

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**PANNON ÖKORÉGIÓBÓL SZÁRMAZÓ FÖLDIMOGYORÓ
SATNYULÁS VÍRUS (*PEANUT STUNT VIRUS*, PSV)
IZOLÁTUMOK JELLEMZÉSE**

Kiss László

Budapest

2011

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

Témavezetők: Dr. Salánki Katalin
tudományos főmunkatárs, PhD
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Dr. Balázs Ervin
egyetemi tanár, MHAS
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Alkalmazott Növénybiológiai és Biogazdálkodási Kihelyezett
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, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

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

.....
Dr. Salánki Katalin
A témavezető
jóváhagyása

.....
Dr. Balázs Ervin
A témavezető
jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2011. március 08.-ai határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Pedryc Andrzej, DSc

Tagjai

Zámboriné Németh Éva, DSc

Horváthné Petróczy Marietta, PhD

Gáborjányi Richard, DSc

Oláh Róbert, PhD

Opponensek

Tóbiás István, DSc

Takács András Péter, PhD

Titkár

Horváthné Petróczy Marietta, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK, JELÖLÉSEK JEGYZÉKE	3
1 BEVEZETÉS.....	5
2 CÉLKITÚZÁS	6
3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
3.1 A PSV általános jellemzése.....	7
3.2 A PSV részecske- és genomszerveződése	9
3.3 A vírusfehérjék funkciói.....	12
3.3.1 Az 1a fehérje.....	12
3.3.2 A 2a fehérje	13
3.3.3 A 2b fehérje	14
3.3.4 A 3a fehérje	15
3.3.5 A 3b fehérje	16
3.4 A PSV genetikai változékonysága és taxonómiája	17
3.5 A PSV alcsoportok részletes jellemzése.....	19
3.5.1 Az I. alcsoport	20
3.5.2 A II. alcsoport.....	21
3.5.3 A III. alcsoport.....	22
3.6 Genetikai változékonyság forrásai a cucumovírusok evolúciójában.....	24
3.6.1 Mutáció.....	24
3.6.2 Rekombináció.....	24
4 ANYAG ÉS MÓDSZER.....	28
4.1 Vírusok és patológiai jellemzésük.....	28
4.1.1 A dolgozatban vizsgált vírusok és izolálásuk.....	28
4.1.2 Gazdanövénykör vizsgálatok.....	29
4.2 Molekuláris és bioinformatikai vizsgálatok	30
4.2.1 A PSV-Rp törzs cDNS klónjának előállítása	30
4.2.2 PSV izolátumok részleges cDNS klónjainak előállítása	32
4.3 Bioinformatikai vizsgálatok	33
4.3.1 Nukleotid sorrend összehasonlítás és filogenetikai elemzés	33

4.3.2	Rekombinációs vizsgálatok	33
5	EREDMÉNYEK.....	34
5.1	A PSV-Rp cDNS klónjainak molekuláris jellemzése	34
5.1.1	A PSV-Rp nukleotid sorrendjének meghatározása és elemzése	34
5.1.2	A PSV-Rp filogenetikai és rekombinációs elemzése	37
5.2	A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok molekuláris jellemzése.....	39
5.2.1	A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok nukleotid sorrendjének meghatározása és elemzése	39
5.2.2	A Pannon ökorégióból származó PSV-izolátumok filogenetikai vizsgálata.....	42
5.3	A Pannon ökorégióból származó PSV-izolátumok gazdanövénykör vizsgálata és tünettani jellemzése	43
5.4	Új tudományos eredmények	48
6	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	49
6.1	A PSV-Rp izolátum molekuláris jellemzése	49
6.2	Rekombináció szerepe a PSV evolúciójában	51
6.3	A Pannon ökorégióból származó PSV-izolátumok molekuláris jellemzése	52
6.4	A Pannon ökorégióból származó PSV-izolátumok gazdanövénykör vizsgálata, az okozott tünetek jellemzése.....	53
7	ÖSSZEFOGLALÁS	55
8	SUMMARY	57
	MELLÉKLETEK	59
8.1	M1. A DOLGOZATHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	59
8.2	M2. IRODALOMJEGYZÉK	60
8.3	M3. A NEMZETKÖZI ADATBANKBA BENYÚJTOTT SZEKVENCIÁK	73
	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	99

RÖVIDÍTÉSEK, JELÖLÉSEK JEGYZÉKE

aa	aminosav (amino acid)
ATPáz	adenozin trifoszfátáz
BMV	rozsнок mozaik vírus (<i>Brome mosaic virus</i>)
CAP	7 metilguanozin sapka (m ⁷ GpppG)
CCMV	tehénborsó klorotikus foltosság vírus (<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i>)
cDNS	komplementer DNS
CMV	uborka mozaik vírus (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CP	köpenyfehérje (coat protein)
DNS	dezoxiribonukleinsav
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
GMMV	<i>Gayfeather mild mottle virus</i>
ICR	belső vezérlő szakasz (internal control region)
IR	gének közötti nem-kódoló nukleotid szakasz, (intergenic region)
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
MP	mozgási fehérje (movement protein)
mRNS	hírvivő ribonukleinsav (messenger RNS)
NCR	nem-kódoló régió
nt	nukleotid
NTP	nukleotid trifoszfát
ORF	nyílt leolvasási keret (open reading frame)
PCR	polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)
PDM	probabilistic divergence measures
PPV	szilvahimlő vírus (<i>Plum pox virus</i>)
PSV	földimogyoró satnyulás vírus (<i>Peanut stunt virus</i>)
PTGS	transzkripció utáni géncsendesítés (post transcriptional gene silencing)
RdRp	RNS függő RNS polimeráz

RNS	ribonukleinsav
RoMV	Robinia mosaic virus
RPA	Ribonuclease protection assay
RT-PCR	reverz transzkripció PCR (reverse transcription PCR)
satRNS	szatellit RNS
sgRNS	szubgenomi RNS
TAV	paradicsom magtalanság vírus (<i>Tomato aspermy virus</i>)
TMV	dohány mozaik vírus (<i>Tobacco mosaic virus</i>)
tRNS	transzfer RNS

1 BEVEZETÉS

A pillangósvirágú növények magas fehérje tartalmuk és tápértékük miatt, az emberiség táplálkozásában ősidők óta meghatározó szerepet töltenek be. Az ide tartozó és Mária Terézia kora óta Magyarországon is nagy területen telepített fehér akác szintén kiemelkedő gazdasági jelentőséggel bír. Invazív faj, a magyarországi erdőterületeink több mint 20%-át az akác foglalja el. Kemény fája, mely szerfának és tűzifának is kiváló, valamint értékes méze miatt a mezőgazdaságból élő emberek egyik fontos haszonnövénye.

A pillangósvirágú növények számos mikroorganizmusnak (gombáknak, baktériumoknak, vírusoknak) nyújtanak életteret, nem egyszer alaposan megkeserítve ezzel a gazdálkodók mindennapjait. A vírusok gazdasági jelentősége több szempontból is meghatározó. Mivel a vírusfertőzött növény nem gyógyítható, ezért a védekezés elsődleges módja a megelőzés. Ehhez társul, hogy átvitelük legtöbb esetben hatékonyan történik levéltetvekkel, polifág kórokozók esetében a vetésforgó sem mindig megoldható. Gazdanövényenként a tünetek meglehetősen eltérhetnek, sőt gyakran tünetmentesen vannak jelen az egyes növényekben. A kórokozók pontos azonosításához legalább a részleges nukleinsav sorrend ismerete szükséges, amely alapján már számos adat áll birtokunkban a vírus faját, rokonsági és evolúciós viszonyait tekintve.

Doktori témámban a földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) hazai izolátumainak vizsgálatát végeztem el. A rendkívül heterogén kórokozó jelentős károkat okozott Észak-Amerikában, Afrikában és Ázsiában pillangós virágú növényeken.

Európából, illetve fehér akácról egyelőre nem közölték a kórokozó teljes nukleotid (nt) sorrendjét. Magyarországi előfordulásáról viszonylag kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre, habár kora nyári sétáink közben éppúgy megpillanthatjuk mozaikos levéltüneteit a Roosevelt téri közel 200 éves „öreg akácon”, mint szántóföldek határoló akácsorán.

2 CÉLKITŰZÉS

Munkánk során a következő feladatokat tűztük ki doktori dolgozatom céljául:

1. Magyarországi fehér akácról származó PSV izolátum teljes hosszúságú genomi komplementer DNS (cDNS) klónjainak előállítása;
2. A genomi cDNS klónok teljes nukleotid szekvenciáinak (mint első európai PSV izolátum) meghatározása;
3. A nukleotid szekvenciák filogenetikai és rekombinációs elemzése. Rokonsági viszonyainak feltárása, a kórokozó evolúciójának pontosabb megismerése.

Az első 3 pont eredményeinek tükrében:

4. További, a Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok részleges RNS3 cDNS klónjainak előállítása;
5. A részleges RNS3 cDNS klónok nukleotid szekvenciáinak meghatározása;
6. Az új izolátumok filogenetikai és rekombinációs elemzése;
7. Az izolátumok gazdanövénykör és tünettan vizsgálat.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A PSV általános jellemzése

A PSV a *Cucumovirus* nemzetség tagja, amely gazdanövény körét tekintve elsősorban a pillangósvirágú növényeket fertőzi. A *Cucumovirus* nemzetség az *Alfamo*-, *Ilar*-, *Bromo*- és *Oleavirus* nemzetségekkel együtt a *Bromoviridae* családba tartozik. (Mayo és Pringle, 1998). A nemzetség tagja még a gazdaságilag legjelentősebb uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV), a főleg krizantémon és paradicsomon előforduló paradicsom magtalanság vírus (*Tomato aspermy virus*, TAV) (Faquet és Mayo, 2001) és a dolgozat megírásával egyidejűleg közlésre került, füzéres díszesorbáról (*Liatris spicata* Willd.) izolált *Gayfeather mild mottle virus* (GMMV) (Ian és mtsai., 2009) is. A PSV részecske-felépítését és genomszerveződését illetően a CMV-hez és a TAV-hoz igen hasonló, szerológiai tulajdonságait, gazdanövénykörét és nt sorrendjét tekintve azonban nagymértékben eltérő azoktól (Diaz-Ruiz és Kaper, 1983).

A PSV világszerte a pillangósvirágú növények gazdaságilag jelentős kórokozója. A vírust elsőként földimogyoróról (*Arachis hypogaea* L.) az Amerikai Egyesült Államokban (USA), Virginiában írták le. A kórokozó a levelek satnyulását és a termés deformációját okozta. A fertőzött területeken mintegy 95%-kal csökkentette a földimogyoró termésmennyiségét (Troutman, 1966). A gazdanövénykör vizsgálatok során 90 növényfajból 61 fajt fertőzött az izolátum, amely alapján a kórokozó széleskörű előfordulására következtettek.

A PSV a világon Afrikában, Amerikában, Ázsiában és Európában általánosan elterjedt (Troutman, 1966; Tsuchizaki, 1973; Fisher és Lockhart, 1978; Beczner és mtsai., 1978). Mintegy 16 növény családba tartozó 73 fajt képes szisztemikusan és / vagy lokálisan fertőzni (Mink és mtsai., 1969; Milbrath és Tolin, 1977). Gazdanövényei elsősorban a pillangósvirágú növények közül kerülnek ki. A kórokozó általánosan megtalálható lucernán (*Medicago sativa* L.), babon (*Phaseolus vulgaris* L.), borsón (*Pisum sativum* L.), földimogyorón (*Arachis hypogaea*), hereféléken (*Trifolium spp.*), sárga csillagfürtön (*Lupinus luteus* L.), lencsén (*Lens culinaris* Medik.), guarbabon (*Cyamopsis tetragonoloba* L.), limababon (*Phaseolus lunatus* L.) és fehér akácon is (*Robinia pseudoacacia* L.) (1. ábra). A kórokozót egyéb zöldségfélékről is leírták: zellerről (*Apium graveolens* L.), paprikáról (*Capsicum annuum* L.), paradicsomról (*Lycopersicon esculentum* Mill.) és uborkáról (*Cucumis sativus* L.) is (Mink, 1972; Xu és

mtsai., 1986). Mint vírus rezervoár a gazdanövények közül kiemelkedő jelentőségű a fehér akác szerepe (Xu és mtsai., 1994), amely növény hazánkban is több mint 400 ezer hektár területen található, erdőterületeink mintegy 22,3 %-át foglalva el (Andrásevits, 2006). Ezen felül jelentőségét tovább növeli az a tény, hogy a fehér akác általánosan előfordul határoló sávként szántóföldi területek mellett, közvetlen fertőzési forrást jelentve a pillangós virágú növényeinkre.



1. ábra. PSV tünete fehér akác levelén (a kép a Roosevelt téri „öreg akác”-ról készült)
(fotó: Kiss L.)

A vírusátvitelben legfontosabb szerepük a levéltetveknek van (2. ábra), amelyek nem-perzisztens módon terjesztik a kórokozót. A nem-perzisztens átvitel során a levéltetvek a felvett vírust néhány percig nagy hatékonysággal viszik át egyik gazdanövényről a másikra, ezt követően a vírusátvitel hatékonysága lecsökken, majd kb. egy óra elteltével megszűnik (Horváth, 1999). Vírusátviteli vizsgálatok az *Aphis craccivora* Koch., az *A. spiraecola* Patch. és a *Myzus persicae* Sulzler jelentőségét igazolták (Hebert, 1967). A kórokozó maggal történő terjedése csekély mértékű, elsősorban azért, mert a kis mennyiségű fertőzött magból kikelő csíranövények rövid időn belül elpusztulnak, megakadályozva ezzel a másodlagos fertőzések létrejöttét (Troutman és mtsai., 1967; Kuhn, 1969).

A PSV hazai előfordulásáról Beczner és Devergne (1979) számolt be először, egy Putnok környékén gyűjtött vörösheréről (*Trifolium pratense* L.) származó izolátum (PSV-Tp) jellemzése során. Részletes tesztnövénykör és szerológiai vizsgálatokkal megállapították, hogy

az általuk gyűjtött PSV-Tp az akkor ismert két PSV alcsoporttól szerológiailag nagymértékben különböző új alcsoport izolátumának tekinthető.

A PSV izolátumok tesztnövénykörének meghatározására irányuló, valamint a szerológiai, és főleg a molekuláris biológiai módszerek fejlődésével lehetővé váló vizsgálatok a kórokozó törzseinek nagymértékű heterogenitását bizonyították. Jelenleg a PSV-nek három alcsoportja ismert, amely alcsoportok megbízható elkülönítése a vírusgenom nukleotid sorrendjének összehasonlításával történik (3.5 fejezet).



2. ábra. *Aphis sp.* által kolonizált fehér akác (fotó: Kiss L.)

3.2 A PSV részecske- és genomszerveződése

A cucumovírusok molekuláris szintű kutatásai terén nagy mennyiségű irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Ezek az adatok azonban elsősorban a CMV, kisebb mértékben a TAV esetében végzett kutatások eredményei. Jelen dolgozatomban ezért a cucumovírusokra széles körben adaptálható ismeretanyagot közlöm, kiegészítve a PSV esetében eddig megismert specifikus kutatási eredményekkel.

A cucumovírusok örökítő anyaga három 29–30 nm átmérőjű ikozahedrális részecskébe csomagolódik be, amely 180 egyforma köpenyfehérje (CP) alegységből épül fel és megközelítőleg 18% RNS-t tartalmaz (Finch és mtsai., 1967). A cucumovírusok genomja három egyszálú, pozitív orientációjú RNS molekulából tevődik össze (3. ábra). Az RNS-ek 5' végén az

eukarióta hírvivő RNS-ekre (mRNS) jellemző 7-metilguanozin sapka (CAP) található (Symons, 1975). Az RNS-ek 3' végei erősen konzerváltak, amelyek magnézium ionok (Mg^{2+}) jelenlétében szállító RNS-szerű (tRNS) másodlagos szerkezetet vesznek fel (Joshi és mtsai., 1983; Rietveld és mtsai., 1983), ezek a motívumok a vírus replikációjánál a negatív RNS szál promóteréül szolgálnak (Sivakumaran és mtsai., 2000).

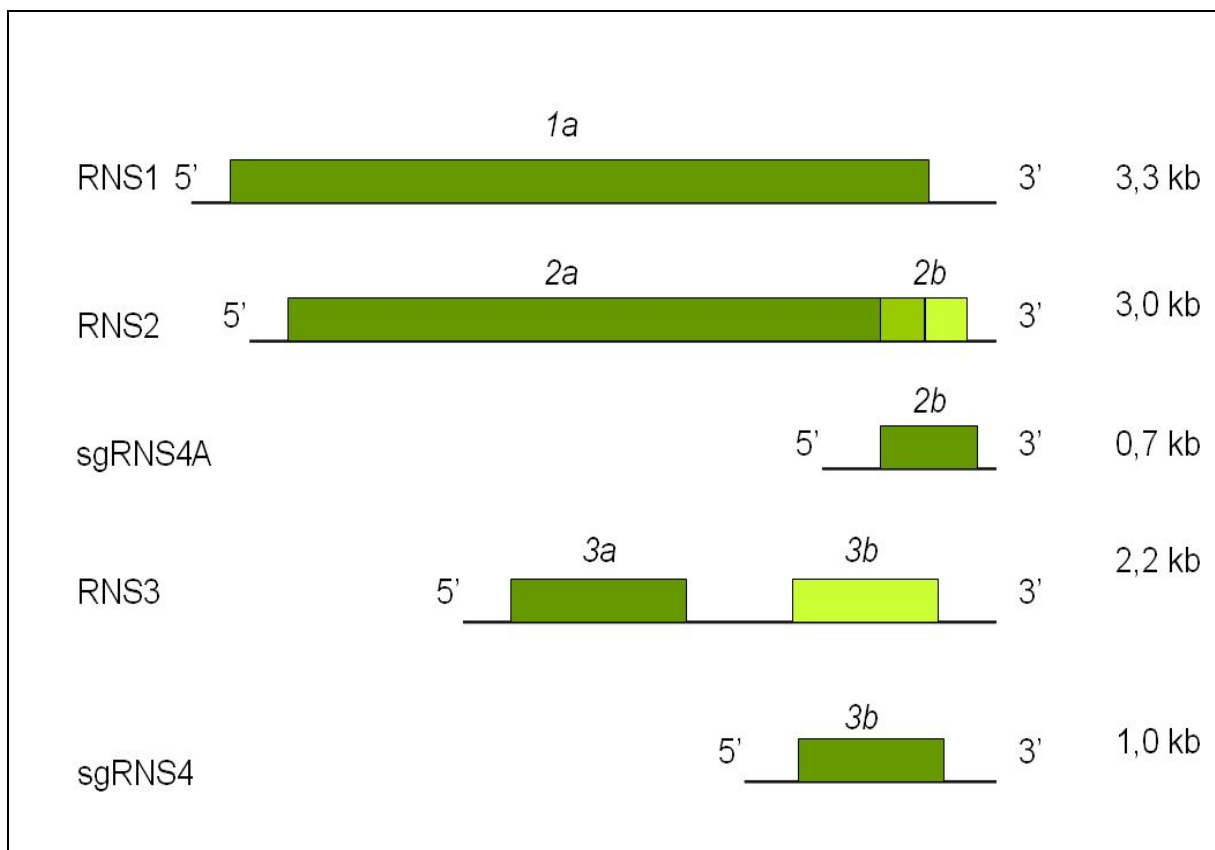
Az RNS1 megközelítőleg 3,3 kilobázis (kb) hosszúságú, monocisztronikus. Egy nyílt leolvasási keretet (ORF) tartalmaz, ami az 1a fehérjét kódolja. Az RNS2 3,0 kb, az RNS3 2,2 kb hosszúságú. Mindkét RNS molekula bicisztronikus. Az RNS2 esetében a 2a és a legkésőbb megismert 2b fehérjét kódoló gének részben átfednek, illetve a 2b ORF-je egy nukleotiddal eltolódott a 2a ORF-hez képest (Ding és mtsai., 1994). A *Bromoviridae* család nagymértékben hasonló genomfelépítése ellenére is a 2b fehérjét kódoló ORF kizárólag a *Cucumovirus* és az *Illavirus* nemzetségeknél található meg (Xin és mtsai., 1998). Az RNS3 szintén két fehérjét, kódol, úgymint 3a (mozgási fehérje, MP) és a 3b (köpeny fehérje, CP) fehérjéket, melyeket egy köztes nem-kódoló nt szakasz (intergenic region, IR) választ el egymástól.

A bicisztronikus RNS-ek 3' végén elhelyezkedő 2b, és 3b fehérjék nem közvetlenül a genomi RNS-ekről, hanem az azokról képződő szubgenomi RNS4A (0,7 kb) és az RNS4-ről (1,0 kb) transzlálódnak (3. ábra). Az sgRNS4 az RNS3-mal közösen egy víruspartikulumba csomagolódik be (Mushegian és Koonin, 1993). A PSV és a CMV esetében előfordul, hogy egy ötödik, megközelítőleg 390 nt hosszú, úgynevezett szatelit RNS (satRNS) is becsomagolódik a genomi és sgRNS-ekkel a virionokba (Naidu és mtsai., 1991, 1992; Roossinck és mtsai., 1992; Yamaguchi és mtsai., 2005). A satRNS-ek vizsgálatakor kimutatták, hogy a CMV és a TAV segíti a CMV satRNS-ek felszaporodását, a PSV viszont nem. Ezzel szemben a PSV satRNS-ek replikációját csak a PSV támogatja (Kaper és mtsai., 1978; Palukaitis és mtsai., 1992; Naidu és mtsai., 1995).

A cucumovírus RNS-ek pozitív orientációjúak, azaz transzlációs hírvivőként szolgálnak a fehérje szintéziséhez, és a replikációs promótereken keresztül az RNS replikáció templátjai is (Kao, 2002). Számos olyan régiót azonosítottak már a vírusgenomban, amelyről kiderült, hogy a vírus működésében meghatározó szerepet tölt be. Az RNS1 és RNS2 5' végén és az RNS1, RNS2 és RNS3 3' végén nagyfokú konzerváltságot figyeltek meg a nt sorrendben. Ez az erősen konzervált régió a PSV esetében is jelen van az RNS-ek 3' végén, mely 40 nt hosszú, és a vírus-akkumulációban játszik jelentős szerepet (McGarvey és mtsai., 1995; Boccard és Baulcombe, 1993; Palukaitis és Garcia-Arenal, 2003). Mindhárom genomi RNS 5' végén belső vezérlő szakaszhoz (internal control region, ICR) hasonló konzervált motívumok találhatók, amelyek a

vírus RNS átírásakor promóterként működnek (Pogue és mtsai., 1992; Boccard és Baulcombe, 1993). Az RNS3 5' nem-kódoló régiója (NCR) a PSV esetében is tartalmazza a cucumovírusokra jellemző uracil-guanin gazdag szakaszt, amely - mint ismeretes - a CMV esetében az RNS3 akkumuláció hatékonysága szempontjából nagy fontosságú (Boccard és Baulcombe, 1993). Érdekes módon ez a régió TAV esetében mintegy háromszor hosszabb, mint a PSV és a CMV esetében (O'Reilley és mtsai., 1998). A PSV-nél szintén megfigyelhető az RNS3 génjeit összekötő IR-ben egy rövid ICR-hez hasonló (5'-GGTTCAATTC-3') konzervált motívum, amely az RNS3 akkumulációjában játszik jelentős szerepet (Boccard és Baulcombe, 1993).

Az átíró vírusfehérjék mennyisége a különböző vírusfehérjék esetén eltérő, amelyek szabályozásában nagy szerepet játszanak a genomi RNS-ek. A fehérjék közül a CP-ből keletkezik a legnagyobb mennyiség, valamivel kevesebb transzlálódik a replikáz komplexet alkotó 2a és 1a fehérjékből, legkevesebb pedig a MP-ből. Az adott fehérjék optimális mennyiségét a transzlációs promóterek eltérő erőssége biztosítja (Kwon és Chung, 2000).



3.ábra. A PSV genomszerveződése

A téglalapokkal a feltüntetett génekhez tartozó ORF-eket, a vonalakkal a nem-kódoló régiókat jelöltük. Világosabb színnel azok az ORF-ek láthatók, amelyek transzlációja nem közvetlenül a genomi RNS-ről történik. Az ORF-ek közül a 2a részlegesen átfed a 2b-vel.

3.3 A vírusfehérjék funkciói

A cucumovírusok RNS-eiről, fehérjeiről, és azok szerepéről szintén jelentős számú irodalmi adat áll rendelkezésünkre, elsősorban a CMV és a TAV terén végzett kutatások eredményei alapján. A vírusok által kódolt öt fehérje, az RNS-ekkel valamint a gazda faktorokkal együtt indítja el a vírus növénybeli akkumulációját, és a betegségtünetek kialakulását. CMV esetében megállapították, hogy az öt vírusfehérje mindegyike kimutatható a vírussal fertőzött növényi szövetből (Gould és Symons, 1978; Davies és Symons, 1988; Hayes és Buck 1990; Ding és mtsai., 1994).

3.3.1 Az 1a fehérje

Az RNS1-ről képződő 1a fehérje megközelítőleg 1000 aminosavból (aa) épül fel és a cucumovírusokra jellemzően hozzávetőleg 111 kilodalton (kDa) molekulatömegű. A vírusreplikációban betöltött elsődleges szerepét a CMV-nél több esetben is bizonyították. Nitta és mtsai. (1988) igazolták, hogy a CMV replikációja nem játszódik le az RNS1 nélkül. RNS1-et kifejező transzgenikus növények esetében Canto és Palukaitis (1998) megállapították, hogy amennyiben a növényeket az RNS2 és RNS3-mal inokulálják, a vírusrészecskék fertőzőképes virionokat hoznak létre, míg 1a fehérje hiányában ez a folyamat nem játszódik le.

Az 1a fehérje N-terminális részén, metiltranszferáz doménre jellemző H...DxxR...Y motívum található, aminek a genomi és szubgenomi RNS-ek CAP strukturájának kialakításában van jelentős szerepe. A fehérje C-terminális szakaszában pedig helikáz doménre jellemző motívumokat azonosítottak, amelyet a metiltranszferáz doméntől prolin gazdag régió választ el (Gorbalenya és mtsai., 1988; Rozanov és mtsai., 1992; O'Reilly és mtsai. 1998). Ilyen helikáz jellegű motívumok közé tartozik két nukleotid trifoszfát (NTP) kötő régió, valamint egy adenozin trifoszfátáz (ATPáz) és feltehetően RNS kötő aktivitású motívum. Ezen régiók hiánya a replikáció gátlását eredményezi (Gorbalenya és mtsai., 1989; Kadaré és Haenni, 1997). Kim és mtsai. (2006) bizonyították, hogy dohányban a *Tcoi2* elnevezésű fehérje kináz kapcsolatba lép a CMV 1a fehérje metiltranszferáz régiójával. Az eredményeket élesztő két-hibrid rendszer alkalmazásával igazolták.

A tünetek jellegét is nagyban befolyásolhatja az 1a fehérje. A CMV-Ns törzs *Nicotiana* cv. Xanthi-fajokon nekrotikus tüneteket mutat, míg a CMV-Rs szisztémikus, mozaikos tüneteket idéz elő. A két izolátum esetében tapasztalt tünetbeli különbséget az 1a fehérje 461-es

arginin és cisztein aminosavaira térképezték. Amennyiben a CMV-Ns arginin aminosavát ciszteinre cserélték, a vírus a növényekben szisztemizálódott, míg a CMV-Rs esetében a csere hatására a vírus elvesztette szisztemikus terjedési képességét. Az aminosavak hiánya a vírusok működésképtelenségét eredményezte (Divéki és mtsai., 2004).

3.3.2 A 2a fehérje

A PSV esetében a 2a fehérje megközelítőleg 845 aa hosszúságú és 94 kDa molekulatömegű. A 2a fehérje az RNS2-ről képződik és RNS függő RNS polimeráz (RdRp) funkciót mutat. Ezt bizonyítja a más vírusok RNS polimeráz enzimeivel mutatott nagyfokú homológia, és a CMV kapcsán leírt, az RNS polimerázokra jellemző Mg^{2+} -kötő GDD motívum jelenléte (Argos, 1988; Bruenn, 1991), továbbá az is, hogy a vírus tisztított replikáz komplexe is tartalmazza a 2a fehérjét (Hayes és Buck, 1990). Ezek mellett Nitta és mtsai. (1988) megállapították, hogy az RNS2 hiányában dohány protoplastokban CMV replikáció nem történik.

Igazolt, hogy a 2a fehérje az 1a fehérjénél nagyobb mennyiségben van jelen a fertőzött növényi szövetekben (Gal-On és mtsai., 1994; Hellwald és Palukaitis, 1995). A CMV 2a fehérjét elsősorban a tonoplasthoz kötötten találták meg, azonban jelentős mennyiségű foszforilált 2a fehérje jelenléte a citoplazmából is kimutatható (Cillo és mtsai., 2002; Gal-On és mtsai., 2000).

A növényi sejten nagy valószínűséggel az 1a fehérje kötődik a membránhoz, vagy a membrán fehérjéhez, a 2a pedig az 1a-hoz kapcsolódik. A 2a foszforiláltsági szintje befolyásolja a fehérje sejten belüli lokalizációját. A replikációs komplexben kizárólag nem foszforilált 2a fehérje található. Megállapították, hogy az 1a fehérjével történő kapcsolódáshoz elegendő a 2a fehérje N-terminális régiójának első 126 aminosava, viszont ha ez a rész foszforilált állapotban van, a fehérje komplex nem jön létre (Kim és mtsai., 2002). Ezek alapján megállapítható, hogy számos más funkciója mellett a 2a jelentős szerepet játszik a replikáz komplex kialakításában.

A cucumovírusoknál a három különálló genomi RNS-ből adódóan fertőzőképes cDNS birtokában viszonylag könnyen készíthetünk, úgynevezett reassortáns (genomi szegmensek átrendeződése) vírusokat. A CMV és a PSV esetében Masashi és mtsai. (2003) élesztő két-hibrid rendszer alkalmazásával bebizonyították, hogy az 1a fehérje C-terminális régiójának

kapcsolatba kell lépnie a 2a fehérje N-terminális régiójával ahhoz, hogy az RNS replikáció elindulhasson.

3.3.3 A 2b fehérje

A cucumovírusok és azon belül a PSV legkisebb fehérjéje. Hossza a PSV esetében 93–97 aa, molekulatömege megközelítőleg 11 kDa. Előfordulását a *Bromoviridae* családon belül a *Cucumovirus* és az *Ilarvirus* nemzetségeknél figyelték meg (Xin és mtsai., 1998). A 2b fehérjét, a 2a-hoz hasonlóan az RNS2-n lévő gén kódolja, azonban átíródása a szubgenomi RNS4A-ról történik. Az ORF részben átfed a 2a 3' régiójával, azonban a fehérje leolvasása +1 nukleotid eltolódással történik.

A 2b fehérje jelenlétét Ding és mtsai. (1994) írták le, azonban az ismert fehérjecsaládoktól jelentősen eltérő aminosav sorrendje miatt szerepét sokáig homály fedte. Az azóta eltelt időszakban számos közlemény jelent meg a 2b szerepéről. A CMV 2b fehérjét *in vivo* elsősorban a sejtmagból mutatták ki, illetve bizonyították, hogy a fehérje 22–36. aminosavak közötti bázikus régiója sejtmagi lokalizációs jelként működik (Lucy és mtsai., 2000).

A CMV és a TAV esetében szintén bizonyítást nyert, hogy a 2b fehérje gátolja a növény transzkripció utáni géncsendesítési (post-transcriptional gene silencing, PTGS) mechanizmusát (Brigneti és mtsai., 1998; Li és mtsai., 1999), illetve megakadályozza, hogy a géncsendesítési szignálmolekulák aktiválják a géncsendesítést a szisztemikusan fertőzött szövetekben (Guo és Ding, 2002).

A 2b-nek ezek mellett jelentős szerepe van a vírus hosszú távú mozgásában és a gazdanövénykör meghatározásában is (Ding és mtsai., 1994; 1995b). PSV esetében a 2b fehérjét nem termelő, illetve az N-terminális régióban részlegesen csonkított fehérjéjű vírusokkal *N. tabacum* protoplasztot és *N. benthamiana* Domin növényeket fertőztek. Mindkét konstrukció esetében megállapították, hogy a 2b nem befolyásolja a vírus sejten belüli replikációját, viszont felelős az inokulált és felsőbb levelekben a vírus-akkumuláció kialakulásáért (Netsu és mtsai., 2008). Du és mtsai. (2008) szintén a 2b, illetve a 2a fehérje C-terminális régiójának szerepét említi a vírus-akkumulációt és a tünetek jellegét illetően.

3.3.4 A 3a fehérje

Más néven a cucumovírusok mozgási fehérjéje (MP). A 3a fehérjét az RNS3-on lévő 3a gén kódolja. Hossza megközelítőleg 287 aa, molekulatömege 31 kDa. A PSV MP aminosav sorrendje a mozgási fehérjét magába foglaló, a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) MP-je alapján elnevezett „30K” szupercsaládba sorolható (Melcher, 2000). Az ide tartozó fehérjék egy 33 aa hosszú konzervált szakaszt tartalmaznak (Mushegian és Koonin, 1993), amely régió az eddigi szekvencia adatok alapján a PSV izolátumok esetében 0–8 aminosavban, míg a CMV esetében mindösszesen 1 aminosavban térhet el az azonos fajba tartozó többi izolátumtól (Hu és mtsai., 1997).

Passzív transzporttal csak legfeljebb 2 nm szélességű és kb. 800 g/mol tömegű molekulák képesek átjutni a plazmodezmán (Crawford és Zambryski, 1999). Bocard és Baulcombe (1993) a CMV esetében bebizonyították, hogy az MP nélkülözhetetlen a vírus sejtről-sejtre terjedéséhez, a replikációban azonban nem vesz részt. Mikroinjektálási kísérletekkel megállapították, hogy a MP képes elősegíteni a plazmodezmákon keresztül saját maga, a vírus RNS-ek, vagy fluoreszcensen jelölt dextránszemcsék szomszédos sejtbe jutását (Canto és mtsai., 1997; Ding és mtsai., 1995a; Vaquero és mtsai., 1994). Ezzel szoros összefüggésben a CMV MP-jét zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) fuzionáltatva az MP elsősorban a plazmodezmák bejáratánál és a központi csatornában mutatható ki (Oparka és mtsai., 1996). Tehát az MP alapvetően meghatározza a vírus rövid távú terjedését is.

Hosszú távú mozgás tekintetében is fontos szerepe van az MP-nek. Li és mtsai. (2001) CMV esetében az MP aminosav sorrendjének 60. aa pozíciójában a prolint alaninra cserélték, amely ugyan nem befolyásolta a vírus rövid távú mozgását, de a mutáns vírus hosszú távú mozgása hőmérséklet érzékenységet mutatott. Choi és mtsai. (2005) megállapították, hogy a CMV esetében mind a 2a fehérje, mind az MP jelentős szerepet játszik a vírus szisztemikus terjedésében cukkini (*Cucurbita pepo convar. giromontia* L.) növényben. Mindkét fehérje, egymástól függetlenül, de elősegíti a vírus hosszútávú mozgását.

A mozgási fehérjék kompatibilitási vizsgálatai meglepő eredményeket mutatnak. A CMV-vel közeli rokon vírus, a TAV MP-jének a CMV MP helyére való beépítése gátolta a vírus sejtről-sejtre történő terjedését (Salánki és mtsai., 2004). A kutatócsoport egy másik kísérletében a CMV MP helyére egy a *Tombusvirus* családba tartozó cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) MP-jét építették. A kísérlet eredményeként a CMVcymMP hibridvírus szisztemikus fertőzést idézett elő a vizsgált

növények többségén, sőt a CP kiejtése után, a vírus bizonyos rövid távú mozgása is megfigyelhető volt (Huppert és mtsai., 2002).

3.3.5 A 3b fehérje

A köpenyfehérje (coat protein, CP). azaz a 3b gén az RNS3 3' végéhez eső részén helyezkedik el, a MP-től egy nem-kódoló megközelítőleg 260 nt hosszú IR választja el. Transzlációs terméke a 24 kDa molekulatömegű CP, amely a szubgenomi RNS4 -ről íródik át (Habibi és Francki 1974; Davies és Symons 1988). Akárcsak a többi cucumovírus a PSV virion partikulum is 29–30 nm átmérőjű ikozahedrális szimmetriájú, és 180 CP alegységből tevődik össze (Francki és mtsai., 1966; Finch és mtsai., 1967). A CP specifikusan köti a saját vírus RNS-t és egyaránt szükséges a vírus hatékony növényen belüli rövid- és hosszútávú és növények közötti terjedéséhez (Mossop és Francki, 1978; Suzuki és mtsai., 1991; Bocard és Baulcombe, 1993; Canto és mtsai., 1997), valamint a tünetek jellegét is nagyban befolyásolja (Takeshita és mtsai., 2001).

A PSV esetében is, akárcsak a CMV-nél a CP N-terminális régiója arginin-ben gazdag, erősen pozitív töltésű és nélkülözhetetlen a vírus részecske kialakulásához (Schmitz és Rao, 1998). A hosszú távú mozgásban a CP jelenléte meghatározó, mivel a cucumovírusok vírusrészecske formájában jutnak el a növény szállítószövetén keresztül a távolabbi szövetekhez (Taliński és García-Arenal, 1995; Salánki és mtsai., 1997). A rövid távú terjedésben is jelentős szerep jut a CP-nek, mert hiányában a sejtről-sejtre terjedés gátolt, vagy rendkívül korlátozott (Canto és mtsai., 1997, Huppert és mtsai., 2002). Mivel a cucumovírusok virionjainak morfológiája és köpenyfehérjéik felépítése nagyon hasonló, ezért a vírusfajok CP alegységei általában képesek egymás genomi RNS-eit becsomagolni (Chen és Francki, 1990; Masashi és mtsai., 2003). A CMV RNS1 és RNS2, a PSV RNS3-mal (C1C2P3) és a PSV RNS1 és RNS2, a CMV RNS3-mal (P1P2C3) mesterségesen fertőzött *N. benthamiana* a fertőzés hatására szisztemikus tüneteket mutatott, azaz a hibrid vírusok életképesek voltak és mindkét CP becsomagolta a másik vírus RNS-eit is (Masashi és mtsai., 2003).

A CP néhány aminosaváról bebizonyosodott, hogy jelentős eltéréseket idéz elő a megjelenő tünetekben. Az CMV-R izolátum *Nicotiana glutinosa* L. tesztnövényen erős törpülés tünetet idézi elő. Szilassy és mtsai., (1999) igazolták, hogy a tünet kialakulásáért a CP 193. negatívan polarizált, aszparagin aminosava a felelős. A CMV-Trk7 esetében, amely mozaikos tüneteket okoz *N. glutinosa*-n, ugyanebben a pozícióban pozitív töltésű lizin található. Gellért és

mtsai. (2005) feltételezik, hogy a 193-as aminosav töltése befolyásolja a 189-től a 192-ig terjedő szekvenciárészen található kazein kináz II kötődését a CP felületén. Nagy valószínűséggel ez a kis különbség két különböző biokémiai utat indukál a vírushatás folyamatában. A tünetek jellegén kívül cucumovírusoknál több esetben bebizonyosodott a CP jelentősége a levéltetvekkel történő vírusátvitelben (Chen és Francki, 1990). Perry és mtsai. (1998) ennek kapcsán a CP 25., 129., 162., 168. és 214. aminosavainak szerepét bizonyították, míg Liu és mtsai. (2002) egy felszíni determináns (β H- β I hurok) meghatározó szerepét emelték ki a sikeres vírusátvitel kialakulásához.

3.4 A PSV genetikai változékonysága és taxonómiája

A cucumovírusok csoportjában az ismert izolátumok szerológiai és molekuláris vizsgálati eredményei alapján a PSV tekinthető a legheterogénebb kórokozónak. Szintén nagyfokú diverzitást mutat a CMV, legkisebb mértékben változékonynak pedig a TAV tekinthető (Palukaitis és Garcia-Arenal, 2003). A PSV alcsoportjainak ismertetése előtt a teljesebb kép érdekében ejtsünk néhány szót a csoport másik két tagjáról is.

A CMV izolátumokat már a 70-es években két fő alcsoportba sorolták elsősorban a patológiai és szerológiai hasonlóság alapján (Devergne és Cardin, 1973). A ma használt, nukleinsav homológiát tükröző felosztás CMV I. és CMV II. alcsoport (Owen és Palukaitis, 1988) megfelel a DTL és ToRS szerotípusoknak (Wahyuni és mtsai., 1992). Jellemző különbség, hogy a két alcsoport hőmérsékleti optimuma eltérő: az I. alcsoportba tartozóké magasabb, mint a II. alcsoportba tartozó izolátumoké (Daniels és Campbell, 1992), ami jelentősen befolyásolja földrajzi elterjedésüket. Az I. alcsoportot a 1990-es évek végén tovább bontották IA és IB alcsoportokra a vírus RNS3 molekula 5' nem-kódoló régiójának nukleinsav sorrendje alapján (Roossinck és mtsai., 1999). Az I. alcsoportba tartozó izolátumok nt szinten 88%-nál nagyobb azonosságot mutatnak, míg a II. alcsoport esetében ez az azonosság 96% feletti. Az alcsoportok között 69–77% azonosságokat állapítottak meg. Ezek alapján elmondható, hogy az I. alcsoport heterogénebb, mint a II. alcsoport (Palukaitis és Garcia-Arenal, 2003). Érdekes megfigyelés továbbá, hogy az IB alcsoportba tartozó törzseket Ázsiában izolálták, míg az IA és II. alcsoportba tartozó törzsek a világ minden táján megtalálhatók (Roossinck és mtsai., 1999).

A jellemzett TAV izolátumok száma sokkal kevesebb a CMV-hez viszonyítva. Az eddig ismert izolátumok genetikai heterogenitása meglehetősen alacsony. Az RNS1 és RNS2 esetében 99% feletti az nt azonosság, míg az RNS3 esetében ez 91%-ot meghaladó, köszönhetően a 3' NCR-ben található nt sorrend megkettőződéseinek (Palukaitis és Garcia-Arenal, 2003).

A cucumovírusok közül leginkább heterogén kórokozónak a PSV tekinthető. A PSV-nek a vírusgenom nukleotid sorrend azonossága alapján három alcsoportja ismert. Hajimorad és mtsai. (1999) szerint egy alcsoportba azok az izolátumok tartoznak, amelyeknek nukleotid sorrend azonossága 90%-nál nagyobb. Fajon belül az alcsoportok között megítélésük szerint ez az érték 70–80% közötti. Ezek mellett az ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) meghatározása szerint a cucumovírusokon belül az alcsoportoknak legalább 65% nukleotid szekvencia azonosságot kell mutatniuk (Roosinck és mtsai., 2006).

A három alcsoport közül a PSV I. (E – eastern) és a PSV II. (W – western), valamint az ide tartozó izolátumok (pl. PSV-E és PSV-W, mint névadók) Észak-Amerikában kerültek leírásra (Mink és mtsai., 1969; Mink, 1972; Naidu és mtsai., 1995; Hu és mtsai, 1997, 1998). Újabb, iráni és japán izolátumok megjelenését követően azonban egyértelművé vált, hogy ez a két alcsoport nem korlátozódik az amerikai földrészre (Bananej és mtsai., 1998; Karasawa és mtsai., 1991, 1992). A III. alcsoportba tartozó izolátumok Kínából származnak (Xu és mtsai., 1998; Yan és mtsai., 2005). Az alcsoportok között a nt szekvencia azonosságok RNS1 és RNS3 szinten 80% körüli értéket mutatnak, míg az RNS2 esetében ez az érték 75% körüli (Hajimorad és mtsai., 1999).

A PSV taxonómiája azonban sokkal összetettebb annál, hogy ebbe a három alcsoportba minden izolátum besorolható legyen. A PSV genetikai sokszínűségét jelzi, hogy Xu és mtsai. (1986) négy szerotípus létezését állapították meg tizenhárom, az USA-ból származó izolátum vizsgálata során. Richter és mtsai. (1987) pedig európai izolátumok esetében, a nagy heterogenitásra való tekintettel, hat szerológiai csoportot határoztak meg, míg a PSV egy fehér akácról származó izolátumát sokáig, mint külön vírust tartották számon *Robinia mosaic virus* (RoMV) néven (Schmelzer, 1971; Richter és mtsai., 1979). Militao és mtsai. (1998) Northern blot analízis segítségével megállapították, hogy a kórokozó az I. és II. alcsoporthoz is közel áll, azonban egyikbe sem sorolható be. Már korábban említettük, hogy Beczner és Devergne (1979) részletes tesztnövénykör és szerológiai vizsgálatokkal bizonyították, hogy az általuk vörös heréről (*Trifolium pratense*) gyűjtött PSV-Tp az akkor ismert két PSV alcsoporttól szerológiailag nagymértékben különböző új alcsoport izolátumának tekinthető. A PSV-Tp *Chenopodium amaranticolor* fertőzött levelén klorotikus lokális léziót okozott, paradicsomon,

borsón mozaikot és deformáltságot, míg uborkán és *N. glutinosa* növényen mozaikosodást figyeltek meg szisztemikus tünetként. Nehezíti a PSV izolátumok taxonómiai besorolását néhány további különleges izolátum. Egy marokkói PSV izolátum súlyos tüneteket okozott szabadföldi körülmények között babon. Az izolátum szerológiai vizsgálata az I. és II. alcsoporttól nagyban eltérő tulajdonságokat határozott meg (Fisher és Lockhard, 1978). Northern blot analízis alapján Hajimorad és mtsai. (1999) az iráni PSV-I izolátum RNS3 molekuláját egyértelműen a II. alcsoportba sorolták. Az RNS1 és RNS2 esetében azonban a hibridizációs jel hiánya és a részleges nt sorrend ismerete alapján egy ősi, feltehetően a II. és egy eddig ismeretlen alcsoport között létrejött reasszortáns folyamatot feltételeztek. A PSV-BV-15 izolátum esetében szintén reasszortáns kialakulásáról beszélhetünk. Hu és Ghabrial (1998) vizsgálatai szerint a PSV-BV-15 RNS1 a II. alcsoportba, míg az RNS2 és az RNS3 az I. alcsoportba tartozik. Ezek mellett lengyel kutatók a RNS-ek szintjén 84–88%-os azonosságot állapítottak meg az általuk meghatározott PSV-P és az I. alcsoport izolátumai között. Az eredmények alapján a PSV-P izolátumot az I. alcsoporthoz közele, de annak nem tipikus tagjaként határozták meg (Obrepalska-Steplovska és mtsai., 2008a, 2008b).

A GenBank (Benson és mtsai., 2008) adatbankban doktori munkám megírásakor mindössze hat PSV genom teljes elsődleges szerkezete található meg. Sokkal kevesebb, mint a CMV esetében, pedig úgy látszik, hogy a PSV heterogenitás és taxonómiai kapcsolatok tekintetében egyaránt összetettebb közele rokonainál.

3.5 A PSV alcsoportok részletes jellemzése

A 60–80-as évek közötti időszakban történt PSV kutatások elsősorban a tesztnövények fertőzésével, szerológiai és radioaktív hibridizációs eszközökkel gazdálkodtak. Habár mindegyik módszernek nagy szerepe volt a PSV terén elért eredményeket illetően, az egyes izolátumok biztos alcsoportbeli hovatartozása a nukleotid sorrend meghatározással vált egyértelművé. A korábbi időszakban ez a lehetőség nem állt a kutatók rendelkezésére és elsősorban az izolátumok megsemmisülése miatt, sok nagy jelentőségű minta veszett el genomjának megismerése nélkül.

3.5.1 Az I. alcsoport

Ahogy az előzőekben említettük a PSV I. (E – eastern) alcsoportja és az ide tartozó izolátumok Észak-Amerikában kerültek elsőként leírásra (Mink és mtsai., 1967, 1969; Mink, 1972). Az alcsoport létezését nukleinsav sorrend meghatározással is alátámasztották (Hu és mtsai., 1997, 1998; Naidu és mtsai., 1995). A PSV-E típus-izolátumot O.W. Barnett az USA-ban bab növényről gyűjtötte (Naidu és mtsai., 1995). Nukleotid sorrendje nem ismert. Az I. alcsoport izolátumait elsősorban az USA délkeleti államaiból jelezték. Alapvető elkülönítése az akkor ismert II. alcsoporttól két tesztnövény segítségével történt. Az I. alcsoport izolátumai 'Tennessee' fajtájú zöldbab fertőzött levelein nekrotikus léziókat, csúcsi levelein nekrotikus gyűrűket és érnekrózt idéztek elő. A II. alcsoport izolátumai ugyanezen növényen nektrózis nélküli mozaik tüneteket indukáltak. Másik határozó bélyegként a zöldborsó 'Perfected Wales' fajtáján az I. alcsoport esetében mozaik volt megfigyelhető, míg a másik esetben súlyos szárnekrózt tapasztaltak (Adams és Antoniw, 2006). A PSV-E mesterséges fertőzés során *C. amaranticolor* tesztnövényen lokális klorotikus léziókat okozott, szisztemizálódás nélkül. Szisztemikus mozaik volt megfigyelhető többek között rézvirágon (*Zinnia elegans* Jacq.), lokális klorotikus léziót követően, szisztemikus mozaikot és satnyulást idézett elő földimogyorón, illetve lokálisan sem fertőzte a fehér akácot.

A PSV-ER szintén az USA-ban került leírásra. Az izolátumot J.W. Demski gyűjtötte tehénborsóról (*Vigna sinensis* Savi et Hassk.) (Naidu és mtsai., 1995). Nukleotid sorrendje teljes mértékben ismert. A részletes szekvencia elemzés a cucumovírusokra jellemző szekvencia motívumok mindegyikét tartalmazza (Naidu és mtsai., 1995; Hu és mtsai., 1997). *C. quinoa* Willd. és *C. amaranticolor* fajokon a PSV-ER lokális léziókat idézett elő, míg tehénborsó, *N. benthamiana*, *N. glutinosa* és *N. clevelandii* Gray. fajokon szisztemikus mozaik tünetek jelentek meg.

A *Tephrosia vogelii* Hook.f.-ről izolált PSV-T szerológiailag közeli rokonságot mutatott a PSV-E izolátummal. A tünetani vizsgálatok során, azonban a *C. amaranticolor* növényeken a szokásos lokális léziókat figyelték meg szisztemizálódás nélkül, míg *C. quinoa* esetében a vírus szisztemizálódását és a levelek deformációját tapasztalták (Waterworth és mtsai, 1973).

A PSV-J az az alcsoportba tartozó izolátumok közül az első olyan, amelyet az amerikai földrészen kívül írtak le. Megjelenését Japánban babról közölte Tsuchizaki (1973). A PSV-J-t az I. alcsoport izolátumai közé sorolták. Ez volt az első PSV izolátum, melynek teljes nt sorrendjét meghatározták (Karasawa és mtsai., 1991, 1992). A PSV-J és a PSV-ER 91% nt azonosságot

mutatott az RNS3 vizsgálata során, amely Hu és mtsai. (1997) szerint egyértelműen igazolja, hogy a PSV-J az I. alcsoportba tartozó izolátum.

A Lengyelországból származó PSV-P, amely nem tipikus tagja az I. alcsoportnak a tünettanilag vizsgálatok során lokálisan sem fertőzte a földimogyorót, a borsón pedig szisztemikus mozaik tüneteket idézett elő (Obrepalska-Steplovska és mtsai., 2008b).

3.5.2 A II. alcsoport

A II. (W-western) alcsoport létezését Mink és mtsai. (1967, 1969) közölték elsőként. Az alcsoport típus izolátumát a PSV-W-t Washington államban babról gyűjtötték és az előzőekben már említett két tesztnövény segítségével tünettanilag egyértelműen elkülönítették a PSV-E izolátumtól. A PSV-W teljes nukleinsav sorrendje megtalálható a GenBank-adatbankban. A radioaktív hibridizációs és a nukleotid sorrend azonossági vizsgálatok egyértelműen a PSV-W eltérő alcsoportba tartozását erősítették meg (Hu és mtsai., 1997). A gazdanövénykör vizsgálatok során megállapították, hogy a földimogyoró, uborka, paradicsom, lencse, zöldborsó, bab (70 fajta vizsgálata) és rézvirág esetében a kórokozó szisztemikus mozaikos tüneteket okozott a nem fertőzött leveleken, míg *C. amaranticolor*, *C. quinoa* és guarbab esetében lokális léziókat figyeltek meg a fertőzött leveleken. A PSV-W nem fertőzte többek között a napraforgót (*Helianthus annuus* L.) és a sárgadinnyét (*Cucumis melo* L.).

Echandi és Hebert (1971) egy nem nevesített PSV izolátumot, a II. alcsoportba soroltak. Tünettani vizsgálatok során az előbb leírt tünetekkel egybevágó eredményeket állapítottak meg. Ezek mellett *N. glutinosa* vizsgálata során a vírus szisztemizálódását, mozaik és satnyulás tünetek kialakulását figyelték meg.

Szintén a II. alcsoport izolátumának tekinthető a Spanyolországból lucernáról származó PSV-B (Diaz-Ruiz és mtsai., 1979). Bár a tesztnövényeken mutatott tünetek alapján az első alcsoportba tartozó PSV-T izolátummal lényegében megegyező tüneteket tapasztaltak, az immunodiffúziós szerológiai vizsgálatok során a PSV-W és a PSV-B között azonos erősségű jelet kaptak, illetve a Northern hibridizációs kísérletek alapján is közeli rokonságot tapasztaltak a PSV-W-vel (Hu és mtsai., 1997).

3.5.3 A III. alcsoport

A PSV legkésőbb azonosított alcsoportja. Kínában a földimogyoró táblákon már a 70-es években jelentős károkat okozott a PSV. Az ide tartozó típus-izolátumot földimogyoróról gyűjtötték 1985-ben és az általa okozott enyhe tünetek miatt PSV-Mi (mild) izolátumnak, az alcsoportot pedig III. (Kínai) alcsoportnak nevezték el (Xu és mtsai., 1998). A PSV-Mi teljes nukleotid sorrendje 2005-ben került meghatározásra. A többi adatbanki szekvenciával összehasonlítva a PSV-Mi 73,6–79,6% nt azonosságot mutatott, mely érték alapján külön alcsoportba tartozó izolátumnak tekinthető (Yan és mtsai., 2005). A PSV-Mi nukleotid és aminosav szekvenciájában fellelhetőek voltak a korábban említett (3.3 fejezet) szekvencia motívumok. Az izolátum jellemzésével egy időben 5 további kínai izolátum jellemzése is megtörtént (PSV-F, PSV-R, PSV-13, PSV-S, PSV-P). A szerológiai vizsgálatok az izolátumok egyezőségét erősítették meg, míg a gazdanövénykör tekintetében mindössze a tünetek erőssége alapján lehetett különbséget tenni. Eszerint a PSV-F, PSV-R, PSV-Mi egy kevésbé virulens, míg a PSV-13, PSV-S, PSV-P egy virulensebb alcsoportba sorolható. A PSV-Mi nem fertőzi a rézvirágot és a borsót, nekrotikus lokális léziókat idéz elő a fehér akác inokulált levelein, azonban szisztemizálódás nem figyelhető meg. A PSV-Mi és a további 5 izolátum *C. quinoa* és *C. amaranticolor* esetében is lokális léziók kialakulását követően, a növényben szisztemizálódott és a csúcsi leveleken mozaik tüneteket okozott (Xu és mtsai., 1998).

A virulensebb csoportba sorolt PSV-S CP génje nt sorrendjének meghatározása is megtörtént. A szekvencia 99%-os azonosságot mutatott a PSV-Mi-vel és jelentősen 79,5–83,6%-ban eltért a másik két alcsoport izolátumától.

Ju és mtsai. (2006) egy kínai, fehér akácról származó izolátumot jellemeztek. A PSV-Rp néven közölt izolátum 945 nt hosszú RNS3 régióját, mely magába foglalta a CP gént is, meghatározták és 92,4% azonosságot állapítottak meg a PSV-Mi-vel, míg a többi alcsoporttal 67,3–73,4% volt ez az érték. A CP kilenc aminosavban tért el a PSV-Mi-től. Tünettani szempontból az azonosságok mellett, legfontosabb különbség az volt, hogy a PSV-Rp a *C. quinoa* és a *C. amaranticolor* fajokat csak lokálisan fertőzte.

A nemzetközi szakirodalomban megtalálható PSV izolátumok tünettani vizsgálatainak eredményeit az 1. táblázatban összegeztük.

1. táblázat. Összesítő táblázat az irodalomban megtalálható PSV izolátumok tünettani vizsgálatának eredményeiből. ^a – Xu és mtsai., 1998; ^b – Ju és mtsai., 2009; ^c – Waterworth és mtsai., 1973; ^d – Obrepalska-Steplovskaja és mtsai., 2008b; ^e – Mink és mtsai., 1969; ^f – Diaz-Ruiz és mtsai., 1979; ^g – Echanti és Hebert, 1971- nem névlegesített izolátum; ^h – magyar izolátum, Beczner és Devergne, 1979)

Növények	Izolátumok												
	I. alcsoport				II. alcsoport				III. alcsoport				HUN
	PSV-E ^a	PSV-ER ^b	PSV-T ^c	PSV-P ^d	PSV-W ^e	PSV-B ^f	PSV ^g	PSV-M ^a	PSV-S ^a	PSV-R ^p ^b	PSV-T ^p ^h		
<i>Arachis hypogaea</i> L.	LLc/Mo, Stu	—	—	—/—	0/Mo, Ma	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo	0/Mo, Stu	—	—	—	
<i>Chenopodium amaranticolor</i> C. and R.	LLc/—	LL/—	LLc/—	LLc(n)/—	LLc/—	—	LL/—	LLc/Mo	LLc/Mo	LL/—	LLc/—	LLc/—	
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	LLc/—	LL/—	0/Mo, Ma	—	LLc/—	—	LL/—	LLc/Mo	LLc/Mo	LL/—	LLc(n)/—	0/Mo	
<i>Clatonia sativus</i> L.	—	—	—	—	0/Mo, Ma	—	LL/Mo	—	—	—	—	—	
<i>Lens culinaris</i> Medik.	—	—	—	—	0/Mo, Ma	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	—	—	—	—	0/Mo, Ma	—	0/Mo	—	—	—	—	0/Mo, Ma	
<i>Méistrago sativa</i> L.	—	—	—	—	0/Mo, Ma	—	—	—	—	—	—	0/—	
<i>Nicotiana benfuminata</i> Domin.	—	0/Mo	—	—	—	—	—	—	—	0/Mo	—	—	
<i>N. clevelandii</i> Gray.	—	0/Mo	—	—	—	—	—	—	—	0/Mo	—	—	
<i>N. debney</i> Domin.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	LLc/Mo, Ma	
<i>N. glutinosa</i> L.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	LLc/—	
<i>N. tabacum</i> L. cv. Xanthi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	LLc(n)/Mo	
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	LLc/Mo	—	—	LLc/Mo	0/Mo, Ma	—	LL/Mo, Stu	LLc/Mo	LLc/Mo	—	LLc/Mo, Ma, LR, Stu	—	
<i>Pisum sativum</i> L.	LLn/N	—	0/I	0/Mo	0/Mo, Ma	—	0/Mo, Stu	0/—	LLn/N	—	0/Mo	—	
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	0/—	—	—	—	—	—	—	LLn/—	LLc/Mo	—	—	—	
<i>Ficus siveasis</i> Savi et Hassk.	LLc/Mo	0/Mo	—	—	0/Mo, Ma	—	LL/Mo, Stu	LLcSMo	LLc/Mo	0/Mo	LLc(n)/C, CHIS, Mo	—	
<i>Zinnia elegans</i> Jacq.	0/Mo	—	0/I	—	0/Mo, Ma	—	—	0/—	0/—	—	0/Mo	—	

* Az egyes növényeken megjelenő lokális / szisztémikus tünet, 0 = tünet nem látható, - = szisztémikusan nem fertőzi, — = nincs adat, *ChIS* = klorotikus foltok, I = látens, LL = lokális lézió, *LL_c* = klorotikus lokális lézió, *LL_n* = nekrotikus lokális lézió, *LR* = levélsodródás, *Ma* = deformáltság, *Mo* = tarkulás, mozaik, *N* = nektrózis, *Stu* = satnyulás, törpülés, *SMo* = enyhe mozaik, *VC* = érkivilágosodás

3.6 Genetikai változékonyság forrásai a cucumovírusok evolúciójában

3.6.1 Mutáció

A genetikai variabilitás elsődleges forrásaként a mutációt említhetjük. Sokáig úgy tartották, hogy az RNS vírusok változékonyságát a mutációk gyakorisága határozza meg. Vírusok esetében a mutációk kialakulásában elsődleges szerepe a RdRp-nek van. Domingo és Holland (1997) az RdRp-ről megállapították, hogy működése közben számos hibát ejt, így a vírus templátként szolgáló molekulájáról készített RNS szekvenciák sokasága az eredeti molekulától általában kis mértékben ugyan, de eltér. Ezek a néhány nukleotidra korlátozódó változások nagymértékben befolyásolhatják - többek között - a vírus növényen belüli terjedését, gazdanövénykörét, tüneteinek jellegét, illetve a vírusátvitelt is.

Schneider és Roossinck (2000, 2001) a vírusgenomban bekövetkező mutációk gyakoriságát vizsgálva megállapították, hogy CMV esetében, *N. benthamiana* tesztnövényeken történt passzálást követően, a mutációk gyakorisága nagyobb volt, mint a paralel vizsgálatokban a TMV és a *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) esetében. Amikor a passzálásos kísérleteket más növényfajokon is elvégezték, kiderült, hogy a vírusok genetikai sokszínűsége elsősorban nem magában a vírusban rejlik, hanem nagyobb szerepe van a gazdanövény – vírus kölcsönhatásának.

3.6.2 Rekombináció

A genetikai variabilitás másik jelentős forrásának a rekombináció tekinthető, amely magába foglalja osztott genommal rendelkező vírusok esetében az egyes genomi RNS-ek átrendeződését (reasszortáció), más néven pszeudorekombináns vírusok kialakulását is. A növényvirológiában, számos esetben jelezték a rekombináció vírusevolúcióra gyakorolt meghatározó jelentőségét. A gazdasági szempontból kiemelkedő jelentőségű szilva himlő vírus (*Plum pox virus*, PPV) esetében meghatározó a rekombináns populációk jelenléte (Glasa és mtsai., 2004; Szathmáry és mtsai., 2009). Újabb kutatási eredmények szerint a *Bromoviridae* családban is kiemelkedő szerepet játszott a rekombináció a *Bromovirus*, *Cucumovirus* és *Ilarvirus* nemzetségek kialakulásában, a részleges reasszortáció leginkább az előbbi kettőnél és

többek között a lucerna mozaik vírusnál (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) volt meghatározó (Codoñer és Elena, 2008).

Kim és Kao (2001) szerint az RdRp az átíró mechanizmus során a templátról átválthat egy másik templát molekulára, rekombináns RNS-t hozva létre. RNS vírusok esetében egyre több adat áll rendelkezésre arról, hogy az átváltás, és így a rekombináció sem véletlenszerűen, hanem rekombinációs „forró” pontokhoz kötötten jön létre. Ezek a pontok elsősorban az erős másodlagos szerkezetet tartalmazó régiókban találhatóak, ahol az RdRp haladása nehezebb. Éppen ezért a rekombináció általában nem véletlenszerűen a teljes genomon, hanem ezen régiók környezetébe csoportosulva megy végbe. Suzuki és mtsai. (2003) szerint az erősen másodlagos szerkezettel bíró úgynevezett „stem-loop” motívumok környezetében figyelhetők meg a rekombinációs események. Ezek a motívumok általában a nem-kódoló régiókban találhatóak.

Fertőzőképes vírus RNS-ek előállításával könnyebbé vált a vírusok rekombinációs sajátosságainak vizsgálata. Masuta és mtsai. (1998) a TAV RNS1 és RNS2-vel, valamint a CMV RNS2 és RNS3 molekulákkal inokuláltak *N. benthamiana* növényeket. A fertőzés után a növényekből a TAV RNS1 és a CMV RNS2 és RNS3 molekulákat nyerték vissza, sőt egy olyan CMV RNS2 molekulát is izoláltak, amelynek 3' NCR-je 320 nt-on keresztül TAV eredetűnek bizonyult. Aaziz és Tepfer (1999) *N. tabacum* L. teszt növényeket inokuláltak TAV és CMV izolátumokkal. A keletkezett víruspopulációban rekombináns RNS3 molekulákat azonosítottak. A 3' NCR, mint rekombinációs forró pont általánosan ismert mind a *Bromovirus*, mind a *Cucumovirus* nemzetségekben. Transzgénikus és nem transzgénikus dohány növényeket CMV RNS-ekkel inokulálva, majd passzálva, Canto és Palukaitis (2001), illetve Canto és mtsai. (2001) megfigyelték, hogy az RNS1 molekula 3' NCR-je 5–11%-ban RNS2 és RNS3 molekularészleteket tartalmazott. A három genomi RNS 3' NCR-ben történt rekombinációját tapasztalták négy CMV izolátum inkaliliomon (*Alstromeria sp.*) történt fenntartása során is. Az RNS2 és RNS3 3' NCR régiójában saját vagy más genomi RNS eredetű inszerciókat figyeltek meg. Ezek az inszerciók érdekes módon dohány fertőzése során többnyire elvesztek (Chen és mtsai., 2002). Ez a jelenség szintén a gazdanövény – vírus kölcsönhatás fontosságát hangsúlyozza az RNS átrendeződési folyamatokban.

Az eddigi kutatási eredmények azt igazolják, hogy a rekombinációs események cucumovírusoknál legnagyobb valószínűséggel az RNS3 szintjén jönnek létre. Bonnet és mtsai. (2005) 159 Spanyolországból származó CMV izolátumot vizsgáltak ribonuclease protection assay (RPA) módszerrel. A kutatások során többek között megállapították, hogy a CMV IA és

IB alcsoportjába tartozó izolátumok között gyakran történik rekombináció, sőt a gyűjtött mintákból az is kiderült, hogy a rekombináns izolátumok ugyanolyan gyakorisággal fordulnak elő Spanyolország középső részein, mint a CMV IA izolátumai. Dohány növényeken de Wispelaere és mtsai. (2005) vizsgálták a CMV és TAV koinokulációja után a rekombinációk kialakulásának esélyét. Meglepő módon a vizsgált RNS3 molekulák 9,6 %-ban rekombinánsnak bizonyultak. A mintákban 28 rekombináns régiót azonosítottak, amelyek többsége az 5', a 3' végen és az IR-ben, valamint az MP-t kódoló régióban volt megfigyelhető.

A rekombináns izolátumok életképességi és fertőzési sajátosságait vizsgálták Pierrugues és mtsai. (2007). Amikor a CMV IA alcsoport izolátumával és a CMV II. alcsoport izolátumával egyszerre fertőztek különböző növényeket, a visszanyert RNS3 klónok között 17 rekombináns molekulát találtak. Ezek közül 6 esetben a vírus életképtelenség bizonyult, elsősorban a sejtről-sejtre terjedés és / vagy a vírusreplikáció gátlása miatt. Két rekombináns az IA izolátumnál súlyosabb tüneteket mutatott dohány és paprika növényeken, míg 9 rekombináns az eredeti vírussal közel azonos tüneteket okozott. Három esetben nagyobb vírusakkumulációt figyeltek meg a fertőzött növényekben, mint a kiindulási IA izolátum esetében, azonban az IA izolátummal történt kevert fertőzés utáni passzálást követően a rekombinánsok versenyképtelenebbnek bizonyultak az eredeti izolátumhoz viszonyítva, majd a populációból elfogytak. Az eredményekből látszik, hogy bár nagy számú, eltérő génállományú vírus keletkezik egy fertőző populációban, tartós fennmaradásuk csak ritkán következik be.

Cucumovírusoknál a kódoló régiókban jóval ritkábban tapasztalhatunk rekombinációt, mint a nem-kódoló régiókban. A génekben bekövetkező változások általában negatív, hátrányos tulajdonságokat idéznek elő, amelyek nagyban csökkentik az esélyét a rekombináns vírusok domináns szerephez jutásához. Ezzel összhangban, általában nagyobb eséllyel maradnak életképesek azok a vírusizolátumok, amelyeknél a teljes, vagy közel teljes ORF cserélődik ki (Bonnet és mtsai., 2005; Escriu és mtsai., 2007).

A genom megváltozása szempontjából nagy jelentőséggel bír a genomi szegmensek átrendeződésével létrejövő reasszortáns vírusok kialakulása is. Mivel a cucumovírusok osztott genommal rendelkeznek egy-egy pszeudorekombináció a teljes genom több, mint 1/3 részének kicserélődését is jelentheti. Annak az esélye, hogy a reasszortáns vírus megmarad-e egy adott populációban, akárcsak a rekombináció esetében, a vírus életképességétől függ. Fraile és mtsai. (1997) kutatásai során 217 CMV izolátumból mindössze 4% bizonyult reasszortánsnak és 7% rekombinánsnak. Megítélésük szerint mind a rekombináció, mind a reasszortáció csekély szerepet játszik a cucumovírusok evolúciójában.

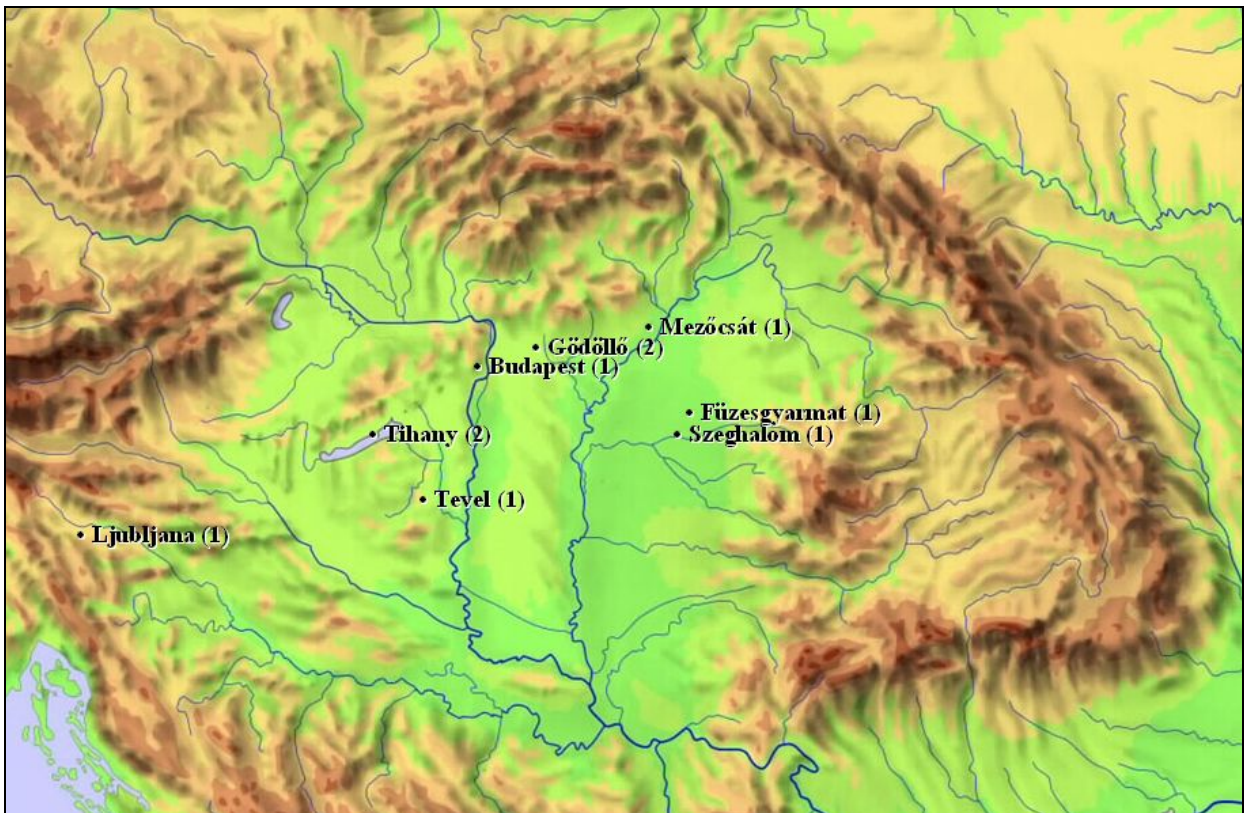
A PSV esetében szintén ismertek reasszortáns izolátumok (PSV-I, PSV-BV-15), melyekről korábban már beszámoltunk (3.4 fejezet) (Hu és Ghabrial, 1998; Hajimorad és mtsai., 1999). Ezek mellett a PSV és a CMV közötti természetes reasszortáns változat kialakulásáról is beszámoltak, mely eredmény alátámasztja a genomi részek átrendeződésének szerepét a vírusevolúcióban (White és mtsai., 1995).

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Vírusok és patológiai jellemzésük

4.1.1 A dolgozatban vizsgált vírusok és izolálásuk

A PSV-Rp törzset 2002-ben Salamon Pál izolálta Gödöllőn fehér akácról és bocsátotta kutatócsoportunk rendelkezésére. A kutatásaink során vizsgált további kilenc PSV izolátumot a Pannon ökorégió területén (4. ábra), enyhe mozaik és levél deformáció tüneteket mutató fehér akác növényekről gyűjtöttük 2007 és 2008 években (2. táblázat). Az izolátumokat *C. quinoa* növényen történt háromszoros egy léziós passzálást követően *N. benthamiana* teszt növényeken szaporítottuk fel a további vizsgálatok elvégzéséhez.



4.ábra. A vizsgált izolátumok gyűjtési helyei. A zárójelben a gyűjtött izolátumok száma látható (térkép: ©Zentai László, 1996)

2. táblázat. A vizsgált PSV izolátumok gyűjtési adatai

Izolátum neve	Gyűjtési hely	Gyűjtési év	Gyűjtötte
PSV-B	Budapest, Magyarország	2008	Kiss László
PSV-Cs	Mezőcsát, Magyarország	2008	Dr. Kondrák Mihály
PSV-F	Füzesgyarmat, Magyarország	2008	Kiss László
PSV-Ljb	Ljubljana, Szlovénia	2008	Kiss László
PSV-Rp	Gödöllő, Magyarország	2002	Dr. Salamon Pál
PSV-Rp2	Gödöllő, Magyarország	2007	Kiss László
PSV-Sz	Szeghalom, Magyarország	2008	Kiss László
PSV-T1	Tihany, Magyarország	2008	Dr. Salánki Katalin
PSV-T2	Tihany, Magyarország	2008	Dr. Salánki Katalin
PSV-Tev	Tevel, Magyarország	2008	Antal Ferenc

4.1.2 Gazdanövénykör vizsgálatok

A vizsgált PSV izolátumokkal a természetes és kísérletes gazdanövények közül 5 növénycsalád 16 fajtát fertőztük (3. táblázat). A fertőzéseket Gödöllőn, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont növényházában, levéltetvektől mentes körülmények között végeztük 14 óra megvilágítás 23 °C-on és 10 óra sötétség 18 °C-on környezeti paraméterek mellett. Minden esetben 3–8 növényt fertőztünk 2–8 leveles állapotban. A leveleket celllittel sértettük meg, majd a *N. clevelandii*-n felszaporított vírust 20mM-os K-Na foszfát pufferben, pH: 8.0, eldörzsölve 1:5 (v/w) inokuláltuk a növények 3–3 levelét. A növényeket tünettanilag a fertőzést követő 1 hónapon keresztül vizsgáltuk vizuális módszerrel. Tünetmentes növények esetében a kórokozó lokális és / vagy szisztemikus terjedését Northern blot analízissel (Sambrook és mtsai., 1989) ellenőriztük az előzőekben meghatározott időpontokban. A Northern blot analízishez White és Kaper (1989) eljárásának alkalmazásával kivont teljes nukleinsav tartalmú mintákat, formaldehid és formamid tartalmú pufferben denaturáltuk (65 °C-on 5 percig), majd szintén formaldehid tartalmú 1%-os agaróz gélben elektroforézissel frakcionáltuk. A nukleinsavakat Hybond-N membránra (Amersham-Pharmacia) vittük át, majd UV fényel (70 mJ/m²) a membránhoz kötöttük.

3. táblázat. A gazdanövénykör vizsgálatokhoz használt növények

Család Faj Fajta	Család Faj Fajta	Család Faj Fajta
<i>Chenopodiaceae</i> <i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste and Reyn.	<i>Leguminosae</i> <i>Arachis hypogea</i> L. <i>Lens culinaris</i> Medik. cv. Éva <i>Medicago sativa</i> L. <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Babilon <i>Pisum sativum</i> L. cv. Rajnai törpe <i>Robinia pseudoacacia</i> L. <i>Vigna sinensis</i> Savi et Hassk. cv. Black eye	<i>Solanaceae</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cv. Kecskeméti jubileum <i>Nicotiana benthamiana</i> Domin. <i>N. clevelandii</i> Gray. <i>N. debney</i> Gray. <i>N. glutinosa</i> L. <i>N. tabacum</i> L. cv. Xanthi
<i>Compositae</i> <i>Zinnia elegans</i> Jacq.		
<i>Cucurbitaceae</i> <i>Cucumis sativus</i> L. cv. Delicates		

A nukleotid sorrend meghatározásához a *N. benthamiana* tesztnövényeken felszaporított izolátumokból Lot és mtsai. (1972) módszerével a PSV-Rp esetében vírust tisztítottunk, a további izolátumokkal fertőzött növényekből pedig teljes nukleinsav kivonást végeztünk az előbbieken említett White és Kaper (1989) eljárásának alkalmazásával. Az RNS kivonására fenol-kloroformos extrakciót és etanolos kicsapást használtunk.

4.2 Molekuláris és bioinformatikai vizsgálatok

4.2.1 A PSV-Rp törzs cDNS klónjának előállítása

A tisztított víruspartikulumokból fenol/SDS kicsapással megkaptuk a cucumovírusokra jellemző három genomi és egy szubgenomi vírus RNS-t, melyet gélelektroforézissel detektáltunk. A cDNS készítés során az RNS-ek 3' végeinek meghatározásához az RNS-eket poliadeniláltuk a Poly (A) polimeráz enzim (Bethesda Research Laboratories) alkalmazásával. Az első szál cDNS-t ennek megfelelően az ellentétes (komplementer) nukleotid sorrendű oligo dT primerrel indítottuk (4. táblázat). A második szál cDNS készítése Gubler és Hoffman (1983) által leírt ribonukleáz H és DNS polimeráz I jelenlétében zajlott cDNA Synthesis Kit (Amersham) alkalmazásával. A kapott cDNS szakaszokat *EcoRV* restrikciós endonukleázzal hasított pBluescriptII SK+ fágemid klónozó vektorba ligáltuk (Stratagene). A cDNS klónok felszaporítását *Escherichia coli* DH5- α és a metiláció deficiens GM2163 törzseken végeztük. A

vírus eredetű cDNS klónok kiválasztása kolónia hibridizáció alkalmazásával történt tisztított vírus RNS jelölésével (Sambrook és mtsai., 1989). A kiválasztott cDNS klónok nukleotid sorrendjének vírus eredetét automatizált fluoreszcens stopnukleotida módszerrel ellenőriztük (Applied Biosystems Gene Analyzer 3100). A három genomiális RNS 5' végének meghatározása a részlegesen ismert szekvenciákra alapozva az 5' Rapid Amplification of cDNA Ends kit (Invitrogen) segítségével a gyártó iránymutatásai alapján történt. A meghatározáshoz az általunk tervezett RNS1-(486–513 nt), RNS2-(257–276nt), RNS3-(269–288nt) vírus-specifikus antiszensz primereket használtuk (4. táblázat).

4. táblázat. A PSV-Rp izolátum meghatározásához használt primerek neve, nukleotid sorrendje és orientációja (az aláhúzott nukleotidok a restrikciós helyeket, a dőlttel jelöltek a T7 RNS polimeráz promóterének szekvenciáját jelölik)

Primer neve	Szekvencia 5'–3'	Orientáció
oligo dT	CGGGGATCCTCGAGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTT	antiszensz
PSV123- <i>Pst</i> I	<u>GGCTGCAG</u> TGGTCTCCTATGGAGCCCTCATAG	antiszensz
PSV12-T7- <i>Bam</i> HI	<u>GGGGATCC</u> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTTTATCAAGAGCGTACGGTTC	szensz
PSV3-T7- <i>Bam</i> HI	<u>GGGGATCC</u> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTTTAAACCAACCAAAACCTGAG	szensz
RNS1-(486-513nt)	TTCAGTATGGCGCATTGTGCCGGACG	antiszensz
RNS2-(257-276nt)	GTGGAAGGCTCTTCCCGCGC	antiszensz
RNS3-(269-288nt)	CGGCGCGCATCCAGTGGTGTC	antiszensz

A valós 5' és 3' végek ismeretében a cucumovírusok 3' végére jellemző erősen konzervált motívumnak köszönhetően mindhárom vírus RNS esetében a teljes szál cDNS készítését a PSV123–3'–*Pst*I oligonukleotid segítségével indítottuk el (4. táblázat). Közvetlenül a vírus 3' vége után az oligonukleotidba egy *Pst*I restrikciós hasítóhelyet építettünk be, amely később elősegítette a cDNS molekula klónozó vektorba ligálását. A szintézist M-MuLV reverz transzkriptázzal (Fermentas) végeztük 42°C-on, 60 percen keresztül.

A keletkezett kettősszálú molekulákat PCR segítségével sokszoroztuk meg (Mullis és Faloona, 1987). Az RNS1 és RNS2 molekulák 5' végének homológiája lehetővé tette, hogy a PSV12-T7-*Bam*HI indítószekvencia alkalmazásával (4. táblázat), közös reakcióban szaporítsuk fel őket. A túlnyúló *Bam*HI hasítóhely az előzőekhez hasonlóan a molekula klónozását tette

könnyebbé, míg a szintén beépített T7 bakteriofág RNS polimeráz promótere a cDNS klónok esetleges későbbi *in vitro* RNS-sé írásához szükséges. Az RNS3 esetében a PSV3-T7-*Bam*HI indítoszekvenciát alkalmaztuk a molekula sokszorosítására, ahol a *Bam*HI hasítóhely és a T7 RNS polimeráz promótere szintén beépítésre került. A PCR során az említett 5' és egységesen a cDNS készítésnél használt 3' primerek segítségével *Taq* DNS polimeráz enzim (Fermentas) jelenlétében felszaporítottuk a cDNS molekulákat. A reakció az RNS1 és RNS2 esetében két fázisban, a következő képpen ment végbe: az első 3 ciklus (30 mp denaturálás 94 °C-on, 30 mp primer kötés (anellálás) 50 °C-on, 3 perc 30 mp lánc hosszabbítás 72 °C-on) után a hátralévő 37 ciklusra az anellálási hőmérsékletet 67 °C-ra emeltük. Az RNS3 szintézise során a reakció egy fázisban (30 mp denaturálás 94 °C-on, 30 mp primer kötés 55 °C-on, 2 perc 30 mp láncépítés 72 °C-on) 30 ciklus alatt történt. A kapott méret specifikus PCR termékeket 1%-os agaróz gélen detektáltuk, majd tisztítottuk [High Pure Purification Kit (Roche Diagnostics)]. A cDNS molekulákat *Bam*HI és *Pst*I restrikciós endonukleázokkal hasítottuk, majd az ugyanezen enzimekkel vágott pBluescriptII SK+ vektorba ligáltuk. Az RNS2 molekuláról készült cDNS-t a benne található *Bam*HI hasítóhely miatt az előbbi eljárás helyett *Eco*RV enzimmel vágott plazmidba, túlnyúló végek nélkül ligáltuk. Az elkészült PSV-Rp RNS1, RNS2, RNS3 klónokat az *Escherichia coli* DH5 α és GM2163 törzseiben tartottuk fenn. A klónok nukleotid sorrendjének meghatározását szubklónok és belső primerek segítségével határoztuk meg automatizált fluoreszcens stopnukleotida módszer alkalmazásával. A kapott részleges nukleotid sorrendek szekvencia adatait a Clone manager 7 (SciEd Central) és az Emboss-Align (Rice és mtsai., 2000) programok segítségével illesztettük össze, majd a GenBank nemzetközi adatbankban helyeztük el.

4.2.2 PSV izolátumok részleges cDNS klónjainak előállítása

A további 9 vizsgált PSV izolátum esetében fertőzött *N. benthamiana* növényekből teljes nukleinsav kivonást (White és Kaper, 1989) és reverz transzkripciót követően PCR technika segítségével felszaporítottuk az RNS3 egy részét, mely tartalmazta a mozgási fehérje gén egy részét, a teljes intergénikus régiót, a köpenyfehérje gént és a 3' nem-kódoló régiót. A vizsgálatokhoz a GenBank-ban megtalálható PSV törzsek és az általunk meghatározott PSV-Rp RNS3 konzervatív régiójára tervezett degenerált uniPSV5' (szensz: 5'-CARAARGCGATTGGTAGTGRG -3') és PSV123-*Pst*I primerpárt használtuk (4. táblázat). A

cDNS készítés az előző alfejezetben ismertetett módon zajlott. A heteroduplex specifikus szakaszok megsokszorozásához PCR technikát alkalmaztunk a következő paraméterek mellett: 30 mp denaturálás 94 °C-on, 30 mp anellálás 60 °C-on, 90 mp lánchosszabbítás 72 °C-on 30 cikluson keresztül. A kapott PCR termékeket 1%-os agaróz gélen detektáltuk, majd tisztítottuk (High Pure Purification Kit, Roche). A DNS mintákat pGEM-T-Easy (Promega) klónozó vektorba ligáltuk, ezzel elkészítve az izolátumok részleges RNS3 molekulájának cDNS klónjait. A cDNS-ek nukleotid sorrendjét automatizált fluoreszcens stopnukleotida módszerrel a plazmid specifikus M13 reverz és M13 forward primerek segítségével határoztuk meg.

4.3 Bioinformatikai vizsgálatok

4.3.1 Nukleotid sorrend összehasonlítás és filogenetikai elemzés

A kapott nukleotid és aminosav sorrendeket az Emboss-Align és a Clustal X (Thomson és mtsai.,1997) programcsomagok segítségével EMBL/NCBI nemzetközi adatbankban elérhető PSV szekvenciákkal hasonlítottuk össze, majd a Clustal X programmal Neighbor-Joining eljárással a TreeWiew 1.6.6. (Page, 1996) felületén az adatokból filogenetikai törzsfát készítettünk. A filogenetikai vizsgálatok során a statisztikai megbízhatóságot a Clustal X program 1000 ismétlést alkalmazó bootstrap analízise biztosította.

4.3.2 Rekombinációs vizsgálatok

A nemzetközi adatbankokban fellelhető PSV szekvenciákra épülő rekombinációs vizsgálatokhoz az általánosan használt és elfogadott TOPALi v2 (Milne és mtsai., 2004) programcsomag PDM (Probabilistic Divergence Measures) analízisét alkalmaztuk (ablak méret =200 nt, ablak elmozdulásának mérete =10 nt) 95%-os szignifikancia szinten.

5 EREDMÉNYEK

5.1 A PSV-Rp cDNS klónjainak molekuláris jellemzése

5.1.1 A PSV-Rp nukleotid sorrendjének meghatározása és elemzése

Munkánk során elkészítettük az PSV-Rp izolátumnak elnevezett, hazai fehér akácról gyűjtött *Peanut stunt virus* 1-es, 2-es és 3-as RNS-einek cDNS klónjait, majd meghatároztuk mindhárom klón teljes elsődleges szerkezetét. A kapott cDNS szekvenciákat a GenBank nemzetközi adatbázisban helyeztük el az AM905353, AM905354, AM905355 azonosító számok alatt. Az RNS1 3325 nt, az RNS2 2942 nt, az RNS3 2208 nt hosszúságúnak bizonyult (3. melléklet), mely adatok megközelítőleg megegyeznek az adatbankban található más PSV szekvenciák hosszával. A nukleotid sorrend megállapítása után azonosítottuk a cucumovírusokra jellemző öt nyílt leolvasási keretet (ORF).

Az RNS1-ről átíródó 1a ORF a 85-ös nt-től a 3078-as nt-ig terjed 998 aminosavat kódolva. A molekula N-terminális részén azonosítható a metiltranszferáz aktivitásra utaló H...DxxR...Y motívum (127., 137–140., 188. aminosavak). A C-terminális részében helikáz motívumok, illetve az 540–555. aminosavak között prolingazdag régió figyelhető meg.

Az RNS2-ről átíródó 2a ORF a 80-as nt-től a 2581-es nt-ig terjed 834 aminosavat kódolva. Az ORF 601–603. aminosavai GDD motívumot kódolnak, amely az RNS függő RNS polimerázok (RdRp) Mg²⁺ kötése szempontjából meghatározó jelentőségű. Az RNS2 szintén meghatároz egy, a 2a-val átfedő 2b ORF-et, amely a 2406–2684. nt között helyezkedik el, és amelyről egy 93 aminosavat kódoló fehérje íródik át. Az N-terminális régióban megtalálható egy leginkább bázikus aminosavaból álló régió (21–45. – RARHRANRKLRLRGHKSPSELRRRKLRLR – bázikus aminosavak aláhúzva), amely sejtmagi lokalizációs jelként értelmezhető.

Az RNS3 egy köztes, 257 nt hosszú IR-rel elválasztva kódolja. a 3a és 3b nyílt leolvasási kereteket. Az IR 1143–1152. nt-ig terjedő szakasza tartalmazza a 5'-GGTTCAATTC-3' konzervált motívumot. Az MP génje a 142-es nt-től a 1011-es nt-ig terjed és 290 aminosavat kódol. A nukleotid sorrendből származtatott aminosav sorrend magába foglalja a 30K szuperfamilára jellemző 33 aa hosszú MSVPQVLCAITRTVMANAEGSIRIYLADLGDDE

konzervált régiót, amely a PSV-Rp esetében 8 aminosavban térhet el a többi PSV izolátumtól (aláhúzott aa-k).

A 3b fehérje (CP) átíródása a szubgenomi RNS4-ről történik. Az RNS3 molekulára vetítve az ORF3b a 1269-es nt-től a 1919-es nt-ig terjed, ami 217 aminosavat kódol. A CP N-terminális része (10–17 aa) argininban gazdag. Mindhárom RNS 3' NCR régiójában megfigyelhető a cucumovírusokra jellemző 40 nt hosszúságú erősen konzervált régió: (5'GTACGGGTTGTCCATCCAGCTAGCGGCTAAAATGGTCAGT3'), illetve az RNS 5' NCR szakaszban a 109–124. nt közötti uracil-guanin gazdag szakasz.

A PSV-Rp teljes nukleotid sorrendjét, valamint az egyes ORF-ek nukleotid és a kódolt aminosav szekvenciáját összehasonlítottuk a nemzetközi adatbankban hozzáférhető néhány cucumovírus izolátum ugyanezen régiói szekvencia adataival (5. táblázat). A táblázatból kiderül, hogy a PSV-Rp RNS-einek teljes nukleotid sorrendje a különböző alcsoportokból származó PSV izolátumokkal összehasonlítva 74,1–84,6% azonosságot mutatott, míg a teljes genomra számítva az azonosság (genomi RNS-ek azonosságainak átlaga – táblázatban nincs feltüntetve): PSV-J esetében (79,5%), PSV-W esetében (83,1%), PSV-Mi esetében (78,2%). Az egyéb cucumovírus izolátumokkal mutatott azonosság ezen a szinten 56,8–68,1% között változott.

A PSV-Rp RNS1 és RNS2 ORF1a, ORF2a, ORF2b és ORF3a tekintetében nukleotid szinten a legnagyobb azonosságot a II-es alcsoportba tartozó PSV-W-vel mutatta, míg az RNS3-at vizsgálva közel azonos mértékű azonosság volt megfigyelhető mindhárom alcsoport terítetében (80,9–83,9%). A CP-t kódoló ORF3b esetében nukleotid szinten a PSV-J 83,3%, a PSV-Mi 83,2%, míg a PSV-W mindössze 78,8% azonosságot mutatott a PSV-Rp-vel. Aminosav szinten a legnagyobb azonosság a III. alcsoportba tartozó PSV-Mi esetében volt megfigyelhető (86,6%). Minden esetben a kapott nt értékek jócskán elmaradtak az egy alcsoportba tartozást jelentő 90%-os határtól. Az eredmények alapján izolátumunk jelentősen eltért a többi PSV izolátumtól és az ismert alcsoportok egyikébe sem volt besorolható. Az alacsony azonossági értékek egy új, IV. alcsoport létrehozását indokolják.

5. táblázat. A PSV-Rp izolátum nukleotid és aminosav sorrendjének összehasonlítása a nemzetközi adatbankban található néhány cucumovírus izolátumával.

A felhasznált izolátumok GenBank-i azonosító számai: PSV-J: D11126, D11127, D00668; PSV-W: U33145, U33146, U31366; PSV-Mi: AY429431, AY429430, AY775057; CMV-Fny: D00356, D00355, D10538; CMV-Trk7: AJ007933, AJ007934, L15336; TAV-KC: AJ320273, AJ320274, AJ237849; GMMV: FM881899, FM881900, FM881901

Vírusok	RNS1			RNS2			RNS3					
	ORF1a		Teljes	ORF2a		Teljes	ORF2b		Teljes	ORF3a		ORF3b
	%nt ^a	%aa ^b		%nt	%aa		%nt	%aa		%nt	%aa	
PSV-J (I)^c	79,6	88,9	75,0	74,4	79,2	67,3	66,0	83,9	86,2	83,8	83,3	82,9
PSV-W (II)	84,6	90,1	82,3	82,5	83,3	75,5	66,7	82,6	87,6	82,1	78,8	71,9
PSV-Mi (III)	79,7	88,7	74,1	73,6	75,5	66,6	67,3	80,9	83,3	84,5	83,2	86,6
CMV-Fny	67,2	72,2	60,1	59,4	54,0	54,8	33,1	60,6	66,5	64,1	56,7	49,1
CMV-Trk	68,1	73,2	61,6	61,6	57,4	57,8	39,3	61,4	68,0	66,6	57,9	50,5
TAV-KC	66,2	68,7	60,6	60,6	55,1	52,1	30,6	66,6	74,2	75,5	68,1	72,1
GMMV	65,7	48,2	56,8	57,0	53,3	50,7	33,1	67,1	74,7	73,3	68,3	72,4

A felhasznált izolátumok GenBank-i azonosító számai: PSV-J: D11126, D11127, D00668; PSV-W: U33145, U33146, U31366; PSV-Mi: AY429431, AY429430, AY775057; CMV-Fny: D00356, D00355, D10538; CMV-Trk7: AJ007933, AJ007934, L15336; TAV-KC: AJ320273, AJ320274, AJ237849; GMMV: FM881899, FM881900, FM881901

^anukleotid

^baminosav

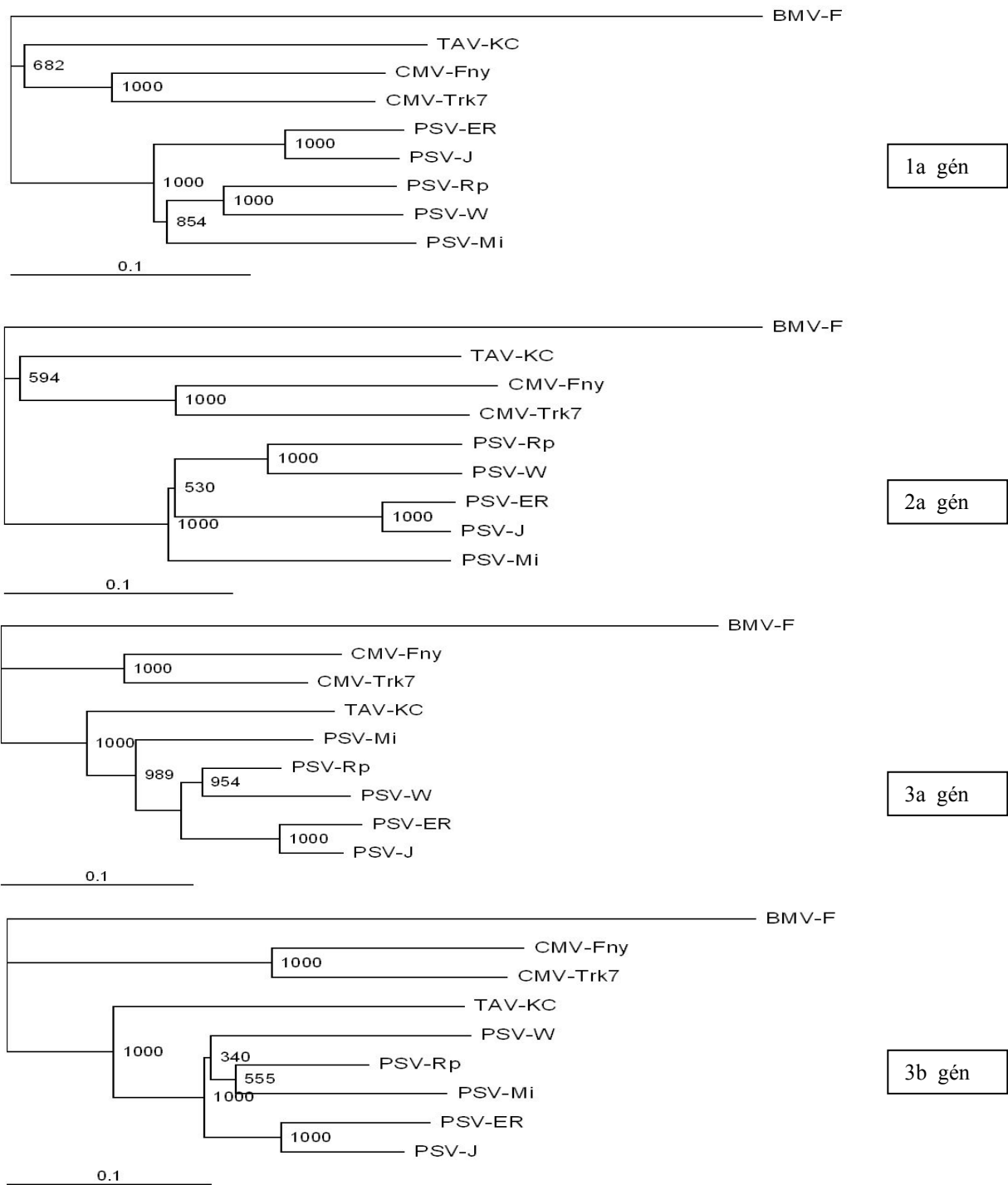
^ca zárójelben az adott PSV izolátumok alcsoportjának számát tüntettük fel

5.1.2 A PSV-Rp filogenetikai és rekombinációs elemzése

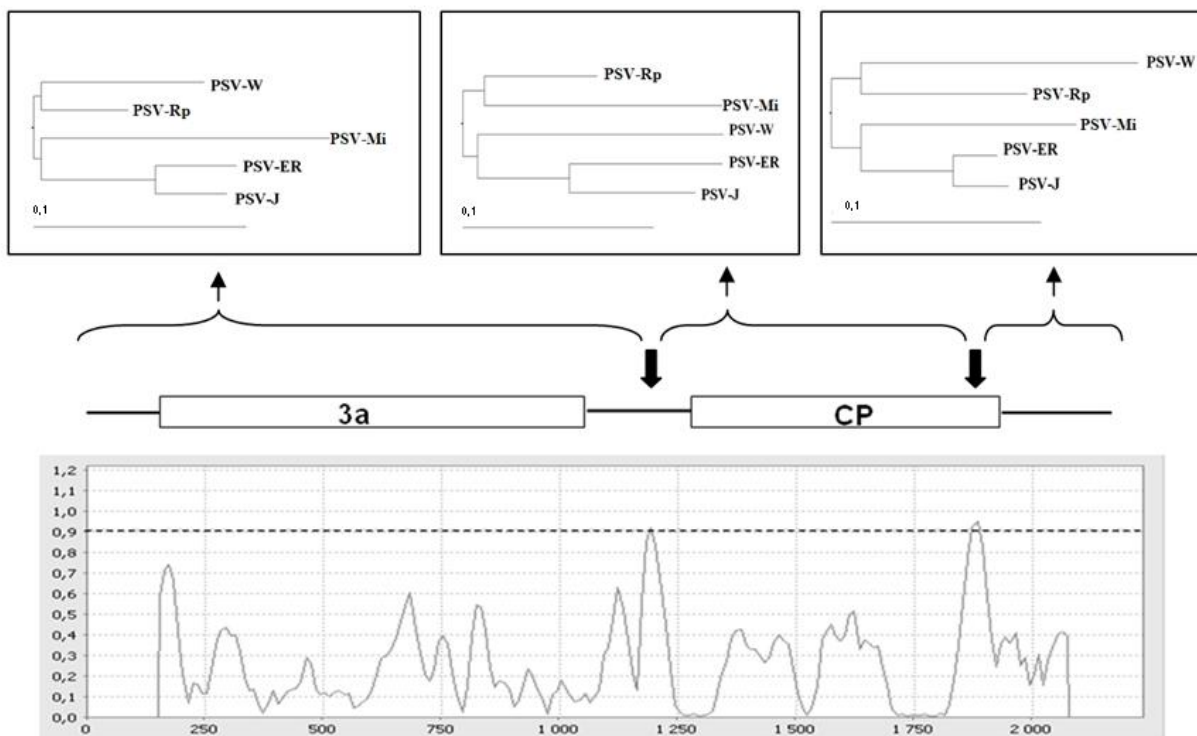
A cucumovírus izolátumok génjeinek nukleotid sorrendjét felhasználva filogenetikai törzsfákat készítettünk (5. ábra). Az 1a, 2a és 3a fehérjéket kódoló gének esetében a PSV-Rp a legközelebbi filogenetikai rokonságot a PSV-W-vel mutatta, azonban alcsoport szinten jelentősen elkülönült attól. A CP-t kódoló 3b gén esetében azonban a legközelebbi rokonsági kapcsolat a PSV-Mi-vel volt megfigyelhető.

Az eltérő filogenetikai eredmények, illetve az RNS-ek esetében megállapított alacsony szekvencia azonossági értékek egyértelműen egy, a PSV evolúciója során az RNS3 szintjén lejátszódott rekombinációs esemény jelenlétére utaltak. .

Ennek tisztázására a GenBank-ban elérhető teljes PSV RNS3 szekvenciákon rekombinációs vizsgálatokat végeztünk. Az elemzés során 2 feltételezett rekombinációs, másnéven forró pontot (hot spot) határoztunk meg 95%-os szignifikancia szinten az 1199. nt és az 1873. nt körüli régióban (az nt értékek a PSV-Rp szekvenciáját alapul véve lettek megadva). Az első forró pont az IR-ben található, 70 nt-dal a ORF3a előtt, míg a másodikat a CP-t kódoló 3b gén stop kodonja előtt 47 nt-dal határoztuk meg. Az RNS3 molekulát 3 részre osztó rekombinációs pontok által meghatározott szakaszokkal ismételt filogenetikai elemzést végeztünk (6. ábra). Az első forró pont előtti, megközelítőleg 1200 nt hosszú régió és a második forró pont utáni 335 nt hosszú régió esetében a PSV-Rp a PSV-W-vel mutatta a legközelebbi rokonságot, míg a két forró pont közötti 674 nt hosszú nt szakasz a PSV-Mi-vel volt a legszorosabb rokonsági viszonyban. A kapott eredmények a középső régió eltérő eredetét bizonyítják, és összhangban vannak a nt sorrend azonosságok eredményeivel. A filogenetikai törzsfák eredményei megerősítik, hogy a PSV evolúciója során az izolátumok között rekombináció történt.



5. ábra. A cucumovírus nemzetség 1a, 2a, 3a és 3b génjeinek nukleotid alapú filogenetikai vizsgálata
 A elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményét mutatják, a BMV-F (GenBank DQ530423, DQ530424, DQ530425) csoporton kívüli kontroll izolátum.



6. ábra. A PSV RNS3 molekulák rekombinációs és filogenetikai elemzése

Az ábra alján a TOPALi v2 programcsomag PDM analízisével meghatározott rekombinációs pontok helyei láthatók (ablakok mérete = 200nt, lépések mérete = 10 nt). A szaggatott vonalak a 95%-os szignifikancia szintet jelölik. Felette a PSV RNS3 molekula sematikus rajza található. A két vastag nyíl a rekombinációs pontok helyét jelöli, a kapcsos zárójelek és a vékony nyilak az adott régiókból készített filogramokra mutatnak.

5.2 A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok molekuláris jellemzése

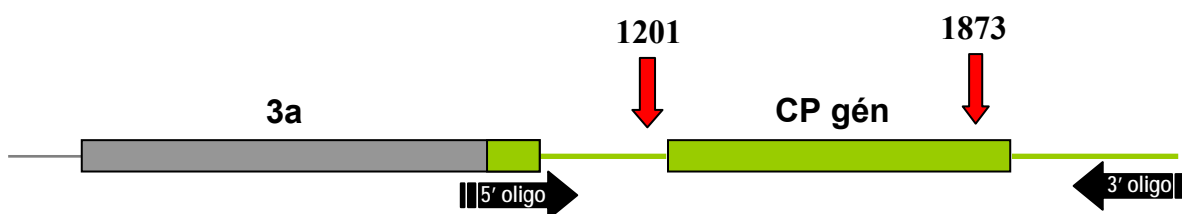
5.2.1 A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok nukleotid sorrendjének meghatározása és elemzése

A PSV-Rp teljes molekuláris elemzését követően további 9 a Pannon ökorégió területéről, fehér akácról származó PSV izolátum jellemzését végeztük el. A molekuláris munkák során a *N. benthamiana* tesztnövényeken felszaporított PSV izolátumok RNS3 molekulájának részleges klónozását és nukleinsav sorrend meghatározását végeztük el. A meghatározott szekvencia adatokat a GenBank nemzetközi adatbázisban helyeztük el a 7. ábrán látható azonosító számok alatt.

Izolátum neve	genomi rész	mérete (nt)	GenBank azonosító szám
PSV-B	részleges RNS3	1342	FM992670
PSV-Cs	részleges RNS3	1542	FM992665
PSV-F	részleges RNS3	1346	FM992666
PSV-Ljb	részleges RNS3	1346	FM992667
PSV-Rp2	részleges RNS3	1347	AM980675
PSV-Sz	részleges RNS3	1345	FM992671
PSV-T1	részleges RNS3	1345	FM992669
PSV-T2	részleges RNS3	1351	FM992668
PSV-Tev	részleges RNS3	1349	FM992672

7. ábra. A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok meghatározott régióinak hossza és GenBank-i azonosító számai

A 9 meghatározott részleges MP-t kódoló gén, teljes IR, CP-t kódoló gén és 3' NCR régió nukleotid sorrendjének mérete 1342–1351 nt között változott, kivéve az 1542 nt hosszúságú PSV-Cs izolátumot, amelynek a 3' NCR régiójában egy 196 nt hosszú szakasz megkettőződését (duplikációját) figyeltünk meg. A vizsgált RNS3 szakaszok teljes egészében magukba foglalták azt a régiót is, mely a PSV-Rp esetében a két rekombinációs pontot és a CP gént tartalmazta (8. ábra).



8. ábra. A PSV RNS3 molekula

Zöld színnel a Pannon ökorégióból származó izolátumok esetében meghatározott nukleinsav szakasz látható. A piros nyilak és a felettük lévő számok a PSV-Rp esetében meghatározott rekombinációs pontokat jelölik.

A vizsgált 9 izolátum CP régióinak nukleotid és a kódolt aminosav sorrendjét összehasonlítottuk egymással és néhány a nemzetközi adatbázisban hozzáférhető cucumovírus

izolátum ugyanezen régiója nukleotid és aminosav sorrendjével (6. táblázat). A Pannon ökorégióból származó izolátumok nukleotid sorrendje 96,3–98,0%, míg aminosav sorrendje 98,1–100% azonosságot mutatott a PSV-Rp izolátumával. Egyéb cucumovírus izolátumok esetében a következő azonosságokat állapítottuk meg: PSV-J (nt: 82,1–83,2%, aa: 81,1–82,9%), PSV-W (nt: 77,6–79,3%, aa: 70,5–72,8%), PSV-Mi (nt: 82,6–84,3%, aa: 85,3–86,6%), CMV-Trk7 (nt: 55,3–58,6%, aa: 49,3–50,2%), CMV-Fny (nt: 53,4–54,8%, aa: 47,5–49,3%), TAV-KC (nt: 65,2–66,7%, aa: 70,2–72,4%), GMMV (nt: 63,5–65,4%, aa: 70,5–72,4%). A fehér akácról származó izolátumok közötti nagyfokú azonossági értékek egyértelműen azt mutatják, hogy ezek az izolátumok egy alcsoportba tartoznak, míg az egyéb PSV izolátumokkal összehasonlítva kizárható a közeli rokonság.

6. táblázat. A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok CP gén nukleotid szekvenciájának (a) és a CP aminosav sorrendjének (b) összehasonlítása más *Cucumovirus*-izolátumokéval

a

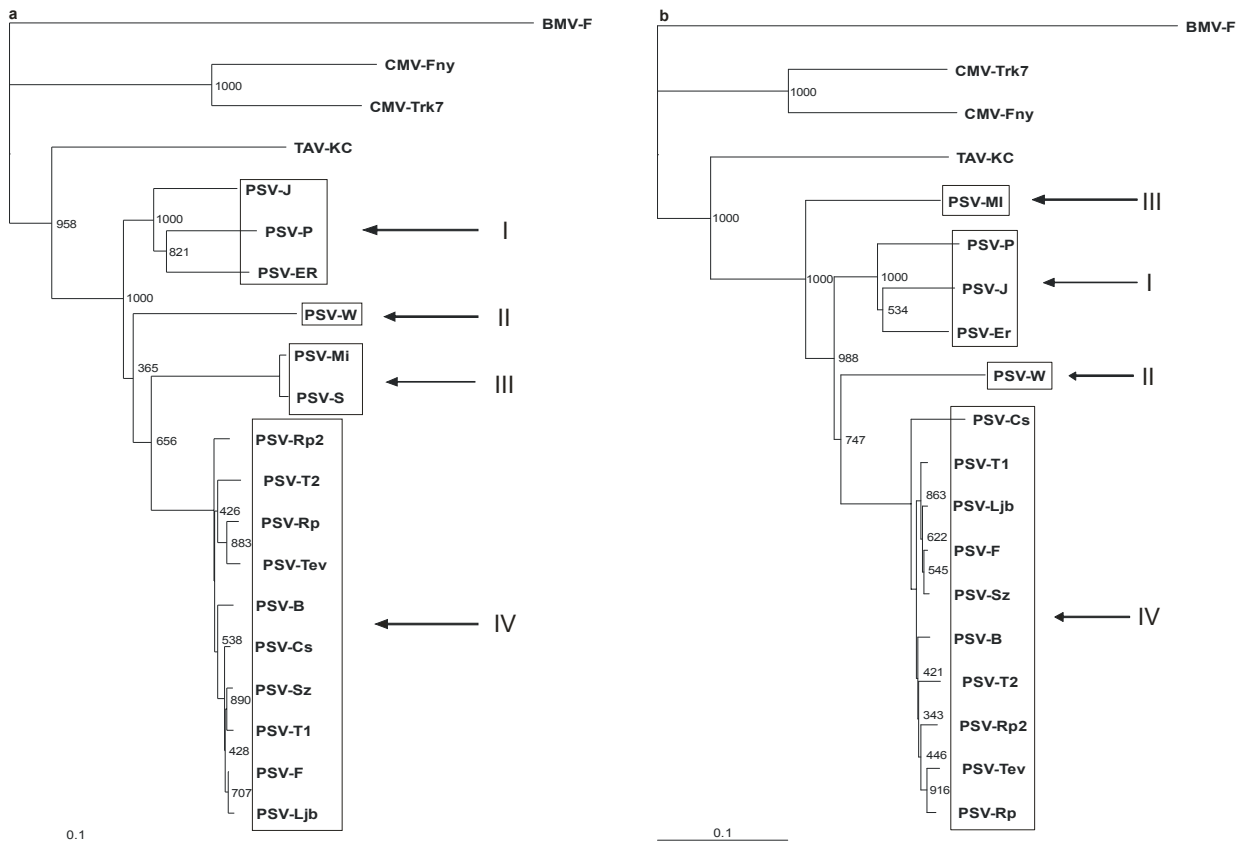
Izolátumok	PSV-B	PSV-Cs	PSV-F	PSV-Ljb	PSV-Rp2	PSV-Sz	PSV-T1	PSV-T2	PSV-Tev
	CP nt%								
PSV-Rp	97,1	96,8	97,1	96,9	97,1	96,8	96,8	96,3	98,0
PSV-J (I)	82,9	82,6	83,1	83,2	83,0	82,6	82,6	82,1	82,9
PSV-W (II)	78,6	78,3	78,9	79,0	79,3	78,3	78,3	77,6	78,7
PSV-Mi (III)	83,7	83,6	84,2	84,3	83,9	83,6	83,6	83,5	82,6
CMV-Fny	53,4	53,4	54,4	54,4	54,8	53,9	54,2	54,6	54,3
CMV-Trk	55,3	56,2	56,2	56,3	57,3	56,2	55,4	56,3	58,6
TAV-KC	66,3	66,1	66,7	66,2	66,6	66,4	65,9	65,8	65,2
GMMV	65,1	64,5	64,3	64,8	65,3	64,3	63,5	64,4	65,4

b

Izolátumok	PSV-B	PSV-Cs	PSV-F	PSV-Ljb	PSV-Rp2	PSV-Sz	PSV-T1	PSV-T2	PSV-Tev
	CP aa%								
PSV-Rp	98,6	98,1	98,6	98,1	100,0	98,6	98,1	98,6	99,5
PSV-J (I)	81,6	81,1	82,0	81,6	82,9	81,6	81,1	82,0	82,9
PSV-W (II)	70,5	71,0	71,9	71,4	71,9	71,4	71,4	70,5	72,8
PSV-Mi (III)	85,7	85,7	86,6	86,2	86,6	86,2	85,7	85,3	86,2
CMV-Fny	48,4	47,5	48,9	48,9	48,9	48,4	48,0	48,4	49,3
CMV-Trk	50,2	49,3	49,8	49,8	50,2	49,8	49,6	49,3	49,8
TAV-KC	70,6	70,6	71,1	70,6	72,0	70,6	70,2	71,1	72,0
GMMV	71,0	71,0	71,4	71,0	72,4	71,0	70,5	71,0	71,9

5.2.2 A Pannon ökorégióból származó PSV-izolátumok filogenetikai vizsgálata

A filogenetikai vizsgálatokat számos cucumovírust alapul véve, a PSV-Rp esetében megállapított 2 rekombinációs pont közötti szakaszra (9a. ábra) és a rekombinációs pontokat magában foglaló teljes klónozott régióra (9b. ábra) is elvégeztük. Az első esetben izolátumaink a III. alcsoporttal mutatták a legközelebbi rokonságot, míg a teljes régió elemzésekor a II. alcsoporttal bizonyult a legszorosabbnak ez a kapcsolat. Mindkét eredmény megegyezett a PSV-Rp esetében kapott korábbi eredményekkel, azaz a II. és III. alcsoport között rekombináció történt. A törzsfán látható, hogy a pannon régióból származó izolátumok egyértelműen elkülönülnek a többi vizsgált mintától és egy új, jól körülhatárolt alcsoportot alkotnak.



9 ábra. A cucumovírus RNS3 molekulák különböző régiójának filogenetikai vizsgálata

a: A rekombinációs pontok közötti nt szakaszt, b: a részleges MP-t kódoló, a teljes IR, a teljes CP-t kódoló és a 3' NCR régiókat magába foglaló nt szakaszt vizsgálva. Az utóbbi a rekombináns régiót is magában foglalja. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményét mutatják, a BMV-F csoporton kívüli kontroll izolátum. A négyzetek és a római számok a PSV csoportok vizuális elkülönítését és azonosítását segítik.

5.3 A Pannon ökorégióból származó PSV-izolátumok gazdanövénykör vizsgálata és tünettani jellemzése

A molekuláris és filogenetikai vizsgálatokat követően mind a 10 PSV izolátum fertőzési és tünettani sajátosságait megvizsgáltuk 5 növény család 16 faján (7. táblázat). Tünetmentes növények esetében a vírus jelenlétét az inokulált és a csúcsi levelekben is Northern blot-tal ellenőriztük, így döntve el, hogy az adott növény látenszen fertőzött-e a kórokozóval, vagy sem.

A vizsgált PSV izolátumok a földimogyorón a fertőzés hatására a növények satnyulását és a csúcsi levelek mozaikosodását okozták (10. ábra). A *C. amaranticolor* esetében mindegyik PSV izolátum az inokulált leveleken klorotikus lokális léziókat idézett elő, a növényben a vírus szisztemizálódott, majd a csúcsi leveleken mozaikosodást és levéldeformációt figyelhattunk meg (11. ábra). A fertőzést követően a lencsén és a borsón egyik esetben sem tapasztaltunk tüneteket, a Northern hibridizáció azonban kimutatta a kórokozó jelenlétét, a vírus minden esetben jelen volt látenszen a növények csúcsi leveleiben. A mesterséges fertőzések során a magonc fehér akác növényeken enyhe mozaikot tapasztaltunk, amely néhány izolátum esetében (PSV-Rp, PSV-Rp2, PSV-T2) kiegészült gyűrű alakú foltokkal. Az egy hónapos vizsgálati időszak végén, a növényeken a tünetek teljes maszkírozódását, eltűnését figyeltük meg.

A vizsgált *Nicotiana*-fajok közül izolátumaink hatékonyan fertőzték a *N. benthamiana* (12. ábra) és *N. clevelandii* teszt növényekben, ezzel a levelek mozaikosodását és a növények törpülését idézve elő. Tünettani szempontból csak a *N. glutinosa* teszt növényeken tapasztaltunk jelentősebb eltérést. A kórokozók minden esetben tünetmentesen jelen voltak az inokulált levelekben, amelyet a fertőzést követő első héten vett mintákból készített Northern analízis is alátámasztott (14. ábra). A kórokozók szisztemikus mozgása azonban csak a PSV-Rp2, a PSV-F, a PSV-Sz és a PSV-Ljb esetében volt szabad szemmel megfigyelhető. Ekkor a csúcsi leveleken mozaikot és gyűrűsfoltosságot tapasztaltunk (13. ábra), míg a többi esetben a radioaktív jelölés sem mutatta a kórokozó szisztemikus terjedését (14. ábra).

A *Cucumis sativus* cv. Delicates, *Lycopersicon esculentum* cv. Kecskeméti jubileum, a *N. debney*, a *N. tabacum* cv. Xanthi növényeknek sem az inokulált, sem a szisztemikusan fertőzött leveléből nem volt kimutatható egyik izolátum sem.



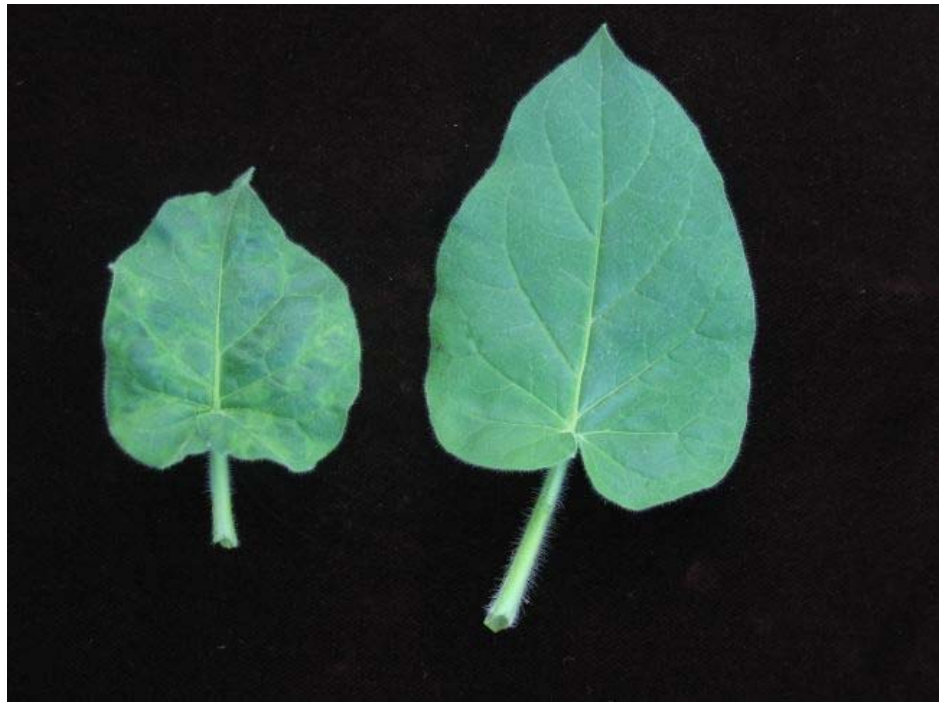
10 ábra. PSV-Rp-vel fertőzött (bal oldalt) és egészséges (jobb oldalt) földimogyoró növény (fotó: Kiss L.)



11. ábra. PSV-Tev okozta tünet *C. amaranticolor* inokulált és csúcsi levelén (fotó: Kiss L.)



12. ábra. PSV-Rp okozta szisztemikus tünet *N. benthamiana* növényen (fotó: Kiss L.)

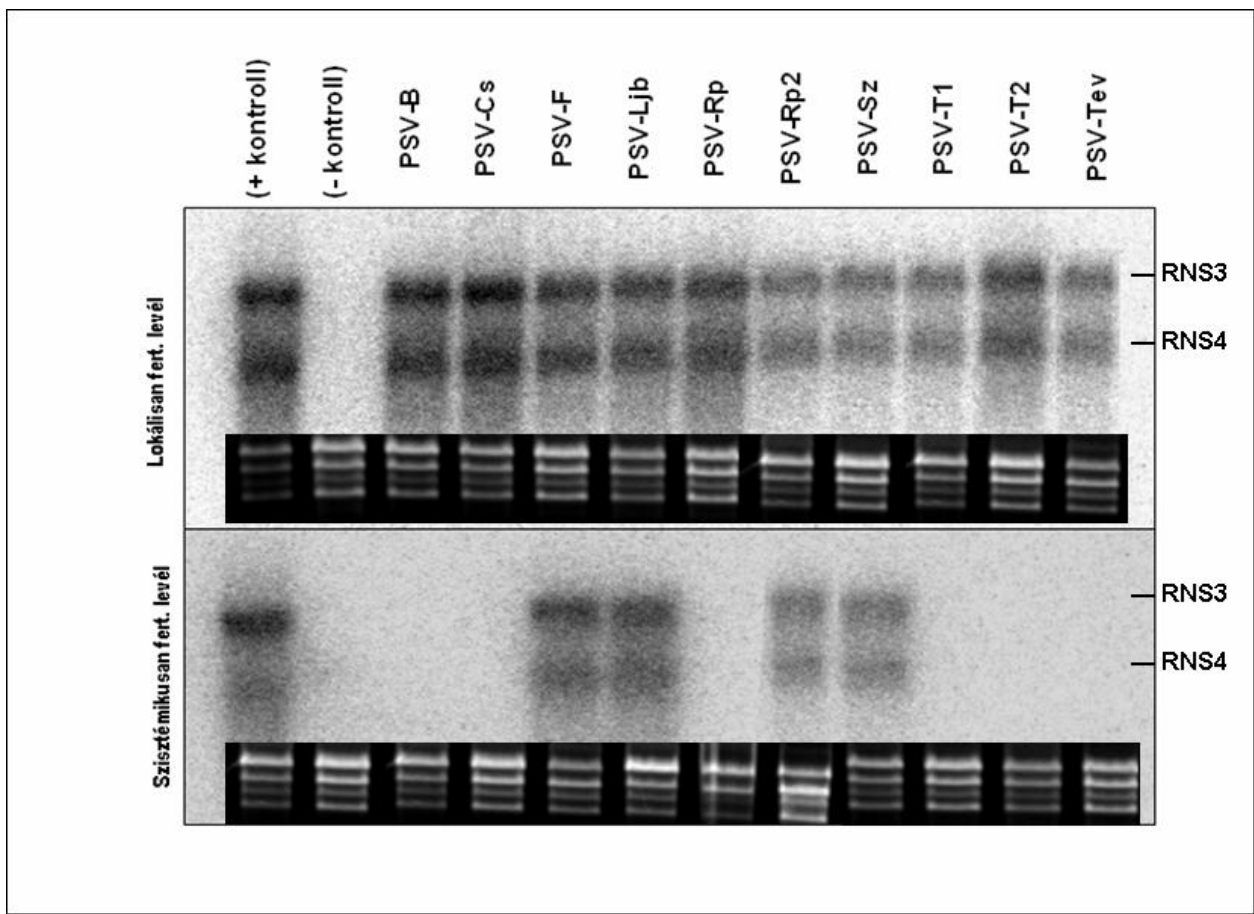


13. ábra. PSV-Rp2 által fertőzött *N. glutinosa* (bal oldalt), és vele azonos korú, egészséges növény (jobb oldalt) homológ levélszintjéről szedett levél (fotó: Kiss L.)

7. táblázat. A vizsgált PSV izolátumok gazdanövényköre és tünettani jellemzése

Növények	Izolátumok										
	PSV-B	PSV-Cs	PSV-F	PSV-Ljb	PSV-Rp	PSV-Rp2	PSV-Sz	PSV-TI	PSV-T2	PSV-Tev	
<i>Arachis hypogaea</i> L.	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu, LR	0/Mo, Stu	
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste and Reyn.	LLe/Mo, Ma	LLe/Mo, Ma	LLe/Mo, Ma	LLe/Mo, Ma	LLe/Mo, Ma	LLe/Mo, Ma	LLe/Mo, Ma	LLe/Mo, Ma	LLe/Mo, Ma	LLe/Mo, Ma	
<i>Cucumis sativus</i> L. cv. Delicates	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	
<i>Lens culinaris</i> Medik. cv. Éva	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cv. Keszkenyéti jub.	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	
<i>Medicago sativa</i> L.	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin.	0/Mo, Stu	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo	0/Mo, Stu	
<i>N. clevelandii</i> Gray.	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	0/Mo, Stu	
<i>N. debney</i> Domin	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	
<i>N. glutinosa</i> L.	0,+/0,-	0,+/0,-	0,+/Mo, RS	0,+/Mo, RS	0,+/0,-	0,+/Mo, RS	0,+/Mo, RS	0,+/0,-	0,+/0,-	0,+/0,-	
<i>N. tabacum</i> L. cv. Xanthi	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	0/0, -	
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Babylon	0/Mo, Ma	0/Mo, Ma	0/Mo, Ma	0/Mo, Ma	0/Mo, Ma	0/Mo, Ma	0/Mo, Ma	0/Mo, Ma	0/Mo, Ma	0/Mo, Ma	
<i>Pisum sativum</i> L. cv. Rajnai törpe	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	0/0, +	
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	0/Mo	LLe/Mo	0/Mo	0/Mo	LLe/RS, Mo	LLe/RS, Mo	LLe/Mo	LLe/Mo	LLe/RS, Mo	0/Mo	
<i>Vigna sinensis</i> Savi et Hassk. cv. Black eye	LLe/Mo	LLe/Mo	LLe/Mo	LLe/Mo	LLe/Mo	LLe/Mo	LLe/Mo	LLe/Mo, Ma	LLe/Mo	LLe/Mo	
<i>Zinnia elegans</i> Jacq.	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	0/Mo	

* Az egyes növényeken megjelenő lokális / szisztemikus tünet, 0 = tünet nem látható, LL_c = klorotikus lokális lézió, LR = levél sodródás, Ma = deformáltság, Mo = tarkulás, mozaik, Stu = satnyulás, törpülés, RS = gyűrűsfoltosság, + / - = Northern analízis eredménye, a kórokozó jelen volt (+) / nem volt jelen (-) a vizsgált növényi részben.



14 ábra. PSV izolátumokkal fertőzött *N. glutinosa* növények vizsgálata Northern blot analízissel. Mintavétel a fertőzés után 1 héttel (lokálisan fertőzött levél) és 3 héttel (szisztémikusan fertőzött levél). Fekete alapon a vizsgált növényekből kivont, etidium-bromiddal festett össznukleinsav kontroll látható. Pozitív kontroll: PSV-Rp-vel fertőzött *N. benthamiana*, negatív kontroll: nem fertőzött *N. glutinosa*.

5.4 Új tudományos eredmények

1. Munkánk során elkészítettük a magyarországi, fehér akácról származó PSV-Rp izolátum mindhárom genomi RNS-ének cDNS klónját.
2. Meghatároztuk a kórokozó genomi RNS-einek teljes elsődleges szerkezetét, és elhelyeztük azokat a nemzetközi adatbázisban.
3. A PSV-Rp izolátum szekvenciája az első ismert teljes PSV szekvencia Európából és fehér akác gazdanövényről egyaránt.
4. Meghatároztuk további 9, a Pannon ökorégió területéről származó fehér akácról gyűjtött PSV izolátum RNS3 molekulájának részleges nukleotid sorrendjét, valamint a származtatott CP aminosav szekvenciáját. Az összes gyűjtött PSV izolátum nukleotid sorrend alapján nagyfokú azonosságot mutatott egymással és jelentősen eltért a többi ismert alcsoport izolátumaitól. Ezek alapján egy új IV. alcsoport létrehozását indítványozzuk.
5. Elvégeztük a IV. alcsoport izolátumainak széleskörű gazdanövénykör és tünetani jellemzését, melynek során a gazdanövénykör szűkülését és látens fertőzések előfordulását tapasztaltuk.
6. A teljes nukleotid sorrend, valamint filogenetikai és rekombinációs vizsgálatok alapján megállapítottunk, hogy az általunk vizsgált PSV izolátumok evolúciója során egy 2 forró ponthoz kötött rekombináció történt. A rekombinációs pontok az IR-ben és a CP-t kódoló régióban történtek és nagy valószínűséggel a II. és a III. alcsoport izolátumai között mentek végbe. A PSV-Rp vizsgálata során tapasztalt rekombináció az első, pontosan jellemzett rekombinációs esemény természetes ökoszisztémából származó cucumovírusok esetén.

6 EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

6.1 A PSV-Rp izolátum molekuláris jellemzése

A *Cucumovirus* nemzetségbe tartozó vírusfajok közül genetikai szinten a PSV-t tekinthetjük a legváltozatosabb kórokozónak. A PSV-izolátumok taxonómiai kapcsolatait vizsgálva számos homályos pont vár még megismerésre, azonban a vírusok genomjának egyre egyszerűbb meghatározása révén, a válaszokra is egyre kevesebbet kell várnunk. A PSV-nek eddig három alcsoportját különítették el. Az alcsoportok közül az 1990-es évek közepéig a PSV I. és a PSV II. volt ismert, melyeknek leírása az USA-ban történt (Mink és mtsai., 1969; Mink, 1972; Naidu és mtsai., 1995; Hu és mtsai., 1997, 1998). A két alcsoport megléte azonban nem bizonyult elégnek az évről-évre felfedezett izolátumok besorolásához. Az 1980-as években, a szerológiai vizsgálatok a PSV izolátumok nagyfokú taxonómiai komplexitását mutatták. Xu és mtsai. (1986) négy szerotípus létezését állapították meg az USA-ban, míg Richter és mtsai. (1987), európai izolátumok esetében hat szerológiai csoportba osztották izolátumaikat, ezek mellett, a fehér akácról származó izolátumot külön vírusként tartották számon (Schmelzer, 1971; Richter és mtsai., 1979). A PSV III. alcsoportjának nukleinsav alapú azonosítására 1998-ban került sor Kínában (Xu és mtsai., 1998; Yan és mtsai., 2005). A jellemzett típus-izolátum földimogyorón enyhe tünetek indukálásával tünt ki a PSV izolátumok közül.

Hazánkban kevés adat áll rendelkezésre a PSV kutatása terén. Egy vörös heréről gyűjtött PSV-Tp izolátum részletes szerológiai és gazdanövénykör vizsgálata során bebizonyosodott, hogy egyik alcsoportba sem sorolható be, hanem egy külön alcsoport izolátumának tekinthető (Beczner és Devergne, 1979), azonban ez az izolátum további vizsgálatokhoz sajnos ma már nem érhető el.

Az eddigi eredmények tükrében az általunk izolált PSV-Rp nukleotid sorrend vizsgálatait követően az alábbi megállapításokat tettük:

A teljes nukleotid sorrend meghatározását követően megállapítottuk, hogy a három genomi RNS hosszúsága megegyezett a cucumovírusoknál általánosan ismert genom méretekkel. Nukleinsav sorrendjében fellelhető volt mind az öt ORF, melyek elhelyezkedésüket tekintve is megegyeznek a cucumovírusoknál megszokottakkal. Az 1a fehérje származtatott aminosav sorrendje N-terminális részén fellelhető a metiltranszferáz doménre jellemző H...DxxR...Y motívum, amelynek a genomi és szubgenomi RNS-ek CAP struktúrájának kialakításában van

jelentős szerepe. Szintén megtalálható a prolingazdag régió, amely az 1a fehérje metiltranszferáz és helikáz doménjét választja el. (O'Reilly és mtsai, 1998). A 2a fehérje kódolt aminosav sorrendjének vizsgálata során a 601–603. aa pozícióban megfigyeltük a GDD motívumot, amely régió az RdRp-k Mg^{2+} kötése szempontjából meghatározó jelentőségű (Argos, 1988) és bizonyíték arra, hogy a 2a fehérje a vírus polimeráza. A sgRNS4A-ról átíródó, és a 2a fehérjével részben átfedő 2b fehérje a PSV legheterogénebb fehérjéje. A PSV-Rp esetében a többi PSV izolátumhoz viszonyítva 66,0–67,3% azonosság volt megfigyelhető, míg egyéb cucumovírusokhoz hasonlítva ez az érték nem érte el a 40%-ot. A nagyfokú változékonyság ellenére a PSV-Rp izolátum esetében is fellelhető volt a Lucy és mtsai. (2000) által jellemzett, bázikus aminosavakban gazdag, sejtmagi lokalizációs jelként funkcionáló régió. A 2b N-terminális régiójában található motívum 25 aminosavból áll, amelyből 17 rendelkezik bázikus tulajdonsággal. Boccard és Baulcombe (1993) igazolta, hogy az RNS akkumulációban jelentős szerepet játszik az RNS3 IR-ben fellelhető rövid ICR-szerű (5'-GGTTCAATTC-3') motívum, amely a PSV-Rp RNS3 molekuláján az 1143–1152. nt közötti régióban található meg. Szintén megfigyelhető a mozgási fehérje aminosav sorrendjében a „30K” mozgási fehérje szupercsaládra jellemző 33 aa hosszúságú erősen konzervált régió (Mushegian és Koonin, 1993). Ez a régió a PSV-Rp esetében 8 aa pozícióban térhet el a többi izolátumtól. Ez az érték jóval nagyobb a CMV izolátumok esetében tapasztalt 1 aa eltéréstől, amely a PSV nagyfokú genetikai változékonyságát támasztja alá. A köpeny fehérje vizsgálata során egy arginin gazdag régió fedezhető fel a fehérje N-terminális részén, amely jelenléte nélkül nem alakul ki a víruspartikulum, és ezáltal a kórokozó hosszú távú mozgása is gátolt (Schmitz és Rao, 1998). Ugyancsak megfigyelhető mindhárom RNS 3' NCR-ben az a 40 nt hosszú konzervált régió, amely a RNS3 5' NCR-ben fellelhető uracil-guanin gazdag szakasszal együtt a vírusreplikációban meghatározó szerepet játszik (McGarvey és mtsai., 1995; Boccard és Baulcombe, 1993).

A PSV-Rp RNS-einek teljes nukleotid sorrendje a különböző alcsoportokból származó PSV izolátumokkal 74,1–84,6% azonosságot mutatott. Ezek alapján és az ICTV cucumovírusokra megadott kritériumai alapján (Roosinck és mtsai., 2006) a PSV-Rp egyértelműen a *Peanut stunt virus* fajhoz tartozó izolátum. A fajon belüli hovatartozást tekintve Hajimorad és mtsai. (1999) szerint, egy alcsoportba azok az izolátumok tartoznak, amelyeknek nukleotid sorrend azonossága 90%-nál nagyobb, míg fajon belül az alcsoportok között ez az érték 70–80% közötti. A PSV-Rp egyértelműen távol esik mindhárom PSV alcsoporttól, hiszen nukleotid szinten egyedül a II. alcsoportba tartozó PSV-W-nél volt megfigyelhető mindhárom genomi RNS esetében 80 %-nál valamivel magasabb azonossági érték, mely értékek azonban

messze elmaradnak az egy alcsoportba tartozást meghatározó 90%-os azonossági szinttől. Ezek alapján indokolt egy új IV. alcsoport létrehozása, melyben a fehér akácról származó PSV-Rp az alcsoportra jellemző típus-izolátumnak tekinthető.

6.2 Rekombináció szerepe a PSV evolúciójában

A PSV-Rp nukleotid sorrendjében az egyéb izolátumokhoz viszonyítva jelentős eltérést figyeltünk meg a vírus CP génjének vizsgálata során. Az előzőekben már említettük, hogy amíg a PSV-Rp RNS1 és RNS2 molekulája a II. alcsoport PSV-W izolátumával mutatta a legnagyobb fokú azonosságot, addig az RNS3 vizsgálata során közel azonos értékeket figyelhettünk meg mindhárom alcsoporttal. Ezzel szemben a CP gén nukleotid sorrendjét vizsgálva az I. és a III. alcsoport izolátumai nagyobb azonosságot mutattak a PSV-Rp-vel, mint a PSV-W. Ezek alapján feltételeztük, hogy a PSV evolúciója során a CP gént magában foglaló rekombinációs esemény történt. A TOPALi v2 (Milne és mtsai., 2004) programcsomag segítségével két rekombinációs pontot azonosítottunk, amely a PSV-Rp CP génjének legnagyobb részét közre fogta. A rekombinációs régióban a III. alcsoport PSV-Mi izolátumával mutatta a legközelebbi rokonságot. A nukleotid sorrend azonossági, filogenetikai és rekombináció analitikai vizsgálatok során kapott eredmények egyaránt a PSV evolúciója során végbement rekombinációt bizonyítják.

A *Cucumovirus* nemzetségben meglehetősen gyakori a rekombinációk előfordulásának aránya (Codoñer és Elena, 2008). Az esetek többségében ezek a rekombinációk az RNS3-ban alakulnak ki, mely adat megegyezik saját kutatási eredményeinkkel. Növényházi körülmények között kevert fertőzés hatására CMV és TAV izolátumok, illetve CMV izolátumok között is rekombinációk kialakulását figyelték meg. A rekombinációk az RNS3 szintjén az NCR, IR régiókban, valamint a CP-t és az MP-t kódoló génben egyaránt kialakultak, azonban a rekombináns izolátumok általában kevésbé voltak életképesek, mint a szülői izolátumok, ezért rövid időn belül kiszelektálódtak (de Wispelaere és mtsai., 2005; Pierrugues és mtsai., 2007). Szabadföldön gyűjtött izolátumok vizsgálatai szintén a rekombináns izolátumok gyengébb életképességét és az izolátumok kontraszelekcióját bizonyították (Bonnet és mtsai., 2005; Escriu és mtsai., 2007). A PSV-Rp esetében történt rekombináció fennmaradása feltehetőleg annak köszönhető, hogy közel az egész CP gén kicserélődött, ugyanis ebben az esetben nagyobb a rekombináns kórokozó túlélési esélye (Bonnet és mtsai., 2005; Escriu és mtsai., 2007). Az eredmények tükrében megállapíthatjuk, hogy a PSV-Rp egy, az eddigi izolátumoktól elkülönülő IV. alcsoport izolátuma, amely egyben bizonyíték is arra, hogy egy rekombinációs esemény

meghatározó szerepet játszott a PSV evolúciójában, habár azt nem tudjuk, hogy milyen evolúciós előnyt biztosított, amely a rekombináns vírus fennmaradását és elterjedését segítette elő.

6.3 A Pannon ökorégióból származó PSV-izolátumok molekuláris jellemzése

A PSV-Rp molekuláris jellemzése után, számos kérdés merült fel vajon egy unikális izolátumról van-e szó, vagy hasonló genetikai állományú izolátumok találhatóak a Kárpát-medencében. Korábban Bonnet és mtsai. (2005) CMV esetében megállapították, hogy a rekombináns izolátumok ugyanolyan gyakorisággal fordulnak elő Spanyolország középső részein, mint a CMV IA izolátumai.

A hazai adatokat tekintve Beczner és Devergne (1979) által közölt, Putnok mellett, vörös heréről gyűjtött izolátum esetében bebizonyosodott, hogy a kórokozó egyik alcsoportba sem sorolható. Az akkori molekuláris technológia még nem tette lehetővé a nukleotid sorrend meghatározását, az izolátum elveszett, így jellemzése már nem történhet meg. A szerológiai és a gazdanövénykör eredményekből tudunk csak következtetni a PSV-Rp és a PSV-Tp közötti rokonsági kapcsolat fokára.

Kutatásaink során további 9 fehér akácról gyűjtött PSV izolátum molekuláris és patológiai jellemzését végeztük el. Előállítottuk a részleges RNS3 cDNS klónokat, melyek tartalmazták a PSV-Rp-nél meghatározott rekombinációs pontokkal közrefogott régiót is. A vizsgált szakaszok mérete közel azonos volt, kivéve a Mezőcsáton gyűjtött PSV-Cs izolátumot, ahol az RNS3 3' NCR régiójában egy 196 nt méretű duplikációt azonosítottunk. Ez a jelenség PSV esetében eddig nem volt ismert, előfordulása a cucumovírusokon belül általában a TAV izolátumok sajátossága (Palukaitis és Garcia-Arenal; 2003). Mivel a vizsgált PSV izolátumok a PSV-Rp izolátummal a Hajimorad és mtsai. (1999) által megadott 90 %-os érték feletti azonosságot mutattak a vizsgált régiókban, ezért az izolátumok csoportbeli hovatartozása egyértelmű. A PSV-Er és PSV-J esetében az RNS3 szintjén ez az érték mindössze 91%, ami elegendő az egy alcsoportba tartozáshoz (Hu és mtsai., 1997). Ezek alapján a Pannon ökorégióból származó 9 izolátum a PSV-Rp-vel közeli rokon, a IV. alcsoportba tartozó izolátumoknak tekinthetők.

A filogenetikai vizsgálatok megerősítették, hogy a többi vizsgált izolátum is magában hordozza a PSV-Rp esetében megfigyelt rekombinációt, tehát az nem csupán a PSV-Rp

izolátumra jellemző egyedi sajátosság, hanem a fehér akácról gyűjtött minták esetében a Pannon ökorégió területén általánosan elterjedt a rekombináns izolátumok előfordulása.

6.4 A Pannon ökorégióból származó PSV-izolátumok gazdanövénykör vizsgálata, az okozott tünetek jellemzése

Az eddigi ismeretek szerint a PSV sokkal változatosabb genetikai háttérrel rendelkezik, mint a CMV, mégis a CMV-nek több mint 1000 gazdanövénye van, míg a PSV mindösszesen 73 fajt fertőz.

Kutatásaink során, a tünettani vizsgálatok is megerősítették, hogy a vizsgált 10 PSV izolátum a jelenleg ismert három PSV alcsoporttól nagymértékben eltér. Az izolátumok közel azonos tüneteket okoznak a vizsgált 16 gazdanövényen. Egyúttal az is megfigyelhető, hogy sok esetben az izolátumok nem, vagy csak nagyon enyhé tüneteket indukálnak a vizsgált növényeken. Az eredményeink alapján feltételezzük, hogy a kórokozó fehér akáchoz történt alkalmazkodása okozza a tünettani változásokat, melyről azonban biztosabb képet csak egyéb gazdanövényekről gyűjtött izolátumok vizsgálata után kaphatnánk.

Eddigi irodalmi adatok szerint a *C. amaranticolor* fajt egyedül a III. alcsoport izolátumai fertőzték szisztemikusan. Egyéb esetben [pl. magyarországi PSV-Tp izolátum (Beczner és Devergne, 1979)] az izolátumok a fertőzött leveleken klorotikus (nekrotikus) lokális léziókat idéztek elő. Jelen kutatásunkban bebizonyosodott, hogy a IV. alcsoport izolátumai szintén szisztemizálódnak a fertőzött *C. amaranticolor* növényekben, e mellett azonban a csúcsi levelek erős deformációja is megfigyelhető (11. ábra). Mivel a filogenetikai és rekombinációs vizsgálatok PSV izolátumaink és a III. alcsoport között a CP-t kódoló régióban mutatták ki a legközelebbi evolúciós rokonságot, ezért feltételezzük, hogy a *C. amaranticolor* esetében a szisztemikus terjedés létrejöttében a CP gén is szerepet játszik. Ezt az eredményt támasztja alá számos korábbi kutatómunka is (Taliensky és Garcia-Arenal, 1995; Salánki és mtsai., 1997). A *C. amaranticolor*-t a megjelenő szisztemizálódás és a levéldeformáció tünetegyüttes alapján, a IV. alcsoport elkülönítésére ajánljuk.

A vizsgált PSV izolátumaink látenszen voltak jelen lencse és zöldborsó növények inokulált és csúcsi leveleiben, amely a levéltetvekkkel történő átvitelben fontos szerepet kaphat, és ezáltal ezek a növényfajok a vírus szinte kiszűrhetetlen rezervoárjaiként működhetnek. A Beczner és Devergne (1979) által jellemzett izolátum borsó esetében rendkívül súlyos szisztemikus tüneteket idézett elő, azaz a tünettani eredményeket összevetve nagy valószínűséggel a PSV-Tp nem közeli

rokona az általunk vizsgált PSV izolátumoknak. Így valószínű, hogy Magyarországon eltérő génállományú PSV izolátumok is megtalálhatók, azonban ezek nem akácon, hanem egyéb gazdanövényeken fordulhatnak elő.

A különböző vizsgált PSV izolátumok által okozott tünetek jelentős mértékben csak a *N. glutinosa* tesztnövény esetében tértek el egymástól. Amíg az izolátumok többségét Northern blot során csak az inokulált levelekből lehetett kimutatni, addig 4 esetben a kórokozó a csúcsi leveleken mozaikot és gyűrű alakú foltokat idézett elő. Du és mtsai. (2008) a már korábban említett CP-nek és a 2a fehérjének a vírus hosszú távú mozgásában, vagy éppen annak gátlásában betöltött szerepét emelik ki. Az eltérő tüneteket produkáló PSV-Rp és a PSV-Rp2 izolátumok CP-inek aa sorrendje 100%-ban azonos, tehát nagy valószínűséggel *N. glutinosa* esetében a 2a fehérje szerepe lehet meghatározó a PSV izolátumok hosszú távú mozgásában. Ennek tisztázására a 2a fehérjék aa sorrendjének elemzése kutatócsoportunkban folyamatban van.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

A *Cucumovirus* nemzetségbe tartozó földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) a pillangósvirágú növények jelentős kórokozója világszerte. Az eddigi kutatási eredmények a PSV izolátumainak nagyfokú heterogenitását bizonyítják. A nemzetközi GenBank adatbankban jelenleg hozzáférhető PSV izolátumokat teljes nukleotid sorrendjük azonossága alapján három alcsoportba sorolták (I, II, III), habár számos, korábban jellemzett izolátum ezekbe a csoportokba nem volt besorolható, így a kórokozó taxonómiája valószínűleg ennél sokkal összetettebb.

Az általunk vizsgált 10 PSV izolátumot a Pannon ökorégió területéről, a vírus fertőzésének jellegzetes tüneteit mutató (mozaik és levéldeformáció) fehér akác növényekről gyűjtöttük. Előállítottuk a PSV-Rp izolátum teljes hosszúságú genomi cDNS klónjait, majd meghatároztuk ezek teljes nukleotid sorrendjét. A nt sorrend jelentősen eltért az eddig ismert három alcsoport izolátumainak szekvenciájától, ami alapján, a nemzetközileg elfogadott kritériumokat figyelembevéve, a PSV-Rp-t egy új IV. alcsoportba soroltuk be, mely csoportban a PSV-Rp típus-izolátumnak tekinthető.

A filogenetikai és a PDM analízissel végzett vizsgálatok során, két rekombinációs pontot azonosítottunk: a CP gén előtti nem kódoló régióban, illetve a CP gén 3' végén. A rekombináció feltehetően a PSV II. és III. alcsoportja között játszódott le. Az általunk azonosított homológ rekombináció az első, pontosan jellemzett rekombinációs esemény természetes ökoszisztémából származó cucumovírusok esetén.

A további 9 Pannon ökorégióból származó PSV izolátum molekuláris vizsgálata során megállapítottuk, hogy izolátumaink nagyfokú azonosságot mutatnak a PSV-Rp-vel, filogenetikailag elhatárolódnak az egyéb alcsoportoktól és ezzel együtt rendelkeznek a PSV-Rp izolátum esetében azonosított rekombináns régióval.

A gazdanövénykör és a tünetek tekintetében a vizsgált 10 PSV izolátum és a már korábban közölt PSV izolátumok között jelentős eltéréseket mutattunk ki. Eredményeink alapján a Magyarországon korábban jellemzett PSV-Tp is taxonómiaiilag távolinak bizonyult az akácról izolált PSV-khez viszonyítva. A *C. amaranticolor*-on tapasztalt tünetek miatt, a növényt az alcsoport tesztnövényes elkülönítésére javasoljuk. A *N. glutinosa* esetében a PSV izolátumok között tapasztalt tünetbeli különbségek a 2a fehérje szerepét feltételezik és további vizsgálatok tárgyát képezik.

A Pannon ökorégióból, fehér akácról gyűjtött PSV izolátumok egy homogén csoport tagjai és egy új, IV. alcsoportba sorolhatók. Az alcsoportra egy homológ, a PSV RNS3 szintjén lejátszódott rekombinációs esemény a jellemző.

Eredményeink tükrében a PSV evolúciójának és taxonómiájának komplexebb megismeréséhez a világ más részeiről származó és egyéb hazai gazdanövényekről gyűjtött izolátumok azonosítása és jellemzése szükséges.

8 SUMMARY

Peanut stunt virus (PSV), belonging to the genus *Cucumovirus*, is an economically important pathogen of legumes worldwide. Recent research results have proved a high degree of heterogeneity of PSV isolates. These isolates are currently available in the international GenBank database have been placed in three subgroups (I, II, III), based upon the identity of their complete nucleotide sequence, although several isolates, having been characterised formerly, could not be included in these groups. Therefore, the taxonomy of the pathogen must be much more complex than the above.

The 10 PSV isolates tested by us were collected from the territory of the Pannon ecoregion, from black locust trees indicating the characteristic symptoms of the viral infection (mosaic and leaf deformation). We produced the full length of cDNA clones of the PSV-Rp genome. Hereupon, the entire nucleotide sequence of these was determined. The nt sequence significantly differed from the sequence of isolates of the three subgroups known so far. According to the ICTV criteria for demarcating species in the genus *cucumovirus*, PSV-Rp was classed into a new subgroup (IV). In this particular group PSV-Rp can be regarded as type isolate.

During phylogenetic tests and PDM analyses, two recombination hot spots were identified: one before the CP gene in the non-coding region, and one at the 3' end of the CP gene. Presumably, the recombination had taken place between subgroups II. and III. of the PSV. The homologous recombination identified by us is the first recombination event that has been accurately characterised in the case of cucumoviruses deriving from natural ecosystems.

In the course of the molecular analysis of PSV isolates originating from the additional 9 Pannonian ecoregions, we found that our isolates show a high degree of identity with PSV-Rp and they are phylogenetically isolated from other subgroups. In addition, they are provided with the recombinated region identified in the case of the PSV-Rp isolate.

In terms of the host range and symptoms, significant differences have been shown between the 10 PSV isolates and the PSV isolates published formerly. Based upon our results, the PSV-Tp, characterised already in Hungary, proved to be taxonomically distant as compared to the PSVs isolated from black locust. Based on the symptoms on *C. amaranticolor*, we suggest the plant to be a separating host of this subgroup. Regarding *N. glutinosa*, symptom related divergences found among PSV isolates postulate the role of protein 2a, and form the subject of further examinations.

PSV isolates collected in the Pannon ecoregion from black locust are members of a homogenous group and can be classified into a new subgroup (IV). The subgroup is characterised with a homologous recombination event, having taken place at the level of PSV RNS3.

In the light of our results, identification and characterisation of isolates deriving from different parts of the world and collected from other domestic host-plants is required for the more complex understanding of the evolution and taxonomy of PSV.

MELLÉKLETEK

8.1 M1. A DOLGOZATHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

IF-es folyóiratcikk:

- **Kiss, L.,** Sebestyén, E., László, E., Salamon, P., Balázs, E. and Salánki, K. (2008): Nucleotide sequence analysis of *Peanut stunt virus* Rp strain suggests the role of homologous recombination in cucumovirus evolution. *Archives of Virology* 153 (7) p. 1373–1377. (IF: 2,02)
- **Kiss, L.,** Balázs, E. and Salánki, K. (2009): Characterisation of black locust isolates of *Peanut stunt virus* (PSV) from Pannon ecoregion show the frequent occurrence of the fourth taxonomic PSV subgroup. *European Journal of Plant Pathology* 125 (4) p. 671–677.. (IF: 2,054)

Nem IF-es folyóiratcikk:

- **Kiss L.,** Salánki K. és Balázs E. (2008): Magyarországi, fehér akácról (*Robinia pseudoacacia* L.) származó földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) izolátumok jellemzése. *Növényvédelem* 44 (11) p. 573–578.

Konferencia kiadványok (absztrakt)

- **Kiss, L.,** Sebestyén, E., László, E., Salamon, P., Balázs, E., Salánki, K. (2007): Nucleotide sequence analysis of *Peanut stunt virus* Rp isolate, prove the role of recombination in *Cucumovirus* evolution, 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology (July 18-20, Budapest), Book of Abstracts, p. 61.
- **Kiss, L.,** Sebestyén, E., László, E., Salamon, P., Balázs, E., Salánki, K. (2008): Molecular characterization of a black locust strain of *Peanut stunt virus*, The 3rd Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (August 20-23, Ljubljana, Slovenia), Book of Abstracts, p. 61.
- **Kiss L.,** Sebestyén E., László E., Salamon P., Balázs E., Salánki K. (2008): In vivo rekombináns földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) izolátum molekuláris jellemzése, 54. Növényvédelmi Tudományos Napok, Növénykórtani szekció, (február 27-28, Budapest), Növényvédelmi Tudományos Napok 2008, p. 29.
- **Kiss L.,** Salánki K., Balázs E. (2009): Pannon ökorégióból származó földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) izolátumok jellemzése, 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, Növénykórtani szekció, (február 23-24, Budapest), Növényvédelmi Tudományos Napok 2009, p. 34.

8.2 M2. IRODALOMJEGYZÉK

1. Aaziz, R. and Tepfer, M. (1999): Recombination between genomic RNAs of cucumoviruses under condition of minimal selection pressure. *Virology*, 263: 282–289.
2. Adams, M.J. and Antoniw, J.F. (2006): DPVweb: a comprehensive database of plant and fungal virus genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 34: Database issue, 382–385.
3. Andrásévits, Z. (2006): A mező és erdőgazdálkodás összehangolt fejlesztésének lehetőségei a dunántúli vállalkozásokban. Doktori disszertáció, Keszthely pp ???
4. Argos, P. (1988): A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Research*, 16: 9909–9916.
5. Bananej, K., Hajimorad, M.R., Roossinck, M.J. and Shahraeen, N. (1998): Identification and characterization of peanut stunt cucumovirus from naturally infected alfalfa in Iran. *Plant Pathology*, 47: 355–361.
6. Beczner, L. and Devergne, J.C. (1979): Characterization of a New Peanut Stunt Virus Strain Isolated from *Trifolium pratense* L. in Hungary. *Acta Phytopatologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 14: 247–267.
7. Beczner, L., Devergne, J.C. and Vassányi, R. (1978): Symptomatological and serological characterization of some Hungarian cucumovirus isolates. *Abstr. of Papers 3. International Congress of Plant Pathology*. München, 16–23 Aug. 1978 p. 45.
8. Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. and Wheeler, D.L. (2008): GenBank. *Nucleic Acids Research*, 36 (Database issue): D25–30.
9. Boccard, F. and Baulcombe, D. (1993): Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology*, 193: 563–578.
10. Bonnet, J., Fraile, A., Sacristan, S., Malpica, J.M. and Garcia-Arenal, F. (2005): Role of recombination in the evolution of natural populations of Cucumber mosaic virus, a tripartite RNA plant virus. *Virology*, 332: 359–368.
11. Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.-W. and Baulcombe, D.C. (1998): Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal*, 17: 6739–6746.
12. Bruenn, J.A. (1991): Relationships among the positive strand and double strand RNA viruses viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acid. Research*, 19: 217–226.

13. Canto, T., Prior, D.A.M., Hellwald, K.-H., Oparka, K.J. and Palukaitis, P. (1997): Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology*, 237: 237–248.
14. Canto, T. and Palukaitis, P. (1998): Transgenically expressed cucumber mosaic virus RNA 1 simultaneously complements replication of cucumber mosaic virus RNAs 2 and 3 and confers resistance to systemic infection. *Virology*, 250:325–336.
15. Canto, T. and Palukaitis, P. (2001): A Cucumber mosaic virus (CMV) RNA 1 transgene mediates suppression of the homologous viral RNA 1 constitutively and prevents CMV entry into the phloem. *Journal of Virology*, 75: 9114–9120.
16. Canto, T., Choi, S.K. and Palukaitis, P. (2001): A subpopulation of RNA 1 of Cucumber mosaic virus contains 3' termini originating from RNAs 2 or 3. *Journal of General Virology*, 82: 941–945.
17. Chen, B. and Francki, R.I.B. (1990): Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal of General Virology*, 71: 939–944.
18. Chen, Y.-K., Goldbach, R. and Prins, M. (2002): Inter- and intramolecular recombinations in the Cucumber mosaic virus genome related to adaptation to *Alstroemeria*. *Journal of Virology*, 76: 4119–4124.
19. Choi, S.K., Palukaitis, P., Min, B., Lee, M.Y., Choi, J.K. and Ryu, K.H. (2005): Cucumber mosaic virus 2a polymerase and 3a movement proteins independently affect both virus movement and the timing of symptom development in zucchini squash. *Journal of General Virology*, 86: 1213–1222.
20. Cillo, F., Roberts, I.M. and Palukaitis, P. (2002): *In situ* localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of cucumber mosaic virus in tobacco and cucumber. *Journal of Virology*, 76: 10654–10664.
21. Codoñer, F.M and Elena, S.F. (2008): The promiscuous evolutionary history of the family Bromoviridae. *Journal of General Virology*, 89: 1739–1747.
22. Crawford K.M. and Zambryski P.C. (1999): Plasmodesmata signaling: many roles, sophisticated statuses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 382–387.
23. Daniels, J. and Campbell, R.N. (1992): Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California. *Plant Disease*, 76: 1245–1250.

24. Davies, C. and Symons, R.H. (1988): Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA3. *Virology*, 165: 216–224.
25. de Wispelaere, M., Gaubert, S., Trouilloud, S., Belin, C. and Tepfer, M. (2005): A map of the diversity of RNA3 recombinants appearing in plants infected with Cucumber mosaic virus and Tomato aspermy virus. *Virology*, 331: 117–127.
26. Devergne, J.C. and Cardin, L. (1973): Contribution l'étude du virus de la mosaïque du concombre CMV. *Annual Phytopathology*, 5: 409–430.
27. Diaz-Ruiz, J.R. and Kaper, J.M. (1983): Nucleotide sequence relationships among thirty peanut stunt virus isolates determined by competition hybridization. *Archives of Virology*, 75: 277–281.
28. Diaz-Ruiz, J.R., Kaper, J.M., Waterworth, H.E. and Devergne, J.C. (1979): Isolation and Characterization of Peanut Stunt Virus from Alfalfa in Spain. *Phytopathology*, 69: 504–509.
29. Ding, B., Li, Q., Nguyen, L., Palukaitis, P. and Lucas, W.J. (1995a): Cucumber mosaic virus 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology*, 207: 345–353.
30. Ding, S.W., Anderson, B.J., Haase, H.R. and Symons, R.H. (1994): New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology*, 198: 593–601.
31. Ding, S.W., Li, W.X. and Symons, R.H. (1995b): A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO Journal*, 14: 5762–5772.
32. Divéki, Z., Salánki, K. and Balázs, E. (2004): The Necrotic Pathotype of the Cucumber mosaic virus (CMV) Ns strain is solely determined by amino acid 461 of the 1a protein. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 17: 837–845.
33. Domingo, E. and Holland, J.J. (1997): RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology*, 51: 151–178.
34. Du, Z., Chen, F., Zhao, Z., Liao, Q., Palukaitis, P., and Chen, J. (2008): The 2b protein and the C-terminus of the 2a protein of Cucumber mosaic virus subgroup I strains both play a role in viral RNA accumulation and induction of symptoms. *Virology*, 380: 363–370.

35. Echandi, E. and Hebert, T.T. (1971): Stunt of Beans Incited by Peanut Stunt Virus. *Phytopathology*, 61: 328–330.
36. Escriu, F., Fraile, A. and García-Arenal, F. (2007): Constraints to genetic exchange support gene coadaptation in a tripartite RNA virus. *PLoS Pathogenes*, 3 e8. doi:10.1371/s0030008.
37. Fauquet, C.M. and Mayo, M.A., (2001): The Bromoviridae. In: *Virus Taxonomy*, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses
38. Finch, J.T., Klug, A. and Van Regenmortel, M.H.V. (1967): The structure of cucumber mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*, 24:303–305.
39. Fisher, H.U. and Lockhart, B.E.L. (1978): Host Range and Properties of Peanut Stunt Virus from Morocco. *Phytopathology*, 68: 289–293.
40. Fraile, A., Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Bernal, J.J., Malpica, J.M. and Garcia-Arenal, F. (1997): Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. *Journal of Virology*, 71: 934–940.
41. Francki, R.I., Randles, J.W., Chambers, T.C. and Wilson, S.B. (1966): Some properties of purified cucumber mosaic virus (Q strain). *Virology*, 28: 729–741.
42. Gal-On A., Canto, T. and Palukaitis, P. (2000): Characterization of genetically modified cucumber mosaic virus expressing histidine-tagged 1a and 2a proteins. *Archives of Virology*, 145: 37–50.
43. Gal-On, A., Kaplan, I.B., Roossinck, M.J. and Palukaitis, P. (1994): The kinetics of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicate a function for RNA1 in virus movement. *Virology*, 205: 280–289.
44. Gellért, Á., Salánki, K., Náray-Szabó, G. and Balázs E. (2005): Homology modelling and protein structure based functional analysis of five cucumovirus coat proteins. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 24: 319–327.
45. Glasa, M., Palkovics, L., Komínek, P., Labonne, G., Pittnerová, S., Kúdela, O., Candresse, T. and Šubr, Z. (2004): Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology*, 85: 2671–2681.
46. Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. (1988): A novel superfamily of nucleotide triphosphate-binding motif containing proteins which are

- probably involved in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Letters*, 235: 16–24.
47. Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. (1989): Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Research*, 17: 4713–4730.
 48. Gould, A.R. and Symons, R.H. (1978): Alfalfa mosaic virus RNA. Determination of the sequence homology between the four RNA species and a comparison with the four RNA species of cucumber mosaic virus. *European Journal of Biochemistry*, 91: 269–278.
 49. Gubler, U., Hoffman, B.J. (1983): A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 25: 263–269.
 50. Guo, H.S. and Ding, S.W. (2002): A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO Journal*, 21: 398–407.
 51. Habili, N. and Francki, R.I.B. (1974): Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. I. Physical and chemical properties. *Virology*, 57: 392–401.
 52. Hajimorad, M.R., Hu, C.C. and Ghabrial, S.A. (1999): Molecular characterization of an atypical old world strain of Peanut stunt virus. *Archives of Virology*, 144: 1587–1600.
 53. Hayes, R.J. and Buck, K.W. (1990): Infectious cucumber mosaic virus RNA transcribed in vitro from clones obtained from cDNA amplified using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, 71: 2503–2508.
 54. Hebert, T.T. (1967): Epidemiology of the peanut stunt virus in North Carolina. *Phytopathology*, 57: 461.
 55. Hellwald, K.-H. and Palukaitis P. (1995): Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against Cucumber mosaic virus. *Cell*, 83: 363–368.
 56. Horváth, J. (1999): A vírusátvitel módszertana. 110–139. In Horváth, J., Gáborjányi, R. (Szerk.): *Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 425.
 57. Hu, C.-C., Aboul-Ata, A.E., Naidu, R.A. and Ghabrial, S.A. (1997): Evidence for the occurrence of two distinct subgroups of peanut stunt cucumovirus strains: molecular characterization of RNA3. *Journal of General Virology*, 78: 929–939.
 58. Hu, C.-C. and Ghabrial, S.A. (1998): Molecular evidence that strain BV-15 of Peanut stunt cucumovirus is a reassortant between subgroup I and II strains. *Phytopathology*, 88: 92–97.

59. Hu, C.-C., Sanger, M. and Ghabrial, S.A. (1998): Production of infectious RNA transcripts from full length cDNA clones representing two subgroups of peanut stunt virus strains: mapping satellite RNA support to RNA1. *Journal of General Virology*, 79: 2013–2021.
60. Huppert, E., Szilassy, D., Salánki, K., Divéki, Z. and Balázs, E. (2002): Heterologous movement protein strongly modifies the infection phenotype of cucumber mosaic virus. *Journal of Virology*, 76: 3554–3557.
61. Ian, P.A., Rachel H.G., Wendy, A. M., Rick, N., Elena J., Meletele, N., Maria S. and Neil B. (2009): Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10: 537–545.
62. Joshi, R.L., Joshi, S., Chapeville, F. and Haenni, A.L. (1983): tRNA-like structures of plant viral RNAs: conformational requirements for adenylation and aminoacylation. *EMBO Journal*, 2: 1123–1127.
63. Ju, H.B., Jang, K.C. and Sang Y.L. (2006): Characterization of Peanut stunt virus Isolated from Black Locust Tree (*Robinia pseudo-acacia* L.). *Plant Pathology Journal*, 22: 125–130.
64. Kadaré, G. and Haenni, A.L. (1997): Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology*, 71: 2583–2590.
65. Kao, C.C. (2002): Lessons learned from the core RNA promoters of brome mosaic and cucumber mosaic virus. *Molecular Plant Pathology*, 3: 53–59.
66. Kaper, J.M., Tousignant, M.E., Diaz-Ruiz, J.R. and Tolin, S.A. (1978): Peanut stunt virus-associated RNA5: second tripartite genome virus with an associated satellite-like replicating RNA. *Virology*, 88: 166–170.
67. Karasawa, A., Nakaho, K., Kakutani, T., Minobe, Y., and Ehara, Y. (1991): Nucleotide sequence of RNA3 of peanut stunt cucumovirus. *Virology*, 185: 464–467.
68. Karasawa, A., Nakaho, K., Kakutani, T., Minobe, Y., and Ehara, Y. (1992): Nucleotide sequence analyses of peanut stunt cucumovirus RNA1 and 2. *Journal of General Virology*, 73: 701–707.
69. Kim, M.J. and Kao, C. (2001): Factors regulating template switch in vitro by RNA-dependent RNA polymerases: implications for RNA-RNA recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 4972–4977.

70. Kim, M.J., Ham, B.K. and Paek, K.H. (2006): Novel protein kinase interacts with the Cucumber mosaic virus 1a methyltransferase domain. *Biochemical and biophysical Research Communications*, 340: 228–235.
71. Kim, S.H., Palukaitis, P. and Park, Y.I. (2002): Phosphorylation of cucumber mosaic virus RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *EMBO Journal*, 21: 2292–2300.
72. Kuhn, C.V. (1969): Effect of peanut stunt virus alone and in combination with peanut mottle virus on peanut. *Phytopathology*, 59: 1513–1516.
73. Kwon, C.S. and Chung, W.I. (2000): Differential roles of the 5' untranslated regions of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2, 3 and 4 in translational competition. *Virus Research*, 66: 175–85.
74. Li, H.W., Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X., Ji, L.H., Wong, S.M. and Ding S-W. (1999): Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO Journal*, 18: 2683–2691.
75. Li, Q., Ryu, K.H. and Palukaitis, P. (2001): Cucumber mosaic virus-plant interactions: Identification of 3a protein sequences affecting infectivity, cell-to-cell movement, and long distance movement. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 14: 378–385.
76. Liu, S., He, X., Park, G., Josefsson, C. and Perry, K.L. (2002): A conserved capsid protein surface domain of cucumber mosaic virus is essential for efficient aphid vector transmission. *Journal of Virology*, 76: 9756–9762.
77. Lot, H.W., Marrou J., Quiot J.B. and Esvan C. (1972): Contribution à l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). I. Méthode de purification rapide du virus. *Annual Review of Phytopathology*, 4: 25–38.
78. Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X. and Ding, S.W. (2000): Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO Journal*, 19: 1672–1680.
79. Masashi, S., Megumi, Y., Toshio, Y. and Tadaaki, H. (2003): Interaction of replicase components between Cucumber mosaic virus and Peanut stunt virus. *Journal of Virology*, 84: 1931–1939.
80. Masuta, C., Ueda, S., Suzuki, M. and Uyeda, I. (1998): Evolution of a quadripartite hybrid virus by interspecific exchange and recombination between replicase components

- of two related tripartite RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 10487–10492.
81. Mayo, M.A. and Pringle, C.R. (1998): Virus taxonomy-1997. *Journal of General Virology*, 79: 649–657.
 82. McGarvey, P., Tousignant, M., Geletka, L., Cellini, F. and Kaper, J.M. (1995): The complete sequence of a Cucumber mosaic virus from Ixora that is deficient in the replication of satellite RNAs. *Journal of General Virology*, 76: 2257–2270.
 83. Melcher, U. (2000): The '30K' superfamily of viral movement proteins. *Journal of General Virology*, 81: 257–266.
 84. Milbrath, G.M. and Tolin, S.A. (1977): Identification, host range and serology of peanut stunt virus isolated from soybean. *Plant Disease Report*, 61: 637–640.
 85. Militao, V., Moreno, I., Rodriguez-Cerezo, E. and Garcia-Arenal, F. (1998): Differential interactions among isolates of peanut stunt cucumovirus and its satellite RNA. *Journal of General Virology*, 79: 177–184.
 86. Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshall, D.F., Hushmeier, D. and McGuire, G. (2004): TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics*, 20: 1806–1807.
 87. Mink, G.I. (1972): Peanut stunt virus. CMI/AAB *Description of Plant Viruses* no. 92.
 88. Mink, G.I., Hebert, T.T. and Silbernagel, M.J. (1967): A strain of Peanut stunt virus isolated from beans in Washington. *Phytopathology*, 57: 1400.
 89. Mink, G.I., Silbernagel, M.J. and Saksena, K.N. (1969): Host range, purification, and properties of the western of the peanut stunt virus. *Phytopathology*, 59: 1625–1631.
 90. Mossop, D.W. and Francki, R.I.B. (1978): Survival of satellite RNA in vivo and its dependence on cucumber mosaic virus for replication. *Virology*, 86: 562–566.
 91. Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335–350.
 92. Mushegian, A.R. and Koonin, E.V., (1993): Cell-to-cell movement of plant viruses. *Archives of Virology*, 133: 239–257.
 93. Naidu, R.A., Collins, G.B. and Ghabrial, S.A. (1991): Symptom modulating properties of peanut stunt virus satellite RNA sequence variants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4: 268–275.

94. Naidu, R.A., Collins, G.B. and Ghabrial, S.A. (1992): Peanut stunt virus satellite RNA: analysis of sequences that affect symptom attenuation in tobacco. *Virology*, 189: 668–677.
95. Naidu, R.A., Hu, C-C., Pennington, R.E. and Ghabrial, S.A. (1995): Differentiation of eastern and western strains of peanut stunt cucumovirus based on satellite RNA support and nucleotide sequence homology. *Phytopathology*, 85: 502–507.
96. Netsu, O., Hiratsuka, K., Kuwata, S., Hibi, T., Ugaki, M., and Suzuki, M. (2008): Peanut stunt virus 2b cistron plays a role in viral local and systemic accumulation and virulence in *Nicotiana benthamiana*. *Archives of Virology*, 153: 1731–1735.
97. Nitta, A., Takanami, Y., Kuwata, S. and Susumu, K. (1988): Inoculation with RNAs 1 and 2 of cucumber mosaic virus induces viral RNA replicase activity in tobacco mesophyll protoplasts. *Journal of General Virology*, 69: 2695–2700.
98. Obrepalska-Steplovska, A., Budziszewska, M., and Pospieszny, H. (2008a). Complete nucleotide sequence of a Polish strain of Peanut stunt virus (PSV-P) that is related to but not a typical member of subgroup I. *Acta Biochimica Polonica*, 55: 731–739.
99. Obrepalska-Steplovska, A., Nowaczyk, K., Budziszewska, M., Czerwoniec, A., and Pospieszny, H. (2008b): The sequence and model structure analysis of three Polish Peanut stunt virus strains. *Virus Genes*, 36: 221–229.
100. Oparka, K.J., Boevnik, P. and Santa-Cruz, S. (1996): Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends in Plant Science*, 1: 412–418.
101. O'Reilly, E.K., Whang, Z., French, R. and Kao, C.C. (1998): Interactions between the structural domains of the RNA replication proteins of plant-infecting RNA viruses. *Journal of Virology*, 72: 7160–7169.
102. Owen, J. and Palukaitis, P. (1988): Characterization of cucumber mosaic virus I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology*, 166: 495–502.
103. Page, R. D. M. (1996): TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357–358.
104. Palukaitis, P. and García-Arenal, F. (2003): Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62: 241–323.
105. Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G. and Francki, R.I.B. (1992): Cucumber mosaic virus. *Advanced Virus Research*, 41: 281–348.

106. Perry, K.L., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1998): Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology*, 242: 204–210.
107. Pierrugues, O., Guilbaud, L., Fernandez-Delmond, I., Fabre, F., Tepfer, M. and Jacquemond, M. (2007): Biological properties and relative fitness of inter-subgroup cucumber mosaic virus RNA 3 recombinants produced in vitro. *Journal of General Virology*, 88: 2852–2861.
108. Pogue, G.P., Marsh, L.E., Connell, J.P. and Hall, T.C. (1992): Requirements for ICR like sequences in the replication of brome mosaic virus genomic RNA. *Virology*, 188: 742–753.
109. Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000): EMBOSS: the European molecular open software suite. *Trends in Genetics*, 16: 276–277.
110. Richter, J., Haack, M., Wesemann, M. and Beczner, L. (1987): Differentiation of peanut stunt virus isolates in six serotypes. *Archiv fuer Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 2: 127–133.
111. Richter, J., Proll, E. and Musil, M. (1979): Serological relationships between Robinia mosiac, clover blotch and peanut stunt viruses. *Acta Virologica*, 23: 489.
112. Rietveld, K., Pleij, C.W.A. and Bosch, L. (1983): Three-dimensional models of the tRNA-like termini of some plant viral RNAs. *EMBO Journal*, 2: 1079–1085.
113. Roossinck, M.J., Bujarski, J., Ding, S.W., Hajimorad, R., Hanada, K., Scott, S. and Tousgnant, M. (2006): Index of Viruses – Bromoviridae In: ICTVdB – *The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm
114. Roossinck, M.J., Sleat, D. and Palukaitis, P. (1992): Satellite RNAs of plant viruses: structure and biological effects. *Microbiol Review*, 56: 265–279.
115. Roossinck, M.J., Zhang, L. and Hellwald, K.H. (1999): Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology*, 73: 6752–6758.
116. Rozanov, M.N., Koonin, E.V. and Gorbalenya, A.E. (1992): Conservation of the putative methyltransferase domain – a hallmark of the Sindbis-like supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, 73: 2129–2134.

117. Salánki, K., Carrére, I., Jacquemond, M., Balázs, E. and Tepfer, M. (1997): Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus. *Journal of Virology*, 71: 3597–3602.
118. Salánki, K., Gellért, Á., Huppert, E., Náray-Szabó, G. and Balázs, E. (2004): The compatibility of the movement protein and the coat protein of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. *Journal of General Virology*, 85: 1039–1048.
119. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual (2nd edition). Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
120. Schmelzer, K. (1971): CMI/AAB *Description of Plant Viruses*, no 65.
121. Schmitz, I. and Rao, A.L.N. (1998): Deletions in the conserved amino-terminal basic arm of cucumber mosaic virus coat protein disrupt virion assembly but do not abolish infectivity and cell-to-cell movement. *Virology*, 248: 323–331.
122. Schneider, W.L. and Roossinck, M.J. (2000): Evolutionarily related Sindbis-like plant viruses maintain different levels of population diversity in a common host. *Journal of Virology*, 74: 3130–3134.
123. Schneider, W.L. and Roossinck, M.J. (2001): Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *Journal of Virology*, 75: 6566–6571.
124. Sivakumaran, K., Bao, Y., Roossinck, M.J. and Kao, C.C. (2000): Recognition of core promoter for minus-strand RNA synthesis by the replicases of brome mosaic virus and cucumber mosaic virus. *Journal of Virology*, 74: 10323–10331.
125. Suzuki, M., Hibi, T. and Masuta, C. (2003): RNA recombination between cucumoviruses: possible role of predicted stem-loop structures and an internal subgenomic promoter-like motif. *Virology*, 306: 77–86.
126. Suzuki, M., Kuwata, S., Kataoka, J., Masuta, C., Nitta, N. and Takanami, Y. (1991): Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA3 using an in vitro transcription system. *Virology*, 183: 106–113.
127. Symons, R.H. (1975): Cucumber mosaic virus RNA contains 7-methyl guanosine at the 5'-terminus of all four RNA species. *Molecular Biology Reports*, 2:277–285
128. Szathmáry, E., Tóbiás, I., Dragoyski, K. and Palkovics, L. (2009): Partial molecular characterization of an unusual, recombinant Plum pox virus isolate from Bulgaria. *Acta Virologica*, 53: 65–67.

129. Szilassy, D., Salánki, K. and Balázs, E. (1999): Stunting induced by cucumber mosaic cucumovirus-infected *Nicotiana glutinosa* is determined by a single amino acid residue in the coat protein. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 12: 1105–1113.
130. Takeshita, M., Suzuki, M. and Takanami, Y. (2001): Combination of amino acids in the 3a protein and the coat protein of cucumber mosaic virus determines symptom expression and viral spread in bottle gourd. *Archives of Virology*, 146: 697–711.
131. Taliansky, M.E. and García-Arenal, F. (1995): Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant. *Journal of Virology*, 69: 916–922.
132. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997): The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876–4882.
133. Troutman, J.L., Bailey, W.K. and Thomas, C.A. (1967): Seed transmission of Peanut Stunt Virus. *Phytopathology*, 57: 1280–1281.
134. Troutman J.L. (1966): Stunt – a newly recognized virus disease of peanuts. *Phytopathology*, 56: 587.
135. Tsuchizaki, T. (1973): Peanut stunt virus isolated from beans in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 39: 67–72.
136. Vaquero, C., Turner, A.P., Demangeat, G., Sanz, A., Serra, M.T., Roberts, K. and García-Luque, I. (1994): The 3a protein from cucumber mosaic virus increases the gating capacity of plasmodesmata in transgenic tobacco plants. *Journal of General Virology*. 75: 3193–3197.
137. Wahyuni, W.S., Dietzgen, R.G., Hanada, K. and Francki, R.I.B. (1992): Serological and biological variation between and within subgroup-I and subgroup-II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathology*, 41: 282–297.
138. Waterworth, H.E., Monroe, R.L. and Kahn R.P. (1973): Improved Purification Procedure for Peanut Stunt Virus, Incitant of Tephrosia Yellow Vein Disease. *Phytopathology*, 63: 93–98.
139. White, J.L. and Kaper, J.M. (1989): A simple method for detection of viral satellite RNAs in small tissue samples. *Journal of Virological Methods*, 23: 83–94.
140. White, P.S., Morales, F. and Roosinck, M.J. (1995): Interspecific reassortment of genomic segment in the evolution of Cucumoviruses. *Virology*, 207: 334–337.

141. Xin, H.W., Ji, L.H., Scott, S.W., Symons, R.H. and Ding, S.W. (1998): Ilarviruses encode a cucumovirus-like 2b gene that is absent in other genera within the bromoviridae. *Journal of Virology*, 72: 6956–6959.
142. Xu, Z., Barnett O.W. and Gibson, P.B. (1986): Characterization of peanut stunt virus strains by host reaction, serology, and RNA patterns. *Phytopathology*, 76: 390–395.
143. Xu, Z., Chen, K., Chen, G. and Cao, G. (1994): Black locust, primary source of peanut stunt virus (PSV) for the PSV epidemics on peanut. *Acta Phytopathologica Sinica*, 24: 305–309.
144. Xu, Z., Higgins, C., Chen, K., Dietzgen, R.G., Zhang, Z., Yan, L., Fang, X. (1998): Evidence for a third taxonomic subgroup of peanut stunt virus from China. *Plant Disease*, 82: 992–998.
145. Yamaguchi, N., Seshimo, Y., Yshimoto, E., Ahn, H.I., Ryu, K.H., Choi, J.K. and Masuta, C. (2005): Genetic mapping of the compatibility between a lily isolate of Cucumber mosaic virus and a satellite RNA. *Journal of General Virology*, 86: 2359–2369.
146. Yan, L.Y., Xu, Z.Y., Goldbach, R., Kunrong, C. and Prins, M. (2005): Nucleotide sequence analyses of genomic RNAs of Peanut stunt virus Mi, the type strain representative of a novel PSV subgroup from China. *Archives of Virology*, 150: 1203–1211.

8.3 M3. A NEMZETKÖZI ADATBANKBA BENYÚJTOTT SZEKVENCIÁK

PSV-Rp izolátum RNS1 molekulája

LOCUS AM905353 3325 bp RNA linear VRL 14-JUL-2009

DEFINITION Peanut stunt virus segment RNA1, complete sequence.

ACCESSION AM905353

VERSION AM905353.1 GI:171850885

KEYWORDS 1a gene; 1a protein; complete genome.

SOURCE Peanut stunt virus

ORGANISM Peanut stunt virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage;
Bromoviridae; Cucumovirus.

REFERENCE 1

AUTHORS Kiss,L., Sebestyen,E., Laszlo,E., Salamon,P., Balazs,E. and Salanki,K.

TITLE Nucleotide sequence analysis of peanut stunt virus Rp strain suggests the role of homologous recombination in cucumovirus evolution

JOURNAL Arch. Virol. 153 (7), 1373-1377 (2008)

PUBMED 18523838

REFERENCE 2 (bases 1 to 3325)

AUTHORS Salanki,K.

TITLE Direct Submission

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..3325
/organism="Peanut stunt virus"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="Rp"
/host="Robinia pseudoacacia"
/db_xref="taxon:12313"
/segment="RNA1"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Hungary:Godollo"
/collected_by="Pal Salamon"

gene 85..3078
/gene="1a"

CDS 85..3078
/gene="1a"
/codon_start=1
/product="1a protein"
/protein_id="CAP19049.1"
/db_xref="GI:171850886"
/db_xref="GOA:B1VCT8"
/db_xref="InterPro:IPR002588"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:B1VCT8"

/translation="MATSSFNLSSELVATRGSSGLVASALVDKVAEEQLLEEQLHHQRRG
LKVYIRNRLDVKESEVIRNRYGGKYDLHLSQQEHAPHGLAGALRLCETLDCLDAFPRT
GLRQDLVLDGGSWVTHFLRGHNVHCCSPCLGVRDKMRHTERLLSMRKAILNDPQNFE
GRQPNFCTNPAEKCDVQAHYAISIHGGYDMGFEGLCRAMNAHGTFILKGTMMFDGAML
FDDSGFIPELKCHWRKIKNAFSEKENASSLSSKLNLVVSGKTLIAFDENESTMSYVH
EWKNIKSFLLTDQTFSYNGYTYGIERCVIYAGIMTYKIIIGVPGVCPPEIIRHCVWFPSL
KDYVGLKIPTSADLVDWKTVRLPLSTLRLDTEEIAMRCYNDKKTWQDQFKIILGVLSSK
SSTIVINGMAMQAGERIDMDDYPFIGFAIMLHTRMSSEQLSEMYEAWDASIIITQWGKD
MTKPIRTFVRLVARTLFPTRLRPRDESEFLVKLSTFVTFNDECISDMGEHWDVMAAAA
VAAWAVEDGKQLAAEKEKALESARQQPVLEDSQPSASSPPPDIELNPMNPSVGQSKPV
EPELKSLSFQTQSSDTRLAERAAAMLEYVAYERQLHNNVVSNLQRIWCSAGGDFTSN
RLEGNLKFVFDTYFLTDPLVNVHVFSSGRWMHTVPAGVKYMGVFNEKGLGPKLDSELYI
VNGDCVICNSDGLSDAVKSLTAPSGTISLVDGVAGCGKTTAIIKKLFQPATDLIVTANK
KSAQDVRMALFGASDSKEACTFVRTADSILLNDAPAVSRVLVDEVVLLHFGQLCAVMA
KLNAVRAICFGDSEQIAFGSRDASFDMRRSSILPDESSTSDTTFRSPQDVVPLVARMA
TKAFPRGTHAKYARWLSQSRVRNSVSCKSVPSVALVDMDESRYFITMTQADKAALVTR
AKELQMPSSFYDNKIKTVHESQGISSEHVTLVRLKSTKCDLFSFPYCLVALTRHKVT
FKYEYCGELKGDLIANVLATNSPII "
ORIGIN

```

1 gttttctaag agcgtacggg tcaaccocctg cctccocctga ctcaccaact tctcagtttt
61 cttcgctttg taagttaaata tcctatggct acgtcctcgt tcaacccttc tgaattggta
121 gctaccocgag gctcatcagg actagtagcg tcagccctcg ttgataaagt tgcagctgag
181 caacttgagg aacaattaca tcatcaacgt agaggcctca aggtctacat ccgaaaccgg
241 ttgtagtaaa aggagtcgga agtgattcga aatcggatg gaggtaagta cgtatcctcat
301 ctgtcccagc aagagcacgc tcctcacggg ctcgctgggtg ccctccgctt gtgtgaaaca
361 ctcgattgtc tagacgcctt tccccgcaca ggtctgaggc aagacctcgt tctagacttc
421 ggtggtagtt gggtcacaca ctctcctcgc ggtcacacag tacactgctg ctctccttgt
481 ttaggcgtcc gggacaaaat gcgccatact gaacgtttat tgagcatgcg gaaagccatc
541 ttaaaccgacc cccaaaattt cgagggtcgc cagccaaatt tttgacgaa cccggctgaa
601 aatgcgagc tacaagccca ttacgccatt tctattcatg gaggatatga tatgggcttc
661 gaaggactat gtagagccat gaatgctcac ggaaccattt tttgaaggg gacgatgatg
721 tttgatgggg cgatgttatt tgatgactca ggctttatcc ccgagttaaa gtgccactgg
781 agaaagatca agaatgcttt cagtgaagaa gagaatgctt catctctttc ttctaaattg
841 aacctggctg tttctgggaa gactctcatt gccttcgact ttgagaatga atccaccatg
901 tcttacgtac atgagtgga gaatatcaaa tccttcctaa cggatcagac tttctcctac
961 aatggataca cctatggcat agaacgatgt gtaatatac ctggtattat gacctacaag
1021 ataatagggtg ttctggcgt gtgccgcccc gaaatcattc gacactgtgt ttggttcccg
1081 tccttgaagg actacgtcgg tttgaagatt ccgacatccg ccgacttagt tgattggaaa
1141 actgttcgcc tgccctctct caccctgcgc gatactgagg agatcgccat gagggtttat
1201 aacgataaga agacctggca agatcaattt aagatcattt tgggagtttt atcttcgaaa
1261 tcttccacta tcgttatcaa tggcatggct atgcaagctg gtgagcgcac cgacatggac
1321 gattatccct tcataggggt cgcctcatg ctgcatacaa gaatgagttc tgaacagtta
1381 agcgaagtgt atgaagcgtg ggaagcctcc atcatcactc aatgggggaa agatatgacg
1441 aaaccaatca gaacgttcgt gaggctggtc gcccgaaactc tgtttccgac gttgcgtccc
1501 cgcgatgaga gtgaattcct agtgaagctt tccacctttg tcaacttttaa tgatgaatgc
1561 atctctgaca tgggagaaca ctgggatgtg atggccaacg ctgctgctgt ggcagcgtgg
1621 gctgttgagg atggtaaaca attggcagct gaaaaggaga aggccttggg atcggcccga
1681 cagcagcccg tgcttgaaga ctctcagcca tccgcctcga gcccccccc tgatatagag
1741 ttgaatccaa tgaaccatc ggtgggtcag tccaaacctg tcgaacctcc tgagcttaaa
1801 tctttatcct tccagactca atctctcagc accagattgg ccgaaagagc cgcagccatg
1861 ttggagtatg tggcttacga acgccaactg cacaataacg ttgtttcaaa tcttcaaagg
1921 atttgggtgt ctgctggcgg tgattttacc tctaactcgtc tgggaaggcaa tttgaagttc
1981 gtgttcgaca cctacttttt gactgatcct ctggccaatg tgcacttctc gtccggaaga
2041 tggatgcata cagtcccggc aggagtcaaa tatatgggtg gtttcaatga aaaggggctc
2101 ggtcctaaac tagatagtga gctgtacatc gtgaacggcg actgtgtcat ttgcaatagt
2161 gacggctctgt ccgatgcggc caaatctctg acagctccat ctggtacatc cagtctgggt
2221 gatgggtgtc ctgggtgtgg gaaaaccact gcaatcaaaa aattgttcca accggcgacc
2281 gatctcatcg taacggctaa caagaagtcg gcacaagacg tcaggatggc tctctttgga

```

2341 gcctcagatt caaaagaagc ttgtactttc gtgagaaccg ccgattctat tctcctcaat
2401 gatgctcccg cggctctcacg tgtgtagtc gatgaagtcg tcctattaca cttcgggcaa
2461 ttatgtgctg tcatggcgaa gttaaacgct gtcagagcta tatgtttcgg ggactccgag
2521 caaatagctt ttgggtcgag ggatgcttct ttcgacatgc gtagatcttc catcctccca
2581 gatgagtcca gcacctctga tactactttc cgaagtctc aggacgtcgt ccctttggta
2641 gctcgcacatg caactaaagc ctttcttagg ggcacgcacg ccaagtatgc tagatggttg
2701 tcacagtcga gggctccgcaa ttccgtgagc tgcaaaagtg tccttagtgt tgcactagtt
2761 gatatggacg agtctcgggt ttatataacg atgactcaag cggacaaaagc tgccttagta
2821 acgagggcga aagagttaca aatgccgagt tcattctatg ataacaagat aaagactgtg
2881 cacgaatctc aaggcatttc ggaagatcat gtgactctgg ttagattgaa aagtactaag
2941 tgtgatctct ttaaatcctt tccctactgt ttagtggctc tcactagaca taaggctact
3001 ttttaagtatg aatattgtgg tgagttgaaa ggtgatttga ttgctaattgt gttagcaaca
3061 aattctccca taatctgac tccacttct aagttggcag ttacattact ctaaactgtc
3121 tgaaaccact aaacaggtta tccctgggtg cgggttgtcc atccagctag cggctaaaat
3181 ggtcagtccc acccaaaagg tgggccaagt ccttacaagg gcttgaggta ctttatacta
3241 tctactccgg atagttgtga agagctgcat acaacgtatg cgttcagctc gagtaccccc
3301 tctatgaggg ctccatagga gacca

//

PSV-Rp izolátum RNS2 molekulája

LOCUS AM905354 2942 bp RNA linear VRL 14-JUL-2009

DEFINITION Peanut stunt virus segment RNA2, complete sequence.

ACCESSION AM905354

VERSION AM905354.1 GI:171850887

KEYWORDS 2a gene; 2a protein; 2b gene; 2b protein; complete genome.

SOURCE Peanut stunt virus

ORGANISM Peanut stunt virus

Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage;
Bromoviridae; Cucumovirus.

REFERENCE 1

AUTHORS Kiss,L., Sebestyén,E., Laszlo,E., Salamon,P., Balázs,E. and Salanki,K.

TITLE Nucleotide sequence analysis of peanut stunt virus Rp strain suggests the role of homologous recombination in cucumovirus evolution

JOURNAL Arch. Virol. 153 (7), 1373-1377 (2008)

PUBMED 18523838

REFERENCE 2 (bases 1 to 2942)

AUTHORS Salanki,K.

TITLE Direct Submission

FEATURES

Location/Qualifiers

source

1..2942

/organism="Peanut stunt virus"

/mol_type="genomic RNA"

/isolate="Rp"

/host="Robinia pseudoacacia"

/db_xref="taxon:12313"

/segment="RNA2"

/lab_host="Nicotiana benthamiana"

/country="Hungary:Godollo"

/collected_by="Pal Salamon"

gene

80..2584

/gene="2a"

CDS

80..2584

/gene="2a"

/codon_start=1

/product="2a protein"

/protein_id="CAP19050.1"

/db_xref="GI:171850888"

/db_xref="GOA:B1VCT9"

/db_xref="InterPro:IPR007094"

/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:B1VCT9"

/translation="MATFSLESLLSGSYGVDTPPEEVERIRARDAAPLSFLSDEGTVES
VPIPSVPEETVGPAREAREEPSTGCSSDSLERSVFLVEDLNAMSDDSVRTVFVELIRPT
YVGCTEVPEFSRNKLTLSVSVARNLISTAFRYPRKLKEYPDLVASIYTKSDIFEEDAP
VEETVSDEVPGYTFFPVERTDGYERPPLGSDWGLIGYQWACHDLIGRREAFEMTIAH
TYELESLSGVDDATLLSNLGSFLMPIHCEYSRVDP SLKTYHLTQPHPTDRVSIESLQ
AACDTS LPTHVCYDDTYHQVFVENADFTT DIDHMTL KQSDLI PRVDGGNYLKPVLNTG
SGSKRLGTTKEVLTAIKKRNADVPELSGSVDLTRISKAVA EKFMSYLNNGNVLAQSNF
LNVVGNF HAYMQKWAASGLSYDDL PDLHAENLQFYEHMVKSDVKPVVSDTLNVDRPVP
ATITFHAKGITSQFSPLFISLFRERFQRCLRSRVIVPVGKISSLEMDNYSVLNKYCLEI
DLSKFDKSQGELHLMIQEEILNLLGCPVPIKWWCDFHRYSYIKDKRAGVSMPI SFQR
RTGDAFTYFGNTLV TMLFAWCYDTHFNRLLFSGDDSLAFSLNPIEGRSDWFTSLFN
MEAKNMDPPTPYICSKFLLTDELGHTFSVPDPLRELQRLGTTKIPDGGVDDSYLRAHF

MSFVSRLLKVLPRMTHSTIEQLKVFYEMKYKKSQSGDECYALLERFTKYSTNFSVYKELYV
SNQKRISLVNSFSGSDFVVERKPVLLKSKRPKLLKGDVECKADLKT PNVGAEGEKRKGS
PQGEPKVTRTQESERIEASKTEGDFVSPGSTTAGAS "

gene 2406..2687
/gene="2b"
CDS 2406..2687
/gene="2b"
/codon_start=1
/product="2b protein"
/protein_id="CAP19051.1"
/db_xref="GI:171850889"
/db_xref="InterPro:IPR004946"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:B1VCU0"

/translation="MLSAKQISKLQMLEQKVKNARARHRANRKLGRGHKSPSELRRRKL
RETLFLLAQLPPALPDVDDIFVGPSPPLSDVSCDETDWFAGNEWCEGSF "

ORIGIN

```
1 gttttctcaa gagcgtacgg ttcaaccct gcctcccctg actcaccaac ttctcagttt
61 tctttgcttt gtaagtttca tggctacctt ctcaactggaa tccctggttg ccggttccca
121 tgggtgttgac actcccagagg aggtagagcg cattagggcg cgtgatgctg cgcccccttc
181 ctttctttcc gacgagggta ccgctcgagag tgtcccgatt ccttctgtcc ctgaagagac
241 agttggctct cgcgaagcgc ggggaagagcc ttccacaggc tgttcatccg attctcttga
301 aagagtctcc tttctagtcc aagacttaaa tgctatgtcg gatgattctg tcagaaccgt
361 cttttagtag ttgatcaggc ccacttacgt aggctgtaca gagggtcccg aatthccag
421 gaacaaattg aactgagtg tgtccgtagc ccgcaacctc atcagcactg ctttcagata
481 cccccgtaag ttgaaggagt atcctgatct tgtagcatct atctatacga aatccgatat
541 ttttgaagaa gatgctccgg tcgaagagac cgtctcagac gaagtcccgg gttacacctt
601 tttcccggta gaacgcaccg atggctacga gcgacccccca ctgggttcgg attgggggtt
661 gataggggat caatgggctt gtcattgatt aatcggccgc cgagaggcat ttgccgaaat
721 gactatagcc cacacttatg aattggagag cttgtccggc gtcggtgatg atgccacatt
781 actgtctaac ctaggctcct tctgatgcc aattcactgt gagtattctc gtgtggatcc
841 ctgctcaaa acttaccact tgactcagcc tcaccctaca gataggggat caattgagtc
901 acttcaagcc gcgtgcgata cttctctccc cactcacgct tgctatgacg atacctacca
961 ccaagttttt gttgaaaatg cggatttcac aacggacatc gatcatatga ctttgaaaca
1021 gtccgattta atcccagggt tcgatgggtg taattatttg aaaccggctc tcaacaccgg
1081 tagtgggtcg aagagacttg ggactactaa ggaagtcttg acagctataa agaaaagaaa
1141 tgctgatgtc cccgaactgt cgggttccgt tgatttgact cgcattagta aagctgtcgc
1201 cgagaagttc atgaaatcct atttaaattg gaacgttcta gcgcaaagta acttcttgaa
1261 tgtcgtaggc aatthtcatg cttacatgca gaaatgggcg gcttccggtc tctcttacga
1321 tgacttgccc gatctgcacg ccgagaatct gcaatthtat gagcacatgg ttaagtctga
1381 tgtcaaaccg gtcgthtccg acactctcaa tgcgcacaga cctgthtctg ctactatcac
1441 cttccacgcc aaagggatca cctcccagtt ctctccacta ttcattcttt tgttcgagag
1501 attccagcgt tgtttgcgaa gtagggtgat agtccctgta ggaaaaattt catctttgga
1561 aatggacaac tattctgttc tcaacaaata ctgthtggag atcgatttat ctaagttcga
1621 taaatcccaa ggagagcttc atctaattgat tcaggaagaa atthtgaacc tcttaggttg
1681 tctgttccc atatccaagt ggtggtgtga tttccacaga tattctaca taaaggacaa
1741 gagagcaggt gtgagcatgc ccataagttt tcaacgtcgc actggtgacg cthttactta
1801 cthtgggaac actctagtta cgatggctct cthtggcttg tgctatgaca cagaccattt
1861 taaccgcttg ttgttctctg gtgacgatcc tthtagcttt tctthgaacc cgattgaggg
1921 tcgatctgat tggthcactt cctthttaa tatggaagct aagaatatgg accccccaac
1981 tccgtacatc tgctcgaagt thctactcac agatgagttg ggccacacct tctccgtccc
2041 cgacctctt cgtgagttgc aacgactcgg aacgaagaaa atccccgatg ggggcgtgga
2101 cgattcctat ctgagagctc actthtatgag thtctgtgagc cgtctcaagg tctcccagg
2161 gatgacgcat agcacgatag aacaactcaa agtgthctat gagatgaagt acaagaaatc
2221 tggcgatgag tgttatgctt tattagagag gthccaaaag tactccacca atthctctgt
2281 ttacaaggag cthtatgtgt ctaacaaaaa gcgtattagc ctggttaact cgtthtctg
2341 cagtgatthc thtgttgaga ggaacctgt gcttaagtct aagagaccga agaagctcaa
```


2401 aggtgatggt gagtgcaaag cagatctcaa aactccaaat gttggagcag aaggtgaaaa
2461 acgcaagggc tcgccacagg gcgaaccgaa agttacgcgg acacaagagt ccgagcgaat
2521 tgaggcgtcg aaaactgagg gagactttgt ttctcctggc tcaactaccg ccggcgcttc
2581 ctgatgtcga cgacattttc gtcggcccgt ctccacctct cagcgacgtt tcttgtgatg
2641 aaaccgattg gttcgctggg aatgagtggg gtgagggtag tttctgagga ctatcctttc
2701 tctctaagtt ggcagctata ttactctaaa ctgtctgaaa ccactaaaca ggttatcctg
2761 gtggtcgggt tgtccatcca gctagcggct aaaatggtca gtctcaccca aaaggtgagc
2821 caggtcctta caagggcttg aggtactcta tactatctac tccggatagt tgtgaagggc
2881 tgcatacaac gtgtgcgctc agtccgggta cccctctct atgagggctc cataggagac
2941 ca

//

PSV-Rp izolátum RNS3 molekulája

LOCUS AM905355 2208 bp RNA linear VRL 14-JUL-2009
DEFINITION Peanut stunt virus segment RNA3, complete sequence.
ACCESSION AM905355
VERSION AM905355.1 GI:171850890
KEYWORDS 3a gene; 3a protein; 3b gene; coat protein; complete genome.
SOURCE Peanut stunt virus
ORGANISM Peanut stunt virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage;
Bromoviridae;Cucumovirus.

REFERENCE 1
AUTHORS Kiss,L., Sebestyén,E., László,E., Salamon,P., Balázs,E. and Salánki,K.
TITLE Nucleotide sequence analysis of peanut stunt virus Rp strain suggests the role of homologous recombination in cucumovirus evolution
JOURNAL Arch. Virol. 153 (7), 1373-1377 (2008)
PUBMED 18523838

REFERENCE 2 (bases 1 to 2208)
AUTHORS Salánki,K.
TITLE Direct Submission

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..2208
/organism="Peanut stunt virus"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="Rp"
/host="Robinia pseudoacacia"
/db_xref="taxon:12313"
/segment="RNA3"
/lab_host="Nicotiana benthamiana"
/country="Hungary:Godollo"
/collected_by="Pal Salamon"
gene 142..1011
/gene="3a"
CDS 142..1011
/gene="3a"
/codon_start=1
/product="3a protein"
/protein_id="CAP19052.1"
/db_xref="GI:171850891"
/db_xref="GOA:B1VCU1"
/db_xref="InterPro:IPR000603"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:B1VCU1"

/translation="MAFSGSSRTL TQSSAASSDDLHKILFSPEAIKEMATKCDLGRH
HWMRADNAV CVRPLVPESTSNKVTRWFKSGYEAGDLPSKGYMSVPQVLC AITRTVMAN
AEGSIRIY LADLGDDELAPID DQVVTLHNRDLPALVSFQPTYDCPMEIVK GKSR CFVV
VTERYGYIGHSGSTASVCS SWQPKFSSKNNNYRPA AAGKTLVLPYNRLSEL SGPSAVA
RLLKSQLNMQSSPFFQLPGSPVIQKAIGSEHEEGLNCNRKLP LEEVSTTPQDMVSSKP
SVVNGVECSGILL"

gene 1269..1919
 /gene="3b"
CDS 1269..1919
 /gene="3b"
 /codon_start=1
 /product="coat protein"
 /protein_id="CAP19053.1"
 /db_xref="GOA:B1VCU2"
 /db_xref="InterPro:IPR000247"
 /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:B1VCU2"

/translation="MASSGSGNGSRRPRRRSSSKVDAHARELRALTAQLNRLVAIS
 AAQMPSLDHPTFVSSRKRCPGYTYTSLDVRPTKTEKGHSFGQRLVLPVPVSEFPKKKV
 SCVQLRLNPSPKFDSTVWVSLRKLSPGYSLTSESVFKLFTDGNAAVLIYQHVSTGVQP
 RNKITFDLASVGTETIGDIGDYAIIIVYSKDDTLEADEMVIHVDVEHQRI.PSASALPV"

ORIGIN

```

1 gttttaaacc aacaaaaacc tgagtctgac cgcgtgccag taggactcac cctgtatagt
61 gtacatagta gatagctaata cagtgccac gttttgtaaa tataacgtgt tgttgttgtt
121 ggttaaaacc ctcaacttgag tatggcttcc tctgggtcta gtcggacttt aacacaacag
181 tcctcggcgg catcatctga tgatctacac aagattttat tcagccccga agccatcaaa
241 gagatggcga ctaaatgcga cctaggtcga caccactgga tgcgcgccga taatgccgtg
301 tgtgtcagac ccctcgttcc cgaatctacg tccaacaaaag tgaccocgatg gtttaaatcc
361 ggttatgaag ccggtgattt accatccaag ggatatatga gcgtccctca agttctgtgc
421 gccatcacc gtaccgtaata ggctaatagct gaagggtcca tcaggatcta tttagctgac
481 ttaggtgatg atgaacttgc cccgatcgat gatcaagtgg tcacactcca taaccgagac
541 ctccctgctc tggatcgtt ccagcccacc tatgattgtc ccatggaaat agtgaaaggg
601 aaaagcaggt gttttgtcgt tgttactgaa aggtacgggt atattggaca ttctgggagt
661 accgcaagcg tgtgttctag ctggcagccg aagttctcat caaagaataa caactatagg
721 ccagccgccg ccggttaagac tctagttcta cttacaaca gattgtctga gctatcaggt
781 ccatcagctg tagcaagact gttgaaatcg cagctcaaca tgcaaagttc tcccttcttt
841 cagttaccocg ggagtcctgt cattcaaaaa gcgattggta gtgagcacga ggaaggttta
901 aattgcaata gaaagctacc tttggaggag gtaagtacca cgcccagga tatggttagc
961 tcaaaaccgt cagtggttaa ccggtgtgag tgttctggga ttttgttgta aatatatgaa
1021 tattatggta tttgtaaata tatttaccta tcgtgtcatc gtgttgtgtg ttacgatgat
1081 gctggcgtga tggaggata cggaccaca ttcagttgct aaagccgtcg atataccttt
1141 tgggttcaat tccctttggt caatttcgcg ttcctttagt ctctagaatg cctatcccga
1201 actcccgtag tactatcgtg tttgtttgta ttgtctttac gtttagtacg cgtcaaccac
1261 attgtttcat ggcattctca ggatctgcta acggttctcg tcgacctcgt agagggaggc
1321 gctcttcgtc taaggtggac gctcatgcta gagagctccg cgctttgacc gctcagctga
1381 atcgtttggt agccatctcg gctgccaga tgccaagcct cgatcatcca accttgttt
1441 ctagcaggaa gtgtcgtccc ggttacacgt acacttcggt ggatgtccga ccgacaaaaa
1501 ctgagaaggg ccatagtttc ggtcagaggt tagttttacc agttcccgta tctgaatttc
1561 cgaagaagaa agtttcgtgc gttcaactcc ggttgaacce gtcgcctaag ttcgactcca
1621 ctgtgtgggt gtcccttagg aaactttcgc ccggtactc tctcaactca gaaagcgtgt
1681 ttaagctctt tacagatggc aatgctgccg tgcttattta tcaacacgtc tcgaccggtg
1741 ttcaaccccg caataagatc actttcgatc tcgcctctgt tggtagcgaa attggtgata
1801 ttggtgatta tgccattatc gtttactcca aggacgatac actcagaggct gatgagatgg
1861 tgatccatgt agatgtagag catcagcgaa tcccttccgc atccgctctc ccggtctaga
1921 gttcaggtac cagtccgaag actttaaact actccccttg ctgccccgagc taagttggta
1981 gttacattac tctaaactgc ctgaagacgc taacggaggt tttctccggc gtacggggtg
2041 tccatccagc tagcggctaa aatggctcag ctcaccocgta aggtgggcca agtctttaca
2101 aaggcttgag gtactctata ctatctactc cggatagttg tgaagggccg cgtacaatgt
2161 acgcactcag cccgggtacc ccctctatga gggctccata ggagacca
  
```

//

PSV-B izolátum részleges RNS3 molekulája

LOCUS FM992670 1342 bp RNA linear VRL 24-NOV-2009
DEFINITION Peanut stunt virus partial cp gene for coat protein, isolate B,
genomic RNA.
ACCESSION FM992670
VERSION FM992670.1 GI:224492723
KEYWORDS .
SOURCE Peanut stunt virus
ORGANISM Peanut stunt virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage;
Bromoviridae;Cucumovirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Kiss,L., Balazs,E. and Salanki,K.
TITLE Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus
(PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of the
fourth taxonomic PSV subgroup
JOURNAL Eur. J. Plant Pathol. 125 (4), 671-677 (2009)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1342)
AUTHORS Kiss,L.
TITLE Direct Submission

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1342
/organism="Peanut stunt virus"
/mol_type="genomic RNA"
/serotype="IV. subgroup"
/isolate="B"
/isolation_source="Robinia pseudoacacia"
/db_xref="taxon:12313"
/country="Hungary:Budapest"
/collection_date="2008"
/identified_by="Laszlo Kiss, Katalin Salanki"
gene 404..1051
/gene="cp"
CDS 404..1051
/gene="cp"
/codon_start=1
/product="coat protein"
/protein_id="CAX30776.1"
/db_xref="GI:224492724"
/db_xref="GOA:C0MNT3"
/db_xref="InterPro:IPR000247"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:C0MNT3"

/translation="MASSGSGNGSRRPRRRGRRSSSSKVDAAHARELRALTAQLNRLVAIS
AAQMPSLDHPTFVSSRKCRPGYTYTSLDVRPTKTEKGHSSEVSLPVPVSEFPKKKVS
CVQLRLNPSPKFDSTVWVSLRKLSPGYSLTSESVFKLFTDGNAAVLIYQHVSTGVQPR
NKITFDLASVGTEIGDIGDYAIIIVYSKDDTLEADEMVIHVDVEHQRIPSASALPV"
mat_peptide 404..1048
/gene="cp"
/product="coat protein"

ORIGIN

```
1  aaaaagcgat  tggtagtgag  cacgaggaag  gtttaaattg  caacagaaag  ctaccttggg
61  aggaggtaag  taccacgccc  caggatatgg  ttagctcaaa  accgtcagtg  gttaacgggtg
121  ttgagtgttc  tgggattttg  ttgtaaatat  atgaatatta  tggatattgt  aaatatattt
181  acctatcgtg  tcatcgtggt  gtgtgttacg  atgatgctgg  cgtgatggaa  ggatacggac
241  ccacattcag  ttgctaaagc  cgtcgatata  ctttttgggt  tcaattccct  ttgggtcaatt
301  tcgcgttcct  ttagtctcta  gaatgcctat  cccgaactcc  cgtagtatta  tcgtatttgt
361  ttgtattgtc  tttacgttta  gtacgcgtca  accacagtgt  ttcattggcat  cttcaggatc
421  tggtaatggg  tctcgcgcgac  ctcgcagagg  gaggcgctct  tcgtcgaagg  tggacgctca
481  tgctagagag  ctccgcgctt  tgaccgctca  gctgaaccgt  ttggtagcca  tctcggctgc
541  ccagatgcca  agcctcgatc  atccaacctt  tgtttctagc  aggaagtgtc  gtccctgggta
601  cacgtacact  tcgttggatg  tccgaccgac  aaaaactgag  aagggccata  gttcgtcaga
661  ggtagttta  ccagttcccg  tatctgaatt  tccgaagaag  aaggtttcgt  gcgttcaact
721  cgggttgaac  ccgtcgccct  agttcgactc  cactgtgtgg  gtgtccctta  ggaaactttc
781  gcccggttac  tctctcactt  cggaaagcgt  gtttaagctc  tttacagacg  gcaatgctgc
841  cgtgcttata  tatcaacacg  tctcgaccgg  tgttcaacct  cgcaacaaga  tcactttcga
901  tctcgcctcc  gttggtaccg  aaattggtga  tattggcgat  tatgccatta  tcgtttattc
961  caaggacgat  acacttgagg  ctgatgagat  ggtgatccat  gtagatgtag  agcatcagcg
1021  aatcccttcc  gcatccgctc  tcccggctca  gagttcaggt  accagtccga  agactttaaa
1081  ctactcccct  ttgctgtggg  gagctaagtt  ggtagttata  ttactctaaa  ctgcctgaag
1141  acgctaaaacg  gagttttctc  cggcgtacgg  gttgtccatc  cagccagcgg  ctaaaatggt
1201  cagtctcacc  cgcaagggtg  gccgagtctt  tacaaaggct  cgagggtactc  tatactatct
1261  actccggata  gttgtgaagg  gctgcgtaca  acgtacgcgt  tcagcccggg  taccctccct
1321  atgagggctc  cataggagac  ca
```

//

PSV-Cs izolátum részleges RNS3 molekulája

LOCUS FM992665 1542 bp RNA linear VRL 24-NOV-2009
DEFINITION Peanut stunt virus partial cp gene for coat protein, isolate Cs, genomic RNA.
ACCESSION FM992665
VERSION FM992665.1 GI:224492713
KEYWORDS .
SOURCE Peanut stunt virus
ORGANISM Peanut stunt virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Bromoviridae; Cucumovirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Kiss, L., Balazs, E. and Salanki, K.
TITLE Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus (PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of the fourth taxonomic PSV subgroup
JOURNAL Eur. J. Plant Pathol. 125 (4), 671-677 (2009)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1542)
AUTHORS Kiss, L.
TITLE Direct Submission

FEATURES

	Location/Qualifiers
source	1..1542 /organism="Peanut stunt virus" /mol_type="genomic RNA" /serotype="IV. subgroup" /isolate="Cs" /isolation_source="Robinia pseudoacacia" /db_xref="taxon:12313" /country="Hungary:Mezocsat" /collection_date="2008" /identified_by="Laszlo Kiss, Katalin Salanki"
<u>gene</u>	408..1058 /gene="cp"
<u>CDS</u>	408..1058 /gene="cp" /codon_start=1 /product="coat protein" /protein_id="CAX30771.1" /db_xref="GI:224492714" /db_xref="GOA:C0MNS8" /db_xref="InterPro:IPR000247" /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:C0MNS8"
	/translation="MASSGSGNGSRRPRRRGRRSSSKVDAHARELRALTAQLNRLVAIS ATQMPSLDHPTFVSSRKCRPGYTYTSLDVRPTKTEKGHSFGQRLVLPAPVSEFPKPKKV SCVQLRLSPSPKFDSTVWVSLRKLSPGYSLTSESVFKLFTDGNAAVLIYQHVSTGVQP RNKITFDLASVGTEIGDIGDYAIIIVYSKDDTLEADEMVIHVDVEHQRI PSASALPV"
<u>mat_peptide</u>	408..1055 /gene="cp" /product="coat protein"

ORIGIN

```

1  attcagaagg cgattggtag tgggcacgag gaaggtttaa attgcaaaag aaagctacct
61  ttggaggagg taagtaccac gccccaggat gtgggttagct caaaaccgtc agtggttaac
121 ggtggtgagt gttctgggat tttggtgtaa atatgtgaat tttatgggat ttgtaaatat
181 atttacctat cgtgtcatcg tgttgtgtgt tacgatgatg ctggcgtgat ggaaggatac
241 ggaccacatc tcagttgcta aagccgtcga tatacctttt gggttcaatt ccctttggtc
301 aatttcgcgt tcctttagtc tctagaatgc ctatcccga a ctcccgtagt attatcgtat
361 ttgtttgtat tgtctttacg tttagtacgc gtcaaccaca gtgtttcatg gcatcttcag
421 gatctggtaa tggttctcgc cgacctcgca gagggaggcg ctcttcgtcg aagggtggacg
481 ctcatgctag agagctccgc gctttgaccg ctcaagctgaa ccgtttggtg gccatctcag
541 ctaccagatg gccaaagcctc gatcatccaa cctttgtttc tagcaggaag tgtcgtcctg
601 ggtacacgta cacttcggtg gatgtccgac cgacaaaaaac tgagaagggc catagtttcg
661 gtcagagggt agttttacca gctcccgtat ctgaatttcc gaagaagaag gtttcgtgcg
721 ttcaactccg gttgagcccg tcgcctaagt tcgactccac tgtgtgggtg tctcttagga
781 aactttcggc cggctactct ctcaactcgg aaagtgtggt taagctcttt acagatggca
841 atgctgccgt gcttatttat caacacgtct cgaccgggtg tcaacccccg aacaagatca
901 ctttcgatct cgcctccggt ggtaccgaaa ttggtgatat tgggtgattat gccattatcg
961 tttattccaa ggacgataca cttgaggctg atgagatggt gatccatgta gatgtagagc
1021 atcagcgaat cccttccgca tctgctctcc cggctagag ttcaggtaacc agtccgaaga
1081 ctttaaacta ctcccctttgc tgtgggagct aagttggtag ttatattact ctaaactgcc
1141 tgaagacgct aaacggaggt ttctccggcg tacgggttgt ccatccagcc agcggctaaa
1201 atggtcagtc tcacccgcaa ggtgggcca gtctttacaa aggcttgagg tactctatca
1261 ggtaccagtc cgaagacttt aaactactcc ctttgtgtgg gagctaagtt ggtagttata
1321 ttactctaaa ctgcctgaag acgctaaacg gagttttctc cggcgtacgg gttgtccatc
1381 cagccagcgg ctaaaatggt cagtctcacc cgcaagggtg gccaaagtct taaaaaggct
1441 tgaggctact tatactatct actccggata gttgtgaagg gtcgcgtaca atgtacgcac
1501 tcagcccggg taccctctct atgagggctc cataggagac ca

```

//

PSV-F izolátum részleges RNS3 molekulája

LOCUS FM992666 1346 bp RNA linear VRL 24-NOV-2009
DEFINITION Peanut stunt virus partial cp gene for coat protein, isolate F,
genomic RNA.
ACCESSION FM992666
VERSION FM992666.1 GI:224492715
KEYWORDS .
SOURCE Peanut stunt virus
ORGANISM Peanut stunt virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage;Bromoviridae;
Cucumovirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Kiss,L., Balazs,E. and Salanki,K.
TITLE Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus
(PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of
the fourth taxonomic PSV subgroup
JOURNAL Eur. J. Plant Pathol. 125 (4), 671-677 (2009)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1346)
AUTHORS Kiss,L.
TITLE Direct Submission

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1346
/organism="Peanut stunt virus"
/mol_type="genomic RNA"
/serotype="IV. subgroup"
/isolate="F"
/isolation_source="Robinia pseudoacacia"
/db_xref="taxon:12313"
/country="Hungary:Fuezesgyarmat"
/collection_date="2008"
/identified_by="Laszlo Kiss, Katalin Salanki"
gene 406..1056
/gene="cp"
CDS 406..1056
/gene="cp"
/codon_start=1
/product="coat protein"
/protein_id="CAX30772.1"
/db_xref="GI:224492716"
/db_xref="GOA:COMNS9"
/db_xref="InterPro:IPR000247"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:COMNS9"

/translation="MASSGSGNGSRRPRRRGRRSSSKVDAHARELRALTAQLNRLVAIS
AAQMPSLDHPTFVSSRKCRPGYTYTSLDVRPTKTGKGHSFGQRLFLPAPVSEFPKKKV
SCVQLRLNPSPKFDSTVWVSLRKLSPGYSLTSESVFKLFTDGNAAVLIYQHVSTGVQP
RNKITFDLASVGTEIGDIGDYAIIIVYSKDDTLEADEMVIHVDVEHQRIPSASALPV"
mat_peptide 406..1053
/gene="cp"
/product="coat protein"

ORIGIN

```
1  attcagaagg cgattggtag tgagcacgag gaaggtttaa attgcaaaag aaagctacct
61  ttggaggagg taagtaccac gccccaggat gtggttaact caaaaccgtc agtggttaac
121 ggtgttgagt gttctgggat tttgttgtaa atatatgtat tatggtaact gtaaataatat
181 ttacctatcg tgatcatcgtg ttgtgtgtta cgatgatgct ggcgtgatgg aaggatacgg
241 acccacattc agttgctaaa gccgtcgata taccttttgg gttcaattcc ctttgggtcaa
301 tttcgcgttc ctttagtctc tagaatgcct atcccgaact cccgtagtat tatcgtatct
361 gtttgtattg tctttacggt tagtacgagt caaccacagt gtttcatggc atcttcagga
421 tctggtaatg gttctcgccg acctcgcaga gggaggcgct cttcgtcgaa ggtggacgct
481 catgctagag agctccgccc tttgaccgct cagctgaacc gtttggtagc catctcagct
541 gccagatgc caagcctcga tcatccaacc tttgtttcta gcaggaagtg tcgtcctggg
601 tacacgtaca cttcgttgga tgtccgaccg acaaaaaactg ggaagggcca tagtttcggt
661 cagaggttat ttttaccagc tcccgtatct gaatttccga agaagaaggt ttcgtgcggt
721 caactccggt tgaaccgctc gcctaagttc gactccactg tgtgggtgct tcttaggaaa
781 ctttcgcccg gctactctct cacttcggaa agcgtgttta agctctttac agatggcaat
841 gctgccgtgc ttatttatca acacgtctcg accggtgttc aaccccgcaa caagatcact
901 ttcgatctcg cctccgttgg taccgaaatt ggtgatattg gtgattatgc cattatcgtt
961 tattccaagg acgatacact tgaggctgat gagatggtga tccatgtaga tgtagagcat
1021 cagcgaatcc cttccgcac cgtctctccc gtctagagtt caggtaaccag tccgaagact
1081 ttaaactact ccctttgctg tggggagcta agttggtagt tatattactc taaactgcct
1141 gaagacgcta aacggagttt tctccggcgt acgggttgct catccagcca gcggctaaaa
1201 tggtcagtct caccgcgag gtgggccaag tctttacaaa ggcttgaggt actctatact
1261 atctactccg gatagttgtg aagggccgcg tacaatgtac gcactcagcc cgggtacccc
1321 ctctatgagg gctccatagg agacca
```

//

PSV-Ljb izolátum részleges RNS3 molekulája

LOCUS FM992667 1346 bp RNA linear VRL 24-NOV-2009
DEFINITION Peanut stunt virus partial cp gene for coat protein, isolate Ljb,
genomic RNA.
ACCESSION FM992667
VERSION FM992667.1 GI:224492717
KEYWORDS .
SOURCE Peanut stunt virus
ORGANISM Peanut stunt virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage;
Bromoviridae;
Cucumovirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Kiss,L., Balazs,E. and Salanki,K.
TITLE Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus
(PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of
the fourth taxonomic PSV subgroup
JOURNAL Eur. J. Plant Pathol. 125 (4), 671-677 (2009)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1346)
AUTHORS Kiss,L.
TITLE Direct Submission

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1346
/organism="Peanut stunt virus"
/mol_type="genomic RNA"
/serotype="IV. subgroup"
/isolate="Ljb"
/isolation_source="Robinia pseudoacacia"
/db_xref="taxon:12313"
/country="Slovenia:Ljubljana"
/collection_date="2008"
/identified_by="Laszlo Kiss, Katalin Salanki"
gene 406..1056
/gene="cp"
CDS 406..1056
/gene="cp"
/codon_start=1
/product="coat protein"
/protein_id="CAX30773.1"
/db_xref="GI:224492718"
/db_xref="GOA:COMNT0"
/db_xref="InterPro:IPR000247"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:COMNT0"

/translation="MASSGSGNGSRRPRRRSSSKVDAHARELRALTAQLNRLVAIS
AAQMPSLDHPTFVSSRKCRPGYTYTSLDVRPTKTGKGFHSGQRLFLPAPVSEFPKKKV
SCVQLRLNPSPKFDSTVWVSFRKLSPGYSLTSESVFKLFDTGNAAVLIYQHVSTGVQP
RNKITFDLASVGTIEIGDIGDYAIIIVYSKDDTLEADEMVIHVVDVEHQRIPSASALPV"
mat_peptide 406..1053
/gene="cp"
/product="coat protein"

ORIGIN

```
1 attcaaaaag cgattggtag tgagcacgag gaaggtttaa attgcaaaaag aaagctacct
61 ttggaggagg taagtaccac gccccaggat gtgggttagct caaaaccgtc agtgggtaac
121 ggtggtgagt gttctgggat tttgttgtaa atatatgtat tatggtagctt gtaaataatat
181 ttacctatcg tgtcatcgtg ttgtgtgtaa cgatgatgct ggcgtgatgg aaggacacgg
241 acccacattc agttgctaaa gccgtcgata taccttttgg gttcaattcc ctttgggtcaa
301 tttcgcggtc ctttagtctc tagaatgcct atcccgaact cccgtagtat tatcgtattt
361 gtttgtattg tctttacggt tagtacgcgt caaccacagt gttttatggc atcttcagga
421 tctggtaacg gttctcgccg acctcgcaga gggaggcgct cttcgtcgaa ggtggacgct
481 catgctagag agctccgcg cttgactgct cagctgaacc gtttggtagc catctcagct
541 gccagatgc caagcctcga tcatccaacc tttgtttcta gcaggaagtg tcgtcctggg
601 tacacgtaca cttcgttggg tgtccgaccg acaaaaactg ggaagggcca tagtttcggt
661 cagaggttat ttttaccagc tcccgtatct gaatttcoga agaagaaggt ttcgtgcggt
721 caactccggt tgaaccgctc gcctaagttc gactccactg tgtgggtgct ttttaggaaa
781 ctttcgcccg gctactctct cacttcggaa agcgtgttta agctctttac agatggcaat
841 gctgccgtgc ttatttatca acacgtctcg accggtgttc aaccccgcaa caagatcact
901 ttcgatctcg cctccggtgg taccgaaatt ggtgatattg gtgattatgc cattatcgtt
961 tattccaagg acgatacact tgaggctgat gagatggtga tccatgtaga tgtagagcat
1021 cagcgaatcc cttccgcac tgcctctccc gtctagagtt caggtaccag tccgaagact
1081 ttaaactact ccccttgctg tggggagcta agttggtagt tatattactc taaactgctt
1141 gaagacgcta aacggagttt tctccggcgt acgggttgct catccagcca gcggctaaaa
1201 tggtcagtct caccgcgaag gtgggccaag tctttacaaa ggcttgaggt actctatact
1261 atctactccg gatagttgtg aagggcgcg tacaatgtac gcactcagcc cgggtacccc
1321 ctctatgagg gctccatagg agacca
```

//

PSV-Rp2 izolátum részleges RNS3 molekulája

LOCUS AM980675 1347 bp RNA linear VRL 24-NOV-2009
DEFINITION Peanut stunt virus cp gene for coat protein, isolate Rp2, genomic RNA.
ACCESSION AM980675
VERSION AM980675.2 GI:222114775
SOURCE Peanut stunt virus
ORGANISM Peanut stunt virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage Bromoviridae; Cucumovirus.

REFERENCE 1
AUTHORS Kiss, L., Balazs, E. and Salanki, K.
TITLE Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus (PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of the fourth taxonomic PSV subgroup
JOURNAL Eur. J. Plant Pathol. 125 (4), 671-677 (2009)

REFERENCE 2
AUTHORS Kiss, L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (03-APR-2008) Kiss L., Department of Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Budapest, Menesi u. 44., H-1118, HUNGARY

REMARK revised by [3]

REFERENCE 3 (bases 1 to 1347)
AUTHORS Kiss, L.
TITLE Direct Submission

COMMENT On Jan 28, 2009 this sequence version replaced gi:172087942.

FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1347
/organism="Peanut stunt virus"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="Rp2"
/host="Robinia pseudoacacia"
/db_xref="taxon:12313"
/country="Hungary:Godollo"
/collection_date="2007"
/collected_by="Laszlo Kiss"

gene 408..1058
/gene="cp"

CDS 408..1058
/gene="cp"
/codon_start=1
/product="coat protein"
/protein_id="CAQ35207.1"
/db_xref="GI:172087943"
/db_xref="GOA:B1VCU2"
/db_xref="InterPro:IPR000247"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:B1VCU2"

/translation="MASSGSGNGSRRPRRGRSSSKVDAHARELRALTAQLNRLVAIS
AAQMPSLDHPTFVSSRKRCPGYTYTSLDVRPTKTEKGHSFGQRLVLPVPVSEFPKPKKV
SCVQLRLNPSPKFDSTVWVSLRKLSPGYSLTSESVFKLFTDGNAAVLIYQHVSTGVQP
RNKITFDLASVGTEIGDIGDYAIIVYSKDDTLEAEMVIHVDVEHQRIPSASALPV"
mat_peptide 408..1055
/gene="cp"
/product="coat protein"

ORIGIN

```
1 attcaaaaag cgattggtag tgagcacgag gaaggtttaa attgcaatag aaagctacct
61 ttggaggagg taagtaccac gccccaggat atggttagct caaaaaccgtc agtgggtaac
121 ggtggtgagt gttctgggat tttggtgtaa atatatgaat attatgggat ttgtaaataat
181 atttacctat cgtgtcatcg tgttgtgtgt tacgatgatg ctggcgtgat ggaaggatac
241 ggaccacatc tcagttgcta aagccgtcga tatacctttt gggttcaatt ccctctggtc
301 aatttcgctg tcctttagtc tctagaatgc ctatcccga a ctcccgtagt actatcgtat
361 ttgtttgatg tgtctctacg tttagtacgc gtcaaccaca gtgtttgatg gcatcttcag
421 gatctggtaa cggttcccgc cgacctcgca gagggaggcg ctctcgtct aagggtggatg
481 ctcatgctag agagctccgc gctttgactg ctcaactgaa ccgtttggtg gccatctcgg
541 ctgcccagat gccaaagcctc gatcatccaa cctttgtttc tagcaggaag tgcctcctg
601 ggtacacgta cacttcggtg gatgtccgac cgacaaaaaac tgagaagggc catagtttcg
661 gtcagagggt agttttacca gttcccgtat ctgaatttcc gaagaagaag gtttcgtgcg
721 ttcagctccg gttgaaccgg tcgcctaagt tcgactccac tgtgtgggtg tcccttagga
781 aactttcggc cggctactct ctcaactcgg aaagtgtggt taagctcttt acagatggca
841 atgctgccgt gcttatttat caacacgtct cgaccgggtg tcaacccccgc aacaagatca
901 ctttcgatct cgcctccggt ggtaccgaaa ttggtgatat tgggtgattat gccattatcg
961 tttattccaa ggacgataca cttgaggctg atgagatggt gatccacgta gatgtagagc
1021 atcagcgaat cccttccgca tccgctctcc cggctagag ttcagggtact agtccgaaga
1081 ctttaaacta ctcccctttct gtggggagct aagttggtag ttatattact ctaaactgcc
1141 tgaagacgct aaacgaagtt ttcttcggcg tacgggttgt ccatccagcc agcgggctaaa
1201 atggtcagtc tcacccgcaa ggtgagccaa gtctttacaa aggcttgagg tactctatac
1261 tatctactcc ggatggttgt gaagggccgc gtacaatgta cgcactcagc ccgggtacct
1321 cctctatgag ggctccatag gagacca
```

//

PSV-Sz izolátum részleges RNS3 molekulája

LOCUS FM992671 1345 bp RNA linear VRL 24-NOV-2009

DEFINITION Peanut stunt virus partial cp gene for coat protein, isolate Sz, genomic RNA.

ACCESSION FM992671

VERSION FM992671.1 GI:224492725

SOURCE Peanut stunt virus

ORGANISM Peanut stunt virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage;Bromoviridae; Cucumovirus.

REFERENCE 1

AUTHORS Kiss,L., Balazs,E. and Salanki,K.

TITLE Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus (PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of the fourth taxonomic PSV subgroup

JOURNAL Eur. J. Plant Pathol. 125 (4), 671-677 (2009)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1345)

AUTHORS Kiss,L.

TITLE Direct Submission

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1345
/organism="Peanut stunt virus"
/mol_type="genomic RNA"
/serotype="IV. subgroup"
/isolate="Sz"
/isolation_source="Robinia pseudoacacia"
/db_xref="taxon:12313"
/country="Hungary:Szeghalom"
/collection_date="2008"
/identified_by="Laszlo Kiss, Katalin Salanki"

gene 406..1056
/gene="cp"

CDS 406..1056
/gene="cp"
/codon_start=1
/product="coat protein"
/protein_id="CAX30777.1"
/db_xref="GI:224492726"
/db_xref="GOA:C0MNT4"
/db_xref="InterPro:IPR000247"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:C0MNT4"

/translation="MASSGSGNGSRRPRRGRSSSKVDAHARELRALTAQLNRLVAIS
AAQMPSLDQPTFVSSRKCRPGYTYTSLDVRPTKTEKGHSFGQRLVLPAPVSEFPKKKV
SCVQLRLNPSPKFDSTVWVSFRKLSPGYSLTSESVFKLFTDGNAAVLIYQHVSTGVQP
RNKITFDLASVGTGTEIGDIGDYAIIIVYSKDDTLEAEMVIHVDVEHQRIPIPSASALPV/"

mat_peptide 406..1053
/gene="cp"
/product="coat protein"

ORIGIN

```
1 attcaaaaag cgattggtag tgagcacgag gaaggtttaa attgcaaaaag aaagctacct
61 ttggaggagg taagtaccac gccccaggat gtggttaact caaaaccgtc agtgggtaac
121 ggtggtgagt gttctgggat tttgttgtaa atatatgtat tatggtagct gtaaataat
181 ttacctatcg tgtcatcgtg ttgtgtgtaa cgatgatgct ggcgtgatgg aaggatacgg
241 acccacattc agttgctaaa gccgtcgata taccttttgg gttcaattcc ctttgggcaa
301 ttcgcggttc ctttagtctc tagaatgcct atcccgaact cccgtagtat tatcgtatct
361 gttcgtattg tctttacggt tagtacgagt caaccacagt gttcatggc atcttcagga
421 tctggtaatg gttctcgccg acctcgcaga gggaggcgct cttcgtcgaa ggtggacgct
481 catgctagag aactccgcg cttgaccgct cagctgaacc gtttggtagc catctcagct
541 gccagatgc caagcctcga tcaaccaacc tttgtttcta gcaggaagtg tcgtcctggg
601 tacacgtaca cttcgttgga tgtccgaccg acaaaaactg aaaagggcca tagtttcggt
661 cagagggttag ttttaccagc tcccgtatct gaatttcoga agaagaaggt ttcgtgcggt
721 caactccggt tgaaccgct gcctaagttc gactccactg tgtgggtgct ttttaggaaa
781 ctttcgcccg gctactctct cacttcggaa agcgtgttta agctctttac agatggcaat
841 gctgccgtgc ttatttatca acacgtctcg accggtgttc aaccccgcaa caagatcact
901 ttcgatctcg cctccggtgg taccgaaatt ggtgatattg gtgattatgc cattatcgtt
961 tattccaagg acgatacact tgaggctgat gagatggtga tccatgtaga tgtagagcat
1021 cagcgaatcc cttccgcatc tgctctcccg gtctagagtt caggtagcag tccgaagact
1081 ttaaactact ccccttgctg tgggagctaa gttggtagtt atattactct aaactgacctg
1141 aagacgctaa acggagtttt ctccggcgta cgggttgctc atccagccag cggctaaaat
1201 ggtcagtctc acccgcgagg tgggccaagt ctttaciaaag gcttgaggta ctctatacta
1261 tctactccgg atagttgtga agggccgctg acaatgtacg cactcagccc gggtagcccc
1321 tctatgaggg ctccatagga gacca
```

//

PSV-T1 izolátum részleges RNS3 molekulája

LOCUS FM992669 1345 bp RNA linear VRL 24-NOV-2009
DEFINITION Peanut stunt virus partial cp gene for coat protein, isolate T1, genomic RNA.
ACCESSION FM992669
VERSION FM992669.1 GI:224492721
SOURCE Peanut stunt virus
ORGANISM Peanut stunt virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage;Bromoviridae; Cucumovirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Kiss,L., Balazs,E. and Salanki,K.
TITLE Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus (PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of the fourth taxonomic PSV subgroup
JOURNAL Eur. J. Plant Pathol. 125 (4), 671-677 (2009)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1345)
AUTHORS Kiss,L.
TITLE Direct Submission

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1345
/organism="Peanut stunt virus"
/mol_type="genomic RNA"
/serotype="IV. subgroup"
/isolate="T1"
/isolation_source="Robinia pseudoacacia"
/db_xref="taxon:12313"
/country="Hungary:Tihany"
/collection_date="2008"
/identified_by="Laszlo Kiss, Katalin Salanki"
gene 406..1056
/gene="cp"
CDS 406..1056
/gene="cp"
/codon_start=1
/product="coat protein"
/protein_id="CAX30775.1"
/db_xref="GI:224492722"
/db_xref="GOA:C0MNT2"
/db_xref="InterPro:IPR000247"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:C0MNT2"

/translation="MASSGSGNGSRRPRRGRSSSKVDAHARELRALTAQLNRFVA
AAQMPSLDHPTFVSSRKCRPGYTYTSLDVRPTKTEKGHSSGQRLVLPAPVSEFPKKKV
SCVQLRLNPSPKFDSTVWVSLRKLSPGYSLTSESVFKLFDTGNAAVLIYQHVSTGVQP
RNKITFDLASVGTEIGDIGDYVLIIVYSKDDTLEADEMVIHVDVEHQRI PSASALPV"
mat_peptide 406..1053
/gene="cp"
/product="coat protein"

ORIGIN


```

1  attcagaaag cgattggtag tgagcacgag gaaggtttaa attgcaaaag aaagctacct
61  ttggagaagg taagtaccac gccccaggat gtgggttagct caaaaccgtc agtgggtaac
121 ggtggtgagt gttctgggat tttggtgtaa atatatgtat tatgggtactc gtaaataatat
181 ttacctatcg tgtcatcgtg ttgtgtgtaa cgatgatgct ggcgtgatgg aaggatacgg
241 acccacattc agttgctaaa gccgtcgata taccttttgg gttcaattcc ctttgggcaa
301 tttcgcgttc ctttagtctc tagaatgcct atcccgaact cccgtagtat tatcgtattt
361 gtttgtattg tctttacggt taatacgcgt caaccacagt gtttcatggc atcttcagga
421 tctggtaatg gttctcgccg acctcgcaga gggaggcgct cttcgtcgaa ggtggacgct
481 catgctagag agctccgcgc tttgaccgct cagctgaacc gttttgtagc catctcagct
541 gccagatgc caagcctcga tcatccaacc tttgtttcta gcaggaagtg tcgtcctggg
601 tacacgtaca cttcgttggg tgtccgaccg acaaaaactg aaaagggcca tagttccggt
661 cagagggttag ttttaccagc tcccgtatct gaatttccga agaagaagg ttcgtgcggt
721 caactccggt tgaaccgcgc gcctaagttc gactccactg tgtgggtgtc tcttaggaaa
781 ctttcgcccg gctactctct cacttcggaa agcgtgttta agctctttac agatggcaat
841 gctgccgtgc ttatttatca acacgtctcg accggtgttc aaccccgcaa caagatcact
901 ttcgatctcg cctccggttg taccgaaatt ggtgatattg gtgattatgt cattatcgtt
961 tattccaagg acgatacact tgaggctgat gagatggtga tccatgtaga tgtagagcat
1021 cagcgaatcc cttccgcac tgcctccccg gtctagagtt caggtaaccag tccgaagact
1081 ttaaactact ccctcgctgt ggggagctaa gttggtagtt atattactct aaactgcctg
1141 aagacgctaa acggagtttt ctccggcgta cgggttgtcc atccagccag cggctaaaaat
1201 ggtcagtctc acccgcaagg tgggccaagt ctttaciaaag gcttgaggta ctctatacta
1261 tctactccgg atagttgtga agggccgcgt acaatgtacg cactcagccc gggtagcccc
1321 tctatgaggg ctccatagga gacca

```

//

PSV-T2 izolátum részleges RNS3 molekulája

LOCUS FM992668 1351 bp RNA linear VRL 24-NOV-2009
DEFINITION Peanut stunt virus partial cp gene for coat protein, isolate T2, genomic RNA.
ACCESSION FM992668
VERSION FM992668.1 GI:224492719
SOURCE Peanut stunt virus
ORGANISM Peanut stunt virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage;Bromoviridae; Cucumovirus.

REFERENCE 1
AUTHORS Kiss,L., Balazs,E. and Salanki,K.
TITLE Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus (PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of the fourth taxonomic PSV subgroup
JOURNAL Eur. J. Plant Pathol. 125 (4), 671-677 (2009)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1351)
AUTHORS Kiss,L.
TITLE Direct Submission

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1351
/organism="Peanut stunt virus"
/mol_type="genomic RNA"
/serotype="IV. subgroup"
/isolate="T1"
/isolation_source="Robinia pseudoacacia"
/db_xref="taxon:12313"
/country="Hungary:Tihany"
/collection_date="2008"
/identified_by="Laszlo Kiss, Katalin Salanki"
gene 411..1061
/gene="cp"
CDS 411..1061
/gene="cp"
/codon_start=1
/product="coat protein"
/protein_id="CAX30774.1"
/db_xref="GI:224492720"
/db_xref="GOA:COMNT1"
/db_xref="InterPro:IPR000247"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:COMNT1"

/Translation="MASSGSGNGSRRPRRGRSSSKVDAHARELRALTAQLNRLVAIS
AAQMPSLDHPTFVSSRKCRLLGYTYTSLDVRPTKTEKGHSSGQRLVLPVPYLNFRRRKF
RAFNSGSNPSPKFDSTVWVSLRKLSPGYSLTSESVFKLF'TDGNAAVLIYQHVSTGVQP
RNKITFDLASVGT EIGDIGDYAIIIVYSKDDTLEADEMVIHVDVEHQRI PSASALPV"
mat_peptide 411..1058
/gene="cp"
/product="coat protein"

ORIGIN

```
1  gtgattcaga aagcgattgg tagtgagcac gaggaagggt taaattgcaa tagaaagcta
61  cctttggaga aggtaagtac cacgccccag gatatgggta gctcaaaaacc gtcagtgggt
121 aacgggtgtg agtgttctgg gattttgttg taaatatatg tatggtatgg cattgtaaat
181 atatttacct atcgtgtcat cgtgttgtgt gttacgatga tgctggcgtg atggaaggat
241 acggacccac attcagttgc taaagccgtc gatatacctt ttgggttcaa ttccctttgg
301 tcaatttcgc gttcccttta gtttctagaa tgcctatccc gaactcccgt agtattatcg
361 tatttgttg tattgtcttt acgtttagta cgcgtcaacc acagtgttcc atggcatctt
421 caggatctgg taatggttct cgtcgacctc gtagaggaag gcgctcttcg tcgaaggagg
481 acgctcatgc tagagagctc cgcgctttga ccgctcagct gaaccgtttg gtggccatct
541 cggctgceca gatgccaagc ctcgatcadc cgacctttgt ttctagcagg aagtgtcgtc
601 ttgggtacac gtacacttcg ttggatgtcc gaccgacaaa aactgaaaag ggccatagtt
661 ccggtcaaag gttagtttta ccagttccgt atctgaattt ccgaagaagg aagtttcgtg
721 cgttcaactc cggttcgaac ccgtcgacta agttcgactc caccgtgtgg gtgtccctta
781 ggaaactttc gcccggtcac tctctcactt cggaaagtgt gtttaagctc ttcacagatg
841 gcaatgctgc cgtgcttatt tatcaacacg tctcgaccgg tgttcaaccc cgcaacaaaa
901 tcactttcga tctcgctcc gttggtaccg aaattggtga tattggcgat tatgccatta
961 tcgtttattc caaggacgat acacttgagg ctgatgagat ggtgatccat gtagatgtag
1021 agcatcagcg aatcccttcc gcatctgctc tcccggctca gagttcaggt accagtccga
1081 agactttaa ctactcccct tgttgtgggg agctaagttg gtagttacat tactctaaac
1141 tgctgaaga cgctaaacgg agttttctcc ggcgtacggg ttgtccatcc tgctagcggc
1201 aaaaatggtc agtctcacc ccaaggtggg ccaagtcttt acaaaggctt gaggtactct
1261 atactatcta ctccggatag ttgtgaaggg ccgcgtacaa tgtacgcact cagcccgggt
1321 accccccta tgagggtcc ataggagacc a
```

//

PSV-Tev izolátum részleges RNS3 molekulája

LOCUS FM992672 1349 bp RNA linear VRL 24-NOV-2009
DEFINITION Peanut stunt virus partial cp gene for coat protein, isolate Tev, genomic RNA.
ACCESSION FM992672
VERSION FM992672.1 GI:224492727
SOURCE Peanut stunt virus
ORGANISM Peanut stunt virus
Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage;Bromoviridae; Cucumovirus.
REFERENCE 1
AUTHORS Kiss,L., Balazs,E. and Salanki,K.
TITLE Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus (PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of the fourth taxonomic PSV subgroup
JOURNAL Eur. J. Plant Pathol. 125 (4), 671-677 (2009)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1349)
AUTHORS Kiss,L.
TITLE Direct Submission

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1349
/organism="Peanut stunt virus"
/mol_type="genomic RNA"
/serotype="IV. subgroup"
/isolate="Tev"
/isolation_source="Robinia pseudoacacia"
/db_xref="taxon:12313"
/country="Hungary:Tevel"
/collection_date="2008"
/identified_by="Laszlo Kiss, Katalin Salanki"
gene 408..1058
/gene="cp"
CDS 408..1058
/gene="cp"
/codon_start=1
/product="coat protein"
/protein_id="CAX30778.1"
/db_xref="GI:224492728"
/db_xref="GOA:C0MNT5"
/db_xref="InterPro:IPR000247"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:C0MNT5"
0
/translation="MASPGSGNGSRRPRRGRSSSKVDAHARELRALTAQLNRLVAIS
AAQMPSLDHPTFVSSRKCRPGYTYTSLDVRPTKTEKGHSFGQRLVLPVPVSEFPKPKKV
SCVQLRLNPSPKFDSTVWVSLRKLSPGYSLTSESVFKLFTDGNAAVLIYQHVSTGVQP
RNKITFDLASVGTEIGDIGDYAIIIVYSKDDTLEADEMVIHVDVEHQRIPSASALPV"
mat_peptide 408..1055
/gene="cp"
/product="coat protein"

ORIGIN

```
1 attcaaaaag cgattggtag tgagcacgag gaaggtttaa attgcaatag aaagctacct
61 ttggaggagg taagtaccac gccccaggat atggttagct caaaaaccgtc agtgggtaac
121 ggtggtgggt gttctgggat tttggtgtaa atatatgaat attatgggat ttgtaaataat
181 atttacctat cgtgtcatcg tgttgtgtgt tacgatgatg ctggcgatg ggaaggatac
241 ggacccacgt tcagttgcta aagccgtcga tatacctttt gggttcaatt ccctttggtc
301 aatttcgctg ccctttagtc tctagaatgc ctatcccga ctcccgtagt attatcgtat
361 ttgtttgat tgtctttacg tttagtacgc gtcaaccaca gtgttttatg gcatctccag
421 gatctggtaa cggttctcgt cgacctcgtg gagggaggcg ctcttcgtct aagggtggacg
481 ctcatgctag agagctccgc gctttgaccg ctcagctgaa ccgtttggtg gccatctcgg
541 ctgcccagat gccaaagcctc gatcatccaa cctttgtttc tagcaggaag tgcgtcctg
601 ggtacacgta cacttcgttg gatgtccgac cgacaaaaac tgaaaagggc catagtttcg
661 gtcagagggt agttttacca gttcccgtat ctgaatttcc gaagaaaaaa gtttcgtgcg
721 ttcaactccg gttgaatccg tcgcctaagt tcgactccac tgtgtgggtg tcccttagga
781 aactttcacc cggctactct ctcacttcgg aaagtgtggt taagctcttt acagatggca
841 atgctgccgt gcttatttat caacacgtct cgaccgggtg tcaacccccg aataagatca
901 ctttcgatct cgcctccggt ggtaccgaaa ttggtgatat tgggtgattat gccattatcg
961 tttactcaa ggacgataca ctcgaggctg atgagatggt gatccatgct gatgtagagc
1021 atcagcgaat cccttccgca tccgctctcc cggctagag ttcaggtaacc agtccgaaga
1081 ctttaaacta ctccccctt gctgcggggag ctaagttggt agttacatta ctctaaactg
1141 cctgaagacg ctaaaccggag ttttctccgg cgtacgggtt gtccatccag ccagcggcta
1201 aatggtcag tctcaccctg aaggtagacc aagtctttac aaaggcttga ggtactctat
1261 actatctact ccggatagtt gtgaagggcc gcgtacaatg tacgcactca gcccgggtac
1321 cccccctatg agggctccat aggagacca
```

//

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek **Dr. Salánki Katalinnak** és **Dr. Balázs Ervinnek**, hogy nagy türelemmel tanítottak a molekuláris virológia tudományára és megteremtették a kutatáshoz szükséges anyagi és technikai feltételeket.

Köszönettel tartozom **Dr. Palkovics Lászlónak**, tanszékvezetőmnek, aki mindvégig lehetőséget teremtett a nyugodt szakmai munkához.

Köszönöm **Dr. Kiss György Botondnak**, hogy munkámat az általa vezetett Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban végezhettem.

Szintén hálás vagyok **Dr. Salamon Pálnak**, aki a PSV-Rp izolátumot bocsátotta rendelkezésünkre és **Dr. Beczner Juditnak**, hogy, **Dr. Beczner László** hagyatékába betekintést nyerhettünk.

Külön köszönöm **Koósné Dr. Szathmáry Erzsébetnek**, **Nádudvariné Novák Júliának**, **Kálai és Nemes Katáknak**, **Dr. Bukovinszky Ágnesnek** és a BCE Növénykórtani Tanszék, valamint az MBK valamennyi volt és jelenlegi munkatársának segítőkészségét és nagyszerű Barátságát.

Jelen dolgozat az OTKA T048683, az OTKA K75168 és az OTKA TS61023 Tudományos Iskolák pályázatok támogatásával jött létre.