

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

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 endofita gombáknak, hanem vírusoknak is lehetnek a növény számára előnyös, pl. a stressztűrést fokozó hatásai (Xu és mtsai, 2008). 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* család *Alphacryptovirus* és *Betacryptovirus* nemzetségébe sorolt, szegmentált dsRNS 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). A kriptikus és endornavírusok több olyan különleges tulajdonsággal rendelkeznek (pl.: pollennel és maggal terjednek, nem okoznak tüneteket, hagyományos virológiai módszerekkel és oltással nem vihetők át, stb.), ami vizsgálatukat rendkívül megnehezíti. E tulajdonságuk és a jellegzetesen alacsony víruskoncentrációjuk miatt a gazdanövényekben történő kimutatásuk nehézkes, felfedezésük általában a véletlennek köszönhető. Ezért jelenleg még csak nem is becsülhető, hányféle különböző kriptikus és endornavírus fordul elő a természetben. A kriptikus növényi vírusok számos növényfajban fordulnak elő, így a *Beta* nemzetségben is rendkívül elterjedtek, s egyes fajok, fajták (szinte) minden egyedében előfordulnak (Xie és mtsai, 1989). A *Beta* nemzetségben háromféle kriptikus vírust – *Beet cryptic virus 1*, -2 és -3 (BCV1, -2 és -3) – azonosítottak, melyeket genomszegmenseik mérete és köpenyfehérjéjük immunológiai tulajdonságai alapján biztosan el lehet különíteni egymástól (Antoniw és mtsai., 1986).

Doktori munkám során elsődleges célom 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 gazdanövényvel kialakult, annak teljes életciklusában érvényesülő harmonikus együttélés megértésének első lépéseként azt kívántuk megvizsgálni, hogy a növényben perzisztáló kriptikus vírusok képesek-e a szövettenyésztés természetestől nagyban eltérő körülményei mellett hosszabb ideig fennmaradni az *in vitro* tenyészetekben, valamint hogy a vírusmentesítésre szokásosan használt merisztéma hőkezeléssel eliminálhatók-e ezek a 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 közelrokon fajok elválása előtt történt vagy későbbi időpontra tehető, nyolc különböző *Capsicum* fajtából 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*-et (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, milyen közös szekvenciabeli illetve szerkezeti tulajdonságok teszik lehetővé a dsRNS-eknek a replikáz által történő felismerését és az intakt genom megőrzését. A klónozás során nyert szekvencia adatok 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 jelenthetnek. Ezért tűztük ki célul azt is, hogy részleteiben kidolgozzunk és bevezetünk egy olyan PCR-en alapuló kimutatási módszert, amellyel a *Beta* nemzetségben előforduló mindhárom kriptikus vírus szelektíven és érzékenyen kimutatható.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növényanyag

A kriptikus- és endornavírusok elterjedésének vizsgálatához egy olyan paprika génbanki gyűjteményt választottunk ki, amely nyolc *Capsicum* faj 63 különböző fajtáját tartalmazta (Csilléry Gábor génbanki gyűjteménye). Azt, hogy e vírusok a szövettenyésztés természetétől nagyban eltérő körülményei között is képesek-e hosszabb ideig fennmaradni, 16 éve *in vitro* körülmények között nevelt tizenhét különböző *Dianthus* fajban valamint 5-7 évig mikroszaporított körülmények között tartott cukorrépa és takarmányrépa növényben vizsgáltuk meg (Tóth Endre és Potyondi László növényanyaga). A cukorrépa kriptikus vírusok elő-

fordulását 28 cukorrépaajtát tartalmazó fajtasorban vizsgáltuk, amely jól reprezentálta a 2004-ben Magyarországon termesztésben lévő fajtákat. Ebből a 28 fajtából a későbbi kísérletekhez, immunológiai tesztek segítségével, két fajtát (Mars, Apolló) választottunk ki, és a 'Mars' fajta leveleiből izoláltuk a *Beet cryptic virus 1* és *-2*-t molekuláris szintű jellemzéshez felhasznált dsRNS kivonatot.

Nukleinsav izolálás

A növény teljes RNS kivonatát RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) és Plant Total RNA miniprep kit (Viogene) felhasználásával izoláltuk, követve a gyártó utasításait. A teljes nukleinsav kivonatot többlépéses fenol-kloroform extrakcióval készítettük. A cukorrépa kriptikus vírusok (BCV1 és -2) klónozásához szükséges dsRNS kivonatot CF-11 oszlopkromatográfiás eljárással izoláltuk, amit RNáz mentes DNáz I és RNáz A kezeléssel tisztítottunk meg a DNS és ssRNS szennyezőktől.

dsRNS-ek kimutatása dsRNS-specifikus monoklonális ellenanyaggal

Ez az immunológiai eljárás olyan monoklonális ellenanyagok használatán alapul, amelyek a dsRNS-ek szerkezetét specifikusan, a szekvenciától és nukleotid összetételtől függetlenül felismerik. A dsRNS-specifikus immunológiai kimutatás során, 30-50 µg teljes nukleinsav kivonatot nem-denaturáló 5%-os PAA gélen választottunk el, majd a nukleinsavat pozitív töltésű membránra blottoltuk át, a dsRNS-ek szelektív kimutatását K2 ill. J2 monoklonális ellenanyaggal végeztük el. Ezzel a módszerrel 40-60 pg dsRNS is kimutatható.

cDNS szintézis és klónozás

A dsRNS molekulák végeinek pontos meghatározásához a dsRNS molekula 3' végeire poly(A) polimeráz enzim segítségével adenzin farkat szintetizáltunk. Az iniciális cDNS szintézist random primerrel (UNRH: 5' GCCGGAGCTCTGCAGAATTC-NNNNNN) indítottuk, a későbbiekben a szekvencia ismeretében szekvencia-specifikus primereket terveztünk. A dsRNS 5'-, ill. 3'-végének pontos meghatározását a poly(A) végekre tervezett oligo(dT) (5' GCTCTGCAGAATTCTTTTTTTTTT) és szekvencia-specifikus primerekkel végeztük. 100 ng tisztított dsRNS-t 99 °C-on, 5 percig denaturáltuk 1,5 % dimetil-szulfoxid és 0,2 µM primer jelenlétében. Ezt 1 órán keresztül tartó reverz transzkripció követte 50 °C-on. A reakcióelegy 1x reakciópuffert, 200 µM dNTP-t, 5 mM DL-dithiothreitol és 0,75 U Thermoscript reverz transzkriptázt tartalmazott, 20 µl végtérfogatban. A cDNS szintézist PCR reakció követte, melyhez 1x *Taq* polimeráz puffert használtunk, 200 µM dNTP-vel, 1,5 mM MgCl₂-dal, 0,2 µM primerrel, 0,04 U *Taq* polimerázzal és 5 µl cDNS-sel kiegészítve, 25 µl végtérfogat-

ban. A mintákat tisztítottuk, majd klónozó vektorba (pGEM3z, pGEM7zf, pCR2.1-TOPO, pTZ57R/T) ligáltuk és baktérium sejtekbe klónoztuk.

Szekvenciaanalízis

A klónozás során kapott szekvenciákat Chromas Lite version 2.01 és a Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) programmal analizáltuk. A DNS- és aminosav-szekvenciák homológia vizsgálatához az NCBI BLAST szoftverét használtuk. A szekvencia-specifikus primereket a Primer3 szoftver segítségével terveztünk. A filogramot MEGA4 programcsomag felhasználásával készítettük.

Virion izolálás és analízise

A 'Mars' fajtájú cukorrépák leveleiből több lépéses ultracentrifugálással izoláltuk a vírusrészecskéket. A virionokról a negatív festést követően elektronmikroszkópos felvételek készültek. A vírusrészecskék nukleinsav-tartalmát a köpenyfehérje proteináz K-val (55 °C) történő emésztése után dsRNS-specifikus immunobloton mutattuk ki. A köpenyfehérjéket 12,5 %-os Laemmli gélben megfuttatva Coomassie Brilliant Blue (G-250) festéssel tettük látthatóvá. A gélből kivágott fehérjéket tömegspektrometriás analízisnek (MALDI-TOF és LC-MS/MS) vetettük alá, hogy ily módon bizonyosságot szerezzünk arról, hogy a cDNS szekvenciájából levezetett putatív köpenyfehérjék valóban a virionban lokalizálódnak-e. A virionban előforduló fehérjék reaktivitását BCV1-, ill. BCV2-specifikus poliklonális szérummal vizsgáltuk (a szérumok Thomas Kühne, BBA Aschersleben nagylelkű ajándékai voltak).

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A kriptikus- és endornavírusok fajfüggő előfordulása *Capsicum* fajokban

Vizsgálatunk elsődleges célja a különböző paprikafajokban feltételezhetően előforduló duplaszálú RNS-vírusok kimutatása volt, illetve annak tisztázása, hogy a különböző fajokban van-e eltérés a dsRNS-mintázatban, s ha igen, létezik-e korreláció a gazdanövények rokonsági viszonyai és dsRNS-mintázata között. Az utóbbi vizsgálatokból arra lehet következtetni, hogy a dsRNS-vírusok a törzsfajlás egy régebbi szakaszában kapcsolódtak-e a növényekhez, és velük együtt fejlődtek tovább, vagy jelenlétük független a taxonómiai besorolástól, a növények származásától. A kriptikus és endornavírusok előfordulását a *Capsicum annuum* mellett – ahol már az 1980-as években leírták a jelenlétüket – hét további *Capsicum* fajban vizsgáltuk meg (Boccardo és mtsai., 1987).

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a nagy molekulatömegű, endornavírusok jelenlétére utaló dsRNS molekula a mikroszatellit markerek alapján felállított *Capsicum* genetikai törzsfá (Nagy és mtsai., 2007) első ágának minden fájában előfordul, azaz a *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* var. *baccatum* és var. *pendulum* fajokban. 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. A genetikai törzsfá 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 törzsfá két fő ága között jellegzetes eltérést mutatnak.

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. 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 kettő–négy dsRNS-spéciesz fordult elő. A *C. chacoense* fajtában 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.

Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a különböző paprikafajokban mind az endornavírusokra, mind a kriptikus vírusokra jellemző dsRNS-ek kimutathatóak. 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. 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 *Pepper cryptic virus 1* szekvencia alapján tervezett primerekkel is (Valverde és Gutierrez, 2008).

A kriptikus vírusok *in vitro* fennmaradása

A kriptikus vírusok fennmaradása a gazdaszervezet 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 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.

DsRNS-immunblot technikával mindhárom BCV-vírus dsRNS genomját sikerült kimutatnunk az 5-7 éven keresztül fenntartott *in vitro* cukorrépa és takarmányrépa kultúrákban. A detektált dsRNS-ek molekuláris azonosítását RT-PCR-rel is elvégeztük. Az általunk meghatározott BCV1 és -2 szekvenciák, valamint a BCV3 RNS-függő RNS-polimerázának az irodalomban publikált szekvenciája alapján primereket terveztünk (S63913; Xie és mtsai., 1993), és bevezettünk egy PCR-en alapuló eljárást a BCV1-3 vírusok biztonságos és specifikus azonosítására. Az *in vitro* körülmények között nevelt növényekben a szekvencia-specifikus primerekkel amplifikált szakaszok nukleotid sorrendje mindhárom esetben 99 %-nál magasabb egyezést mutatott a BCV1, -2, ill. -3 szekvenciáival (a BCV1 és BCV2 szekvenciákat mi határoztuk meg, lsd. alább). Vizsgálatainkat kiterjesztettük egy 15 éven keresztül fenntartott, tizenyolc *Dianthus*-fajból, ill. fajtából álló *in vitro* génbanki gyűjteményre is. Immunblot eljárással itt is több fajban detektáltuk a dsRNS-ek jelenlétét, köztük a *Carnation cryptic virus tripartita* dsRNS genomját a *Dianthus caryophyllus* növényekben (Lisa és mtsai., 1981). A tenyészetek vírusmentesítésére használt, és más vírusoknál bizonyítottan hatékony merisztéma hőkezelés nem vezetett a kriptikus vírusokra jellemző dsRNS-ek eltűnéséhez a mikroszaporított növényekből.

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 RNS-függő RNS-polimerázt kódoló régió *in vitro* körülmények között is megőrizte korrekt szekvenciáját.

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

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 egy 616 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek számított molekulamérete 72,5 kDa. Ez a protein a GenBank adatbázisban található szekvenciák közül a *Partitiviridae* család vírusainak RNS-függő RNS-polimerázaival (RdRp) mutatja a legnagyobb hasonlóságot és azonosítható rajta a kriptikus vírusok RdRp-jére jellemző valamennyi konzervált aminosav motívum (Bruenn, 1993). Mivel az azonosított a motívumok a fehérje polimeráz funkciójának betöltéséhez fontosak, valószínűsíthető, hogy a dsRNS1 által kódolt fehérje a virális polimeráz. A RdRp-vel elvégzett szekvencia-összehasonlításaink meglepő eredményt hoztak: a BCV1 RdRp, a *Vicia cryptic virus* (VCV), ill. *White clover cryptic virus 1* (WCCV1) vírusok RdRp-jével 80,6 %, ill. 82,3 %-ban azonos volt, továbbá mindhárom vírus feltűnően nagy hasonlóságot mutatott a *Partitiviridae* család gombavírusainak polimerázaihoz (Boccardo és Candresse, 2005a és b; Blawid és mtsai., 2007; Coutts és mtsai., 2004). 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 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 egy 489 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek számított molekulamérete 53,4 kDa. Ez a protein szintén a *Partitiviridae* család vírusainak köpenyfehérjéivel mutatja a legnagyobb hasonlóságot, bár ez a hasonlóság az RdRp esetében megfigyelt értékeknél mindenképpen kisebb mértékű. A nagyobb heterogenitás ellenére több olyan konzervált aminosav régió is azonosítható a BCV1 és a vele rokon vírusok köpenyfehérjéiben, amelyek a többi növényi kriptikus vírus köpenyfehérjéjében nem vagy csak részben mutathatók ki. A konzervált régiók szerepének azonosítása még nem történt meg, de e régiók különböző vírusokban való megőrződése funkcionális jelentőségüket valószínűsíti.

A BCV1 virionok analízise során egy domináns ~55 kDa körüli molekulatömegű fehérje sávot azonosítottunk, amely tömegspektrometriai analízist követően, 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 egyetlen, a dsRNS2 által kódolt 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, *Vicia cryptic virus*, ill. *White clover cryptic virus 1* genomok hasonlósága nemcsak a fehérjékre terjed ki, hanem a dsRNS genom 5' és 3' nem transzlálódó régiói (UTR) esetén is szembetűnő. Különösen a dsRNS szegmensek együttes kapszidálódását biztosító 5' UTR-ek esetén figyelhető meg jelentősebb homológia (Strauss és mtsai., 2000). A 3' UTR-ek a dsRNS1 genom szegmenseknél szintén rendkívül hasonlóak, a dsRNS2-ek különböző gazdaszervezetekben azonban nagyobb variabilitást mutatnak.

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 (1987) 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. A szegmens negatív szálán is található két kisebb leolvasási keret. Az ORF1 által determinált aminosav szekvencia az adatbázisban jelenleg megtalálható szekvenciák közül a jellegzetesen növényi kriptikus vírusok RdRp-éhez mutatja a legnagyobb hasonlóságot, így megállapíthatjuk, hogy a dsRNS2 által kódolt fehérje a virális polimeráz.

A dsRNS1 szegmens pozitív szálán azonosított 1281 nt hosszúságú ORF 426 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek számított molekulatömege 49,1 kDa. A dsRNS3 szegmens pozitív szálán azonosított 1182 nt hosszúságú ORF pedig 393 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek számított molekulatömege 45 kDa.

A BCV2 virionokban két domináns fehérje sávot azonosítottunk ~36, illetve ~33 kDa becsült molekulatömeeggel, melyek mérete megegyezik a Kühne és munkatársai által 1987-

ban publikált eredményekkel. A BCV2-specifikus ellenanyaggal mindkét fehérje erős jelet adott, ezért valószínűleg mindkét fehérje részt vesz a virion felépítésében. A virion fehérjék 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, 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 és -3 ORF1 leolvasási keretében kódolt fehérje számított molekulatömege közötti eltérésre.

A dsRNS-ek 5'-végein itt is egy konzervált felismerő szekvenciát (5' AGAATTA) találunk, ami eltér a BCV1-nél azonosított szekvenciától, megegyezik azonban más, jellegzetesen növényi kriptikus vírusok genom szegmenseinek 5' terminális végeivel (Xie és mtsai., 1993). A konzervált terminális régió kívül a dsRNS1, -2 és -3 5' UTR-ei között már nem figyelhető meg jelentősebb szekvencia hasonlóság, további különbség még, hogy a BCV2-nél a 3'-végeken nem azonosítottunk poly(A)-véget.

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.

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* -ban 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 cukorrépaajtásokban. 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 pillangósvirágú 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.

IDÉZETT IRODALOM

1. JF. Antoniw, JM. Linthorst, RF. White, JF. Bol, *J. Gen. Virol.* **67**, 2047-2051 (1986)
2. R. Blawid, D. Stephan, E. Maiss, *Arch. Virol.* **152**, 1477-1488 (2007)
3. G. Boccardo, T. Candresse, *Arch. Virol.* **150**, 399-402 (2005a)
4. G. Boccardo, T. Candresse, *Arch. Virol.* **150**, 403-405 (2005b)
5. G. Boccardo, V. Lisa, E. Luisoni, RG. Milne, *Adv. Virus Res.* **32**, 171-214 (1987)
6. JA. Bruenn, *Nucleic Acids Res.* **21**, 5667-5669 (1993)
7. RH. Coutts, L. Covelli, F. DiSerio, A. Citir, S. Acikgöz, C. Hernandez, A. Ragozzino, R. Flores, *J. Gen. Virol.* **85**, 3399-3403 (2004)
8. T. Fukuhara, R. Koga, N. Aoki, C. Yuki, N. Yamamoto, N. Oyama, T. Udagawa, H. Hoiuchi, S. Miyazaki, Y. Higashi, M. Takashita, K. Ikeda, M. Arakawa, N. Matsumotho, H. Moriyama, *Arch. Virol.* **151**, 995-1002 (2006)
9. SA. Ghabrial, KW. Buck, BI. Hillman, RG. Milne, in Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, ed. by C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball (Elsevier/Academic Press, London, 2005), pp. 580-590
10. T. Kühne, A. Stanarius, H. Kleinhempel, *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* **23**, 95-104 (1987)
11. V. Lisa, E. Luisoni, RG. Milne, *Ann. Appl. Biol.* **98**, 431-437 (1981)
12. I. Nagy, A. Stágel, Zs. Sasvári, M. Röder, M. Ganal, *Genome* **50**, 668-688 (2007)
13. T. Natsuaki, KT. Natsuaki, S. Okuda, M. Teranaka, RG. Milne, G. Boccardo, E. Luisoni, *Intervirology* **25**, 69-75 (1986)
14. EE. Strauss, DK. Lakshman, SM. Tavantzis, *J. Gen. Virol.* **81**, 549-555 (2000)
15. RA. Valverde, DL. Gutierrez, *Mexican Journal of Phytopathology* **26**, 1-6 (2008)
16. WS. Xie, JF. Antoniw, RF. White, *J. Gen. Virol.* **74**, 1467-1470 (1993)
17. WS. Xie, JF. Antoniw, RF. White, *Plant Pathol.* **38**, 527-533 (1989)
18. P. Xu, F. Chen, JP. Mannas, T. Feldman, LW. Sumner, MJ. Roossinck, *New Phytol.* **180**, 911-921 (2008)

Az értekezés témaköréből megjelent publikációk jegyzéke

Folyóiratcikkek

IF-os folyóiratcikk

Szegő, A., Enünlü, N., Desmukh, PS., Veliceasa, D., Hunyadi-Gulyás, É., Kühne, T., Ilyés, P., Potyondi, L., Medzihradzky, K., Lukács, N. (2009). The genome of *Beet cryptic virus 1* shows high homology to certain cryptoviruses present in phylogenetically distant hosts. *Virus Genes* (DOI: 10.1007/s11262-009-0432-4). IF: 1,376 (2008)

Nem IF-os folyóiratcikk

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.

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.

Konferencia kiadványok

Nemzetközi konferencia (full paper)

Szegő, A., Tóth, E., Potyondi, L., Lukács, N. (2004). Long term survival of cryptic viruses in aseptically grown *in vitro* propagated plants. 5th IVCHB Conference. 12-17 September, Debrecen, Hungary. 505-511 p.

Szegő, A., Tóth, E., Potyondi, L., Lukács, N. (2004). Detection of *Carnation cryptic virus* in wild *Caryophyllaceae* and in *in vitro* cultured *Dianthus* species. International Conference on Horticulture Post-graduate. 17-19 November, Lednice, Czech Republic. 217-222 p.

Nemzetközi konferencia (absztrakt)

Szegő, A., Enünlü, N., Veliceasa, D., Desmukh, PS., Szilák, L., Lukács, N. (2008). Complete nucleotide sequence and genome characterization of two *Beet cryptic viruses*: BCV1 and -2. 9th International Congress of Plant Pathology. 24-29 August, Torino, Italy. *Journal of Plant Pathology* **90**, S2.203.

Szegő, A., Enünlü, N., Veliceasa, D., Desmukh, PS., Szilák, L., Lukács, N. (2008). Cloning and molecular characterization of double-stranded RNA of two *Beet cryptic viruses* (BCV1 and -2). First Symposium on Horticulture in Europe. 17-20 February, Vienna, Austria. 76 p.

Szegő, A., Árvay, K., Vajda, GB., Sun, HM., Hu, S., Dalmadi, Á., Nagy, I., Csilléry, G., Lukács, N. (2008). Putative endogenous dsRNA-viruses in *Capsicum* species. First Symposium on Horticulture in Europe. 17-20 February, Vienna, Austria. 271 p.

Szegő, A., Enünlü, N., Veliceasa, D., Desmukh, PS., Sun, H., Szilák, L., Lukács, N. (2007). Sequence comparison of RNA-dependent RNA-polymerases indicates different origin of *Beet Cryptic Virus 1* and -2. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiol-

ogy. 18-20 July, Budapest, Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **54**, 124.

Szegő, A., Vajda, G., Árvay, K., Hu, S., Nagy, I., Lukács, N. (2006). Occurrence and distribution of putative endogenous dsRNA-viruses in *Capsicum* species. Non-specific and Specific Innate and Acquired Plant Resistance Conference. 31 August-3 September, Budapest, Hungary. 71 p.

Szegő, A., Vajda, G., Hu, S., Nagy, I., Lukács, N. (2006). Occurrence of double-stranded RNAs indicating the presence of putative cryptoviruses and endornaviruses in *Capsicum* species. 8th Conference of the European Foundation for Plant Pathology and the BSPP presidential Meeting. 13–17 August, Copenhagen, Denmark. 116 p.

Magyar konferencia (full paper)

Szegő, A., Vajda, G., Kiss-Bába, E., Nagy, I., Lukács, N. (2006). Putatív endogén duplaszálú RNS-vírusok paprikafajokban. XVI. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum. Január 26-27., Keszthely. 95-99 p.

Magyar konferencia (absztrakt)

Albert, Zs., **Szegő, A.**, Ladányi, M., Lukács, N. (2009). A növényi kriptikus vírusok rokonsági viszonyainak vizsgálata a kodonhasználat analízisével. 55. Növényvédelmi Tudományos Napok. Február 23-24., Budapest. 37 p.

Szegő, A., Albert, Zs., Enünlü, N., Ladányi, M., Veliceasa, D., Lukács, N. (2008). Növényi kriptovírusok molekuláris jellemzése és evolúciós eredetük vizsgálata. Fialat agrárkutatók az élhető Földért. November 24., Budapest. 28 p.

Szegő, A., Enünlü, N., Veliceasa, D., Desmukh, PS., Szilák, L., Lukács, N. (2008). A *Beet Cryptic Virus 1* és *-2* cukorrépa kriptikus vírusok dsRNS genomjainak molekuláris jellemzése. 54. Növényvédelmi Tudományos Napok. Február 27-28., Budapest. 30 p.

Ilyés, P., **Szegő, A.**, Lukács, N. (2006). A *Beta* nemzetség kriptikus vírusainak kimutatására alkalmas immunológiai ill. PCR-en alapuló eljárások kidolgozása. 53. Növényvédelmi Tudományos Napok. Február 13-15., Budapest. 34 p.

Szegő, A., Enünlü, N., Veliceasa, D., Kiss-Bába, E., Vajda, G., Illés, P., Desmukh, PS., Lukács, N. (2005). Cryptic viruses and enigmatic double-stranded RNAs in vegetables. Lippay János - Ormos Imre - Vas Károly Tudományos Ülésszak. Október 19-20., Budapest. 384-385 p.

Szegő, A., Tóth, E., Lukács, N. (2005). Perzisztáló kriptikus vírusok. XI. Növénynevelési Tudományos Napok. Március 3-4., Budapest. 128 p.

Enünlü, N., Veliceasa, D., Desmukh, PS., Morgun, B., **Szegő, A.**, Koster, S., Beuther, E., Lukács, N. (2003). Cryptic plant viruses. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak. November 6-7., Budapest. 414-415 p.