDAQMLFH
101	VLGICDQMLL	STDRFTRSSP	AWIPIVSQLY	ISVLWMVAIL	RVFVASGYGA
151	LYSSLINDLI	GHLRIDECEMI	PGPLVPPFFQS	LGAVCGPYEW	IGDIVAAFPD
201	FTTLWDAENF	CPTADLARTC	PVPAIMLDQL	HYFATWTIPA	EQILYTNFQW
251	YR NIFSLGLG	AGNANNRIGP	QLCGSLYSR	AQVDSAR AFW	NAALSSGITR
301	TNAAEANGAF	YTQAQLLGFY	SQNGTLQLDW	FQQVAVVMQK	YTQYFNGSTP
351	LKSISTIGIG	AVAVIGAPTP	DPATR DWFYF	AATGIEPFLC	SRFAPPREIP
401	NTLGMIFSHA	DHELEEQAEQ	YAILTHTNIR	WSPSVVAQNA	WTAVNDGASR
451	NGDYWIMMNY	RFSTRISLKT	QFAQVIASRY	HQQAANRVD	

28. ábra: BCV1 köpenyfehérje tömegspektrometriás analízise során azonosított peptidek. A, Az ~55 kDa köpenyfehérje LC-MS/MS analízis alapján meghatározott peptidjei 32,5 %-ban fedik le a dsRNS1 nukleinsav szekvenciából (ORF1) levezetett proteint. B, A ~38 kDa fehérje MALDI-TOF analízis alapján azonosított peptidszekvenciái 12 %-ban fedik le a dsRNS1 nukleinsav szekvenciából (ORF1) levezetett proteinszekvenciát. A vizsgált és a levezetett peptidek közötti egyezést piros kiemeléssel jelöltük.

Eredményeink alapján egyértelműen megállapíthatjuk, hogy a dsRNS2 a virális köpenyfehérjét kódolja. Ezzel az irodalomban, első ízben mutattuk ki közvetlenül, hogy a cDNS-

szekvenciából levezetett putatív köpenyfehérje ténylegesen jelen van a virionban, sőt a BCV1 esetében annak fő, feltehetőleg egyetlen építőeleme.

5.6.5. BCV1 dsRNS1 és dsRNS2 5' és 3' nem transzlálódó régióinak analízise

A BCV1 dsRNS1 és -2 5', illetve 3' nem kódoló végeinek analízisét különösen fontosnak tartottuk, mivel ezek a régiók teszik lehetővé az RdRp által történő specifikus felismerést, s szerkezetüknek egyben garantálnia kell a korrekt iniciációt és terminációt. A vírusok nem transzlálódó szekvenciáinak összehasonlítása segítséget nyújthat a replikáz által történő felismerés szerkezeti jegyeinek azonosításához, és alkalmas lehet a különböző kriptikus vírusok között fennálló hasonlóság vizsgálatára is.

5.6.5.1. Az 5' nem transzlálódó régiók

A BCV1 dsRNS1 és dsRNS2 5' nem transzlálódó régiói (5' UTR) a hosszú nyílt leolvasási keretek előtt helyezkednek el és 93, ill. 122 nukleotid hosszúságúak. Közöttük rendkívül nagy mértékű hasonlóság figyelhető meg, az UTR-ek mintegy 80 %-ban azonosak egymással. A szekvencia összehasonlítás során több konzervált motívumot tudunk azonosítani (29. ábra), beleértve az 5' terminális GAUCAAAAGA szekvencia motívumot, amely a BCV1 dsRNS-ek mellett megtalálható a VCV dsRNS1 ill. -2 nem kódoló szekvenciáiban is (Blawid és mtsai., 2007).

5'BCV1 (RNA1)	1	GAUCAAAAGA	GU	AACAGCUC	UU	GCCCAUA	-UUU	UCAAG	AUCAAAA	UAGAA	AUUGA	AUCUUA	CUGCUCUA
5'VCV (RNA1)	1	GAUCAAAAGA	GU	AACAGCUC	UUGC	-CACG	-UUU	UCGCA	AUCAAAA	UAGAA	CACGA	AUCUCAG	CUGCUCUA
5'WCCV1 (RNA1)	1	-----	CUU	GUACACA	-	UUU	UUGCA	AUCAAAA	UAGAAC	CGA	AUCUUGA	CUGCUCUA	
5'BCV1 (RNA2)	1	GAUCAAAAGA	UC	AACAGCUC	UU	GUUCAAG	UUU	CUGUA	AUCAAAA	UAGAAC	CACAG	AUCUCAG	CUGCUCUG
5'VCV (RNA2)	1	GAUCAAAAGA	GU	AACAGUCC	UU	GUAACA	-UUU	UCACA	AUCAAAA	UAGAAC	CGGA	AUCUUGA	CUGCUCUA
5'WCCV1 (RNA2)	1	-----	GUU	UUAACUUA	AGC	UUU	UCGUA	AUCAAAA	UAGAAC	CGGA	AUCUCAG	CUGCUCUA	
						**		**	*****		**	**	**
5'BCV1 (RNA1)	72	CCUCAACUU	GU	UACUACUC	UAA								
5'VCV (RNA1)	71	CCUCAACUU	UU	UACUACUC	UAC								
5'WCCV1 (RNA1)	53	CCUCAACUU	AA	UACUACUC	UAC								
5'BCV1 (RNA2)	72	ACUCAACUU	GU	UACUACUC	UA	AGA	UACUCA	AAU	AUCGCC	CCUCUC	GUA	UAG	
5'VCV (RNA2)	71	CCUCAACUU	UU	UACUACU	UA	ACG	UUGUUU	--	AUCA	ACCGUCC	UCUCA	-	
5'WCCV1 (RNA2)	55	CCUCAACUU	UU	UACUACUC	UA	CCG	CUAACU	-U	AGCC	CCCUAC	CCACA	AG	
						*****	**	**	**	**	**	**	**

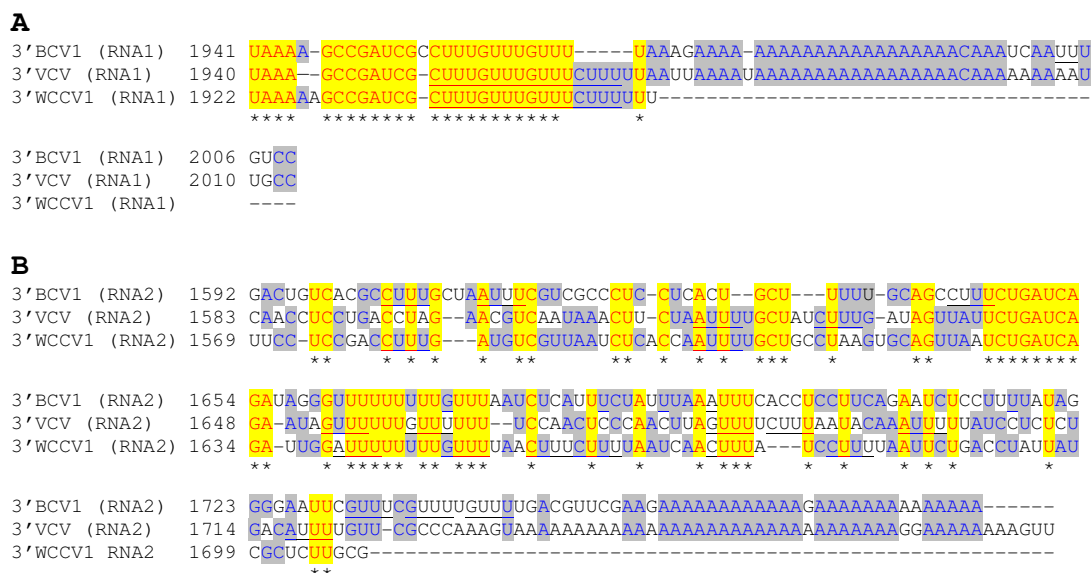
29. ábra: *Beet cryptic virus 1*, *Vicia cryptic virus* és *White clover cryptic virus 1* 5' nem transzlálódó régióinak (UTR) összehasonlító analízise. Az nukleotidok teljes egyezését sárga alapon piros színnel és az oszlop alá helyezett csillaggal, a részleges egyezést szürke alapon kék színnel jelöltük. A partitívirusok 5' UTR-jére jellemző CAA és CAAA ismétlődő szekvenciákat aláhúzott karakterekkel emeltük ki.

A 29. ábrán szereplő valamennyi 5' UTR-ben azonosíthatók a CAA és CAAA ismétlődő szekvenciák, melyek meglétét már számos partitívirus jellemzésénél leírták (Strauss és

mtsai., 2000; Coutts és mtsai., 2004). Az 29. ábrán bemutatott mindhárom vírus 5' UTR régiója szembetűnően nagyfokú megegyezést mutat, a WCCV1 dsRNS1 és -2 5' régióiban feltűnő rövidülés feltehetőleg annak tudható be, hogy a szekvenciák nem teljesek (Blawid és mtsai., 2007).

5.6.5.2. A 3' nem translálódó régió

A BCV1 dsRNS1 és dsRNS2 3' nem translálódó régiói (3' UTR) a hosszú nyílt leolvasási keretek után helyezkednek el és 64, ill. 191 nukleotid hosszúságúak. Mind a két terminális szekvencia uracilban gazdag, és a 3' UTR teljes hosszában CUUU, GUUU és AUUU ismétlődő szekvencia-motívumok azonosíthatók (30. ábra). Mindkét dsRNS molekulát egy 22, ill. 27 nt hosszúságú adenilált véget is tartalmazó szekvencia zárja le, hasonlóan a *Partitiviridae* család más, eddig megismert tagjaihoz (Chen és mtsai., 2006b; Blawid és mtsai., 2007; Coutts és mtsai., 2004). Az eddig említett tulajdonságokon kívül, a dsRNS1 és -2 3' nem translálódó szekvenciái között nem figyelhető meg hasonlóság.



30. ábra: *Beet cryptic virus 1*, *Vicia cryptic virus* és *White clover cryptic virus 1* 3' nem-transzlálódó régióinak összehasonlító analízise. Az nukleotidok teljes egyezését sárga alapon piros színnel és az oszlop alá helyezett csillaggal, a részleges egyezést szürke alapon kék színnel jelöltük. A CUUU, GUUU és AUUU ismétlődő szekvenciákat aláhúzott karakterekkel emeltük ki.

Az is érdekes, hogy a BCV1 dsRNS1 3' UTR-je sokkal inkább hasonló a WCCV1 dsRNS1-hez (75,9 %-ban azonos nukleinsavak építik fel) és a VCV dsRNA1-hez (79,7 %

azonosság) (30.A ábra), mint a BCV1 dsRNS2 a WCCV1 dsRNS2-höz (57,5 % azonosság) vagy a VCV dsRNA2-höz (54,6 % azonosság) (30.B ábra).

Látható tehát, hogy *Beet cryptic virus 1*, *Vicia cryptic virus* és *White clover cryptic virus 1* vírusok közötti hasonlóság nemcsak a fehérjét kódoló genom szegmensekre terjed ki, hanem az 5' és 3' nem transzlálódó régiók esetén is szembetűnő. Különösen az RNS-függő RNS-polimeráz által történő specifikus felismerést biztosító 5' UTR-ek mutatnak kiemelkedően nagymértékű egyezését. A 3' UTR-ek a dsRNS1 genom szegmenseknél ugyancsak hasonlóak, azonban a dsRNS2 esetében a különböző gazdaszervezetekben nagyobb variabilitást mutatnak.

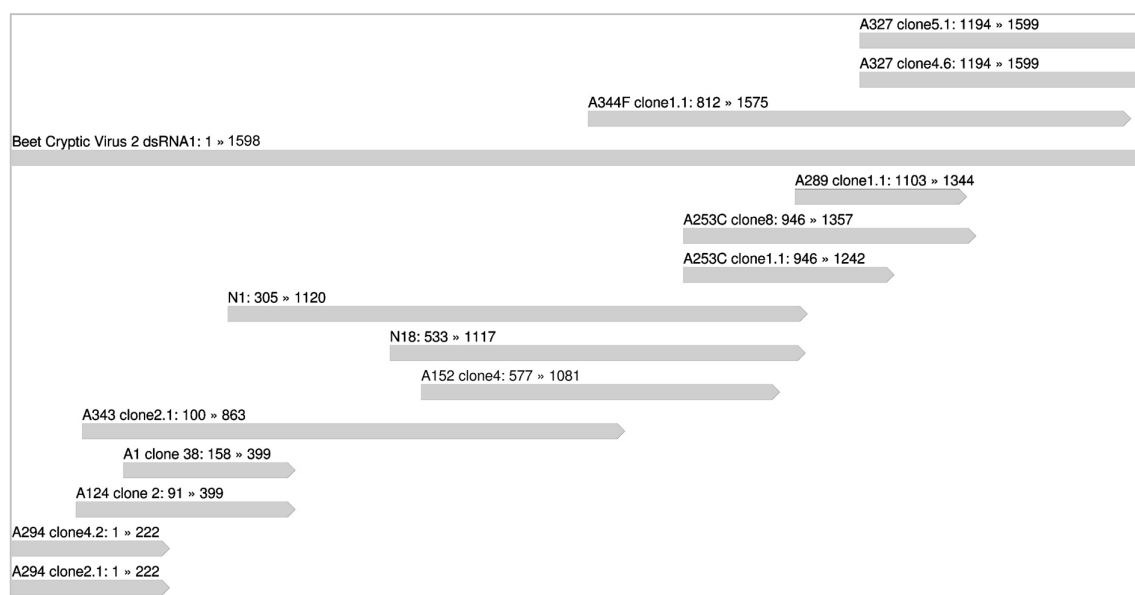
5.7. *Beet cryptic virus 2* molekuláris jellemzése

5.7.1. BCV2 dsRNS1 (CP1) szekvencia meghatározása

A BCV2 vírus cDNS-ének klónozását nem ismert fajtájú cukorrépa levélből izolált dsRNS templáttal kezdtük el. A dsRNS-t CF-11 kromatográfiával tisztítottuk és DNáz I, valamint RNáz A enzimekkel kezeltük magas só koncentrációjú oldatban. A BCV2 vírus genomját alkotó dsRNS molekulák 1%-os agaróz gélben az elektroforézist követően nagyon közel helyezkednek el egymáshoz, így gélelúcióval nem választhatók el, ezért a cDNS-szintézist a genomi dsRNS-ek együttes jelenlétében végeztük. A kezdeti cDNS szintézishez random hexamer primereket (UNRH) használtunk (Choi és mtsai., 1999). A kapott cDNS terméket PCR segítségével felszorzoztuk, szintén UN-primereket használva. A már felszorzozott terméket EcoRI restrikciós endonukleázzal emésztettük és pGEM-7Zf (+) vektorba ligáltuk, a konstrukciót *E. coli* JM 109 kompetens sejtekbe transzformáltuk. A transzformánsokat a „blue-white” teszt alapján előszelektáltuk, majd az inzertek meglétét kolónia-PCR-rel, M13 for és M13 rev primerekkel, vizsgáltuk. A legnagyobb méretű inzertet tartalmazó plazmidokat megszekvenáltattuk. A kísérleteknek egy részét Natalya Enünlü PhD-hallgató végezte, az ő munkájából származnak az N-jelű klónok.

A szekvenciákból a VectorNTI program segítségével három cDNS-contigot alakítottunk ki, amelyek három különböző genomi dsRNS molekulát reprezentálnak (dsRNS1, -2 és -3). Az egyik cDNS-contig (dsRNS1), amelyet az N1 és N18 klónok együttesen alkotnak, 815 bp hosszúságú volt. Az N12, N42 és N37 klónokból 968 bp hosszúságú contigot tudunk kialakítani (dsRNS2). Az N13, N17, N23 N27, N28, és N32 klónok szekvencia homológok voltak, és egy 711 bp hosszúságú cDNS molekula (dsRNS3) képezhető belőlük.

A dsRNS1 molekula hiányzó részeinek meghatározásához *Beta vulgaris* cv. 'Mars' növényekből izolált BCV2 dsRNS molekulákat használtunk (17. ábra). A cDNS-szintézishez kezdetben *UNRH*, a molekula 5' végénél pedig reverz, ill. a 3' végénél forward orientációjú szekvencia-specifikus primereket alkalmaztunk. A molekula végeinek pontos meghatározását a BCV1-nél bevált módon, azaz a dsRNS 3' végére rövid adenzin véget szintetizálva végeztük el. A rövid szekvencia elemekből levezetett dsRNS1 szekvenciájának ellenőrzéséhez a teljes molekulát két részletben is felszorzoztuk az NP89-NP90 illetve NP91-NP92 primer párokkal (klón jelölése: A343 és A343), majd szekvenáltattuk.



31. ábra: A BCV2 dsRNS1 szekvenciájának meghatározására szolgáló független cDNS-klónok elhelyezkedése a kódoló szálon. A cDNS-klónok zömét *UNRH* random primereket használva nyertük. Az 5'- illetve 3'-végeket oligo(dT) primerek segítségével előállított klónokból határoztuk meg. Az ábrán a klón jelölése mellett a lefedett szekvencia régiót is megadtuk. Minden levezetett szekvencia legalább két független klón szekvenciáján alapul és a klónok egymással átfednek.

A BCV2 dsRNS1 végső teljes szekvenciáját tizennégy egymással átfedő, független cDNS-klónból határoztuk meg. A dsRNS1 szekvencia minden részletét legalább két egymástól független klónnal erősítettük meg (31. ábra). Azokban az esetekben, ahol a párhuzamos klónok szekvenciái eltértek egymástól (ez tizennyolc nukleotid esetében fordult elő) további független klónokat szekvenáltattunk és használtunk fel a végleges nukleotid sorrend kialakításához.

A BCV2 dsRNS1 1598 nt hosszúságú (32. ábra), a molekula guanin-citozin (GC) tartalma 44 %-os. A szekvencia számítógépes analízise során a dsRNS1 pozitív szálán egy nagy, 1281 nt (ORF1) hosszúságú ORF-t azonosítottunk. A pozitív szálon egy kisebb putatív leolvasási keret is (ORF2: 999 nt - 1274 nt) található. Az ORF1 start kodonja, az AUG a 113-115, az UAG stop kodon pedig az 1391-1393 pozícióban helyezkedik el (32. ábra), a kódolt fehérje 426 aminosavból áll, számított molekulamérete 49,1 kDa (34. ábra). Az 5' nem transzlálódó régió (5' UTR) 112 nt hosszú és az 5'-AGA ATT ATA CCC...-3' szekvencia részlettel kezdődik. A 205 nt hosszúságú 3' nem transzlálódó régió (3' UTR) az ORF1-t követően helyezkedik el. A dsRNS1 molekulát nem zárja adenilált vég.

```

1  AGAAUUUAUCA UCUUAGUCUU GCGAAUUAUUC AGUUAAGACU AAGAAGUAAU CUUAAUUUAC CUAUUAAACGC UUUUUUGUUU CGUACAUAUC
      M T G P T Q A H L I E A T S F T G L N R D E L
91  UACCCAAUAGC GCGACAAUCA UAAUGACUGG ACCCACACAG GCCCACCUCA UCGAAGCGAC AAGUUUCACG GGACUCAACC GUGACGAGCU
    LD S I V D A L Q E E N Q I G T F R D R P K A Y R R Y V H V R
181 CGACAGCAUC GUGGACGCCU UACAAGAGA GAACCAAAU GGUACCUUUC GUGACAGGCC AAAAGCCUAC AGGCGAUUAG UUCACGCUAG
    R S Q E L F D R L S E L Y A D L F T S N W S A F K H A Y I T E
271 CUCUCAGGAG CUCUUUGAUC GGCUAAGCGA ACUCUAUGCC GAUUUAUUUA CAAGUAUUG GUCUGCUUUC AAGCAUGCCU AUUUUACAGA
    E P T G R E D A N S I S T K A S F M A Q C Y L T A W F W D T Q
361 GCCAACUGGC CGUGAAGAUG CAAACAGCAU CUCAACGAAA GCCUCUUUCA UGGCUCAAUG UUAUUUGACC GCGUGGUUCU GGGACACGCA
    Q Y C I R E S V R K L S G T A Y N Q H F T E D L N L I S P K Y
451 AUACUGGAUA CGCGAAAGCG UAAGAAAGU GUCAGGCACU GCCUACAACC AGCAUUUCAC AGAGGACCUC AACCUCAUCU CCCCUAAGUA
    Y D P F L Q H L N M V I R P T L I H Q S T E D T L Y I P L L G
541 UGAUCCAUCU UACAACACC UGAACAUGGU CAUAGAGCCC ACUCUCAUCC ACCAAUCCAC AGAAGAUACA CUCUAUAUCC CACUGCUUGG
    G Q T F N Y N E D A Y N F L N L Q G C G T E I R Q V Y A I T D
631 ACAACGUUU AACUACAACG AGGAUGCUUA UAACUUUCUC AAUCUCCAAG GCUGCGGCAC CGAAAUCGCG CAAGUUUAUG CCAUAAACAGA
    D V M D S R R T E W S T I P L A T N V L G R A S W L L D F K Q
721 UGUUAUGGAC AGCAGACGCA CAGAUGGUC AACAAUACCA CUCGCCACCA ACGUACUGGG ACGAGCUAGC UGGCUACUCC ACUUCAAGCA
    Q G N A Y A W F P F E S N F T E L D L V A P Y I L G I P C T P
811 AGGCAACGCC UAUGCUUGGU UCCGUUGA AUCCAACUUU ACUGAGCUAG ACUUAUAGC ACCUUAUACU CUUGAAUAC CCUGCACUCC
    P R L G P R D E D H Y Q H W T H N D P P L S T D G N I I L N P
901 AAGACUGGGA CCCCGAGACG AAGACCACUA CCAGCACUGG ACCCACAAUG AUCCCCUCU AAGCACAGAU GGCAUAUCA UUUUGAAUCC
    P L A Y V R S S E R K F F G N A E Y R T M E Y N S Y T Q N F E
991 GCUGGCAUUA GUACGUUCGU CUGAACGCAA AUUCUUUGGC AAUGCUGAGU ACAGAACAUA GGAAUUAUAC AGCUACACAC AAAACUUUGA
    E A Y M P R V T T S T Q A K N K R K K D A A P E Q L S T G Q G
1081 AGCUUAUUG CCAAGAGUUA CUACCUCAAC ACAAGCGAAG AACAGCGCA AGAAAGAUGC UGCACCAGAG CAGUUAUUA CCGGACAAAG
    G D G S S S S K D A E M S T E E S E A P P P P K I P R P R Q I
1171 AAGUGGAUCA UCAUCAUGA AAGAUGCUGA GAUGUCUACU GAAGAAUCAG AAGCUCCACC ACCGCCAAG AUUCCAAGAC CAAGACAAAU
    I H Q F R L I D W V Y H S R V I L G A D K A M Q R R A L W D F
1261 CCAUCAUUC AGAUUGAUCG ACUGGGUUUA CCACUCAAGA GUAAUCCUAG GAGCUGACAA AGCUAUGCAA CGACGUGCCC UUUUGGACUU
    F I H A G A T P S H Q P R P
1351 CAUUAUGUCU GGAGCAACUC CAAGUCAUCA ACCAAGGCCU UAGUUUAUUU GUUUUAUUU UUAUUUAUU GUAAUGAACA AUGCAACUUU
1441 UGUUUUAUUU AUCAGAAUUU UCAGUUUGAU GUUUAAUCUA UCAUUGUUUU UUAUCACAGU AUCUAACACA CUGGUAGCUA ACCGCACUGA
1531 UGAACAGUAU AAGGGCAGCA GGCAUGUACA CCCACAGGAA AUUCCUGAGG GACUAUACAG CCCUGUCU

```

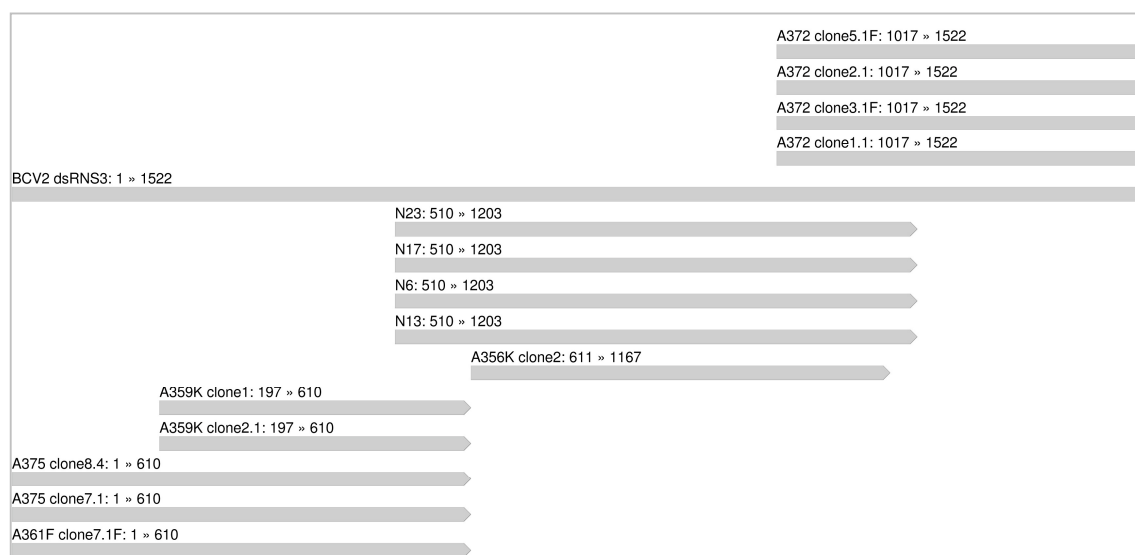
32. ábra: A BCV2 dsRNS1 1598 nt hosszúságú, és egy nagy, 1281 nt hosszúságú nyílt leolvasási keret (ORF1) azonosítható rajta. Az ORF1 426 aminosavat kódol és 112 nt hosszúságú 5', ill. 205 nt hosszúságú 3' nem transzlálódó régiók szegélyezik.

5.7.2. BCV2 dsRNS3 (CP2) szekvencia meghatározása

A BCV2 esetében - az irodalmi adatok (Natsuaki és mtsai., 1986), valamint a saját kísérleti eredményeink (17. ábra) alapján - azt vártuk, hogy a genom két dsRNS molekulából áll, és csak a genom klónozás és szekvenálása közben derült fényt arra, hogy a BCV2 genomját valójában három szegmens építi fel.

A BCV2 dsRNS3 molekula 711 bp hosszúságú szekvencia részletét Natalya Enünlü *UNRH* random primerrel határozta meg (lsd. 5.7.1 fejezet). Az N13, N17, N23, N27, N28 és N32 klónok által kódolt szekvencia jóságát, *Beta vulgaris* cv. 'Mars' növényekből izolált dsRNS templáton az NP98 és NP99 primerpárral ellenőriztük. Az ily módon amplifikált A365 jelölésű, 556 bp hosszúságú cDNS teljesen egészében megegyezett a random primerekkel felszorzozott klónokból kialakított contiggal. A hiányzó részeket ebben az esetben is oligo(dT) és szekvencia-specifikus primerek segítségével határoztuk meg.

A BCV2 dsRNS3 teljes szekvenciáját tizennégy egymással átfedő, független cDNS-klónból határoztuk meg (33. ábra). A dsRNS3 szekvencia minden részletét legalább két egymástól független klónnal erősítettük meg. Azokban az esetekben, ahol a párhuzamos klónok szekvenciái eltértek egymástól (ez tizenkét nukleotid esetében fordult elő) további független klónokat szekvenáltattunk és használtunk fel a végleges nukleotid sorrend kialakításához.



33. ábra: A BCV2 dsRNS3 szekvenciájának meghatározására szolgáló független cDNS-klónok elhelyezkedése a kódoló szálon. A belső cDNS-klónokat *UNRH* random primereket használva nyertük. Az 5'- illetve 3'-végeket oligo(dT) primerek segítségével előállított klónokból határoztuk meg. Az ábrán a klón jelölése mellett a lefedett szekvencia régiót is megadtuk. Minden levezetett szekvencia legalább két független klón szekvenciáján alapul és a klónok egymással átfednek.

A BCV2 dsRNS3 1522 nt hosszúságú (34. ábra), a molekulát felépítő nukleotidok guanin-citozin (GC) tartalma 44 %-os. A szekvencia számítógépes analízise során a dsRNS3 pozitív szálán egy nagy 1182 nt (ORF1) hosszúságú ORF-t azonosítottunk. A negatív szálon két kisebb leolvasási keret (ORF2: 331 - 546 nt, ORF3: 1215 - 1367 nt) található. Az ORF1 start

kodonja, az AUG a 127-129, az UAA stop kodon pedig az 1306-1308 nt pozícióban helyezkedik el. Az ORF1 által kódolt fehérje 393 aminosavból áll, melynek számított molekulamérete 45 kDa (34. ábra). Az 5' nem transzlálódó régió (5' UTR) 126 nukleotid hosszú és az 5'-AGA ATT ATA CCC...-3' szekvencia részlettel kezdődik. A dsRNS3 molekulát nem zárja adenilált vég.

```

1  AGAAUUUUCAC CUUAGUCUCA GAAAUUUUUU ACAGAGACUA AGACGUGUUA AAUUUUUUUA CCCAUCACAG CUAUUAUACU UCCAACUUCA
      M A P N D E L A A N L Q G L K R P A
91  ACCUCAACAC GAAGAAAGAC UUUACUUUCC CAUUCAAUUG CACCGAAUGA CGAACUUGCU GCAAACCUUC AAGGACUCA ACGUCCUGCU
      L D E I V H Y L E D R N Q I G I S H D K N L S Y N R T C V L
181 CUUGACGAAA UAGUGCAUUA UCUUGAGGAC CGUAAUCAAA UCGGUUAUUC UCACGAUAAG AACUUGUCCU ACAAUAGGAC GUGUGUACUA
      L T N E L H A R L V T L Y T N L F T T S W R H F K S A V R K
271 CUCACCAAUG AGUUAACUUG CAGGCUCUGG ACUCUUUACA CGAACCCUUC CACCACUUCA UGGCGACACU UUAAGAGUGC CGUUCGUUAG
      E M P R T E A N P Q R W L A N C Y I T A W F W D L Q A S I Q
361 GAAAUGCCCC GCACUGAAGC CAAUCCACAA CGCUGGUCUG CCAACUGCUA CAUAACUGCA UGUUUUUGG AUCUCCAGC CUCCAUCCAA
      E A T K T L S G K I Y Q D Y F R D N I H P I L D R Y D P F L
451 GAAGCCACCA AGACCUUGUC UGGUAAGAUU UACCAAGACU ACUUCGAGU UAACAUCAC CCACUUCUGG ACCGUUAUGA UCCUUUCUC
      Q H L N T I I K P T H I V N A T E D V L Y F P I I S A D Y R
541 CAACAUUCA ACACCAUUAU CAAGCCAACU CACAUGUUA AUGCAACUGA AGAUGUCCUC UACUCCCA UCAUUUCAGC CGACUACAGA
      R A D A D M N I H R I T G A F T R P N V V M D L V S L M D D
631 CGUGCUGAUG CUGACAUGAA UAUCCAUCGC AUUACUGUGU CAUUCACCCG CCAAUUGUG GUUAUGGAUC UAGUUUCACU GAUGGACGAC
      P N S G W S T V P L N T N V F G R P G W L L D Y D G T D A Y
721 CCAACUCGCG GUUGUCCAC AGUACCUUUA AACACAAGU UGUUUUGCCG CCGAGGUCUG CUACUAGACU AUGACGGAAC CGAUCGUUAU
      A W F P M E N N Y N M C D L I A P H I L A T P C T A K L G I
811 GCUUGGUUUC CUAUGGAGAA CAAUUACA AUUGUGCAUC UAAUCGCCCC UCACAUUCUC GCUACGCCCU GCACAGCGAA AUUAGGCAUA
      Y D A D I W Q N C P G N I P I T A T T A R T A R R E S E R R
901 UAUGACGCGU AUUUUUGGCA AAUUUGCCCA GGCAAUUAC CAAUAACAGC AACAAACGCU AGAACCCUC GACGUGAUC CGAAGCCGU
      F Y G S A E T R T I E Q R N Y T V N F P E L L K P R D T G A
991 UUCUACGGAU CUGCAGAAC CAGAACA AUUGAGAGAA ACUACACUGU CAUUUUUCCU GAGCUUCUAA AGCCAAGAGA CACCGGACGA
      R A L V T T T Q R A S T S G S V E P T T G A Q P E P E T P T
1081 CGGCUCUAG UCACCACCAC CCAGAGAGU UCAACUUCUG GGUCUGUUGA ACCGACGACA GGUGCUCUAC CAGAACCUGA GACACCAACU
      F Q I T F R Q F R I L D Y C Y L A K V I H K S N S Q M I N K
1171 UUUACAGUAA CAUUUCGACA AUUUCGCAU CUCGAUUAU GCUAUCUAGC GAAGGUCAUC CACAAGUCUA AUUCCAGAU GAUCAACAAG
      A L R N F I O K G A S K K T E
1261 GCACUCGCGA ACUUAUCA GAAGGAGGCC UCCAAGAAGA CCGAGUAACU AAUGUAUUA AUUAGAUUAG UUAACAACUCU GUCAUUAUUU
1351 GUGAACAUUU UGACCAUUUU GUGAACAUUU UGACCUACUU UUAUCAUGA AAGUUUUUUU UCAAGAAUUU GUGUGUUUAA CUACCACUG
1441 CUUGUUGCUU UCUGCAUAAA AGGGCAGCAG GCAUAGAAA CCAUUAGAU UAAUUUCUAA CAGGACUCUU AUGGCCAUG CC

```

34. ábra: A BCV2 dsRNS3 pozitív szálának nukleotid sorrendje és az ebből levezetett fehérje szekvencia. A BCV2 dsRNS3 1522 nt, amelyen egy nagyobb, 1182 nt hosszúságú nyílt leolvasási keret (ORF1) azonosítható. Az ORF1-t 393 aminosavat kódol és az 5' ill. 3' nem transzlálódó régiók határolják.

5.7.3. A putatív virális köpenyfehérjék (CP1 és CP2) jellemzése

A BCV2 virionokban két domináns fehérje sávot azonosítottunk: ~36 illetve ~33 kDa körüli molekulatömeggel. Ezek mellett néhány kisebb, 15 kDa-nál kisebb méretű fehérje is megfigyelhető volt a Coomassie-val festett 12,5 %-os SDS-PAA gélen (27.A ábra). A fehérjék reaktivitását BCV1-, ill. BCV2-specifikus poliklonális szérummal vizsgáltuk (27.B ábra). A BCV2-specifikus ellenanyag mindkét nagyobb molekulatömegű proteinnel erős reakciót mutatott, emellett megjelent egy szintén erős immunreaktivitást mutató fehérjesáv is a ~15 kDa mérettartományban.

A gélből kivágott fehérjék tömegspektrometriás analízise (MALDI-TOF és LC-MS/MS analízisek) alapján egyértelműen megállapítható, hogy a BCV2 nagyobbik (~36 kDa) köpenyfehérjéjét a dsRNS1 ORF1 kódolja (30 % lefedettség, 35. ábra). Ebből a fehérjéből származik a ~15 kDa molekulatömegű, alacsonyabb koncentrációban megjelenő és erős immunreaktivitást mutató fehérjesáv is (18 %-os lefedettség), amelyet proteolitikus bomlás-terméknek tekintünk (36. ábra), mivel a meghatározott peptid szekvenciák csak a fehérje C-terminális régiójából származnak.

```

1   MTGPTQAHLI EATSFTGLNR DELDSIVDAL QEENQIGTFR DRPKAYRRYV
51  HVRSQELFDR LSELYADLFT SNWSAFKHAY ITEPTGREDA NSISTKASFM
101 AQCYLTAWFW DTQYCIRESV RKLSGTAYNQ HFTEDLNLIS PKYDPFLQHL
151 NMVIRPTLIH QSTEDTLYIP LLGQTFNYNE DAYNFLNLQG CGTEIRQVYA
201 ITDVMSRRT EWSTIPLATN VLGRASWLLD FKQGNAYAWF PFESNFTELD
251 LVAPYILGIP CTPRLGPRDE DHYQHWTHND PPLSTDGNI I LNPLAYVRSS
301 ERKFFGNAEY RTMEYNSYTQ NFEAYMPRVT TSTQAKNKRK KDAAPEQLST
351 GQGDGSSSSK DAEMSTEES APPPKIPRP RQIHQFRLID WVYHSRVILG
401 ADKAMQRRAL WDFIHAGATP SHQPRP

```

35. ábra: A ~36 kDa köpenyfehérje (CP1) tömegspektrometriás analízise. Az LC-MS/MS analízis alapján az azonosított fehérje szegmensek 30 %-ban fedik le a dsRNS1 nukleinsav szekvenciából (ORF1) levezetett proteint. A vizsgált és a levezetett peptidek közötti egyezést piros kiemeléssel jelöltük.

```

1   MTGPTQAHLI EATSFTGLNR DELDSIVDAL QEENQIGTFRD RPKAYRRYV
51  HVRSQELFDR LSELYADLFT SNWSAFKHAY ITEPTGREDAN SISTKASFM
101 AQCYLTAWFW DTQYCIRESV RKLSGTAYNQ HFTEDLNLISP KYDPFLQHL
151 NMVIRPTLIH QSTEDTLYIP LLGQTFNYNE DAYNFLNLQGC GTEIRQVYA
201 ITDVMSRRT EWSTIPLATN VLGRASWLLD FKQGNAYAWFP FESNFTELD
251 LVAPYILGIP CTPRLGPRDE DHYQHWTHND PPLSTDGNIIL NPLAYVRSS
301 ERKFFGNAEY RTMEYNSYTQ NFEAYMPRVT TSTQAKNKRKK DAAPEQLST
351 GQGDGSSSSK DAEMSTEES APPPKIPRP RQIHQFRLIDW VYHSRVILG
401 ADKAMQRRAL WDFIHAGATP SHQPRP

```

36. ábra: A ~15 kDa fehérje tömegspektrometriás analízise. Az LC-MS/MS analízist követően az azonosított fehérje szegmensek 18 %-ban fedik le a dsRNS1 nukleinsav szekvenciából (ORF1) levezetett proteint. A vizsgált és a levezetett peptidek közötti egyezést pirossal emeltük ki. Az ábrán aláhúzással jelöltem azt a C-terminális végen található, 15 kDa számított molekula tömegű szekvencia részletet, ami a nagyfokú lefedettség miatt valószínűleg kiadja az LC-MS/MS analízis során vizsgált ~15 kDa fehérje szekvenciáját.

A virionokban előforduló másik köpenyfehérjéjét (~33 kDa) a dsRNS3 kódolja, az azonosított protein szekvenciák 35 %-ban fedik le az ORF1 által kódolt fehérjéjét (37. ábra).

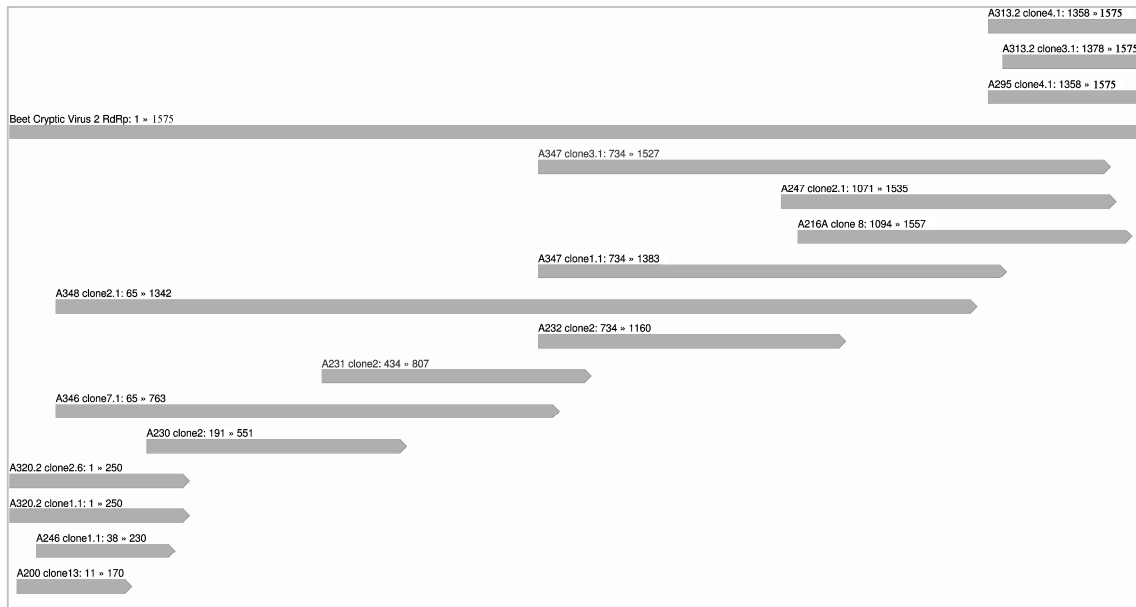
1 MAPNDELAAN LQGLKRPALD EIVHYLEDRN QIGISHDKNL SYNRTCULLT
51 NELHARLVTL YTNLFSTSWR HFKSAVRKEM PRTEANPQRW LANCYITAWF
101 WDLQASIQEA TKTLSGKIYQ DYFRDNIHPI LDRYDPFLQH LNTIIKPTHI
151 VNATEDVLYF PIISADYRRA DADMNIHRIT GAFTRPNVVM DLVSLMDDPN
201 SGWSTVPLNT NVFGRPGWLL DYDGTDAYAW FPMENNYNMC DLIAPHILAT
251 PCTAKLGIYD ADIWQNCPGN IPITATTART ARRESERRFY GSAETRITIEQ
301 RNYTVNFPEL LKPRDTGARA LVTTTQRAST SGSSEPTTGA QPEPETPTFQ
351 ITFRQFRILD YCYLAKVIHK SNSQMINKAL RNFIQKGASK KTE

37. ábra: A ~33 kDa becsült méretű köpenyfehérje (CP2) tömegspektrometriás analízise. Az LC-MS/MS analízist követően az azonosított fehérje szegmensnek 35 %-ban fedik le a dsRNS3 nukleinsav szekvenciájából (ORF1) levezetett proteint. A vizsgált és a levezetett peptidek közötti egyezést piros kiemeléssel jelöltük.

5.7.4. BCV2 dsRNS2 (RdRp) szekvencia meghatározása

A BCV2 dsRNS2 szegmensének első, 968 bp hosszúságú szekvencia részletét random primerekkel határoztuk meg (ld. 5.7.1 fejezet). A további kísérletek során ezeket a klónokat (N12, N42 és N37) felhasználtuk a nukleotid sorrend ellenőrzésére szolgáló primerek (NP41-től NP46-ig) tervezéséhez, de teljes hosszúságú contig kialakításában nem. A teljes szekvenciát az előzőekben már leírt stratégiát alkalmazva határoztuk meg. A rövid szekvencia elemekből kialakított komplett cDNS-szekvencia helyességének ellenőrzéséhez kísérletet tettünk a teljes dsRNS2 molekula amplifikálására is. Az NP52 és NP94 primerekkel 1462 nt hosszúságú PCR terméket vártunk, azonban mivel az NP94 primer egy 8 nt-nyi egyezés következtében aspecifikusan is kötődni képes, rövidebb amplifikációs terméket kaptunk (A348/2/1). Emellett a dsRNS2 szálát két részletben is felsokszoroztuk (A346 [NP52-NP93] és A347 [NP45-NP94] szakaszok).

A BCV2 dsRNS2 teljes szekvenciáját tizenhat egymással átfedő, független cDNS-klónból határoztuk meg. A dsRNS2 szekvencia minden részletét legalább két egymástól független klónnal erősítettük meg (38. ábra). Azokban az esetekben, ahol a párhuzamos klónok szekvenciái eltértek egymástól (ez tíz nukleotid esetében fordult elő) további független klónokat szekvenáltattunk és használtunk fel a végleges nukleotid sorrend kialakításához.



38. ábra: A BCV2 dsRNS2 szekvenciájának meghatározására szolgáló független cDNS-klónok elhelyezkedése az RdRp-t kódoló szálon. A cDNS-klónok zömét random hexamer és BCV2 dsRNS2-specifikus primereket használva nyertük. Az 5'-, illetve 3'-végeket oligo(dT) primerek segítségével előállított klónokból határoztuk meg. Az ábrán a klón jelölése mellett a lefedett szekvencia régiókat is megadtuk. Minden levezetett szekvencia legalább két független klón szekvenciáján alapul és a klónok átfednek.

A BCV2 dsRNS2 1575 nt hosszúságú (39. ábra), a molekula GC-tartalma 43 %-os. A szekvencia számítógépes analízise során a dsRNS2 pozitív szálán egy nagy, 1428 nt hosszúságú ORF-t (ORF1) azonosítottunk. A negatív szálon két kisebb leolvasási keret (ORF2: 478 - 705 nt, ORF3: 708 - 986 nt) található. Az azonosított ORF1 start kodonja, az AUG a 100-102, az UAG stop kodon pedig az 1525-1527 pozícióban helyezkedik el (39. ábra). Az 5' nem transzlálódó régió (5' UTR) 99 nukleotid hosszú és az 5'-AGA ATT ATA CCC...-3' szekvencia részlettel kezdődik. A 48 nt hosszúságú 3' nem transzlálódó régió (3' UTR) az ORF1-t követően helyezkedik el. A dsRNS2 molekulát nem zárja adenilált vég.

```

1 AGAAUUAUAC CCUAGCUUUC UAGAAGACG GGAGUCAUAG UGAAAGCGCU AGGUAAGAU UUACUACUAA UUUUAUCGU CCUACGUGU
M R T I N N Y E Y T S F T E D L E E T D Y T H P H V V
91 ACUUCACAAU UGAGGACAAU CAACAACUAC GAGUAUACAA GUUUCACCGA AGAUCUCGAG GAGACAGAAU AUACUCACCC ACACGUGGUC
R R D P E V T Y E D T F A K K E L L S R Y P A L Y E N L I R
181 AGGAGAGUUC CUGAAGUAC CUUAAGAC ACCUUCGCAA AGAAGGAGUU GUUAAGCAGG UAUCCAGCAC UGUUAGAAA UUUUAUCCGU
G W S R S Y Y T G Q E H L R A I M Q Y A T P N T N F S E C V
271 GGAUGGUCAA GAAGCUAUA CACUGGACAA GAGCACUUGC GUGCGAUCAU GCAGUAUGCC ACACCAAUA CUAACUUUAG UGAAUGGUC
Q H A Y T K A I T K V T E S L H S L P T V R A F N V L E E L
361 CAACACGCUU AUACCAAAGC GAUCACUAAA GUGACAGAAA GUUUAACUAG CCUCCAACU GUGAGGGCAU UCAAUGUUCU GGAAGAGUUA
D L I P Y E S S S S A G Y T Y R G V K G P O H G E N H M O A
451 GAUCUCAUUC CAUAUGAAUC GUCAUCAUCG GCGGCUAUA CGUAUAGAGG CGUUAAGGU CCACAACAU GUGAAAUA UAUGCAAGCG
I K T A K A V L W S V I K D D G E G I E H V I D T Y V P D V
541 AUCAAAACAG CCAAGGCAGU ACUUUGGUCC GUCAUAAAAG ACGACGGAGA AGGUAUCGAA CACGUCAUUG ACACUUUAGU GCCAGACGUA
G Y T R T Q L T D L R E K M K V R G V W G R A F H Y I L L E
631 GGUUAUACGA GAACUCAGCU UACUGAUUCU CGAGAGAAGA UGAAGGUUAG AGGAGUAUGG GGAAGAGCGU UUCAUUACAU UCUUCUAGAA
G T S A A P L L E A F A N S N T F F H I G K D P T V S V P Y
721 GGAUCUUCAG CGGCACCGCU ACUUGAGGCC UUCGCAACU CAAUAACAUU CUUCCAUAUU GGAAGAGACC CAACAGUUG CGUACCAUUA
L I S Y T K G Q A P W L T A I D W Q A F D A T V S R F E I N
811 CUAAUUUCGU ACACCAAAGG ACAAGCUCA UGUUAACGG CAAUUGACUG GCAAGCAUUU GAUGCUACAG UUAGCAGAAU CGAAUUAAC
A A F D I I K S K I T F P N L E T E Q A F E I S R Q L F I H
901 GCAGCCUUGU AUUAUAUCAA GAGCAAGAUU ACGUUUCCAA ACCUGGAAAC AGAGCAAGCG UUCGAAUUCU CAAGACAUCU GUUCAUCCAU
K K L A A P N G K I Y R I H K G I P S G S Y F T S I I G S V
991 AAGAAGCUGG CAGCGCAA A CGAAAGUAU UACGAGAUAC ACAAGGUUA CCACUACGGG AGUUUUUCA CAUCAUUUA CGGAUCAGUC
V N R L R I E Y L W N L K F N R G P K V C F T Q G D D S L I
1081 GUGAAUAGAU UGAGAAUGA AUUUUAUGG AACCUCAAU UCAACAGAGG ACCAAAAGUA UGUUUCACUC AAGGCGACGA CUCGCUAUA
G D D E L Y S P M D M A A F V K P L N W F I N T S K S M T S
1171 GGAGAUGAGC AACUGUACAG CCCAAUGGAC AUGGCGCAU UUGUUAAACC ACUGAACUGG UUUUAUAACA CAUCAAGUC AAUGACUUCG
K V P E A I T F L G R S S L G G L N Q R D L K R C L R L L I
1261 AAAGUCCAG AAGCCAAUAC GUUCUUGGGA CGGUAAGUU UAGGCGGCUU AAUAACAGU GAUUUAAGC GUUGCCUCCG UUUACUUAUA
L P E Y P V T S G D I S A F R A N S I W R D S G S T S Q I L
1351 UUACCAGAU ACCCGGUAC AUCUGGCGAU AUUAGCAUUC UCAGGGCUAA CUCARUCUGG AGAGAUCUGU GUUCAACAG CCAAUCCUU
H E I A N A L R R K Y G I A K E Q D V P R Y L R P W K A
1441 CAUGAGAUAG CAAACGCACU UCGACGAAAG UAUGGAAUUG CUAAGAGCA GGACGUACCA AGGUAUCUCA GACCCUGGAA AGCCUUAUA
1531 GCAUCCAUAC CUCAUCCGGG GGGGAAGGUU CCAUUGGAAC CCUCU

```

39. ábra: A BCV2 dsRNS2 1575 nt hosszúságú, és egy nagy, 1428 nt nyílt leolvasási keretet (ORF1) tartalmaz. Az ORF1 475 aminosavat kódol és az 5' (99 nt), ill. 3' (48 nt) nem transzlálódó régiók szegélyezik.

5.7.5. Putatív RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp) jellemzése

A BCV2 dsRNS2 nagy nyílt leolvasási kerete (ORF1) 475 aminosavból álló putatív fehérjét kódol, melynek számított molekulatömege 54,2 kDa. Ez a protein az NCBI adatbázisban található szekvenciák közül a *Partitiviridae* család vírusainak RNS-függő RNS-polimerázaival mutatja a legnagyobb hasonlóságot. A *Partitiviridae* családon belül az növényi kriptikus vírusok között találjuk a legközelebbi rokon polimeráz szekvenciákat: *Black raspberry cryptic virus* RdRp részleges szekvenciájával (ABU55400) 68,6 %-os a hasonlósága, a *Pepper cryptic virus 1* RdRp parciális szekvenciájával (ABC96789) 66,6 %-os, a *Beet cryptic virus 3*-ével (AAB27624) 65,9 %-os és a *Pyrus pirifolia partitivirus*-ével pedig (BAA34783) 64,6 %-os (40. ábra). A *Fragaria chiloensis cryptic virus* (YP001274391) és *Raphanus sativus cryptic virus 2* RdRp-vel (ABB04855), melyek szintén a *Partitiviridae* család növényi vírusai, már kisebb mértékű hasonlóságot tudunk azonosítani: 47,7 %-t és 46,9 %-t. A *Beet cryptic virus 1*, a *Vicia cryptic virus* (AAX39023) és *White clover cryptic virus 1* (AAU14888) RdRp-k mindössze ~23 %-ban hasonlók a BCV2 putatív RdRp-hez, a

Partitiviridae család gomba vírusaival végzett összehasonlítás során is 30 % alatti értékeket kaptunk.

BCV3 RDRP	(1)	MAYRNIREYEE T N F N E E L Y Q I E G H T N T I G R E S E V I L N D E F A K A I L I D E F F V L Y E Q V C Q G W A R S F Y T L E G H M Q
BCV2 RDRP	(1)	--MRTINNYEYTSFTELDLEETDYTHPHVVRRDPEVTYEDTFAKKELLSRYPALYENLIRGWSRSYYTGQEHLR
BrCV RDRP	(1)	MALQLVNDHDFIDFQADLEILPENHAQTI R R E P N T V Y H D D F A L R E L K S A Y P L L Y E Q Y L E G W S R S F Y T K E D H M K
PCV1 RDRP	(1)	-----MPEKHLA
PpV RDRP	(1)	MEQNAFN G F E F V D Y S E E L E N L N Q N H I H K V R R E S N T T Y V D K F A E R E L I D L H F E Y H R Q F I Q G W S R S Y Y N T E R H M E
*		
BCV3 RDRP	(74)	A I L A Y A Q P D T F R E T F D Q T I W D Q A Y T A V Q N E L R S L E K A R A F D V N T E L D K V P Y E Q S S S A G Y G Y R S H K G F P G G E T H
BCV2 RDRP	(72)	A I M Q Y A T P N T N F S E C V Q H A Y T K A I T K V T E S L H S L E T V R A F N V L E E L D L I P Y E S S S A G Y T Y R G V K G F Q H G E N H
BrCV RDRP	(74)	A I M Q Y S Y P N I F I E A V N E N L Y N Q A I N A T L E R L R S L E T V R A I D V L T D L D S V S F E P T S S A G Y G Y N G V K G D S L G E I H
PCV1 (RDRP)	(8)	A V L N Y S M P N V F A S Q L S Q S L Y R Q A I E S A K N G F I S L P R V K A F D V L T E M D Q V P F K S S S S A G Y N Y T G R K G L I G D E N H
PpV RDRP	(74)	A L L N Y G T R N I F V D N V D Y N L Y Q G C I D T V K N G L R S L E R V K A F D V L T E L N L V S Y K S T A A G Y N Y M G A K G F D G Y N H
* * * * *		
BCV3 RDRP	(147)	M R A I S R V K P T L M T A I R P D E E G P E Y T L E S V P D I G Y T R T Q L A D L R E K T K V R G V W G R A F H Y I L I E G T A A R P L L E N
BCV2 RDRP	(145)	M Q A I K T A K A V L W S V T K D G E G I E H V I D T Y V P D V G Y T R T Q L T D L R E K M K V R G V W G R A F H Y I L L E G T S A A P L L E A
BrCV RDRP	(147)	K Q A I R R A K A T L W S A I R T E D E G I D H V I R T F V P D V G Y T R T Q L T Q H R E K T K V R G V W G R C F H Y I L L E G T A A Q P L L D A
PCV1 RDRP	(81)	S R A I S I A K A V L W S A I K D D G E G I E H V I R T S V P D V G Y T R T Q L T D L L E K T K V R Q V W G R A F H Y I L L E G L V A Y P F I Q T
PpV RDRP	(147)	K Q A I R R A R A T V G D V S D N G I E G L R R A I T T A V P D V G Y T R T Q L T D L T E K T K I R N V W G R A F H Y I L I E G T S A D P L I R M
* * * * *		
BCV3 RDRP	(220)	F M L G T F E M H I G S D P Q L S V P R I L H Q M K R E G S K W L Y A L D W S S F D S S V T R F E I N C A F N L L K E R I E F P N E E T E L A F E
BCV2 RDRP	(218)	F A N S N T F E F H I G K D P T V S V P Y L I S Y T K G Q - A P W L T A I D W Q A F D A T V S R F E I N A A F D I I K S K I T F P N L E T E Q A F E
BrCV RDRP	(220)	F K A G T T E L H I G Q D P K Q S V P N L L S I S N H - C K W L M A L D W S S F D A T V S R F E I H A A F D I L K Q F V Q F P N V E T E Q A F E
PCV1 RDRP	(154)	V M S H K T F I H A G Q D P L I S V P R L L S D V A L N - C K W I Y S L D W S Q F D A T V S R F E I H A A F D I I K S Y V D F P N Y E T E Q A F E
PpV RDRP	(220)	F S K T K S E Y H I G R D P L D S V E D V L S E T A G K - A R W L Y A I D W K Q F D A T V S R F E I N A A F D I I M D L T E F P N Y P I Y V A F E
* * * * *		
BCV3 RDRP	(293)	L S R I L F K H K K L A A P D G N I Y M I H K G I P S G S Y Y T S I V G S V V N R L R I E Y I W R V L F S R S F H R C Y T Q G D D S L I G E T F L
BCV2 RDRP	(290)	I S R Q L F I H K K L A A P N G K I Y R I H K G I P S G S Y F T S I I G S V V N R L R I E Y L W N L K F N R G E K V G F T Q G D D S L I G D D E L
BrCV RDRP	(292)	I S R Q L F I H K K I A A P D G K I Y W S H K G I P S G S Y Y T S I I G S V V N H L R I E Y I F R T V T G N G F K V G Y T Q G D D S I I G L D S Y
PCV1 RDRP	(226)	I T R Q L F I H K K V A A P D G Y I Y E S H K G I P S G S Y Y T S L V G S I I N Y L R I N Y L W R L L T G H P E Q Q C H T L G D D S L V G D N S Y
PpV RDRP	(292)	L S R Q L F I H K K I A A P D G Y I Y W S H K G I P S G S Y F T S I I G S I I N R L R I E Y L W R K I T G H G F L A C Y T Q G D D S L S C D D E F
* * * * *		
BCV3 RDRP	(366)	V E F E T V A R E A A K Y G W I M N P D K T E Y S T D P G Y V T F L G R T A H G F M N A R S L D K C L R L L M F P E Y P V T S G R I S A Y R A E S
BCV2 RDRP	(363)	Y S P M D M A A F V K P L N W F I N T S K M S T K V P E A I T F L G R S S L G G L N Q R D L K R C L R L L I L P E Y P V T S G D I S A F R A N S
BrCV RDRP	(365)	I D F S L L S E A A Q P L G W V L N E A K T E T E A V G M -----
PCV1 RDRP	(299)	V N P Q A I E E A A N K L -----
PpV RDRP	(365)	T P E K F A E I A N Q I G W V L N E K T E Y S T I P S E V H F L G R T M L G G L N T R E I K R C L R L L I Y P E Y P V D S G R I S A Y R A K S
*		
BCV3 RDRP	(439)	I A R D C G L S E V I N L V A R R I R R Q Y G V A S E D E V P H Y F K R Y V A
BCV2 RDRP	(436)	I W R D S G S T S Q I L H E I A N A L R R K Y G I A K E Q D V P R Y L R P W K A
BrCV RDRP	(-)	-----
PCV1 RDRP	(-)	-----
PpV RDRP	(438)	I S E D V C R L S E L L N K I E R R I Q G Q Y G I A S D E E V P D Y F K R Y V L

40. ábra: *Beet cryptic virus 2*, *Beet cryptic virus 3* (AAB27624; 65,9 %), *Black raspberry cryptic virus* (ABU55400; 68,6 %), *Pepper cryptic virus 1* (ABC96789; 66,6 %) és *Pyrus pirifolia partitivirus* (BAA34783; 64,6 %) RdRp-k összehasonlító analízise.

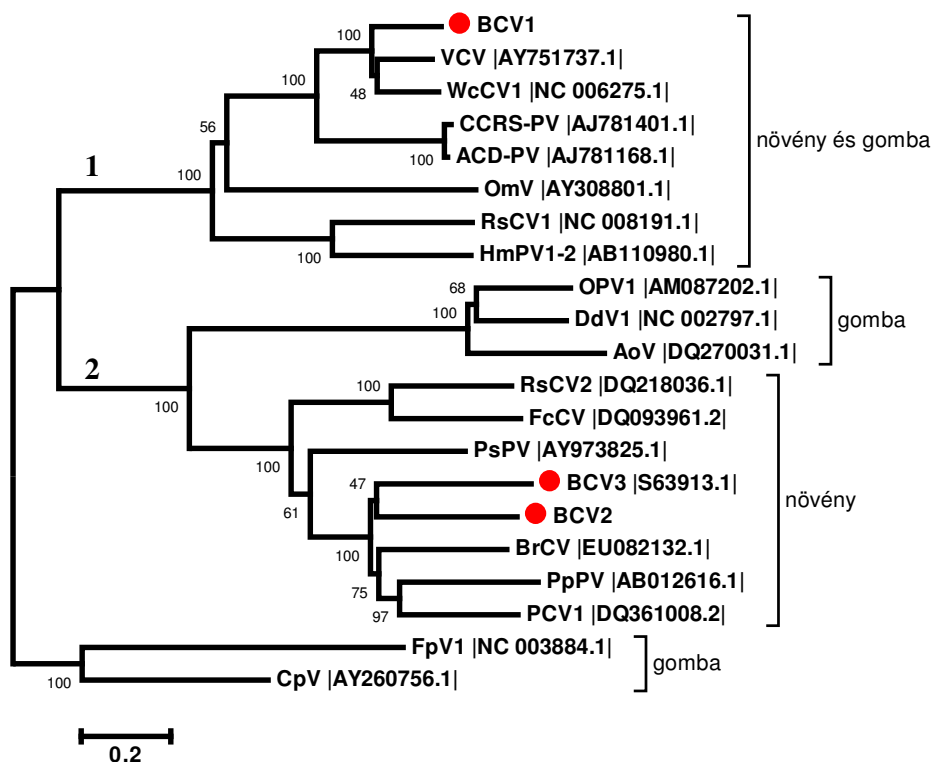
A BCV2 dsRNS2 ORF1 által kódolt fehérje (475 AA) tartalmazza az RNS-függő RNS-polimerázra jellemző valamennyi (3-tól 8-ig) konzervált aminosav motívumot. Mivel partitív vírusok egymáshoz való kapcsolatát a putatív RdRp szekvenciák összehasonlításával lehet a legjobban jellemezni (Bruenn, 1993), ebben az esetben is elvégeztük az RdRp-kben előforduló konzervált motívumok összehasonlítását, és BCV2 RdRp-vel fennálló hasonlóságukat a 41. ábrán mutatjuk be. A teljes szekvenciák összehasonlítása alapján generált filogram a 42. ábrán tekinthető meg.

RDRP	3	4	5	6	7	8
OPV1	PKTRLVW	54 DFSSFDTKVP	61 GVPSGSWWTQMLDSVVN	19 VLGDSS	38 KLLGVK	7 RPTLEW
DdV1	PKTRLVW	54 DFSAFDSKVP	61 GVPSGSWWTQMLDSVVN	19 VLGDSS	38 KLLGTK	7 RSTDEW
AoV	PKTRLVW	55 DFSSFDSKVP	61 GVPSGSWWTQMVDSVVN	19 VLGDSS	38 KLLGTT	7 RDTDEW
FpV1	LKQRPVY	54 DWSGFDQRLP	72 GVP SGMLNTQFLDSFGN	24 IMGDDN	44 ETLISYQ	7 RPIGKL
CPV	LKVRPVN	55 DWSKFDQVVP	93 GVP SGILCTQLIDSFVN	24 LMGDDN	44 ETLGYT	7 RSLSKL
OMV2	PKVRLVF	55 DWSGFDRYAR	74 GIYSGYMQTQLIDSLYN	21 VQGDSS	39 EVLYKYR	7 RDPIAL
RsCV1	PKIRTVF	60 DWSEFDMRVY	66 GMP SGIFCTQFWD SFYN	22 VLGDVV	46 QVLSYI	7 RDSNQL
HmV12	DKVRTVF	61 DWSEFDMRVY	79 GMP SGIFCTQFYDSFYN	21 LMGDDA	46 TVLSYT	7 RSAEDV
ACD-PV	NKMRTIW	60 DWKRFDKKAY	71 GIP SGLFITQLIDSWYN	21 VQGDSS	46 EVLSYR	7 RDELAM
CCRS-PV	NKMRTIW	60 DWKRFDKKAY	71 GIP SGLFITQLIDSWYN	21 VQGDSS	46 EVLSYR	7 RDELAM
BCV1	NKMRTIW	60 DWSRFDKRAY	70 GIP SGLFITQLIDSWYN	21 VQGDSS	46 EVLSYR	7 RDEIMM
VCV	NKMRTIW	60 DWSRFDKRAY	70 GIP SGLFITQLIDSWYN	21 VQGDSS	46 EVLSYR	7 RDEIAM
WCCV1	NKMRTIW	60 DWSRFDKRAY	70 GIP SGLFITQLIDSWYN	21 VQGDSS	46 EVLSYR	7 RDEITM
FcCV	RKIRNVW	55 DWSGFDASVQ	50 GIP SGCFTNIIGSIVN	19 THGDSS	40 SFLSRK	7 RDELLC
RmCV	RKIRNVW	55 DWSGFDASVQ	50 GIP SGCFTNIIGSIVN	19 THGDSS	40 SFLSRK	7 RDELIC
RsCV2	TKVRNVW	55 DWSGFDASVQ	50 GIP SGCFTNIIGSVVN	19 THGDSS	40 TFLGRS	7 RDEFVC
BCV3	TKVRGVW	55 DWSSFDSSVT	50 GIP SGSYYTSIVGSVVN	20 TQGDSS	38 TFLGRT	7 RSLDKC
BCV2	MKVRGVW	55 DWQAFDATVS	50 GIP SGSYFTSIIGSVVN	19 TQGDSS	38 TFLGRS	7 RDLKRC
BrCV	TKVRGVW	55 DWSSFDATVS	50 GIP SGSYYTSIIGSVVN	20 TQGDSS	-	-
PCV1	TKVRQVW	55 DWSQFDATVS	50 GIP SGSYYTSLVGS IIN	20 TLGDSS	-	-
PpV	TKIRNVW	54 DWKQFDATVS	50 GIP SGSYFTSIIGS IIN	20 TQGDSS	38 HFLGRT	7 REIKRC
PpPV	MKIRNVW	54 DWSGFDASVS	50 GIP SGSYYTMLVDTIIN	19 CQGDSS	40 EYLGRT	7 RERQKV
	* *	* **	* ** *	***	*	*

41. ábra: Néhány *Partitiviridae* családba tartozó vírus RNS-függő RNS-polimeráz motívumának összehasonlító analízise. Az összehasonlításban szereplő vírusok neveinek rövidítésjegyzéke a 23. ábra szövegében található. Az aminosavak teljes egyezését sárga alapon piros színnel és az oszlop alá helyezett csillaggal jelöltük. A BCV2 RdRp motívum aminosavaival mutatott részleges egyezést szürke alapon kék színnel jelöltük.

Az általunk meghatározott *Beet cryptic virus 1* és -2, valamint az irodalomban leírt RNS-függő RNS-polimeráz nukleinsav szekvenciáinak összehasonlító analízise során azt találtuk, hogy a *Partitiviridae* családba tartozó vírusokat tartalmazó filogenetikai fa két egymástól jól elkülönülő ágra osztható (42. ábra). A filogram mindkét fő ágán egymás közelében figyelhetők meg a gomba eredetű partitivirus és a növényi eredetű kriptovírus szekvenciák. Az egyes főágakban elhelyezkedő gomba és növényi vírusok hasonlósága jóval nagyobb, mint amilyen hasonlóságot a különböző főágakon elhelyezkedő növényi vírusok között megfigyelhetünk. A filogramon belül a növényi kriptovírusok három csoportra oszthatók fel. A BCV1 a filogenetikai fa első ágán helyezkedik el, a *Vicia cryptic virus*, a *White clover cryptic virus 1* és a *Raphanus sativus cryptic virus 1* növényi kriptikus vírusokkal egyetemben. A BCV1, a VCV és WCCV1 RdRp-je mellett feltűnően nagy hasonlóságot mutat a *Partitivirus* nemzetségbe tartozó gombavírusok polimerázával, így például a cseresznye klorotikus fertőzésével asszociáltan jelentkező *Amasya cherry disease associated-partitivirus* és *Cherry chlorotic rusty spot-associated partitivirus* vagy a *Helicobasidium mompa partitivirus VI-2* polimerázával, melyek szintén a filogram első ágán helyezkednek el. Az adatbázisokban található többi növényi kriptikus vírus, szintén az RdRp-szekvenciák alapján, a filogenetikai fa

második ágán található. A BCV2, a *Beet cryptic virus 3*, *Pepper cryptic virus 1*, *Black raspberry cryptic virus* és *Pyrus pyrifolia partitivirus* növényi kriptikus vírusok közé sorolható. A tripartita genomú *Raphanus sativus cryptic virus 2* és a *Fragaria chiloensis cryptic virus* pedig egy harmadik, az előző kettőtől elkülönülő csoportot alkot, szintén a filogram második ágán belül.



42. ábra: A BCV1, BCV2 és BCV3 rokonsági körébe tartozó vírusok GenBank-ból származó RdRp nukleotid szekvenciái alapján szerkesztett filogram. Az ágvégeken az egyes vírusok rövidítéseit (rövidítések jegyzéke a 23. ábra szövegében található) tüntettük fel, mellettük a GenBank elérési kód (*accession number*) szerepel. Az elágazásoknál található értékek az 1000 ismétléssel számított *bootstrap* értékeket jelzik, százalékban kifejezve. A törzsfá alatt található szakasz hosszának genetikai távolságra vonatkoztatott értéke 0,2 egység.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. A kriptikus- és endornavírusok elterjedése és kapcsolatuk a gazdanövényekkel

A kriptikus- és endornavírusok elterjedésének szisztematikus vizsgálatát kiválasztott növényfajokban és nemzetségekben azért láttuk szükségesnek, mert hozzásegítenek, hogy későbbi, a gazda-vírus kölcsönhatás felderítését célzó vizsgálatainkhoz megfelelő rendszereket azonosítsunk, és előzetes információt nyerjünk az adott fajjal asszociált dsRNS-vírusok sokféleségéről vagy potenciális hasonlóságáról. Kísérleteink során abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a teljes nukleinsav kivonatok ≥ 10 kbp mérettartományában detektált dsRNS-ek putatív endornavírusok, míg az 1-3 kbp tartományban kimutatott dsRNS párosok putatív kriptovírusok jelenlétére utalnak. Munkánkat megkönnyítette, hogy a dsRNS-ek kimutatását specifikus ellenanyagok segítségével, nyers nukleinsav kivonatokban végezhettük el.

6.1.1. A kriptikus- és endornavírusok fajfüggő előfordulás *Capsicum* fajokban

A kriptikus- és endornavírusokról egyelőre nem áll rendelkezésünkre elég adat ahhoz, hogy evolúciós eredetükre, ill. kialakulásuk/szétválásuk idejére vonatkozóan megalapozott következtetéseket vonhassunk le. Elterjedésük és hasonlóságuk vizsgálata genetikailag jól jellemzett génbanki gyűjteményekben azonban kísérleti adatokat szolgáltathat megbízható következtetések levonásához vagy az irodalomban javasolt hipotézisek verifikálásához. Vizsgálatainkhoz a *Capsicum* nemzetséget választottuk, mert a paprika hungarikum, géntérképezése a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban nagy lendülettel folyik, és legalábbis a *Capsicum annuum* esetében irodalmi adatok álltak rendelkezésre arról, hogy valószínűleg mindkét vírus előfordulhat ebben a fajban (Valverde és mtsai., 1990). Az elmúlt évben szekvenciaadatokkal is alátámasztották, hogy az izolált dsRNS-ek valóban virális eredetűek, és joggal nevezhetők a *Pepper cryptic virus 1* és *Bell pepper endornavirus* genomi dsRNS-einek (Valverde és Gutierrez, 2007 és 2008).

A kriptikus és endornavírusok előfordulását a *Capsicum annuum* fajon túlmenően hét további *Capsicum* fajban (*C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. praetermissum*, *C. chacoense*, *C. pubescens*, *C. eximium*) is megvizsgáltuk. A paprika gazdasági jelentősége miatt jól jellemzett génbanki gyűjtemények állnak rendelkezésre, amelyek közül Csilléry Gábor gyűjteménye vált számunkra hozzáférhetővé. Ebből a gyűjteményből Dr. Nagy István 64. csoportjában is vizsgált *Capsicum* fajtát bocsátott rendelkezésünkre. Vizsgálatunk elsődleges

célja a különböző paprikafajokban található duplaszálú RNS-vírusok kimutatása volt, illetve annak tisztázása, hogy a különböző fajokba tartozó fajták származásuk szerint tartalmaznak-e dsRNS-vírusokat, tehát hogy ezek a vírusok a törzsfajlás egy régebbi szakaszában kapcsolódtak-e a növényekhez, és velük együtt fejlődtek tovább, vagy a jelenlétük független a taxonómiai besorolástól, a növények származásától.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a nagy molekulatömegű, endornavírusok jelenlétére utaló dsRNS molekula a mikroszatellit markerek alapján felállított *Capsicum* genetikai törzsfája (Nagy és mtsai., 2007) első ágának szinte minden fájában előfordul, azaz a *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* var. *baccatum* és var. *pendulum* fajokban (15. ábra). A dsRNS a legtöbb fajnál minden, vagy majdnem minden fajtában jelen volt, kivéve a *C. annuum* fajt, ahol négy fajtában megtaláltuk, de hatban nem volt jelen. Bár a vizsgált 10 fajta nem reprezentálja kellő mélységgel a különféle nemesített fajtákat, köztudott, hogy a nemesítők ebbe a fajtakörbe a többiekénél nagyobb heterogenitást vittek be, ami az endogén dsRNS-ek szintjén is megmutatkozik. Feltételezésünk szerint ez az oka annak, hogy ennél a fajnál nem ismerhető fel egy közös, a különböző fajtákra jellemző dsRNS-mintázat.

A genetikai törzsfája második ágába tartozó fajok közül a *C. eximium* és a *C. pubescens* nem tartalmazott enigmatikus dsRNS-t, és a *C. chacoense*-ben is jóval kisebb volt a dsRNS molekulatömege, mint az első ág fajaiban. Az endornavírusok mérettartományába eső dsRNS-ek tehát méretük és meglétük szempontjából a törzsfája két fő ága között jellegzetes eltérést mutatnak. Arra vonatkozólag, hogy szekvenciájukban és a kódolt fehérjékben van-e különbség, és ha igen, mekkora a variabilitás, az elvégzett kísérletekből nem vonható le következtetés.

A kisebb méretű, kriptikus vírusok jelenlétére utaló 1-3 kbp dsRNS-párosok sokkal kevesebb fajtában vannak meg, de itt is megfigyelhető a korreláció a paprika fajtacsoportok (Nagy és mtsai., 2007) és a dsRNS-párosok előfordulása között (15. ábra). Nem mutathatók ki ilyen kis molekulatömegű dsRNS-párosok a *C. praetermissum*, *C. baccatum* var. *baccatum* és var. *pendulum*, valamint a *C. eximium* és *C. pubescens* fajokban. A legváltozatosabb mintázatot a *C. chinense* és *C. frutescens* fajtáinál figyeltük meg, itt két-négy dsRNS-spéciesz fordult elő. A *C. chacoense* fajtákban is találtunk kisebb méretű dsRNS-párosokat, a *C. annuum* pedig itt is fajtafüggő variabilitást mutatott. Amennyiben a dsRNS-párosok kriptikus vírusok genomi dsRNS-ét reprezentálják, az eredmények alapján legalább 4-5-féle kriptikus vírus előfordulása feltételezhető paprikában. A dsRNS-ek közötti szekvencia-hasonlóságról és annak mértékéről eddig nem állnak rendelkezésre adatok.

Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a különböző paprikafajokban mind az endornavírusokra, mind a kriptikus vírusokra jellemző dsRNS-ek kimutathatók. A vizsgált dsRNS-ek mintázata a mikroszatellit markerek alapján megállapított genetikai törzsfán belül az egyes csoportokra, ill. fajokra jellemző, ami a filogenetikai fa helyességét is alátámasztja (15. ábra). Szekvencia adatok hiányában a vírusszekvenciák esetleges közös eredetére nem vonhatók le további következtetések, de megkezdtük az egyik *C. chinense* fajta dsRNS-einek klónozását, hogy a szekvencia ismeretében tervezett primerek segítségével PCR-rel vizsgálhassuk, hogy mely fajokban/fajtákban fordulnak elő hasonló szekvenciák. Hasonló PCR-amplifikációt tervezünk az irodalomban publikált parciális PCV1 szekvencia alapján tervezett primerekkel is.

6.1.2. A *Beet cryptic virus*-ok megváltozott gyakorisága cukorrépában

A *Beta* nemzetség különböző fajaiban és alfajaiban háromféle kriptikus vírust azonosítottak: a *Beet cryptic virus 1*, -2 és -3-t (BCV1, BCV2 és BCV3), melyek genom szegmenseik mérete és köpenyfehérjéjük immunológiai tulajdonságai alapján is megkülönböztethetők egymástól (Antoniw és mtsai., 1986; Ghabrial és mtsai., 2005). A *Beta* nemzetség kriptikus vírusainak korai jellemzése során a BCV1 és a BCV2 vírusok egyaránt gyakoriak voltak a termesztett cukorrépaajtákban; a két vírus külön-külön és együtt is előfordult (Kassanis és mtsai., 1977; Boccardo és mtsai., 1987). Ezt támasztották alá Dr. Lukács Noémi és munkatársai által a 90-es években az NSZK-ban és Magyarországon végzett analízisei is. A BCV1 ugyan ritkábban fordult elő, mint a BCV2, de igen elterjednek számított, és egyes fajtákban a BCV3-t is ki tudták mutatni (Lukács Noémi személyes közlése). Ezután azonban változás következett be a cukorrépa fajtahasználatban, és kísérleteim megkezdésekor már egyetlen egy találmásra begyűjtött cukorrépa mintákban sem sikerült kimutatnunk a BCV1 vírus jelenlétét. Célszerűnek tűnt tehát a véletlen próbálkozások helyett szisztematikus vizsgálatokat végezni, ezért megvizsgáltuk a 2004-ben Magyarországon termesztésben lévő valamennyi fajtát, hogy az egyes BCV vírusok elterjedéséről átfogó képet nyerjünk.

Eredmények szerint, a BCV1 a megvizsgált 28 cukorrépa fajta közül csak egyben, a Mars fajtában fordult elő, azonban itt is a BCV2 vírussal együtt volt jelen. Kizárólagosan BCV1 tartalmú egyedeket a későbbi szisztematikus analízisek során sem sikerült találnunk. A BCV2-t összesen 14 fajtában tudtuk azonosítani. A BCV3, amely a cukorrépában egyébként is elég ritka, a 28 fajta egyikében sem volt detektálható (16. ábra és 7. táblázat). Pillanatnyilag nem világos, hogy minek köszönhető a korábban gyakori BCV1 vírus visszaszorulása. Az

utóbbi évtizedekben a cukorrépa nemesítés egyik legfontosabb célja a rhizománia rezisztens fajták előállítására volt (Scholten és mtsai., 1996), és a nemesítők szerint valamennyi általunk vizsgált fajta rendelkezett ezzel a tulajdonsággal, egyes fajták még különböző gombarezisztenciákat (rizoktónia-, cercospóra- és lisztharmat rezisztencia) is mutattak. Jelenlegi ismereteink alapján nem dönthető el, hogy a BCV1 miért tűnt el teljesen ezekből a fajtákból. Lehetséges, hogy az újonnan nemesített fajták kevésbé támogatják a BCV1 fennmaradását, hiszen a kis kódoló kapacitású kriptikus vírusok különösen rá vannak utalva a gazdanövénnyel való szoros együttműködésre.

Meglepetésünkre több fajtában egy ismeretlen eredetű dsRNS páros (3-3,5 kbp) is megjelent. Méretük alapján ezek a dsRNS-ek a *Betacryptovirus* nemzetségre jellemző mérettartományban helyezkednek, ezért elképzelhető, hogy egy eddig még ismeretlen a bétakriptovírus jelenlétét indukálják.

6.1.3. A kriptikus vírusok *in vitro* fennmaradása

A kriptikus vírusok fennmaradása - a genom kis kódoló kapacitása és a gazdanövény egész élete során tartó perzisztenciája miatt - minden esetben a gazdaszervezet lététől és segítő hatásától függ, ami a gazdához való nagyfokú alkalmazkodásukat feltételezi (Boccardo és mtsai., 1987). Kísérleteink során *in vitro* szegfű és cukorrépa kultúrákban vizsgáltuk meg, hogy a természetes körülmények között konzekvensen működő adaptáció vajon képes-e a hosszú távú szövettenyésztés, természetestől eltérő körülményei mellett is biztosítani a kriptikus vírusok fennmaradását.

Kísérleteink során dsRNS-immunblot technikával mindhárom BCV-vírus dsRNS genomját sikerült kimutatnunk az 5-7 éven keresztül fenntartott *in vitro* cukorrépa és takarmányrépa kultúrákban (6. ábra; Szegő és mtsai., 2005). A detektált dsRNS-ek molekuláris azonosítását RT-PCR-rel is elvégeztük. Erre azért volt lehetőségünk, mert az általunk meghatározott BCV1 és -2 szekvenciák, valamint a BCV3 RdRp-jének az irodalomban publikált szekvenciája alapján primereket terveztünk, és bevezettünk egy PCR-en alapuló eljárást a BCV1-3 vírusok biztonságos és specifikus azonosítására (Ilyés és mtsai., 2007). Az *in vitro* körülmények között nevelt növényekben a szekvencia-specifikus primerekkel amplifikált szakaszok nukleotid sorrendje mindhárom esetben 99 %-nál magasabb egyezést mutatott az általunk meghatározott BCV1 és BCV2, ill. a GenBank adatbázisban található BCV3 (S63913) szekvenciáival (Xie és mtsai., 1993).

Vizsgálatainkat kiterjesztettük egy 15 éven keresztül fenntartott, tizennyolc *Dianthus*-fajból, ill. fajtából álló *in vitro* génbanki gyűjteményre is. Immunoblot eljárással itt is több fajban detektáltuk a dsRNS-ek jelenlétét, köztük a *Carnation cryptic virus* tripartita dsRNS genomját a *Dianthus caryophyllus* növényekben (8. ábra). A tenyészetek vírusmentesítésére használt (Fraga és mtsai., 2004), és más vírusoknál bizonyítottan hatékony merisztéma hőkezelés sem vezetett a kriptikus vírusokra jellemző dsRNS-ek eltűnéséhez a mikroszaporított növényekből (9. ábra).

A kísérleteink egyértelműen bizonyítják, hogy legalább négyféle kriptikus vírus (*Beet cryptic virus 1*, -2, -3 és a *Carnation cryptic virus*) képes *in vitro* körülmények között tartósan fennmaradni a gazdanövényben, azaz valódi perzisztens növényi vírusként viselkedik. A *Beet cryptic virus 1* és -3 esetében azt is kimutattuk, hogy az RdRp-t kódoló régió *in vitro* körülmények között is megőrizte korrekt szekvenciáját.

6.2. *Beet cryptic virus 1* (BCV1) molekuláris jellemzése

Kísérleteink elsődleges célja a BCV1 és BCV2 vírusok dsRNS genomjának molekuláris karakterizálása volt, mivel a tudomány mai állásánál a genom teljes, nukleotid szintű leírása a vírusok jellemzésének szerves részét képezi. Továbbá a klónozás során nyert szekvencia adatokat összehasonlító szekvencia vizsgálatokra is felhasználhatjuk, hogy további megerősítést és a jelenleginél pontosabb információkat szerezzünk a kriptikus vírusok eredetéről. A klónozási munkát Natalya Enünlü és Dorina Veliceasa PhD-hallgatók kezdték el (N jelű klónok), szintén dr. Lukács Noémi témavezetése mellett, távozásuk után pedig én folytattam tovább a kísérletes munkát.

A *Beet cryptic virus 1* genom jellemzésére klónoztuk a dsRNS1 és dsRNS2 szegmenseknek megfelelő cDNS-eket és meghatároztuk teljes szekvenciájukat. A BCV1 dsRNS1 2008 bp, a dsRNS2 1798 bp hosszúságú, a szekvenciákat a GenBank adatbázisban EU489061 és EU489062 azonosítókkal tettük hozzáférhetővé.

A dsRNS1-en egy 1851 nt hosszúságú folyamatos nyílt leolvasási keretet (ORF) azonosítottunk, ami 616 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek számított molekulamérete 72,5 kDa (20. ábra). Ez a protein a GenBank adatbázisban található szekvenciák közül a *Partitiviridae* család vírusainak RNS-függő RNS-polimerázaival mutatja a legnagyobb hasonlóságot és azonosítható rajta a kriptikus vírusok RdRp-jére jellemző valamennyi konzervált aminosav motívum. Mivel az azonosított a motívumok a fehérje polimeráz funkciójának be-

töltéséhez fontosak, valószínűsíthető, hogy a dsRNS1 által kódolt fehérje a virális polimeráz (Bruenn, 1993).

A kriptikus vírusok egymáshoz való viszonya a putatív RdRp-k összehasonlításával jellemezhető a legjobban. A BCV1 RdRp-t más kriptovírusok polimeráz szekvenciáival összehasonlítva azt találtuk, hogy a lóbabban azonosított *Vicia cryptic virus* (Blawid és mtsai., 2007), ill. a fehérherében előforduló *White clover cryptic virus 1* (Boccardo és Candresse, 2005a) RdRp szekvenciáit 80,6 %, ill. 82,3 %-ban építik fel azonos aminosavak. Mindhárom szekvencia 616 aminosavból áll, és folytonossági hiány nélkül egymás alá írhatók (22. ábra). A többi növényi kriptikus vírus RdRp-jével ennél kisebb mértékű (20-25 %-os) hasonlóság figyelhető meg.

A BCV1 dsRNS1 klónozása, a gemon szekvenciájának meghatározását túlmenően, rendkívül érdekes eredményt hozott. Natalya Enünlü a cDNS-klónjainak analízise során azt találta, hogy a dsRNS1 molekula az egyik klón mentén, egy a teljes hosszúságú szekvenciánál rövidebb cirkuláris formát is felvehet. A cirkuláris szegmensek meglétét egy független kísérletben ellenőriztük (Ilyés, 2006). A *Partitiviridae* család egyetlen tagjában sem figyeltek meg eddig gyűrű alakú genomot vagy cirkularizálódásra való hajlamot, így ez az eredmény mindenképpen jelentős, hiszen a dsRNS molekulák növényi fennmaradásukat nagyban fokozhatja a cirkularizálódás.

A dsRNS2 pozitív szálán egy nagy, 1470 nt hosszúságú, és két kisebb putatív ORF-t azonosítottunk, a negatív szálon szintén két kisebb leolvasási keret található. A nagy ORF 489 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek számított molekulamérete 53,4 kDa (25. ábra). Ez a protein szintén a *Partitiviridae* család vírusainak köpenyfehérjéivel mutatja a legnagyobb hasonlóságot, bár ez a hasonlóság az RdRp-nél megfigyelt értékeknél mindenképpen kisebb mértékű. A nagyobb heterogenitás ellenére több olyan konzervált aminosav régió is azonosítható a BCV1, WCCV1, VCV, RsCV1, ACD-PV és CCRS-PV vírusok köpenyfehérjéiben, amelyek a többi kriptikus vírus köpenyfehérjéjében nem vagy csak részben mutathatók ki (26. ábra). A konzervált régiók szerepének azonosítása még nem történt meg, de e régiók különböző vírusokban való megőrződése funkcionális jelentőségüket valószínűsíti.

Annak bizonyítására, hogy a BCV1 dsRNS2 valóban a köpenyfehérjét kódolja, analizáltuk a BCV1 virionokban előforduló fehérjéket. Egyrészt tömegspektrometriás analízisnek vetettük alá őket, másrészt ellenőriztük a reaktivitásukat BCV1-, ill. BCV2-specifikus poliklonális antiszérumokkal (27. ábra). A BCV1 virionokban megjelenő domináns ~55 kDa

körüli molekulatömegű fehérje sáv 32,5 %-os lefedettséggel szekvencia egyezést mutatott a dsRNS2 cDNS-ből levezetett putatív köpenyfehérje aminosav sorrendjével. Ez a fehérje a BCV1-specifikus antiszérummal is erős immunreakciót adott. A bemutatott adatokból levonható az a következtetés, hogy a BCV1 viriont valószínűleg a dsRNS2 által kódolt egyetlen 53,4 kDa molekulatömegű köpenyfehérje építi fel. Kriptikus vírusok esetében ez az első közvetlen bizonyíték a kódoló gén és a viriont felépítő köpenyfehérje egymásnak való megfelelésére.

A BCV1, VCV, ill. WCCV1 genomok hasonlósága nemcsak a fehérjékre terjed ki, hanem a dsRNS genom 5' és 3' nem transzlálódó régiói esetén is szembetűnő. Különösen a dsRNS szegmensek együttes kapszidálódását biztosító 5' UTR-ek esetén figyelhető meg jelentősebb homológia (Strauss és mtsai., 2000). A terminális szekvenciák konzerváltak (5' GATCAAAAGA), és a szekvenciák analízise során azonosítottuk a *Partitiviridae* család 5' UTR-eiben szintén megtalálható CAA és CAAAA motívumokat (29. ábra; Strauss és mtsai., 2000; Coutts és mtsai., 2004). Az ismétlődő CAA régiók szerepét a dohánymozaik vírus genom jellemzése során határozták meg először, úgy tűnik, hogy a transzláció korrekt iniciációban vesznek részt. (Zaccomer és mtsai., 1995).

A 3' UTR-ek a dsRNS1 genom szegmenseknél szintén rendkívül hasonlóak, a dsRNS2-ek különböző gazdaszervezetekben azonban nagyobb variabilitást mutatnak. A dsRNS tartalmú vírusoknál a dsRNS molekula 3' nem kódoló vége tartalmazza a replikáz enzim felismerő helyét. A legtöbb vírus esetében a genom replikációját egy replikációs enzimkomplex végzi, ami a vírus által kódolt RNS-függő RNS-polimeráz mellett változatos gazda faktorokat is tartalmaz. Arról nincsenek ismereteink, hogy a kriptikus vírusok replikációja pontosan milyen mechanizmus szerint történik, de azt tudjuk, hogy kicsi a genomjuk kódoló kapacitása, ezért nagy a valószínűsége annak, hogy a replikációjukhoz a vírus által kódolt RNS-függő RNS-polimeráz mellett feltehetőleg gazdafehérjéket is igénybe kell venniük, amihez előnyös lehet a gazdához való nagyfokú alkalmazkodás. Ez akár azt is eredményezheti, hogy a különböző fajok kriptikus vírusainak köpenyfehérjét kódoló szegmenseinek 3' végei heterogénebbek lettek, emellett, mivel bizonyítottan replikálódnak, megőrizték a replikáz enzim felismerő helyeit (30. ábra).

6.3. *Beet cryptic virus 2* (BCV2) molekuláris jellemzése

A *Beet cryptic virus 2* vírusokról a klónozási munka kezdetén kevesebb irodalmi adat állt a rendelkezésünkre, mint a BCV1-ről, ráadásul ezek az eredmények sokszor nem voltak

egységesek. Natsuaki és munkatársai (1986) két genomi dsRNS (MW $0,94 \cdot 10^6$ és $0,87 \cdot 10^6$) jelenlétét publikálták. Ezzel szemben Kühne és munkatársai (1986) két köpenyfehérje molekulát azonosítottak, és ha elfogadjuk azt az elméletet, hogy a kriptovírus dsRNS-ek monocisztronosak akkor a két köpenyfehérjét kódoló gén mellé egy harmadik, az RdRp-t kódoló genomi szegmensre is szükség van. Kísérleteink során egyértelműen bebizonyosodott, hogy a genom három dsRNS-ből áll, melyek közül kettő, feltehetőleg azonos méretük miatt, a gélelektroforézis szokásos körülményei között nem válik el egymástól. A *Beet cryptic virus 2* genom jellemzésére klónoztuk a dsRNS1-3 szegmenseknek megfelelő cDNS-eket, és meghatároztuk a teljes szekvenciájukat: a dsRNS1 1589 bp, a dsRNS2 1575 bp, a dsRNS3 pedig 1522 bp hosszúságú.

A dsRNS2 pozitív szálán egyetlen, 1428 nt hosszúságú ORF-t (ORF1) azonosítottunk, ami 475 aminosavból álló, 54,2 kDa molekulaméretű fehérjét kódol (39. ábra). A szegmens negatív szálán is található két kisebb leolvasási keret. Az ORF1 által determinált aminosav szekvencia a *Partitiviridae* család növényi vírusai közül a *Black raspberry cryptic virus*, a *Pepper cryptic virus 1*, a *Pyrus pyrifolia partitivirus* és a *Beet cryptic virus 3* RNS-függő RNS-polimerázaihoz hasonló, 65-70 %-ban (Tzanetakis és Martin, 2007; Valverde és Gutierrez, 2008; Osaki és mtsai., 1998; Xie és mtsai., 1993). Ennél a fehérjénél, hasonlóan a BCV1 RdRp-hez, szintén azonosítani tudtuk a kriptovírusok RdRp-jére jellemző konzervált aminosav motívumokat (Bruenn, 1993), így megállapíthatjuk, hogy a dsRNS2 által kódolt fehérje a virális polimeráz (41. ábra).

A BCV2 virionokban két domináns fehérje sávot azonosítottunk: ~36, illetve ~33 kDa becsült molekulatömeggel, melyek mérete megegyezik a Kühne és munkatársai által 1986-ban publikált eredményekkel. A BCV2-specifikus ellenanyaggal mindkét fehérje erős jelet adott, ezért valószínűleg mindkét fehérje részt vesz a virion felépítésében (27. ábra). Annak kiderítésére, hogy pontosan melyik genom szegmens kódolja az egyes köpenyfehérje fragmenteket, elvégeztük a denaturáló gélből kivágott virionfehérjék tömegspektrometriás analízisét. A dsRNS1 szegmens pozitív szálán azonosított 1281 nt hosszúságú ORF 426 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek számított molekulatömege 49,1 kDa (32. ábra). A tömegspektrometriás analízisből egyértelműen kiderült, hogy a nagyobb köpenyfehérjét a dsRNS1 kódolja, ugyanis a ~36 kDa becsült molekulatömegű protein 30 %-os szekvencia egyezést mutatott a dsRNS1 cDNS-ből levezetett fehérjével. A virionokban előforduló másik köpenyfehérjét (~33 kDa) a dsRNS3 kódolja (34. ábra), az azonosított protein szekvenciák 35 %-ban fedik le az ORF1 által kódolt, 393 aminosavból felépülő fehérjét. Az eredményekből

arra következtettünk, hogy a BCV2 viriont két, ~36, illetve ~33 kDa becsült molekulatömegű fehérje építi fel, melyeket a dsRNS1 és -3 genomi szegmensek kódolnak. Jelenleg nem rendelkezünk olyan kísérleti eredményekkel, amelyek magyarázatot adnának a virionokban azonosított köpenyfehérjék és dsRNS1 ORF1 leolvasási keretében kódolt fehérje számított molekulatömege közötti eltérésre. Mivel rajtunk kívül idáig egyetlen kriptikus vírus esetében sem végezték el a virionok és a köpenyfehérje analízisét, arról sincs információnk, hogy a BCV2-vel rokon vírusok esetében megfigyeltek-e hasonló jelenséget. Munkahipotézisünk az, hogy az mRNS-ről képződő fehérje poszttranszlációsan proteolitikus hasítást szenved, és egyik fragmentuma a köpenyfehérje, másik fragmentuma egy más, eddig nem azonosított funkciót tölt be. Amennyiben az utóbbi fragmentumhoz sikerül egy biológiai funkciót hozzárendelni vagy legalább létezésére közvetlen bizonyítékot találni, megdönthető az a kriptikus vírusokra vonatkozó tévhit, hogy csak RdRp-t és köpenyfehérjét kódolnak.

A dsRNS-ek 5'-végein itt is egy konzervált felismerő szekvenciát (5' AGAATTA) találunk, ami teljesen eltér a BCV1-nél azonosított szekvenciától. Megegyezik azonban a *Beet cryptic virus 3*, a *Black raspberry cryptic virus* és a *Pyrus pyrifolia partitivirus* RdRp-t kódoló genom szegmenseinek 5' terminális végeivel, tehát nemcsak az RdRp-t kódoló gének között fedezhető fel hasonlóság e vírusok között, hanem a nemkódoló régiók között is. A konzervált terminális régió kívül a dsRNS1 és -2 5' UTR-ei között már nem figyelhető meg jelentősebb szekvencia hasonlóság, és a BCV1 jellemzésénél kiemelt CAA régiók is hiányoznak. További különbség még, hogy a BCV2-nél a 3'-végeken nem azonosítottunk polyA-véget.

6.4. A kriptikus vírusok eredete és lehetséges szerepe a növényben

Szinte semmilyen ismeretünk sincs arról, hogy a gazdanövények úgyszólván véletlenül őrzik meg az egyszer beléjük került kriptikus vírusokat, vagy esetleg előnyeik származhatnak az együttélésből. A *White clover cryptic virus 1* szekvenciájának leírását (Boccardo és Candresse, 2005b) követően jelent meg első és idáig egyetlen publikáció, ami a kriptovírus fehérje gazdasejtben betöltött szerepét jellemzi. A szerzők azt találták, hogy egy korábban azonosított és a gyökérgümők nodulációs mechanizmusában résztvevő fehérjének, valamint a WCCV1 köpenyfehérjéjének teljesen azonos a szekvenciája. E fehérje túltermeltetése beindítja a növény védekező reakcióit, a noduláció elmaradását és patogenezissel asszociált fehérjék szintézisét vonja maga után (Nakatsukasa-Akune és mtsai., 2005). Növénypatogén gombák (pl. *Cryphonectria parasitica*) esetében az is jól ismert, hogy vírusaik a gomba virulenciáját jelentősen befolyásolhatják, ezért elképzelhető az is, hogy a növényben élősködő, de ott ala-

csony kópiaszámban előforduló kriptikus vírusok a növényt fertőző gombába átkerülve befolyásolják annak virulenciáját. A kriptovírusok fenntartása ilyen esetben a növény biológiai védekezésének egy formájaként képzelhető el.

Kezdetben, a kriptikus vírusok jellemzésével foglalkozó kutatók nem tételeztek fel hasonlóságot olyan kriptovírusok között, amelyek gazdanövényei genetikailag távol álltak egymástól, sőt kifejezetten a kereszthibridizálás és a szerológiai keresztreakciók hiányáról tudósítottak (Boccardo és mtsai., 1987). Az elmúlt néhány évben azonban, az kriptovírus szekvenciák számának növekedésével több olyan eredmény született, amelyek szerint rokonfajok tartalmazhatnak olyan kriptovírusokat, amelyek szekvenciája nagyon hasonló. Ilyen kiemelkedően nagyfokú hasonlóság áll fenn a pillangósvirágú növényekben azonosított *Vicia cryptic virus* és *White clover cryptic virus 1* között (Blawid és mtsai., 2007). Hasonló eredményt publikáltak Salem és munkatársai (2008), akik a *Rosa multiflora cryptic virus* jellemzése során azt találták, hogy a *Fragaria chiloensis cryptic virus* és a *Rosa multiflora cryptic virus* RdRp szekvenciáit 87 %-ban építik fel azonosak aminosavak. Ezekben az eredményekben túlmutat a BCV1 vírus 5.6. fejezetben leírt hasonlósága a VCV és WCCV1 vírusokhoz.

A megfigyelt hasonlóságok alapjaiban kérdőjelezzik meg azokat a korábbi feltételezéseket, amelyek gazdanövények és a kriptikus vírusaik kovergens evolúciójáról számoltak be (Boccardo és mtsai., 1987). A nagy genetikai távolságok miatt rendkívül valószínűtlennek tűnik, hogy az érintett gazdanövény fajok evolúciós szétválásuk óta hordozzák ezeket a vírusokat. Ennél sokkal kézenfekvőbb magyarázat lenne egy - eddig kellő tudományos bizonyossággal még nem azonosított - feltehetőleg gomba vektor előfordulása. Közismert, hogy a növényi vírusok terjesztésében gomba vektorok vesznek részt (például: *Bymovirus*; Adams és mtsai., 1988). Ezt a feltételezést látszanak alátámasztani egy ukrán kutatócsoport 2005-ben publikált eredményei is. *Helicobasidium purpureum*-ból, egy a cukorrépat kolonizáló endofita gombából sikerült klónozniuk egy rövid cDNS-szakaszt (Melnichuk és Spyrydonov, 2005), amely az általunk meghatározott BCV1 RdRp-szekvenciával teljesen megegyezik. Bár a publikációkban bemutatott bizonyítékok még hiányosak, ha a leírt eredményeket teljes tudományos alapossággal bizonyítani lehet, ez az eredmény megváltoztathatja a kriptovírusokról alkotott szemléletünket.

6.5. Kitekintés

A *Beet cryptic virus 1* és -2 vírusokkal folytatott eddigi kutatómunkánk a genom szekvenciájának meghatározásával alapot teremt a későbbi vizsgálatokhoz, a vírusperzisztenciát

lehetővé tevő biológiai és élettani összefüggések feltárásához. Az első tisztázandó kérdések egyike a kriptovírusok mennyiségi megoszlásának jellemzése a gazdaszervezetben, és a gazdanövények fejlődése során vagy stresszhatásra bekövetkező esetleges koncentrációváltozások feltárása. Ezt kvantitatív RT-PCR-rel szeretnénk megvizsgálni. Különösen fontos lenne annak megállapítása, hogy a kriptikus vírusok merisztéma hőkezelés után megfigyelt koncentrációcsökkenése egy minden sejtben bekövetkező redukció, vagy a vírus a sejtek egy részéből történő eliminációjának következménye.

A BCV1 dsRNS1 klónjainak analízise során azt találtuk, hogy ez a genomi szegmens valószínűleg cirkuláris formát is felvehet. A cirkularizáció meglétét a BCV1-gyel rokon vírusok, a *Vicia cryptic virus* és *White clover cryptic virus 1* RdRp-inek esetén is megvizsgáljuk, s ha ott is megfigyelhető, a cirkularizációt elősegítő szerkezetek/túlnyúló végek vizsgálatát tervezzük.

Annak a kiderítésére, hogy a *Beet cryptic virus*-ok rendelkeznek-e valamilyen, a gazda számára is hasznos funkcióval, tervezzük a BCV1 ill. a BCV2 köpenyfehérjék dohány modellnövényben történő kifejezését, és az ellenállóképesség, ill. a növényi védekezésben szerepet játszó fehérjék expressziójának analízisét.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Megállapítottuk, hogy a *Capsicum* nemzetség különböző fajaiban és fajtáiban mind az endornavírusokra, mind a kriptikus vírusokra jellemző dsRNS-ek előfordulnak, és e fajok valószínűleg olyan dsRNS-vírusokat is tartalmaznak, amelyeket az irodalomban eddig nem írtak le. A vizsgált dsRNS-ek mintázata a mikroszatellit markerek alapján megállapított genetikai törzsfán belül jellemző az egyes csoportokra, ill. fajokra. A *C. annuum*, *C. chinense* és *C. frutescens* fajokban mind az endorna-, mind a kriptovírusok, a *C. baccatum* var. *pendulum* és *C. baccatum* var. *baccatum*-ban pedig csak az endornavírusok jelenléte feltételezhető. A *C. chacoense*-ben szintén mindkét vírus előfordulhat, de az endornavírusokra jellemző dsRNS molekulatömege alacsonyabb, mint a többi fajnál.
2. A *Beet cryptic virus*-ok és a *Carnation cryptic virus* előfordulását *in vitro* szaporított növényanyagban megvizsgálva megállapítottuk, hogy mind a négy kriptikus vírus képes *in vitro* körülmények között tartósan fennmaradni a gazdanövényben, azaz valódi perzisztens növényi vírusként viselkedik.
3. Megállapítottuk, hogy az elmúlt évtizedben megváltozott a *Beet cryptic virus*-ok elterjedtsége a termesztett cukorrépa-fajtákban. A BCV1 vírusok előfordulása visszaszorult, így a 2004-ben, Magyarországon termesztésben lévő fajták közül csak egyben tudtuk azonosítani. Ezzel szemben a BCV2 jelenleg is gyakorinak számít, és legalább a fajták felében kimutatható.
4. Meghatároztuk a *Beet cryptic virus 1* (BCV1) bipartita genomjának teljes szekvenciáját és bizonyítottuk, hogy a dsRNS1 a virális replikázt (RdRp), a dsRNS2 pedig a köpenyfehérjét kódolja. Megállapítottuk, hogy mindkét genom szegmens, valamint a dsRNS molekulák által kódolt fehérjék rendkívül nagyfokú hasonlóságot mutatnak a pillangós-virágú növényekben azonosított *Vicia cryptic virus*-hoz és *White clover cryptic virus 1*-hez.
5. Meghatároztuk a *Beet cryptic virus 2* (BCV2) tripartita genomjának teljes szekvenciáját és bizonyítottuk, hogy a virionok felépítésében két köpenyfehérje vesz részt, melyeket a dsRNS1 és -3 szegmensek kódolnak. A harmadik genom szegmens, a dsRNS2, az RNS-függő RNS-polimerázt kódolja.

6. Az általunk meghatározott *Beet cryptic virus 1* és -2 szekvenciák, valamint az irodalomban publikált *Beet cryptic virus 3* RNS-függő RNS-polimeráz szekvenciája alapján kidolgoztunk és bevezettünk egy RT-PCR-en alapuló, specifikus eljárást a *Beet cryptic virus*-ok szelektív és érzékeny kimutatására.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A növényi vírusok döntő többsége RNS-vírus. Genomjuk alapján a növényi RNS-vírusok három csoportba sorolhatók: a duplaszálú-RNS (dsRNS), a pozitív (mRNS-ként működő) egyszálú-RNS ((+)ssRNS) és a negatív egyszálú-RNS ((-)ssRNS) vírusok csoportjába. A kettősszálú RNS-vírusok rendkívül elterjedtek a természetben, a baktériumoktól és a gombáktól kezdve, a növény- és állatvilágig szinte mindenhol előfordulnak, és számos egészségügyileg, állatorvosilag és mezőgazdaságilag fontos vírus tartozik közéjük.

Csoportunk olyan növényekben előforduló dsRNS-vírusok vizsgálatával foglalkozik, amelyek nem idéznek elő tüneteket, és egyes növényfajok/fajták egyedeiben feltehetőleg azok egész élete folyamán fennmaradnak és replikálódnak. Ezek közé tartoznak a *Partitiviridae* családba sorolt, szegmentált genommal rendelkező kriptikus vírusok, illetőleg az *Endornavirus* nemzetségbe tartozó, egyetlen, 14-17 kbp hosszúságú genomi dsRNS-sel rendelkező endornavírusok. A kriptikus- és az endornavírusok több olyan különleges tulajdonsággal rendelkeznek (pollennel és maggal terjednek, nem okoznak tüneteket, hagyományos virológiai módszerekkel és oltással nem vihetők át, stb.), ami vizsgálatukat rendkívül megnehezíti, s ugyanakkor elméleti és gyakorlati szempontból érdekessé teszi őket.

A tézisemben leírt eredmények három témakörbe csoportosíthatók:

1. A kriptikus- és endornavírusok fajfüggő előfordulása *Capsicum* fajokban.
2. A kriptikus vírusok *in vitro* fennmaradása.
3. A *Beta* nemzetség fajaiban előforduló *Beet cryptic virus 1* és -2 molekuláris jellemzése.

A kriptikus és endornavírusok előfordulását a *Capsicum annuum* mellett - ahol már az 1980-as években leírták a jelenlétüket - hét további *Capsicum* fajban vizsgáltuk meg. A nagy molekulatömegű enigmatikus dsRNS-ek jelenléte a Nagy és munkatársai (2007) által mikroszatellit markerek alapján felállított *Capsicum* törzsfá első fajkörének minden fájára - *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. praetermissum*, *C. baccatum* var. *baccatum* és var. *pendulum* - jellemző volt. A második fajkörben csak a *C. chacoense*-ben mutattunk ki enigmatikus dsRNS-t, de ez jóval kisebb volt, mint az előző fajokban előforduló spéciesz. A kriptovírusok genomját reprezentáló dsRNS-eknél is korrelációt figyeltünk meg a paprika fajtacsoportok és a jellegzetes dsRNS-páros előfordulása között. A *C. chinensis*, *C. frutescens* és a *C. chacoense* szinte minden fajtájában kimutathatók voltak 1-3 kbp hosszúságú dsRNS-párosok, amelyek egyes *C. annuum* fajtákban is jelen voltak, a *C. baccatum* alfajaiban azonban egyetlen egyedben sem fordultak elő. Összességében tehát megállapíthatjuk, hogy a kü-

lönböző paprikafajokban mind az endornavírusokra, mind a kriptikus vírusokra jellemző dsRNS-ek kimutathatók, és a vizsgált dsRNS-ek mintázata a mikroszatellit markerek alapján felállított filogenetikai fán belül az egyes ágakra, ill. fajokra jellemző. Szekvencaadatok hiányában a vírusok esetleges közös eredetére egyelőre nem vonhatók le további következtetések.

A kriptikus vírusok fennmaradása a gazdaszervezet segítő hatásától függ, ami a gazdához való nagyfokú alkalmazkodásukat feltételezi. Kísérleteink során *in vitro* szegfű és cukorrépa kultúrákban vizsgáltuk meg, hogy ez a természetes körülmények között konzekvensen működő adaptáció vajon képes-e a hosszú távú szövettenyésztés természetestől eltérő körülményei mellett is biztosítani a kriptikus vírusok fennmaradását. A *Beet cryptic virus*-ok és a *Carnation cryptic virus* előfordulását *in vitro* szaporított növényanyagban megvizsgálva megállapítottuk, hogy mind a négyféle kriptikus vírus tartósan fennmaradt az *in vitro* körülmények között tartott gazdanövényekben, azaz valódi perzisztens növényi vírusként viselkedtek.

A *Beta* nemzetség fajaiban háromféle kriptikus vírust, *Beet cryptic virus 1*, -2 és -3 (BCV1, -2 és -3) azonosítottak, melyek genom szegmenseik mérete és köpenyfehérjéjük immunológiai tulajdonságai alapján biztosan elkülöníthetők egymástól. A *Beet cryptic virus 1* genomjának jellemzésére klónoztuk a dsRNS1 és dsRNS2 szegmenseknek megfelelő cDNS-eket és meghatároztuk teljes szekvenciájukat. A BCV1 dsRNS1 2008 bp, a dsRNS2 1798 bp hosszúságú, a szekvenciákat a GenBank adatbázisban EU489061 és EU489062 azonosítókkal tettük hozzáférhetővé. A *Beet cryptic virus 2* esetében - az irodalmi adatok, valamint a saját kísérleti eredményeink alapján - azt vártuk, hogy a genom szintén két dsRNS molekulából áll, azonban a genom klónozása és szekvenálása közben bebizonyosodott, hogy a BCV2 genomot valójában három szegmens építi fel. A *Beet cryptic virus 2* genom jellemzésére klónoztuk a dsRNS1-3 szegmenseknek megfelelő cDNS-eket, és meghatároztuk a teljes szekvenciájukat: a dsRNS1 1589 bp, a dsRNS2 1575 bp, a dsRNS3 pedig 1522 bp hosszúságú.

A *Beet cyryptic virus*-ok biztonságos és érzékeny kimutatására az általunk meghatározott *Beet cyryptic virus 1* és -2 szekvenciák, valamint az irodalomban publikált *Beet cyryptic virus 3* RNS-függő RNS-polimeráz szekvenciája alapján kidolgoztunk és bevezettünk egy RT-PCR-en alapuló specifikus eljárást.

Annak bizonyítására, hogy a BCV1 és -2 megfelelő genomi szegmensei valóban a köpenyfehérjét kódolják, a BCV1 és -2 virionokban előforduló fehérjéket egyrészt tömegspektrometriás analízisnek vetettük alá, másrészt ellenőriztük a reaktivitásukat BCV1-,

ill. BCV2-specifikus poliklonális antiszérumokkal. Eredményeink azt mutatják, hogy a BCV1 viriont valószínűleg a dsRNS2 által kódolt egyetlen köpenyfehérje építi fel, míg a BCV2 virionok felépítésében két köpenyfehérje vesz részt, melyeket a dsRNS1 és -3 szegmensek kódolnak. Kriptikus vírusok esetében ez az első közvetlen bizonyíték a kódoló gén és a viriont felépítő köpenyfehérje egymásnak való megfelelésére.

A BCV1 dsRNS1 és a BCV2 dsRNS2 a virális RNS-függő RNS-polimerázt kódolja, melyet a polimerázokra jellemző konzervált aminosav motívumok alapján azonosítottunk. Az általunk meghatározott szekvenciák és az irodalomban leírt szekvenciák összehasonlítása alapján a növényi kriptovírusok legalább két, jól elkülönülő ágra oszthatók. A BCV1 RdRp-je a *Vicia cryptic virus* és *White clover cryptic virus 1* vírusok mellett feltűnően nagy hasonlóságot mutat a *Partitiviridae* család gombavírusainak RdRp-jéhez. A csoporton belül a cukorrépában, ill. pillangósokban előforduló RdRp-k között aminosav szinten 82 %-os azonosságot figyeltünk meg. Ezzel az irodalomban első ízben azonosítottunk olyan nagyfokú hasonlóságot nem-rokon növényfajokban előforduló kriptovírusoknál, ami a legvalószínűbben egy közös, a fajok elválása után (is) működő vektor által közvetített transzferrel lenne magyarázható. A kriptovírusok másik ágába, amelybe a BCV2 és BCV3 is tartozik, eddig kizárólag növényi gazdaszervezetekben perzisztáló vírusokat soroltak be.

A doktori értekezésemben leírt eredmények, azaz két kriptikus vírus molekuláris jellemzése, a kriptikus- és endornavírusok egyes nemzetségekben való elterjedtségének és *in vitro* körülmények között való tartós fennmaradásának leírása megteremti azt a kísérleti alapot és eszköztárat, melynek segítségével hozzáláthatunk a kriptikus vírusok biológiai tulajdonságainak és evolúciós eredetének pontos felderítéséhez.

9. SUMMARY

RNA viruses make up the vast majority of plant viruses. They can be divided into three major classes differentiated by whether the infectious virion particles contain the genome as double-stranded RNA (dsRNA), positive strand (messenger-sense) single-stranded RNA ((+) ssRNA), or negative strand single-stranded RNA ((-) ssRNA). DsRNA-viruses are extraordinarily widespread in nature and are found in a very wide range of hosts from bacteria and fungi to plants and animals. Many dsRNA-viruses are of great medical, veterinary or agricultural importance.

Most of the plant dsRNA-viruses, however, do not cause any recognizable economic losses. Plant virus members of the *Partitiviridae* family and the *Endornavirus* genus, all widespread and present in almost every plant in certain species/cultivars, belong to these non-pathogenic viruses. The term cryptic virus is also used to describe the plant virus genera of the *Partitiviridae* family. Cryptic- and endornaviruses present several peculiar features that make their study rather difficult but very interesting from the theoretical and practical point of view. They are thought to be transmitted only via seed and pollen, they do not induce any symptoms, and although they are present at very low concentration, they persist and multiply within the host throughout their lives without inducing any symptoms. The organization of the genome of these viruses is different. While the genome of endornaviruses consists of one high molecular weight (more than 10 kbp) dsRNA, cryptic viruses have a small bi- or tripartite genome with dsRNA-segments ranging 1–4 kbp.

In my thesis I describe:

1. The species-dependent occurrence of cryptic- and endornaviruses in *Capsicum* species.
2. The long term survival of cryptic viruses under *in vitro* conditions.
3. The molecular characterization of *Beet cryptic virus 1* and *-2*.

The presence of endornaviral and cryptoviral dsRNAs in *Capsicum annuum* has been reported previously. We investigated whether these endogenous dsRNA-viruses also occur in seven further *Capsicum* species. High-molecular weight dsRNAs (>10 kbp) were detected in every species - *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. praetermissum*, *C. baccatum* var. *baccatum* and var. *pendulum* - of the first clade of *Capsicum* phylogenetic tree established on the basis of microsatellite markers (Nagy *et al.*, 2007). In the second clade of the tree we identified >10 kbp dsRNAs only in *C. chacoense*, but their molecular weight was lower than in the other species. The occurrence of dsRNA genomes of cryptic viruses also parallels the

Capsicum phylogenetic tree. DsRNA-species of 1-4 kbp were observed in almost every species of *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. chacoense* and *C. annum*, but no dsRNAs in this size range could be detected in the two subspecies of *C. baccatum*. Taken together our results indicate that dsRNAs probably representing the genomic dsRNA of endorna- and cryptoviruses do occur in different pepper species, and the dsRNA-pattern observed in our experiments runs parallel to the *Capsicum* phylogenetic tree established on the basis of microsatellite markers. Further experiments are underway to prove the endoviral and cryptoviral origin of the dsRNAs detected in our experiments.

Viruses have evolved to harmonise with their host plant on which they completely depend for replication and multiplication, therefore drastic alteration of the physiological conditions (e.g. long term tissue culturing) may have a strong effect on the virus. To analyse the influence of long term tissue culturing on the survival of cryptic viruses, *in vitro* propagated carnation and sugar beet plants were examined. We found that cryptic viruses are so well adapted to their hosts that *Beet cryptic viruses* and *Carnation cryptic virus* are able to survive under *in vitro* conditions for at least 5-7 and 15 years, respectively.

In the *Beta* genus three different *Beet cryptic viruses* (BCV1, -2, -3) have been identified, which can be distinguished serologically and on the basis of the molecular weights of their genomic RNAs. To characterize the genome of *Beet cryptic virus 1* and -2 we cloned and sequenced cDNAs of genomic dsRNAs. BCV1 dsRNAs are 2008 bp and 1783 bp long, and their sequences are available in GenBank under accession number: EU489061 and EU489062. In case of BCV2 - based on the literary data and our own gelelectrophoretic analyses - we expected that the genome would also consist of two dsRNA molecules, but the cloning and sequencing of the BCV2 genome showed that it was built up of effectively three dsRNA segments. Complete sequences of three dsRNA molecules (dsRNA1 1589 bp, dsRNA2 1575 bp, dsRNA3 1522 bp) have been determined. Based on our sequences and the sequence of BCV3, which can be found in the database, we developed and introduced an RT-PCR procedure, which allows sensitive and specific detection of each of the known *Beet cryptic viruses*.

To understand the function of deduced amino acid sequences we analysed the BCV1 and -2 capsid proteins by mass spectrometry and by using BCV1- / BCV2-specific polyclonal antibodies. Sequencing of the peptides derived from the capsid proteins proved unequivocally that the capsid of BCV1 is built up of only one capsid protein encoded by dsRNA2, whereas the BCV2 capsid consists of two proteins encoded by dsRNA1 and dsRNA3. BCV1 dsRNA1

and BCV2 dsRNS2 each encode an RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp); the viral RdRps were identified on the basis of conserved motifs considered as markers of viral RdRps. Multiple RdRp alignments show that BCV1 and BCV2 clearly belong to different groups of cryptic viruses. BCV1 RdRp shows most homology to *Vicia cryptic virus*, *White clover cryptic virus 1* and to some fungal viruses of the *Partitiviridae* family. Within this subgroup the BCV1 RdRp shared ~82 % amino acid sequence identity to VCV and WCCV1, i.e. to cryptic viruses of *Fabaceae* family. This is the first time that a high sequence similarity between cryptic viruses of unrelated plant species has been reported. Our results indicate the presence of a common transmission vector proceeding to divergence of the species. In contrast, BCV2 resembles a group of cryptic viruses, which, to our present knowledge, occur only in plant species.

The results discussed in my PhD thesis comprise the molecular characterization of two cryptic viruses, the description of the cryptic- and endornaviral distribution in different species of *Capsicum* and the long term survival of cryptic viruses under *in vitro* conditions. Taken together these results provide experimental systems and tools for further research to understand the biological properties and to clarify the evolutionary origin of cryptic viruses.

10. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- ACCOTTO, GP., BRISCO, MJ., HULL, R. (1987). *In vitro* translation of double-stranded RNA genome from *Beet Cryptic Virus 1*. *Journal of General Virology* **68**, 1417-1422.
- ACCOTTO, GP., BOCCARDO, G. (1986). The coat proteins and nucleic acids of two beet cryptic viruses. *Journal of General Virology* **67**, 363-366.
- ADAMS, MJ., SWABY, AG., JONES, P. (1988). Confirmation of the transmission of *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) by the fungus and *Polymixa graminis*. *Annals of Applied Biology* **112**, 133-141.
- ALIOTO, D., ZACCARIA, F., COVELLI, L., DI SERIO, F., RAGOZZINO, A., MILNE, RG. (2003). Light and electron microscope observations on chlorotic rusty spot, a disorder of cherry in Italy. *Journal of Plant Pathology* **85**, 215-218.
- ALLISON, R., JOHNSTON, RD., DOUGHERTY, WG. (1986). The nucleotide sequence of the coding region of tobacco virus genomic RNA, evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology* **154**, 9-20.
- ALTSCHUL, SF., GISH, W., MILLER, W., MYERS, EW., LIPMAN, DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- ANTONIOW, JF., LINTHORST, JM., WHITE, RF., BOL, JF. (1986). Molecular cloning of the double stranded RNA of Beet Cryptic Viruses. *Journal of General Virology* **67**, 2047-2051.
- BEAVIS, RC., CHAIT, BT. (1996). Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins. *Methods in Enzymology* **270**, 519-551.
- BLAWID, R., STEPHAN, D., MAISS, E. (2007). Molecular characterization and detection of *Vicia cryptic virus* in different *Vicia faba* cultivars. *Archives of Virology* **152**, 1477-1488.
- BOCCARDO, G., CANDRESSE, T. (2005a). Complete sequence of the RNA1 of an isolate of *White clover cryptic virus 1*, type species of the genus *Alphacryptovirus*. *Archives of Virology* **150**, 399-402.
- BOCCARDO, G., CANDRESSE, T. (2005b). Complete sequence of the RNA2 of an isolate of *White clover cryptic virus 1*, type species of the genus *Alphacryptovirus*. *Archives of Virology* **150**, 403-405.
- BOCCARDO, G., LISA, V., LUISONI, E., MILNE, RG. (1987). Cryptic plant viruses. *Advances in Virus Research* **32**, 171-214.
- BROWN, GG., FINNEGAN, PM. (1989). RNA plasmids. *International Review of Cytology* **117**, 1-56.
- BRUENN, JA. (1993). A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. *Nucleic Acids Research* **21**, 5667-5669.
- CHEN, L., CHEN, JS., ZHANG, H., CHEN, SN. (2006a). Complete nucleotide sequences of three dsRNA segments from *Raphanus sativus-root cv. Yipinghong* with leaf yellow edge symptoms. *Archives of Virology* **151**, 2077-2083.

- CHEN, L., CHEN, JS., LIU, L., YU, X., YU, S., FU, TZ., LIU, WH. (2006b). Complete nucleotide sequences and genome characterization of double-stranded RNA 1 and RNA 2 in the *Raphanus sativus*-root cv. Yipinghong. *Archives of Virology* **151**, 849-859.
- CHENG, J., JIANG, D., FU, Y., LI, G., PENG, Y., GHABRIAL, SA. (2003). Molecular characterization of a dsRNA totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. *Virus Research* **93**, 41-50.
- CHOI, YG., CROFT, BJ., RANGLES, J.W. (1999). Identification of sugarcane strait mosaic-associated virus by partial characterization of its double-stranded RNA. *Virology* **89**, 877-883.
- COMPEL, P., PAPP, I., BIBO, M., FEKETE, C., HORNOK, L. (1999). Genetic interrelationships and genome organization of double-stranded RNA elements of *Fusarium poae*. *Virus Genes* **18**, 49-56.
- COUTTS, RH., COVELLI, L., DI SERIO, F., CITIR, A., ACIKGÖZ, S., HERNANDEZ, C., RAGOZZINO, A., FLORES, R. (2004). Cherry chlorotic rusty spot and Amasya cherry diseases are associated with a complex pattern of mycoviral-like double-stranded RNAs. II. Characterization of a new species in the genus *Partitivirus*. *Journal of General Virology* **85**, 3399-3403.
- COVELLI, L., COUTTS, RH., DI SERIO, F., CITIR, A., AÇIKGÖZ, S., HERNÁNDEZ, C., RAGOZZINO, A., FLORES, R. (2004). Cherry chlorotic rusty spot and Amasya cherry diseases are associated with a complex pattern of mycoviral-like double-stranded RNAs. I. Characterization of a new species in the genus *Chrysovirus*. *Journal of General Virology* **85**, 3389-3397.
- CRAWFORD, LJ., OSMAN, TA., BOOY, FP., COUTTS, RH., BRASIER, CM., BUCK, KW. (2006): Molecular characterization of a partitivirus from *Ophiostoma himal-ulmi*. *Virus Genes* **33**, 33-39.
- DAWE, AL., NUSS, DL. (2001). Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics* **35**, 1-29.
- DI SERIO, F., FLORES, R., RAGOZZINO, A. (1996). Cherry chlorotic rusty spot: description of a virus-like disease from cherry and studies on its etiological agent. *Plant Disease* **80**, 1203-1206.
- DODDS, JA., MORRIS, TJ., JORDAN, RL. (1984). Plant viral double-stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology* **22**, 151-168.
- DULIEU, P., PENIN, P., DULIEU, H., GAUTHERON, DC. (1988). Purification of virus-like particles from *Vicia faba* and detection by ELISA in crude leaf extracts. *Plant Science* **56**, 9-14.
- ENÜNLÜ, N., VELICEASA, D., DESHMUKH, S., MORGUN, B., STEPANYUK, V., KÖSTER, S., LUKÁCS, N. (2003). Genomic characterization of plant cryptic virus. *EMBO Workshop, Genomic Approaches in Plant Virology*. (28-31 May Keszthely, Hungary) 32 p.
- FELSENSTEIN, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.

- FLACHMANN, M., LESEMANN, DE., FRENZEL, B., KOENIG, R. (1990). Isometric virus-like particles in *Albies alba* Mill. and other *Albies* species: partial purification and improved detection by means of immunoelectron microscopy. *Journal of Phytopathology* **129**, 193-202.
- FRAGA, M., ALONSO, M., ELLUL, P., BORJA, M. (2004). Micropropagation of *Dianthus gratianopolitanus*. *HortScience* **39**, 1083-1087.
- FUKUHARA, T., KOGA, R., AOKI, N., YUKI, C., YAMAMOTO, N., OYAMA, N., UDAGAWA, T., HOIUCHI, H., MIYAZAKI, S., HIGASHI, Y., TAKESHITA, M., IKEDA, K., ARAKAWA, M., MATSUMOTO, N., MORIYAMA, H. (2006). The wide distribution of endornaviruses, large dsRNA replicons with a plasmid like properties. *Archives of Virology* **151**, 995-1002.
- FUKUHARA, T., MORIYAMA, H., NITTA, T. (1995). The unusual structure of a novel RNA replicon in rice. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 18147-18149.
- FUKUHARA, T., MORIYAMA, H., PAK, J., HYAKUTAKE, H., NITTA, T. (1993). Enigmatic double-stranded RNA in Japonica rice. *Plant Molecular Biology* **21**, 1121-1130.
- GHABRIAL, SA., BUCK, KW., HILLMAN, BL., MILNE, RG. (2005). Family of *Partitiviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA (eds.) *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London, pp. 580-590.
- GHABRIAL, SA. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes* **16**, 119-131.
- GABRIEL, CJ., WALSH, R., NOLT, BL. (1987). Evidence for a latent viruslike agent in cassava. *Phytopathology* **77**, 92-95.
- GIBBS, MJ., PFEIFFER, P., FUKUHARA, T. (2004). Genus *Endornavirus*. In: Fauquet, CM., Mayo, MA., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, LA. (eds), *Virus taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London, pp. 603-605.
- GIBBS, MJ., KOGA, R., MORIYAMA, H., PFEIFFER, P., FUKUHARA, T. (2000). Phylogenetic analysis of some large double-stranded RNA replicons from plants suggests they evolved from a defective single-stranded RNA virus. *Journal of General Virology* **81**, 227-233.
- HACKER, CV., BRASIER, CM., BUCK, KW. (2005). Double-stranded RNA from a *Phytophthora* species is related to the plant endornaviruses and contains a putative UDP glycosyltransferase gene. *Journal of General Virology* **86**, 1561-1570.
- HANSEN, DR., VAN ALFEN, NK., GILLIES K., POWELL, WA. (1985). Naked dsRNA associated with hypovirulence of *Endothia parasitica* is packaged in fungal vesicles. *Journal of General Virology* **66**, 2605-2614.
- HAYES, RJ., BUCK, KW. (1993). Analysis of replication complexes of positive strand RNA plant viruses. In: *Molecular Virology: A Practical Approach*. pp. 1-34.
- HILLMANN, BL., FULBRIGHT, DW., NUSS, DL., VAN ALFEN, NK. (1995). *Hypoviridae*. In: F. A. Murphy (Ed.): *Sixth Report of the International Committee for the taxonomy of Viruses*. New York.

- HORIUCHI, H., MORIYAMA, H., FUKUHARA, T. (2003). Inheritance of *Oryza sativa endornavirus* in F1 and F2 hybrids between japonica and indica rice. *Genes and Genetic Systems* **78**, 229-234.
- HORIUCHI, H., UDAGAWA, T., KOGA, R., MORIYAMA, H., FUKUHARA, T. (2001). RNA-dependent RNA-polymerase activity associated with endogenous double-stranded RNA in rice. *Plant and Cell Physiology* **42**, 197-203.
- HULL R (2002). In: Matthew's Plant virology. Academic Press, London p. 1001.
- IHRMARK, K., JOHANNESSON, H., STENSTRÖM, E., STENLID, J. (2002). Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genetics and Biology* **36**, 147-154.
- ILYÉS, P., SZEGŐ, A., NEER, ZS., POTYONDI, L., LUKÁCS, N. (2007) A *Beta* nemzetség kriptikus vírusainak kimutatására alkalmas PCR-en alapuló eljárás kidolgozása. *Növényvédelem* **43**, 453-459.
- ILYÉS, P. (2006). Diplomamunka. A *Beta* nemzetség kriptikus vírusainak kimutatására alkalmas PCR-en alapuló eljárás kidolgozása.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- JIAN, J., LAKSHMAN, DK., TAVANTZIS, SM. (1998). A Virulence-associated, 6.4-kb, double-stranded RNA from *Rhizoctonia solani* is phylogenetically related to plant *Bromoviruses* and electron transport enzymes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 601-609.
- KASSANIS, B., WHITE, RF., WOODS, RD. (1977). *Beet cryptic virus*. *Phytopathologische Zeitschrift* **90**, 350-360.
- KIMURA, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.
- KÜHNE, T., STANARIUS, A. (1989). Untersuchungen zur Charakterisierung der Cryptic-Viren in *Beta vulgaris* L. und *Sinapsis alba* L. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor scientiae naturalium aus dem Institut für Phytopathologie Aschersleben.
- KÜHNE, T., SCHUBERT, J., STANARIUS, A., LEISER, RM. & PLOBNER, L. (1986). Purification and partial characterization of beet cryptic virus. *Recent Results in Plant Virology*, (23-27 March Reinhardsbrunn, Germany) pp.54-55.
- LAEMMLI, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LARKIN, MA., BLACKSHIELDS, G., BROWN, NP., CHENNA, R., MCGETTIGAN, PA., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, IM., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, JD., GIBSON, TJ., HIGGINS, DG. (2007). ClustalW2 and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- LISA, V., LUISONI, E., MILNE, RG. (1981a). A possible virus cryptic in carnation. *Annals of Applied Biology* **98**, 431-437.
- LISA, V., LUISONI, E., MILNE, RG. (1981b). Double-stranded ribonucleic acid from carnation cryptic virus. *Virology* **115**, 410-413.

- LU, G., MORIYAMA, EN. (2004). Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Briefings in bioinformatics* **5**, 378-88.
- LUKÁCS, N. (1994). Detection of virus infection in plants and differentiation between coexisting viruses by monoclonal antibodies to double-stranded RNA. *Journal of Virological Methods* **47**, 255-72.
- MÁRQUEZ, M., REDMAN, RS., RODRIGUEZ, RJ., ROOSSINCK, MJ. (2007). A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* **315**, 513-515.
- MELNYCHUK, MD., SPIRIDONOV, VG. (2005). [Molecular identity of double-stranded RNA-elements of viral nature isolated from the sugar beet]. *Mikrobiolohichnyĭ Zhurnal* **67**, 55-62.
- MELNYCHUK, MD., SPYRYDONOV, VH., OLEKSIENKO, IP. (2005). [Characteristics of virus double-stranded RNA, isolated from microscopic fungi parasitizing on sugar beet]. *Mikrobiolohichnyĭ Zhurnal* **67**, 52-57.
- MERTENS, P. (2004). The dsRNA viruses. *Virus Research* **101**, 3-13.
- MORIYAMA, H., HORIUCHI, H., KOGA, R., FUKUHARA, T. (1999). Molecular characterization of two endogenous dsRNAs in rice and their inheritance by interspecific hybrids. *The Journal of Biological Chemistry* **12**, 6882-6888.
- MORIYAMA, H., NITTA, T., FUKUHARA, T. (1995). Double-stranded RNA in rice: a novel RNA replicon in plants. *Molecular and General Genetics* **248**, 364-369.
- MUELLER, DR., VOSHOL, H., WALDT, A., WIEDMANN, B., VAN OOSTRUM, J. (2007). LC-MALDI MS and MS/MS--an efficient tool in proteome analysis. *Sub-cellular biochemistry* **43**, 355-380.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- MURRAY, EE., LOTZERL, J, EBERLE, M. (1989). Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research* **17**, 477-498.
- NAGY, I., STÁGEL, A., SASVÁRI, ZS., RÖDER, M., GANAL, M. (2007). Development, characterization and transferability to other *Solanaceae* of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* **50**, 668-688.
- NAKATSUKASA-AKUNE, M., YAMASITHA, K., SHIMODA, Y., UCHIUMI, T., ABE, M., AOKI, T., KAMIZAWA, A., AYABE, S., HIGASHI, S., SUZUKI, A. (2005). Suppression of root nodule formation by artificial expression of the TrEnodDR1 (Coat Protein of *White clover cryptic virus 1*) gene in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-microbe Interactions* **18**, 1069-1080.
- NATSUAKI, T., NATSUAKI, KT., OKUDA, S., TERANAKA, M., MILNE, RG., BOCCAR-DO, G., LUISONI, E. (1986). Relationships between the cryptic and temperate viruses of alfalfa, beet and white clover. *Intervirology* **25**, 69-75.
- NEUHOFF, V., STAMM, R., ELBL, H. (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with Commassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systemic analysis. *Electrophoresis* **6**, 427-448.
- NOGAWA, M., KAGEYAMA, T., NAKATANI, A., TAGUCHI, G., SHIMOSAKA, M., OKAZAKI, M. (1996). Cloning and characterization of mycovirus double-stranded

- RNA from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *robiniae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **60**, 784-788.
- OH, CS., HILLMAN, BI. (1995). Genome Organization of a partitivirus from a filamentous ascomycete *Atkinsonella hypoxylon*. *Journal of General Virology* **76**, 1461-1470.
- OSAKI, H., NAKAMURA, H., SASAKI, A., MATSUMOTO, N., YOSHIDA, K. (2006). An endornavirus from a hypovirulent strain of the violet root rot fungus, *Helicobasidium mompa*. *Virus Research* **118**, 143-149.
- OSAKI, H., KUDO, A., OHTSU, Y. (1998). Nucleotide sequence of seed- and pollen-transmitted double-stranded RNA, which encodes a putative RNA-dependent RNA polymerase, detected from Japanese pear. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **62**, 2101-2106.
- PFEIFFER, P. (1998). Nucleotide sequence genetic organization and expression strategy of the dsRNA associated with 447 cytoplasmic male sterility trait in *Vicia faba*. *Journal of General Virology* **79**, 2349-58.
- PFEIFFER, P., JOUNG, JL., HEITZLER, J., KEITH, G. (1993). Usual structure of the dsRNA associated with 447 cytoplasmic male sterility in *Vicia faba*. *Journal of General Virology* **74**, 1167-1173.
- POTYONDI, L., HESZKY, L. (1992). Gynogenic haploids produced in ovule cultures of male sterile, fertile, mono- and multigerm sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines. *Acta Agronomica Hungarica* **41**, 125-130.
- ROZEN, S. AND SKALETSKY, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.
- SAITOU, N., NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- SALEM, NM., GOLINO, DA., FALK, BW., ROWHANI, A. (2008). Complete nucleotide sequences and genome characterization of a novel double-stranded RNA virus infecting *Rosa multiflora*. *Archives of Virology* **153**, 455-462.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SAMMONS, DW., ADAMS, LD., NISHIZAWA, EE. (1981). Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **2**, 135-141.
- SCHOLTEN, ON., JANSEN, RC., KEIZER, LCP., DE BOCK, TSM., LANGE, W. (1996). Major genes for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta vulgaris*. *Euphytica* **91**, 331-339.
- SCHÖNBORN, J., OBERSTASS, J., BREYEL, E., TITTGEN, J., SCHUMACHER, J., LUKÁCS, N. (1991). Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts. *Nucleic Acids Research* **19**, 2993-3000.
- SCHUMACHER, J., RANGLES, JW., RIESNER, D. (1983). A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of viroid and virusoids. *Analytical Biochemistry* **135**, 288-295.
- SIEPEN, M., POHL, JO., KOO, BJ., WEGE, C., JESKE, H. (2005). *Poinsettia latent virus* is not a cryptic virus, but a natural polerovirus – sobemovirus hybrid. *Virology* **336**, 240-250.

- STANARIUS, A., MEYER, U., KÜHNE, T. (1989). Terms of cultivation influence amount of beet cryptic virus particles in sugar beet plants (*Beta vulgaris* var. *altissima*). *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* **25**, 421-428.
- STRAUSS, EE., LAKSHMAN, DK., TAVANTZIS, SM. (2000). Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctonia solani*. *Journal of General Virology* **81**, 549-555.
- SZEGŐ, A., TÓTH, EK., POTYONDI, L., LUKÁCS, N. (2005). Detection of high molecular weight dsRNA persisting in *Dianthus* species. *Acta Biologica Szegediensis* **49**, 17-19.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.
- TUOMIVIRTA, TT., HANTULA, J. (2003). Two unrelated double-stranded RNA molecule patterns in *Gremmeniella abietina* type A code for putative viruses of the families *Totiviridae* and *Partitiviridae*. *Archives of Virology* **148**, 2293-2305.
- TZANETAKIS, IE., PRICE, R., MARTIN, RR. (2008). Nucleotide sequence of the tripartite *Fragaria chiloensis* cryptic virus and presence of the virus in the Americas. *Virus Genes* **36**, 267-72.
- TZANETAKIS, IE., MARTIN, RR. (2007). *Black raspberry cryptic virus*. Unpublished.
- TZANETAKIS, IE., KELLER, KE., MARTIN, RR. (2005). The use of reverse transcriptase for efficient first- and second-strand cDNA synthesis from single- and double-stranded RNA templates. *Journal of Virology Methods* **124**, 73-77.
- VALVERDE, RA., GUTIERREZ, DL. (2008). Molecular and biological properties of a putative partitivirus from Jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología (Mexican Journal of Phytopathology)* **26**, 1-6.
- VALVERDE, RA., GUTIERREZ DL. (2007). Transmission of a dsRNA in bell pepper and evidence that it consists of the genome of an endornavirus. *Virus Genes* **35**, 399-403.
- VALVERDE, RA., ARANCIBIA, RA., CAN, F. (1994). Non-radioactive probes by direct labeling of ssRNA from dsRNA. *BioTechniques* **17**, 70-72.
- VALVERDE, RA., NAMETH, S., ABDALLHA, O., AL-MUSA, O., DESJARDINS, P., DODDS, JA. (1990). Indigenous double-stranded RNS from pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Science* **67**, 195-201.
- VALVERDE, RA., DODDS, JA., HEICK, JA. (1986). Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopatology* **76**, 459-465.
- VELICEASA, D., ENUNLU, N., KOS, PB., KOSTER, S., BEUTHER, E., MORGUN, B., DESHMUKH, SD., LUKACS, N. (2006). Detection of a new putative cryptic virus in *Pinus sylvestris* L. *Virus Genes* **32**, 177-186.
- WAKARCHUK, DA., HAMILTON, RI. (1985). Cellular double-stranded RNA in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Molecular Biology* **14**, 637-639.
- XIE, WS., ANTONIW, JF., WHITE, RF. (1993). Nucleotide sequence of *Beet cryptic virus 3* dsRNA which encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology* **74**, 1467-1470.

- XIE, WS. (1992). Studies on cryptic viruses in sugar beet and ryegrass. PhD. thesis. University of London.
- XU, P., CHEN F., MANNAS JP., FELDMAN T., SUMNER LW., ROOSSINCK MJ. (2008). Virus infection improves drought tolerance. *New Phytologist* **180**, 911-921.
- ZABALGOGEAZCOA, IA., GILDOW, FE. (1992). Double-stranded ribonucleic acid in 'Barsoy' barley. *Plant Science* **83**, 187-194.
- ZACCOMER, B., HAENNI, AL., MACAYA, G. (1995). The remarkable variety of plant RNA genomes. *Journal of General Virology* **76**, 231-247.
- ZACHERTOWSKA, A., BREWER, D., EVANS, DH. (2006). Characterization of the major capsid proteins of myxoma virus particles using MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Virology Methods* **132**, 1-12.
- ZANOTTO, PM., GIBBS, MJ., GOULD, EA., HOLMES, EC. (1996). A reevaluation of the higher taxonomy of viruses based on RNA polymerases. *Journal of Virology* **70**, 6083-6096.
- ZIEGENHAGEN, B., GUILLEMAUT, P., SCHOLZ, E. (1993). A procedure for mini-preparations of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Plant Molecular Biology Report* **11**, 117-121.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Lukács Noéminek, aki hasznos tanácsaival mindvégig segítette, szakmailag irányította munkámat, és aki a tanszéki munkák során nemcsak szakmai, de erkölcsi irányítást is nyújtott.

Köszönöm Ilyés Pál, Vajda Gergely, Árvay Katalin, Albert Zsolt és Bognár Ádám diákok, valamint Sun Hongmei és Shuixiu Hun vendégkutatók lelkiismeretes és kitartó munkáját. Köszönettel tartozom Dr. Szilák Lászlónak, akihez a molekuláris technikák alkalmazása során felmerülő kérdéseimmel bármikor fordulhattam. A leírt kísérletek egy része Natalya Enünlü munkájára épül, akinek az általa alkalmazott módszerek átadásáért is hálával tartozom.

Külön köszönet illeti Potyondi Lászlót, Tóth Endrét, Nagy Istvánt és Csilléry Gábort, akik a növényanyagot kísérleteinkhez rendelkezésünkre bocsátották. Köszönöm Burgyán Józsefnek és az MBK Növény Virologiai és Bioinformatikai Csoport valamennyi munkatársának a hibridizálási kísérletek során nyújtott segítségét.

Köszönet illeti a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék valamennyi dolgozóját a rengeteg gyakorlati segítségért és tanácsért. Külön köszönetemet fejezem ki Kissné Bába Erzsébetnek, akire nemcsak munkatársként, de barátként is folyamatosan számíthattam.

Köszönetemet fejezem ki az Oktatási és Kulturális Minisztériumnak, hogy a Deák Ferenc Ösztöndíj odaítélésével támogatta a doktori dolgozatom elkészítését.

Dolgozatomat családomnak ajánlom, mellyel szeretném kifejezni hálámat az általuk nyújtott szeretetért, támogatásért és ösztönzésért, amely nem nélkül nem jöhetett volna létre a dolgozatom.

Köszönöm férjemnek, Májer Istvánnak, hogy akkor is bízott bennem, amikor már magam sem.