

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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

## 1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A vírusok gazdasági jelentősége több szempontból is meghatározó. Mivel a vírusfertőzött növény nem gyógyítható, ezért a védekezés elsődleges módja a megelőzés. Gazdanövényenként a tünetek meglehetősen eltérhetnek, sőt gyakran tünetmentesen vannak jelen a növényekben. A kórokozók pontos azonosításához legalább a részleges nukleinsav sorrend ismerete szükséges, amely alapján már számos adat áll birtokunkban a vírus fajtát, 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 a pillangósvirágú növényeken.

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

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 gazdanövénykór és tünettani vizsgálata.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1. 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, enyhe mozaik és levél deformáció tüneteket mutató fehér akác növényekről gyűjtöttük 2007 és 2008 években (1. táblázat). Az izolátumokat *C. quinoa* növényen történt passzálást követően *N. benthamiana*. teszt növényeken szaporítottuk fel a további vizsgálatok elvégzéséhez.

#### 1. 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

### 2.2. Gazdanövénykör vizsgálatok

A vizsgált PSV izolátumokkal a természetes és kísérletes gazdanövények közül 5 növény család 16 fajtát fertőztük (2. táblázat). Minden esetben 3–8 növényt fertőztünk 2–8 leveles állapotban. 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. A Northern blot analízishez White és Kaper (1989) eljárásának alkalmazásával kivont teljes nukleinsav tartalmú mintákat formaldehid és formamid tartalmú pufferben denaturáltuk, majd szintén formaldehid tartalmú 1%-os agaróz gélben elektroforézissel frakcionáltuk. A nukleinsavakat Hybond-N membránra vittük át, majd UV fényel a membránhoz kötöttük.

## 2. 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.

### 2.3. Molekuláris és bioinformatikai vizsgálatok

#### 2.3.1. A PSV-Rp törzs cDNS klónjának előállítás

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. Az első szál cDNS-t ennek megfelelően az ellentétes (komplementer) nukleotid sorrendű oligo dT primerrel indítottuk. A második szál cDNS készítése Gubler és Hoffman (1983) által leírt ribonukleáz H és DNS polimeráz I jelenlétében zajlott. A kapott cDNS szakaszokat pBluescriptII SK+ fágemid klónozó vektorba ligáltuk. A cDNS klónok felszaporítását *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  és 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 segítségével történt. A meghatározáshoz az általunk tervezett RNS1-(486–513 nt), RNS2-(257–276nt), RNS3-(269–288nt) vírusspecifikus antiszensz primereket használtuk.

A valós 5' és 3' végek ismeretében mindhárom vírus RNS esetében a teljes szál cDNS készítést a PSV123–3'-*Pst*I oligonukleotid segítségével indítottuk el. A szintézist M-MuLV reverz transzkriptázzal végeztük.

A keletkezett kettősszalú 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, közös reakcióban szaporítsuk fel őket. Az RNS3 esetében a PSV3-T7-*Bam*HI indítószekvenciát alkalmaztuk a molekula sokszorosítására. A PCR során az említett 5' és egységesen a cDNS készítésnél használt 3' primerek segítségével *Taq* DNS polimeráz enzim jelenlétében felszaporítottuk a cDNS molekulákat. A reakció az RNS1 és RNS2 esetében két fázisban ment végbe. Az RNS3 szintézise során a reakció egy fázisban 30 ciklus alatt történt. A kapott méret specifikus PCR termékeket 1%-os agaróz gélen detektáltuk, majd tisztítottuk (High Pure Purification Kit). A cDNS molekulákat *Bam*HI és *Pst*I restrikciós endonukleázokkal hasítottuk, majd az ugyanezen enzimekkel vágott pBluescriptII SK+ vektorba ligáltuk. Az elkészült PSV-Rp RNS1, RNS2, RNS3 klónokat az *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  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.

### **2.3.2. PSV izolátumok részleges cDNS klónjainak előállítása**

A további 9 vizsgált PSV izolátum esetében fertőzött *N. benthamiana* növényekből teljes nukleinsav kivonást és reverz transzkripciót követően PCR technika segítségével felszaporítottuk az RNS3 egy meghatározott 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' és PSV123-*Pst*I primerpárt használtuk. A heteroduplex specifikus szakaszok megsokszorozásához PCR technikát alkalmaztunk. A kapott PCR termékeket 1%-os agaróz gélen detektáltuk, majd tisztítottuk (High Pure Purification Kit, Roche). A DNS mintákat pGEM-T-Easy 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.

## **2.4. Bioinformatikai vizsgálatok**

### **2.4.1. 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.

### **2.4.2. 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.

### 3. EREDMÉNYEK

#### 3.1. A PSV-Rp cDNS klónjainak molekuláris jellemzése

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 hosszúságának bizonyult, 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 átiródó 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. A C-terminális részében helikáz motívumok, illetve az 540–555. aminosavak között prolin gazdag régió figyelhető meg.

Az RNS2-ről átiródó 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) Mg<sup>2+</sup> 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 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 szupercsaládra jellemző 33 aa hosszú MSVPQVLCAITRTVMANAEGSIRIYLADLGDDE konzervált régiót, amely a PSV-Rp esetében 8 aminosavban térhet el a többi PSV izolátumtól (aláhúzott aa-k).

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.

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 régióinak szekvencia adataival. 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: 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 tekintetében (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.

### **3.2. A PSV-Rp filogenetikai és rekombinációs elemzése**

A cucumovírus izolátumok génjeinek nukleotid sorrendjét alapul véve filogenetikai törzsfákat készítettünk. 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.

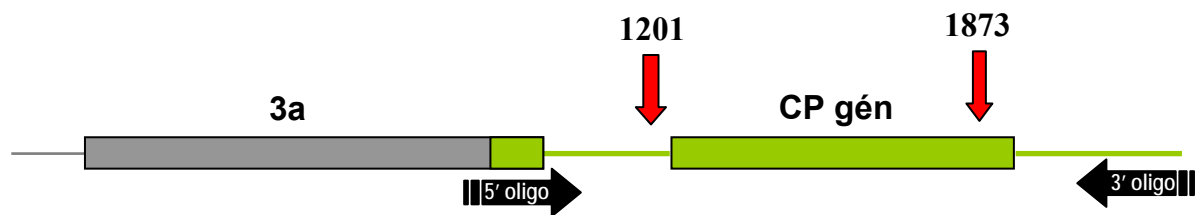
Ennek tisztázására a GenBank-ban elérhető teljes PSV RNS3 szekvenciákon rekombinációs vizsgálatokat végeztünk. Az elemzés során 2 feltételezett rekombinációs, más néven forró pontot (hot spot) határoztunk meg 95%-os szignifikancia szinten az 1199. nt és az 1873. nt körüli régióban. Az első forró pont 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. 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.

### 3.3 A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok molekuláris jellemzése

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 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) figyeltük 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 (1.ábra).



1. ábra. A PSV RNS3 molekula

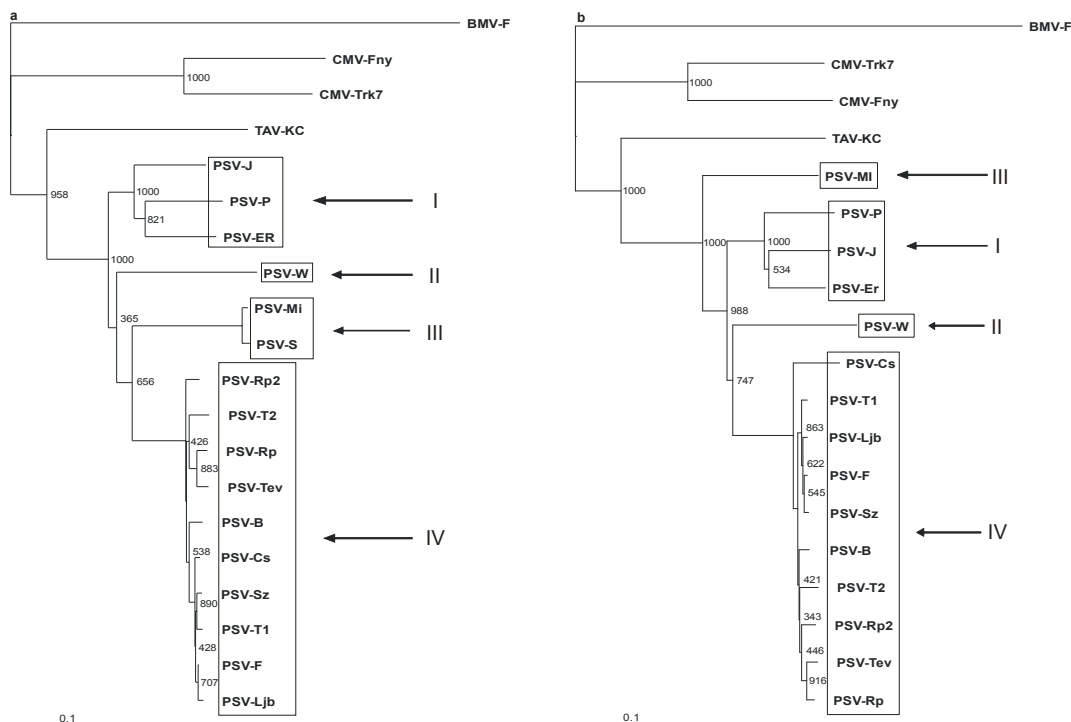
Zöld színnel a Pannon ökorégióból származó izolátumok esetében meghatározott nukleinsav szakasz látható. A piros nyilak és a felettük lévő számok a PSV-Rp-nél meghatározott rekombinációs pontokat jelölik.

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

### 3.4 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 (2a. ábra) és a rekombinációs pontokat magában foglaló teljes klónozott régióra (2b. 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.



**2 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 rekombinációs 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.

### 3.5 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. 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. 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 figyelhettünk meg. 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 figyeltük meg.

A vizsgált *Nicotiana*-fajok közül 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. 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, míg a többi esetben a radioaktív jelölés sem mutatta a kórokozó szisztemikus terjedését.

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.

### 3.5 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 tünettani 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.

## 4. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

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 méretekkkel. Nukleinsav sorrendjében fellelhető volt mind az öt ORF, melyek elhelyezkedésüket tekintve is megegyeznek a cucumovírusoknál megszokottakkal.

A PSV-Rp RNS-einek teljes nukleotid sorredje 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.

### 4.1. Rekombináció szerepe a PSV evolúciójában

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

gében 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). Szabadszíven 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 arra is, hogy egy rekombinációs esemény meghatározó szerepet játszott a PSV evolúciójában, habár azt jelenleg nem tudjuk, milyen evolúciós előnyt biztosított, amely a rekombináns vírus fennmaradását és elterjedését segítette elő.

#### **4.2. 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.

A hazai adatokat tekintve Beczner és Devergne (1979) által közölt, Putnok mellett, vörös heréről gyűjtött izolátum esetében bebizonyosodott, hogy a kórokozó egyik akkor ismert 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. 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.

#### **4.3. 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 enyhe 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. 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 (Taliánsky 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 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.

## 5. FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Beczner, L. and Devergne, J.C. (1979): Characterization of a New Peanut Stunt Virus Strain Isolated from *Trifolium pratense* L. in Hungary. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 14: 247–267.
2. 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.
3. Codoñer, F.M and Elena, S.F. (2008): The promiscuous evolutionary history of the family Bromoviridae. *Journal of General Virology*, 89: 1739–1747.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Gubler, U., Hoffman, B.J. (1983): A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 25: 263–269.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

12. Page, R. D. M. (1996): TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357–358.
13. Palukaitis, P. and García-Arenal, F. (2003): Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62: 241-323.
14. 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.
15. Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000): EMBOSS: the European molecular open software suite. *Trends in Genetics*, 16: 276–277.
16. Roosinck, M.J., Bujarski, J., Ding, S.W., Hajimorad, R., Hanada, K., Scott, S. and Tousignant, 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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm)
17. Salánki, K., Carrère, 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.

## 6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

### 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.