

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A BURGONYA S VÍRUS (*POTATO VIRUS S*, PVS) MOLEKULÁRIS JELLEMZÉSE

PÁJTLI ÉVA

Témavezető:

DR. PALKOVICS LÁSZLÓ



Budapest

2015

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, D.Sc.
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM, Kertészettudományi
Kar, Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Pakovics László
egyetemi tanár, D.Sc.
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM, Kertészettudományi
Kar, Növénykórtani Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.



Az iskolavezető jóváhagyása



A témavezető jóváhagyása

1. A munka előzményei, kitűzött célok

A burgonya (*Solanum tuberosum* L.) az egyik legnagyobb területen termesztett élelmisznővény a világon, számos országban az alapvető élelmezési cikkek közé tartozik. A betakarított termésmennyiséget figyelembe véve a 4. helyet foglalja el a búza, a rizs és a kukorica után az élelmisznővények között (Ábrahám, 2009). Magyarországon a burgonya termesztése nagy hagyományokkal rendelkezik, a hazai burgonya fajtanemesítés központja Keszthely, ahol kiváló magyar fajtákat állítanak elő.

A burgonyát számos fitopatogén vírus fertőzheti, ezek közül a burgonya S vírus (*Potato virus S*, PVS) a *Carlavirus* nemzetség tagja (Matthews, 1979), mely az egyik legkevésbé vizsgált növényi víruscsoportok közé tartozik. Wetter szerint a PVS az egész világon az egyik legelterjedtebb a burgonyát fertőző vírusok közül (Wetter, 1971). A vírus fő gazdanövénye a burgonya, napjainkban már az összes burgonyatermesztő országban elterjedt (de Bokx, 1969; de Bruyn Oubuter, 1952). A PVS közönséges törzse nagyon sok burgonyafajtán nem okoz látható tüneteket, illetve egyes fajtákon csak nagyon enyhe tünetek jelennek meg (Vaughan és van Slogteren, 1956). A vírus jelenlétének gazdasági jelentőségét az adja, hogy 10-20%-kal csökkenti a termésmennyiséget (Wetter, 1971). Emiatt a vírus terjedésének megállítása, illetve a vírusmentes szaporítóanyag előállítása kardinális kutatási téma lehet a jövő burgonyatermesztésében.

Kutatócsoportunk 2009-2013-ban lehetőséget kapott, hogy konzorciumi tagként részt vegyen a „Burgonya termesztéstechnológiák és márkavédjegyek kifejlesztése” című (NKTH-TECH-09-A3-2009-0210) pályázatban, mely kapcsán szakmai és anyagi segítséget kaptunk többek között a burgonya S vírus molekuláris vizsgálatához.

A munka során célul tűztük ki egy megbízható PVS diagnosztikai módszer kidolgozását, mellyel még alacsony koncentráció esetén is kimutatható a vírus. A módszer felhasználásával szeretnénk meghatározni a begyűjtött izolátumok köpenyfehérje gén nukleotidsorrendjét. A szekvenciák segítségével a saját izolátumainkat összehasonlítjuk a világ más részéről származó izolátumokkal, hogy rokonsági viszonyaikat feltérképezhessük.

Továbbá célul tűztük ki, hogy kidolgozunk egy olyan eljárást, mellyel meghatározhatjuk a PVS teljes genomjának szekvenciáját. A módszer felhasználásával meghatározzuk néhány saját PVS izolátum teljes örökítőanyagának nukleotidsorrendjét. A szekvenciaadatokat összevetjük a nemzetközi adatbázisban szereplő más PVS izolátumokéval és más rokon fajokéval, hogy származásukról ismereteket gyűjthessünk. Az esetleges intermolekuláris átrendeződések azonosításának céljából rekombinációs vizsgálatokat végzünk. A konzervált domén vizsgálattal szeretnénk új információkat szolgáltatni a PVS gének lehetséges funkcióiról.

2. Anyag és módszer

2.1 Vizsgálatok helye és ideje

A vizsgálatokat 2009 és 2014 között a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar, Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában végeztük.

2.2 Vizsgálatok anyaga

2.2.1 Begyűjtött vírusizolátumok

Munkánk során 22 különböző izolátumot gyűjtöttünk 4 országból (1. táblázat). A minták minden esetben burgonya csúcsi leveléből származtak.

1. táblázat A begyűjtött PVS izolátumok jellemzői (POL-Lengyelország, HUN-Magyarország, TAN-Tanzánia, UKR-Ukrajna)

Izolátum	Származási hely	Gazdanövény
Ewa	POL	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Leona
Bonita	HUN	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Bonita ojo (de) perdisz
Ditta	HUN	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Ditta
FabioA	HUN	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Fabiola
FabioB	HUN	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Fabiola
FabioC	HUN	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Fabiola
Lady Rosetta	HUN	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Lady Rosetta
Mayan Twilight	HUN	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Mayan Twilight
Papa negra	HUN	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Papa negra
Desiré	HUN, Keszthely	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Desiré
06.62	HUN, Keszthely	<i>Solanum</i> sp. 06.62 klón
09.369	HUN, Keszthely	<i>Solanum</i> sp. 09.369 klón
09.539	HUN, Keszthely	<i>Solanum</i> sp. 09.539 klón
89.216	HUN, Keszthely	<i>Solanum</i> sp. 89.216 klón
89.217	HUN, Keszthely	<i>Solanum</i> sp. 89.217 klón
89.243	HUN, Keszthely	<i>Solanum</i> sp. 89.243 klón
89.249 (PVS-HU1)	HUN, Keszthely	<i>Solanum</i> sp. 89.249 klón
Boglarka	HUN, Nyírtelek	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Boglárka
Kilimanjaro	TAN, Kilimandzsáró	<i>Solanum</i> sp.
Alex	UKR	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Finka
Irena	UKR	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Finka
Valery	UKR	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Finka

2.3 Molekuláris vizsgálatok

Az összribonukleinsav kivonást SpectrumTM Plant Total RNA Kit-tel (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) végeztük, a gyártó utasítása szerint. Az RT-PCR-hez a Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) termékeit használtuk. Az antiszenz primerek felhasználásával

reverz transzkripció (RT) során állítottuk elő a PVS nukleinsavával komplementer cDNS első szálát. A 10 µl végtérfogatú reakcióelegy 4 µl össznukleinsavat, 1 µl (100 µM) antiszenz primert, 2 µl RT puffert (5X), 1 µl dNTP Mixet (5 mM), 0,5 µl RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase-t (200 u/µl), 0,25 µl RiboLock™ RNase Inhibitor-t (40 u/µl), 1,25 µl desztillált vizet tartalmazott. Az össznukleinsavat az antiszenz primer jelenlétében 65 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd az elegyet 5 percen keresztül jégen hűtöttük. Ezt követően adtuk hozzá a reakcióelegy többi komponensét, ezután 30 percen át tartó reverz transzkripció következett 50 °C-on, majd 85 °C-on 5 perc alatt inaktiváltuk az enzimet. A cDNS szintézist követően a vírusgenomot hat átfedő régióban megsokszoroztuk a PCR optimalizálásával, az antiszenz és szenz primerek segítségével. A PCR-analízis 50 µl végtérfogatú reakcióelegy 3 µl cDNS-t, 5 µl Taq puffert (10x), 3 µl MgCl₂-t (25 mM), 2 µl dNTP Mixet (5 mM), 1-1 µl antiszenz és szenz primert (20 µM), 0,5 µl Taq DNS polimerázt (5 u/µl), 34,5 µl desztillált vizet tartalmazott. A PCR-terméket a High Pure Purification Kit-tel (Roche, Basel, Switzerland) tisztítottuk, majd pGEM-T Easy Vektorba ligáltuk. A ligálást követően a rekombináns plazmidot *E. coli* DH5α, vagy TG90-es, illetve JM 109-es kompetens sejtekbe hősokkos módszerrel transzformáltuk (Orkin, 1990).

2.4 Bioinformatikai vizsgálatokhoz felhasznált programok

2.4.1 Szekvencia analízis

A szekvenciák összeillesztéséhez és elemzéséhez a CLC Sequence Viewer 7.6, illetve a CLC Main Workbench (QIAGEN, Aarhus, Denmark,) software csomagot használtuk. A Neighbor Joining (NJ), UPGMA (Unweighted Pair Group Method) analíziseket használtuk a filogenetikai törzsfák készítésekor a Jukes–Cantor korrekciós ráta figyelembe vételével (Jukes, 1969). A filogenetikai vizsgálatok során a statisztikai megbízhatóságot a program 1000 ismétlést alkalmazó bootstrap analízise biztosította. Hidrofóbicitás értékeket a Kyte és Doolittle képlet alapján számítja program, 9 aminosav ablak szélességgel (Kyte and Doolittle, 1982).

2.4.2 Rekombinációs vizsgálatok

A potenciális rekombinációs események detektálására az RDP4.39 Beta programot használtuk (Martin és mtsai., 2010). A program által használt módszereket (RDP, Chimaera, BootScan, 3Seq, GENECONV, MaxChi, és SiScan) az alapértelmezett paraméterekkel alkalmaztuk (ablak méret = 200 nt, ablak elmozdulásának mérete = 20 nt) 95%-os szignifikanciaszinten (Boni et al., 2007; Gibbs et al., 2000; Martin and Rybicki, 2000; Martin et al., 2005; Padidam et al., 1999; Posada and Crandall, 2001; Smith, 1992).

2.4.3 Konzervált domén detektálás

A konzervált domén detektálást a CDD v3.13 programmal végeztük, mely a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> internetes címen elérhető. A CDD a RPS-BLAST-ot (Reverz Pozíciós-Specifikus Blast) használja, melyet az alapbeállításokkal alkalmaztunk (Marchler-Bauer et al., 2015).

3. Eredmények

3.1 A begyűjtött PVS izolátumok molekuláris jellemzése

3.1.1 A CP régió molekuláris jellemzése

A munkánk során 22 PVS izolátumot gyűjtöttünk 4 országból. Az általunk kidolgozott Nested PCR módszer alkalmasnak bizonyult a PVS detektálására. A módszer segítségével felszaporítottuk a köpenyfehérje régiót tartalmazó szakaszt és meghatároztattuk a nukleotidsorrendjüket. A köpenyfehérjét kódoló ORF5 régió minden izolátumunk esetében 885 nukleotid hosszú a stop kodonnal együtt. A régióról transzlálódó köpenyfehérje 294 aminosavból áll és megközelítőleg 33 kDa nagyságú. A fehérjéknek csak az N-terminális végén az első 38 aminosav változékony, a közepüknél összesen 5 pozícióban figyelhető meg aminosav eltérés, míg a C-terminális végük homológ.

3.1.2 A teljes genomok molekuláris jellemzése

Három magyar, három ukrán és egy lengyel PVS izolátum teljes genomját hat átfedő régióban (PVS1-PVS6) megsokszoroztuk PCR-technika segítségével. Az általunk kidolgozott módszer lehetőséget nyújt a PVS genomok szekvenciájának gyors és egyszerű meghatározására.

A vizsgált izolátumok mindegyike az Ewa kivételével 8485 nukleotid hosszúságú (Ewa: 8482 nt). Minden vizsgált izolátum genomjának 5'-végén 62 nukleotid hosszú nem transzlálódó régió (5' UTR) helyezkedik el, majd 6 nyílt leolvasási keret következik. Az ORF1 5928 nukleotid (63-5990 nt) hosszú, az Ewa izolátumnál ez a szakasz 5925 nukleotid hosszúságú (63-5987 nt). Az ORF2 732 nukleotid hosszú és 14 bázisos átfedésben van az ORF1-el. Az ORF3 327 nukleotid és 23 nukleotid az átfedés az ORF2-vel, míg az ORF4 a legrövidebb nyílt leolvasási keret 198 nukleotid hosszú és 37 nukleotid átfedésben van az ORF3-mal. Az ORF5-nél két lehetséges start kodont figyeltünk meg. Az első 6969. (Ewa: 6966.), a második pedig 249 nukleotiddal a 3' vég irányába a 7218. (Ewa: 7215.) pozícióban helyezkedik el a genomon. Az ORF6 285 nukleotid hosszú és szintén átfedésben (4 nt) van az előtte lévő szakasszal. Az izolátumok a 3'UTR-t (102 nt) követően poliadenilált véggel rendelkeznek.

A vizsgált 7 saját izolátum komplett genomját összehasonlítottuk az NCBI adatbázisban található teljes genom szekvenciával rendelkező PVS izolátumokkal. A filogenetikai vizsgálat során a törzsfán az izolátumok két ágon helyezkednek el. A kékkel jelölt csoportban az andesi törzshez (PVS^A) tartozók, míg a sárgával jelölt csoportban a közönséges törzshöz (PVS^O) tartozó izolátumok találhatók. A két csoport között, a közönséges törzshöz közelebbi rokonságot mutatva, helyezkedik el Vltava izolátum. Ennek az izolátumnak külön PVS^{REC} elnevezésű csoportot alkottunk. PVS^A csoportba tartozó két izolátumnál a filogenetikai fa ágának hosszából arra következtetünk, hogy a rokonság igen távoli a fajon belül. A PVS^O csoporton belül két alcsoport rajzolódik ki. Az 'A' csoportban, melyben a Bonita is megtalálható, a 09.369 közeli rokonságot mutat a két amerikai izolátummal. A 'B' csoportban az ukrán izolátumaink szoros rokonságot mutatnak a lengyel Ewa izolátumunkkal és közös rokonságot feltételezhetünk a 89.249 izolátumunkkal és a Leona őseivel.

Az ORF1 a leghosszabb nyílt leolvasási keret a PVS genomon, melyről a a replikáz fehérje transzlálódik. A vizsgált izolátumok esetében a régióról átíródó fehérje 1975 aminosavból áll és megközelítőleg 223 kDa nagyságú (222,769-223,435 kDa). Ennek a fehérjének kiugróan magas a leucin tartalma, több mint 10%. A második leggyakoribb aminosav az alanin (~7,75%). Az Ewa izolátumban egy nukleotid triplet deléció található a 432. nukleotid után, mely sem a többi általunk vizsgált, sem az NCBI-ban található izolátumban nem megfigyelhető. Az ukrán és lengyel izolátumok esetében megfigyelhető jellemző aminosav motívumok (S₄₇₅I₆₁₉T₆₈₈L₇₉₄N₈₆₂), melyek szintén közös származásra utalnak. Az NCBI GenBank konzervált domén adatbázisával (CDD) összevetve a 223K fehérjén 6 domént detektáltunk, melyből 3 specifikus és 3 nem specifikus találat. A 3 specifikus találat elhelyezkedése a 223K fehérjén a következő: A virális metiltranszferáz (43-352 aa), az OTU-szerű cisztein proteáz (900-994 aa), az AAA (ATPáz egyéb sejt szintű funkcióval) domén (1171-1285 aa). A 3 nem specifikus találat elhelyezkedése a fehérjén a következő: A carlavírus endopeptidáz (999-1087 aa), virális (szuperfamilia 1) RNS helikáz (1181-1423 aa); RNS függő RNS polimeráz (1766-1854 aa)¹. Az Alex és a 09.369 izolátumok esetében a helikáz multidoménen még egy AAA (1175-1263 aa) és egy SSL2 (Suppressor of Stem-Loop) (1181-1275 aa) domént is detektáltunk.

Az ORF2 régió hosszában nincs eltérés az izolátumaink között. Erről a szakaszból egy 243 aminosavat tartalmazó fehérje transzlálódik, mely az irodalom szerint 25 kDa nagyságú, viszont a CLC Main Workbench program minden esetben ~27 kDa molekulatömegűre

¹ Az Ewa izolátum esetében a deléció miatt a régiók pozíciója egy aminosavval előrébb csúszik.

kalkulálta. A régióban megfigyeltünk törzs specifikus aminosav motívumokat. A közönséges törzs esetében D₁₇₀I₁₇₂G₂₁₂ motívum, míg az andesi törzs esetében az E₁₇₀V₁₇₂S₂₁₂ aminosav motívum a jellemző az ORF2-ben. A törzsekre jellemző konzervált aminosavak lehetőséget nyújtanak egy esetleges törzs specifikus diagnosztikai módszer kidolgozására. A 84. pozícióban elhelyezkedő valin (V₈₄) az ukrán és a lengyel izolátumok sajátja. A CDD-vel összevetve a 25K fehérjén a 40-235 aminosav pozícióban virális RNS helikáz (szupercsalád 1) multidomént azonosítottunk az izolátumainkban. A Bonita 25K fehérje C-terminális szekvenciáján nem specifikus találatként detektáltuk a CIDE_N_ICAD cell death-inducing effector, N-terminal, inhibitor of caspase-activated DNase) domént (185-235 aa), ez a találat a többi izolátumra nem jellemző.

Az ORF3-ról egy 108 aminosavból álló, megközelítőleg 12 kDa (11,79-11,83 kDa) nagyságú fehérje transzlálódik. Törzsspecifikus aminosav motívum ebben a régióban is található, a PVS^O törzsre a H₇₃P₉₇, a PVS^A törzsre az Y₇₃Q₉₇ a jellemző. A CDD-vel specifikus találatként növényi vírusokra jellemző mozgási fehérje (3-103 aa) domént azonosítottunk minden saját izolátumban. Az Ewa esetében a program multidoménként valin-tRNS ligázt (4-45 aa) és nem specifikus találatként a katalitikus mag doménjét (4-31 aa) detektálta.

Az ORF4-ről a legkisebb fehérje transzlálódik, ami 66 aminosavból épül fel és megközelítőleg 7 kDa (7,31-7,33 kDa) nagyságú. Törzsspecifikus aminosav motívumot ez a fehérje is tartalmaz, a közönséges törzs esetében R₅₁G₆₁, ami a PVS^A törzsben K₅₁R₆₁. A konzervált domén vizsgálat esetében 12-65 aminosav helyzetben a 7 kDa köpenyfehérje domént azonosítottuk.

Az ORF5 azonosításakor két lehetséges start kodont (AUG1, AUG2) detektáltunk, egymástól 249 nukleotid távolságra. Az AUG1 esetében egy 377 aminosavból álló, megközelítőleg 42 kDa-s (41,66-41,84 kDa) fehérje transzlálódik. A szekvenciák illesztésekor megfigyelhető, hogy a fehérje N-terminális vége változékony, míg a C-terminális vége konzerváltabb. Törzsspecifikus aminosav motívumot ezen a szakaszon is megfigyeltünk. A közönséges törzsre a H₃G₁₆S₄₇T₉₁, míg az andesi törzsre az N₃S₁₆G₄₇G₅₇S₉₁ a jellemző. A közönséges törzsbe tartozó SW-14 a 16. pozícióban a glicin helyett arginint tartalmaz. Az AUG2 esetében az előzőnél 83 aminosavval kisebb, 294 aminosavból álló fehérje íródik át. Minden izolátumunkon két domént azonosítottunk specifikus találattal. A carlavírus specifikus köpenyfehérje domén (Flexi_CP_N) a 48-99 aminosav pozícióban, míg a flexivírus specifikus köpenyfehérje domén (Flexi_CP) a 108-247 aminosav pozícióban helyezkedik el.

Az ORF6 egy 94 aminosavból álló, megközelítőleg 11 kDa (10,83-10,74 kDa) nagyságú fehérjét kódol és tartalmaz törzsspecifikus aminosav motívumokat. A közönséges törzsre a D₄Q₈₁, míg az andesi törzsre az E₄P₈₁ aminosavak a jellemzők. A 11K fehérjének

kiugróan magas az arginin tartalma. A 11K fehérje konzervált domén analízise során a 1-89 aminosav pozícióban minden izolátum esetében azonosítottuk, specifikus találattal a Carla_C4 szuperfamiliahoz tartozó a carlavírusokra jellemző putatív nukleinsav-kötő fehérje motívumot.

A *Potato virus S* izolátumokkal végzett vizsgálatok alkalmával 6 potenciális rekombinációs eseményt detektáltunk az RDP4.39 Beta programcsomaggal. Az első lehetséges rekombinációs eseményt (rekombinációs esemény 1) a Vltava izolátumnál figyeltük meg. A rekombinálódó szakasz 6116-8518 nukleotid között található. Ez esetben a közönséges törzsbe tartozó Ewa a major szülő és az andesi törzsbe tartozó BB-AND adja a minor szülői részt. A törzsfán is megfigyelhető, hogy a major szülőtől származó régióban a rekombináns Vltava a Leona és az Ewa közelében a közönséges törzs tagjai között foglal helyet, míg a minor szülő régiót vizsgálva a BB-AND izolátummal az andesi törzset képviselik. A rekombinációs esemény 2-es esetén a 89.249 izolátum a potenciálisan rekombináns, mely genomjának a nagyobb része (2805-8475 nt) feltételezhetően a Valery-ből, míg kisebb része (1-2804 nt és 8476-8627 nt) az Ewa-ból származik. A régiókról készült törzsfá átrendeződése is alátámasztja ezt a feltételezést. A rekombinációs esemény 3-as esetén a lengyel Ewa a rekombináns és genomjának nagy része (2795-8518 nt) a Vltava izolátumból, míg kisebb része (1-2794 nt és 8519-8627 nt) a Valery-ből származik. A rekombinálódó régióban az Ewa az ukrán izolátumokkal közös ágon helyezkedik el a törzsfán. Korábbi vizsgálataink is alátámasztják a lengyel és az ukrán izolátumaink közeli rokonságát. A rekombinációs esemény 4-es alkalmával ismét az Ewa a potenciálisan rekombináns izolátum. Az elemzés eredményeképp a Leona izolátumból származik az 1-5971 és 7231-8627 nukleotid közti szakasz, míg a kisebb rész az 5972-7230 nukleotid közti a Valery-ből. A rekombinálódó szakasz a három TGB fehérjét tartalmazza. Szintén a már említett közeli rokonságra következtetünk, melyet a rekombinációs régiók törzsfája is igazol. A rekombinációs esemény 5-ös esetén mind a három ukrán izolátumot tekintjük rekombinánsnak. A 2761-8150 nukleotid közti régiót a 09.369 izolátumból származtatjuk, míg a 1-2760 és 8151-8627 nukleotid közti szakaszt a Leona-ból. A major régió törzsfáján az ukrán izolátumok még egy külön álló ágat képeznek, a minor régió esetében a Leona is ezen ágon helyezkedik el, a szekvencia szakasz közeli rokonságát prezentálva. A rekombinációs esemény 6-os eredményeképp a Yunnan YN a rekombináns, a WaDef-US izolátumból származtatjuk a 1-4445 és 4878-8627 nukleotid közti régiót, míg az Id4106-US izolátumból a 4446-4877 nukleotid közti régiót. Az analízis alapján lehetséges, hogy a kínai izolátum két amerikai származású izolátum rekombinálódása folytán keletkezett. A rekombinációs esemény a filogenetikai törzsfákról is leolvasható. Ezt az eseményt a 9 algoritmusból, csupán 3 (RDP, GENECONV, Bootscan) támogatja.

3.2 Új tudományos eredmények

1. Kidolgoztunk egy Nested PCR-technikán alapuló diagnosztikai módszert, mellyel alacsony víruskoncentráció esetén is megbízhatóan detektálható a PVS. A módszerrel felszaporított szakasz a teljes köpenyfehérje gént tartalmazza.
2. A kifejlesztett diagnosztikai módszer segítségével 1 lengyel, 1 tanzániai, 3 ukrán és 17 magyar izolátum köpenyfehérje gén szekvenciáját határoztuk meg és feltártuk rokonsági kapcsolataikat. A szekvenciákat feltöltöttük a nemzetközi adatbankba.
3. Kidolgoztunk egy PCR-technikán alapuló eljárást, mellyel 6 átfedő régióban megsokszorozható a PVS teljes genomja, így egyszerűen és gyorsan meghatározható a vírus örökítő anyaga.
4. A 3 magyar, 3 ukrán és 1 lengyel PVS izolátum teljes genom szekvenciáját meghatároztuk az általunk kidolgozott módszerrel. A szekvenciákat a nemzetközi adatbázisban közzétettük, ezzel nagymértékben bővítettük az adatbázis PVS teljes genom szekvencia gyűjteményét.
5. Az elvégzett konzervált domén vizsgálattal új információkat szolgáltatunk a PVS gének lehetséges funkcióiról.
6. Számos olyan aminosav-motívumot azonosítottunk, melyek ismeretében különösebb elemzés nélkül az izolátumok törzsekbe sorolhatók.
7. Rekombinációs vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy az PVS genomjára jellemzőek az intermolekuláris átrendeződések, a vizsgálatok alkalmával 6 potenciális rekombinációs eseményt detektáltunk, melyek közül 5 eddig még nem került leírásra a nemzetközi irodalomban.
8. Javaslatot tettünk egy új törzs, a rekombináns törzs létrehozására.

4. Következtetések

A 3 magyar, 3 ukrán és 1 lengyel PVS izolátum teljes genom szekvenciáját meghatároztuk és megállapítottuk, hogy felépítésük megegyezik a Matoušek és munkatársai (Matousek et al., 2005) által leírt PVS izolátumával. A 7 saját izolátum komplett genomja és az NCBI adatbázisban található teljes genom szekvenciák alapján elkészítettük a filogenetikai törzsfát. A két törzs ezen a törzsfán is nagy jól elkülönül, viszont a Vltava, a két csoport között, egy külön ágat képvisel. A Vltava Duarte és munkatársai (Duarte et al., 2012) szerint a két törzsből származó rekombináns izolátum. Az eredményt a mi vizsgálataink is alátámasztják. Erre alapozva javasoljuk egy új törzs elkülönítését PVS^{REC} elnevezéssel. A vizsgálatok azt mutatják, hogy az ukrán izolátumok, melyek aminosav szinten csak

replikázban különböznek egymástól, közeli rokonságban állnak a lengyel izolátummal is. A lehetséges közös származást a rekombinációs vizsgálat eredményei is támogatják. Meggyőződésünk, hogy a 09.369 magyar izolátum amerikai ősoktól származik, ezt minden régió vizsgálata alátámasztja.

ORF1 régió

Az ORF1 régió által kódolt fehérjén számos fehérje domént detektáltunk az izolátumainkon. Az N-terminális végen specifikus találatként azonosítottuk a metiltranszferáz domén. Kutatók szerint a metiltranszferáz szerepet játszik a sapka struktúra kialakításában, mellyel növeli a vírus RNS stabilitását és a transláció iniciációjához is elengedhetetlen (Ahola et al., 2000; Ahola et al., 1997; Kong et al., 1999; Rozanov et al., 1992). Ennek kapcsán a *Potato virus S-t* összehasonlítottuk az NCBI adatbázisban teljes genom szekvenciával rendelkező *Carlavirus* nemzetségbe tartozó másik 34 fajjal. A PVS-t a vizsgálatok során a saját 89.249 izolátum képviseli. A nemzetségbe tartozó fajok esetében is minden fajból egy izolátum szerepel a vizsgálatokban. A *Carlavirus* nemzetség vizsgálatakor számos konzervált aminosav motívumot detektáltunk a metiltranszferáz doménen, ilyenek például az YLSP, az SHP, vagy a LEN, melyek minden bizonnyal esszenciálisak a carlavírusok számára.

A második specifikus találat az OTU-szerű cisztein proteáz. Ebbe a fehérjecsaládba olyan fehérjék tartoznak amelyek homológok a *Drosophila* fajok petefészekrák (ovarian tumor, OTU) génjével. Tagjai között olyan fehérjék szerepelnek, melyek eukariótából, vírusokból és patogén baktériumból származnak. A konzervált cisztein és hisztidin és esetleg aszparaginsav képviselik a katalitikus aminosavakat a feltételezhetően proteáz funkció során (Makarova et al., 2000). A tapasztalt aminosav szekvencia homológia alapján feltételezzük, hogy a PVS izolátumokban is proteáz aktivitása van a fehérjeszakasznak. Ezt a feltételezést erősíti, hogy a domén közvetlen folytatásaként egy proteáz szerepű carlavírus endopeptidázt detektáltunk. Véleményünk szerint a két domén közösen látja el a funkciót. A carlavírus endopeptidáz családban (Merops peptidáz adatbázisban C23-as család) Lawrence és munkatársai a *Blueberry scorch virus* (BBScV) 223K fehérjén azonosítottak egy papain-szerű proteináz domént. Feltételezésük szerint az autoproteolízis katalitikus aminosavai a C₉₉₄H₁₀₇₅, vagy a C₈₉₅H₉₈₄ (Lawrence et al., 1995). A PVS genomok és a *Carlavirus* nemzetség többszörös illesztése során megfigyeltük, hogy a BBScV C₉₉₄H₁₀₇₅ aminosavai minden carlavírusra változás nélkül jellemző. Ez alapján feltételezzük, hogy ezen aminosavak ebben a pozícióban esszenciálisak a vírusok működéséhez. A BBScV C₈₉₅H₉₈₄ aminosavai is konzerváltak a carlavírusok esetében. Van néhány kivétel (*Cowpea mild mottle virus*, *Aconitum latent virus*, *Potato latent virus*, *Sweet potato chlorotic fleck virus*), melyeknél a

nukleinsav változás aminosav változásban is megnyílvánul, mégis funkcióképes marad a vírus. Korábban a BBScV-vel végzett a deléciós vizsgálatokkal Lawrence és munkatársai is erre a véleményre juttottak Ennek kapcsán a *Potato virus S*-t összehasonlítottuk az NCBI adatbázisban teljes genom szekvenciával rendelkező *Carlavirus* nemzetségbe tartozó másik 34 fajjal. A PVS-t a vizsgálatok során a saját 89.249 izolátum képviseli. A nemzetségbe tartozó fajok esetében is minden fajból egy izolátum szerepel a vizsgálatokban (Lawrence et al., 1995). Ezt figyelembe véve feltételezzük, a PVS esetében a BBScV C₉₉₄H₁₀₇₅ aminosavainak megfelelően, a C₁₀₀₃H₁₀₈₄ (Ewa: C₁₀₀₂H₁₀₈₃) az autoproteolízis katalitikus aminosavai. A doménen a többszörös illesztés alkalmával megfigyeltünk egy glicint (G₁₀₄₀) és egy arginint (R₁₂₂₈)², melyek szintén minden vizsgált carlavírusban fontos funkciót láthatnak el. Az aminosav pozíció meghatározása a saját PVS izolátumaink alapján került megadásra.

A harmadik specifikus találat az AAA_22 domén. Ezt a találatot az ABC-transzporterek fehérje szupercsaládba sorolta a program. Az ABC-transzporterek (ATP-kötő kazetta transzporterek, ATP-binding cassette transporters) az egyik legnagyobb és legősibb fehérje szupercsalád tagjai. Képviselői megtalálhatók minden létező taxonban a prokariótáktól az emberig. A nukleotid-kötő domén mutatja a legnagyobb hasonlóságot a család minden tagjánál. Ezek a transzmembrán fehérjék rendkívül sokféle anyag membránon való átjuttatását végezhetik, a sejtmembránon vagy a sejt belső membránjain keresztül (Dean et al., 2001). Az AAA család egy viszonylag új család az ATPázok körében. Az AAA motívum erősen konzervált, mely ~230 aminosavból áll, Walker motívumot tartalmaz, ami ATPáz aktivitású. Az ATPáz aktivitás mellett számos különböző sejtszintű funkciójuk lehet, mint a sejt-ciklus szabályozás, proteolízis, citoskeleton szabályozás, vagy a vezikulum közvetített fehérje transzport (Patel and Latterich, 1998; Walker et al., 1982). Az AAA doménnel átfedésben detektáltuk a virális RNS helikáz multidomént. Virális RNS helikáz (szupercsalád 1) csoportba tartozók domének helikáz és NTPáz tevékenysége már bizonyított (de Cedron et al., 1999). A multidoménen az Alex és a 09.369 izolátum esetében még egy AAA és egy SSL2 domént azonosítottunk. Kimutatták, hogy az SSL2 génnek nukleinsav javító mechanizmus mellett, ATPáz illetve helikáz aktivitása is lehetséges (de Cedron et al., 1999; Gulyas and Donahue, 1992). Mivel találat esetében a doménnek van NTPáz tevékenysége, mellyel az izolátumaink fehérjéje szekvencia homológiát mutat, kijelenthetjük, hogy a fehérje régiónak biztosan hasonló szerepe van a PVS replikációjában. Izolátumainkban a virális (szupercsalád 1) RNS helikáz domén N-terminális részén tartalmazza a GAGKS (1181-1185 aa, Ewa: 1180-1184 aa) konzervált motívumot. Ez a konzervált motívum a carlavírusok esetében a GXGKS-sel jellemezhető, ami alátámasztja a kutatók korábbi eredményeit (Gorbalenya et al., 1988;

² aminosav pozíció a saját PVS izolátumaink alapján

Zimmern, 1987). A doménon azonosítottunk egy konzervált motívumot, mely minden carlavírusban változatlanul TFGESTG szekvenciájú.

Az ORF1-ről transzlálódó fehérje C-terminális végén azonosítottuk az RdRp domént. Az RdRp katalizálja a komplementer RNS szál szintézisét egy adott RNS templátról, ennek segítségével replikálódnak a negatív szálak, a pozitív szálak és a szubgenomi RNS-ek is (O'Reilly and Kao, 1998). Ennek tudatában feltételzzük, hogy a 223K fehérje C-terminális része látja el a vírus replikáció során az RNS polimeráz funkciót.

Vizsgálataink eredmény alapján kijelentjük, hogy az ORF1 egy replikáz funkciójú fehérjét kódol. A PVS replikázán a metiltranszferáz, a helikáz és az RNS-függő RNS-polimeráz domének elhelyezkedése illetve azok jellemzői megfelelnek a *Carlavirus* nemzetség más tagjainál tapasztaltakkal (Matousek et al., 2005). Azonosítottunk még két proteáz aktivitású domént egymás közvetlen közelében. Úgy gondoljuk, hogy a két domént tartalmazó 187 aminosavból álló szakasz autoproteolízist végez.

ORF2 régió

Az ORF2 által kódolt fehérje, mely 25 kDa nagyságú, hasonlóan az ORF1-hez tartalmazza az NTPáz/helikáz domént, melyben a konzervált G-GKSS/T motívum megtalálható (Gorbalenya et al., 1988; Lin et al., 2009; Zimmern, 1987). A saját mintáink esetében ez a motívum GAGKS szekvenciájú, ahogy az előző régióban is, és a 25K fehérje N-terminális végéhez közel (47-51 aa) helyezkedik el. A virális RNS helikáz funkciót a konzervált domén vizsgálunk is alátámasztja a 40-235 aminosav pozícióban azonosított multidomén formájában.

A Bonita 25K fehérje C-terminális szekvenciáján nem specifikus találatként detektáltuk a CIDE_N_ICAD domént (185-235 aa). Bár a CDD nem specifikus találatként matematikailag megbízható eredménynek azonosította a CIDE_N_ICAD domént, mi ezt az eredményt nem fogadjuk el, csupán véletlen szekvencia homológiának tartjuk a Bonita esetében.

ORF3 régió

Az ORF3 által kódolt fehérje a TGBp2, mely 12 kDa nagyságú és két hidrofób régióval rendelkezik, melyet a mi vizsgálataink is alátámasztanak (Lin et al., 2009). Ezzel a tulajdonsággal a vírusnak lehetősége van a sejtről sejtre való terjedésre. Ezt támasztja alá a CDD vizsgálat eredménye is, miszerint specifikus találatként növényi vírusokra jellemző mozgási fehérje (3-103 aa) domént azonosítottunk minden saját izolátumban. A növényi vírus mozgási fehérje szupercsalád magába foglalja számos ismert növényi vírus mozgási fehérjéjét, több különböző ssRNS növényi vírus családból, tartalmazza többek között a *Potexvirus*, *Hordeivirus* és a *Carlavirus* nemzetség tagjait is (Scott et al., 1994).

A fehérje N-terminális végén detektált kisebb domén egy aminoacil-tRNS szintetáz, a valil-tRNS szintetáz mag doménje. Kutatók szerint minden szervezet számára esszenciális az aminoacil-tRNS szintetáz. Ez az enzim olyan monomer, amely aminoacetilálja a nukleotidok 2'-OH csoportját a t-RNS-ek 3' végén a transláció során, ismert még ligáz és dinukleotid-kötő tulajdonsága is. A mag domén alapja egy glicin gazdag, ún. Rossmann-motívum (GxGxxG), amely jellegzetes ATP-kötő motívum (Szymanski et al., 2000; Venkatachalam et al., 1999). Bár a jellegzetes Rossmann-motívumot nem tartalmazza a vírus fehérje, mégis úgy gondoljuk, hogy a detektált doménnek lehet hasonló funkciója.

ORF4 régió

Az ORF4 régió a legrövidebb kódoló szakasz a PVS izolátumok genomján, melyről értelemszerűen a legkisebb fehérje, a 7K íródik át. A 7K fehérje az N-terminális végén erősen hidrofób részt tartalmaz, melynek az intercelluláris mozgásban van szerepe (Ju et al., 2005; Morozov et al., 1987; Schepetilnikov et al., 2005). Morozov és munkatársai szerint ez a hidrofób szegmens szignálként is funkcionál az endoplazmatikus retikulumba való bejutáshoz (Morozov et al., 1991).

ORF5 régió

Az ORF5 esetében két lehetséges start kodont (AUG1, AUG2) detektáltunk, egymástól 249 nukleotid távolságra. Az AUG1 esetében megközelítőleg 42 kDa-os, míg az AUG2 esetében megközelítőleg 33 kDa-os fehérje íródik át. A két startkodon jelentőségét már potexvírusok esetében vizsgálták. Kutatók szerint CP N-terminális régiója az AUG1 utáni szakasz fontos a TGBp1-el együtt a vírus sejtről sejtre mozgásához, viszont ez a rész nélkülözhető a virionképzéskor. A köpenyfehérje alegységek pedig az AUG2 utáni szakaszból transzlálódnak (Ozeki et al., 2009; Verchot-Lubicz et al., 2007). A fehérjének ezen tulajdonságát a konzervált domén vizsgálatunk is támogatja. Az AUG2 utáni fehérjén a carlavírus specifikus köpenyfehérje domént és a flexivírus specifikus köpenyfehérje domént detektáltuk.

A saját izolátumaink is tartalmazzák a konzervált hidrofób aminosav motívumot (AGFDFFDGLL), mely minden fonál alakú vírusra jellemző (Foster and Mills, 1991; Koonin and Gorbalenya, 1989).

ORF6 régió

Az irodalmak alapján az ORF6 régió a ciszteinben gazdag nukleinsav-kötő fehérjét (nucleic acid binding protein, NABP) kódolja. Ez a fehérje felelős a levéltetűvel történő átvitelért, a géncsendesítés szupresszállásáért (Chiba et al., 2006; Foster, 1991; Foster and Mills, 1992; Gramstat et al., 1990). A konzervált domén vizsgálat alkalmával specifikus

találatként carlavírusokra jellemző putatív nukleinsav-kötő fehérje motívumot azonosítottunk. A carlavírus nukleinsav-kötő fehérje család tartalmazza a potenciális C-4 típusú cink-ujjat, melynek alapja négy konzervált cisztein (Foster and Mills, 1990). A PVS izolátumainkban a cink-ujj motívum az RCWRCYRVYPPICNSKCDNRTC szekvenciájú és az 54-75 aminosav pozícióban helyezkedik el a fehérjén.

A 11K fehérje valószínűleg a vírus transzkripció szabályozója és bizonyították, hogy a *Chrysanthemum virus B* cink-ujj fehérjéje közvetlen kölcsönhatásban van a kromatinnal és a növényi promóterekkel, így mint eukarióta transzkripciós faktorként (TF) működik (Gramstat et al., 1990; Lukhovitskaya et al., 2013). A tapasztalt aminosav szekvencia homológai alapján feltételezzük, hogy a PVS esetében ilyen funkciókat lát el a 11K fehérje. Gramstat és munkatársai (Gramstat et al., 1990) által tervezett cink-ujj modell alapján megterveztük a saját izolátumaink modelljét, melyen Lukhovitskaya és munkatársai (Lukhovitskaya et al., 2013) által azonosított mag lokalizációs szignált (nuclear localization signal, NLS) is jelöltük.

3'UTR

Foster és munkatársai (Foster et al., 1992) a *Helenium virus S* (HeIVS) és a PVM genomjának 3'-végén azonosított egy putatív poliadenilációs szignált (AATAAA). Ez a motívum az AAGAAA szekvenciával 24 nukleotiddal a 3'-vég előtt a saját izolátumainkban is megtalálható. Ez a hexamer a *Carlavirus* nemzetségben csak a PVS izolátumokra jellemző. Kutatók szerint a *Potato virus X* 3' UTR régióban található egy másik hexamer (ACTTAA), mely az RNS szintézishez nélkülözhetetlen (Batten et al., 2003). Ezt a motívumot az összes közös törzsbe tartozó PVS izolátum változatlanul tartalmazza, viszont az andesi törzs tagjainál a GCTTAA a jellemző szekvencia.

Rekombinációs vizsgálatok

Rekombinációs vizsgálataink azt bizonyítják, hogy az PVS genomjára jellemzőek az intermolekuláris átrendeződések. A PVS izolátumokkal végzett vizsgálatok alkalmával 6 potenciális rekombinációs eseményt detektáltunk, melyek közül 5 eddig még nem került leírásra a nemzetközi irodalomban. Az általunk gyűjtött izolátumok mindegyike részt vesz az általunk kimutatott lehetséges rekombinációs eseményekben. Az első lehetséges rekombinációs eseményt (rekombinációs esemény 1), miszerint a Vltava izolátum rekombináns és a két törzsből származnak a szülői szekvenciák, már Duarte és munkatársai (Duarte et al., 2012) is megfigyelték. Ebben az esetben a Vltava az andesi törzsből tartalmazza azokat a régiókat, melyek a levéltetű átvihetőségért és a súlyosabb tünetek kialakulásáért felelősek. A közös törzsből a replikáz gént és a TGBp1 gén 5'-végét tartalmazza. Ez az esemény gyakorlati szempontból is fontos, mert ez bizonyíték arra, hogy az eredetileg levéltetűvel nem terjedő és enyhébb tüneteket okozó közös törzs tagjai

képesek lehetnek a jobb adaptálódási és versengési képességgel rendelkező andesi törzs tulajdonságait átvenni. Ez a megfigyelés magyarázatul szolgálhat a köpenyfehérje szekvencia alapján törzsekbe sorolt izolátumok biológiai tulajdonságainak különbségeire. A vírus patológiájának és átvitelének vizsgálatakor feltétlenül szükséges a teljes örökítőanyag szekvenciájával együtt elemezni az eredményeket, a genomban bekövetkező intermolekuláris átrendeződések miatt. A rekombinációs esemény 3-as esetén a lengyel Ewa izolátum nagy része a Vltava izolátumból, míg kisebb része a Valery-ből származik. Az eredmény alapján lehetséges, hogy a két törzsből származó izolátum szülő szekvenciaként részt vett egy másik közös törzshöz tartozó izolátummal való rekombinációs eseményben. A másik három potenciális rekombinációs esemény a közös törzs tagjai között történt. A jövőben nagy figyelmet kell fordítani a PVS molekuláris vizsgálatára és a rezisztencianemesítésre, hogy megelőzhessük a veszélyesebb törzsek kialakulását és elterjedését.

5. Irodalomjegyzék

- Ábrahám É. B. (2009). Fajta és öntözés hatása a burgonya termésmennyiségének és minőségének alakulására mezőszégi talajon. Doktori értekezés. Debrecen. 6-10, 34-38.
- Ahola, T., den Boon, J. A., and Ahlquist, P. (2000). Helicase and capping enzyme active site mutations in brome mosaic virus protein 1a cause defects in template recruitment, negative-strand RNA synthesis, and viral RNA capping. *Journal of Virology* **74**, 8803-8811.
- Ahola, T., Laakkonen, P., Vihinen, H., and Kaariainen, L. (1997). Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities. *Journal of Virology* **71**, 392-397.
- Batten, J. S., Yoshinari, S., and Hemenway, C. (2003). Potato virus X: a model system for virus replication, movement and gene expression. *Molecular Plant Pathology* **4**, 125-131.
- Boni, M. F., Posada, D., and Feldman, M. W. (2007). An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* **176**, 1035-1047.
- Chiba, M., Reed, J. C., Prokhnovsky, A. I., Chapman, E. J., Mawassi, M., Koonin, E. V., Carrington, J. C., and Dolja, V. V. (2006). Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* **346**, 7-14.
- de Bokx, J. A. (1969). Particle length of various isolates of Potato virus S. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **75**, 144-146.
- de Bruyn Oubuter, M. P. (1952). A new potato virus. In "Proceedings of the Conference on Potato Virus Diseases", pp. 83, Wageningen-Lisse
- de Cedron, M. G., Ehsani, N., Mikkola, M. L., Garcia, J. A., and Kaariainen, L. (1999). RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS Letters* **448**, 19-22.
- Dean, M., Rzhetsky, A., and Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* **11**, 1156-1166.
- Duarte, P. D. G., Galvino-Costa, S. B. F., Ribeiro, S. R. R. D., and Figueira, A. D. (2012). Complete genome sequence of the first Andean strain of potato virus S from Brazil and evidence of recombination between PVS strains. *Archives of Virology* **157**, 1357-1364.
- Foster, G. D. (1991). Molecular Variation between Ordinary and Andean Strains of Potato Virus-S. *Research in Virology* **142**, 413-416.
- Foster, G. D., and Mills, P. R. (1990). Detection of Strains of Potato Virus-S by Nucleic-Acid Spot Hybridization (Nash). *Potato Research* **33**, 487-495.
- Foster, G. D., and Mills, P. R. (1991). Evidence for Subgenomic RNAs in Leaves Infected with an Andean Strain of Potato Virus-S. *Acta Virologica* **35**, 260-267.
- Foster, G. D., and Mills, P. R. (1992). The 3'-Nucleotide Sequence of an Ordinary Strain of Potato Virus-S. *Virus Genes* **6**, 213-220.

- Foster, G. D., Scott, R., Draper, J., and Mills, P. R. (1992). Expression of Helium Virus-S Coat Protein in Escherichia-Coli, Invitro in Rabbit Reticulocyte Lysate and Transgenic Tobacco. *Acta Virologica* **36**, 567-575.
- Gibbs, M. J., Armstrong, J. S., and Gibbs, A. J. (2000). Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* **16**, 573-582.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., and Blinov, V. M. (1988). A Novel Superfamily of Nucleoside Triphosphate-Binding Motif Containing Proteins Which Are Probably Involved in Duplex Unwinding in DNA and Rna Replication and Recombination. *Febs Letters* **235**, 16-24.
- Gramstat, A., Courtzopanis, A., and Rohde, W. (1990). The 12-Kda Protein of Potato Virus-M Displays Properties of a Nucleic Acid-Binding Regulatory Protein. *Febs Letters* **276**, 34-38.
- Gulyas, K. D., and Donahue, T. F. (1992). Ssl2, a Suppressor of a Stem-Loop Mutation in the His4 Leader Encodes the Yeast Homolog of Human Ercc-3. *Cell* **69**, 1031-1042.
- Ju, H. J., Samuels, T. D., Wang, Y. S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R. S., and Verchot-Lubicz, J. (2005). The potato virus X TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiology* **138**, 1877-1895.
- Jukes, T. H. C., C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In "Mammalian protein metabolism". Academic Press, New York, US. .
- Kong, F., Sivakumaran, K., and Kao, C. (1999). The N-terminal half of the brome mosaic virus 1a protein has RNA capping-associated activities: Specificity for GTP and S-adenosylmethionine. *Virology* **259**, 200-210.
- Koonin, E. V., and Gorbalenya, A. E. (1989). Evolution of Rna Genomes - Does the High Mutation-Rate Necessitate High-Rate of Evolution of Viral-Proteins. *Journal of Molecular Evolution* **28**, 524-527.
- Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophatic Character of a Protein. *Journal of Molecular Biology* **157**, 105-132.
- Lawrence, D. M., Rozanov, M. N., and Bradley, I. H. (1995). Autocatalytic Processing of the 223-Kda Protein of Blueberry Scorch Carlavirus by a Papain-Like Proteinase. *Virology* **207**, 127-135.
- Lin, Y., Druffel, K., Whitworth, J. L., Pavek, M. J., and Pappu, H. (2009). Biological and molecular properties of Potato virus S from late blight resistant potato. *Phytopathology* **99**, S74.
- Lukhovitskaya, N. I., Solovieva, A. D., Boddeti, S. K., Thaduri, S., Solovyev, A. G., and Savenkov, E. I. (2013). An RNA Virus-Encoded Zinc-Finger Protein Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Regulator of Cell Size and Proliferation in Two Tobacco Species. *Plant Cell* **25**, 960-973.
- Makarova, K. S., Aravind, L., and Koonin, E. V. (2000). A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and Chlamydia pneumoniae. *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 50-52.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S. N., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z. X., Yamashita, R. A., Zhang, D. C., Zheng, C. J., and Bryant, S. H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research* **43**, D222-D226.
- Martin, D., and Rybicki, E. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* **16**, 562-563.
- Martin, D. P., Posada, D., Crandall, K. A., and Williamson, C. (2005). A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *Aids Research and Human Retroviruses* **21**, 98-102.
- Matousek, J., Schubert, J., Ptacek, J., Kozlova, P., and Dedic, P. (2005). Complete nucleotide sequence and molecular probing of Potato virus S genome. *Acta Virologica* **49**, 195-205.
- Matthews R. E. (1979). Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*. **12**, 129-296.
- Morozov, S. Y., Lukasheva, L. I., Chernov, B. K., Skryabin, K. G., and Atabekov, J. G. (1987). Nucleotide-Sequence of the Open Reading Frames Adjacent to the Coat Protein Cistron in Potato Virus-X Genome. *Febs Letters* **213**, 438-442.

- Morozov, S. Y., Miroshnichenko, N. A., Solovyev, A. G., Zelenina, D. A., Fedorkin, O. N., Lukashova, L. I., Grachev, S. A., and Chernov, B. K. (1991). In vitro Membrane-Binding of the Translation Products of the Carlavirus 7-Kda Protein Genes. *Virology* **183**, 782-785.
- O'Reilly, E. K., and Kao, C. C. (1998). Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* **252**, 287-303.
- Orkin, S. (1990). Molecular-Cloning - a Laboratory Manual, 2nd Edition - Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Nature* **343**, 604-605.
- Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Maejima, K., Himeno, M., Senshu, H., Kawanishi, T., Kagiwada, S., Yamaji, Y., and Namba, S. (2009). The N-terminal Region of the *Plantago asiatica* mosaic virus Coat Protein Is Required for Cell-to-Cell Movement but Is Dispensable for Virion Assembly. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 677-685.
- Padidam, M., Sawyer, S., and Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265**, 218-225.
- Patel, S., and Latterich, M. (1998). The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends in Cell Biology* **8**, 65-71.
- Posada, D., and Crandall, K. A. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13757-13762.
- 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.
- Schepetilnikov, M. V., Manske, U., Solovyev, A. G., Zamyatnin, A. A., Schiemann, J., and Morozov, S. Y. (2005). The hydrophobic segment of Potato virus X TGBp3 is a major determinant of the protein intracellular trafficking. *Journal of General Virology* **86**, 2379-2391.
- Scott, K. P., Kashiwazaki, S., Reavy, B., and Harrison, B. D. (1994). The Nucleotide-Sequence of Potato Mop-Top Virus-Rna-2 - a Novel Type of Genome Organization for a Furovirus. *Journal of General Virology* **75**, 3561-3568.
- Smith, J. M. (1992). Analyzing the Mosaic Structure of Genes. *Journal of Molecular Evolution* **34**, 126-129.
- Szymanski, M., Deniziak, M., and Barciszewski, J. (2000). The new aspects of aminoacyl-tRNA synthetases. *Acta Biochimica Polonica* **47**, 821-834.
- Vaughan, E. K., van Slogteren, D. H. M. (1956). *Potato virus S* in Oregon. *American Potato Journal*. **33**, 218-219.
- Venkatachalam, K. V., Fuda, H., Koonin, E. V., and Strott, C. A. (1999). Site-selected mutagenesis of a conserved nucleotide binding HXGH motif located in the ATP sulfurylase domain of human bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 2601-2604.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C. M., and Bamunusinghe, D. (2007). Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology* **88**, 1643-1655.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982). Distantly Related Sequences in the Alpha-Subunits and Beta-Subunits of Atp Synthase, Myosin, Kinases and Other Atp-Requiring Enzymes and a Common Nucleotide Binding Fold. *Embo Journal* **1**, 945-951.
- Wetter, C. (1971). *Potato virus S*. In: Descriptions of plant viruses. Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied Biologists, Kew, England. **60**, 1-3.
- Zimmern, D. (1987). Evolution of RNA viruses. In "RNA genetics" (J. Holland, Domingo, E., Ahlquist, P. ed.), pp. 211-240. Boca Raton, CRC Press.

A dolgozat nem jöhetett volna létre az NKTH-TECH-09-A3-2009-0210 pályázat anyagi és a konzorciumi tagok szakmai támogatása nélkül.

6. Az értekezés témakörében megjelent publikációk

Lektorált folyóiratban (MTA listás) megjelent közlemények

Pájtli É., Palkovics L. (2015): A burgonya S vírus (Potato virus S, PVS) lehetséges rekombinációi. *Növényvédelem*, „in press”

Konferencia közlemények („full paper”)

Pájtli É., Zámbo Á., és Palkovics L. (2013): Recombination studies on a Hungarian Potato virus S (PVS) isolate. *Episteme czasopismo naukowo-kulturalne* 3(18), 357-366.

Konferencia összefoglalók („abstract”)

Pájtli É., Zámbo Á., Polgár Zs., Wolf István, Cernák I. és Palkovics L. (2012): Hazai burgonya S vírus (Potato virus S, PVS) izolátum komplett genomjának molekuláris vizsgálata és rokonsági viszonyainak feltérképezése 58. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2012. február 21-22, p 48.

Pájtli É., Zámbo Á., Polgár Zs., Wolf István, Cernák I. és Palkovics L. (2013): Molecular analysis of the complete genome of Hungarian Potato virus S isolate and the mapping of its genetic relationships. 12th IPVE Symposium on Plant Virus Epidemiology, Arusha, Tanzania, 28 January-1 February, p 150.

Pájtli É., Zámbo Á., és Palkovics L. (2013): Egy hazai burgonya S vírus (Potato virus S, PVS) izolátum rekombinációs vizsgálata. 59. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2013. február 19-20., p 56.

Pájtli É., Zámbo Á., Polgár Zs., Wolf István és Palkovics L. (2013): Phylogenetic relationship among Potato virus S isolates. 17th Joint Meeting of EAPR Breeding and Varietal Assessment Section and EUCARPIA Section Potatoes, Hévíz, Hungary, June 30-July 4, p 39.

7. Az értekezés témaköréhez nem, vagy nem közvetlenül kapcsolódó publikációk jegyzéke

Impakt faktoros folyóiratcikkek

Petróczy M., Csejk Gy., Pájtli É. and Palkovics L. (2012): Plasmopara obducens occurring on Impatiens walleriana hybrids and species in Hungary. Morphological and molecular characterization of the pathogen. *Acta Alimentaria*, 41 (Supplement), 171-179. IF 0.475

Palkovics L., Pájtli É. and Salamon P. (2015): First report on natural infection of Colombian datura virus (CDV) in chinese lantern (*Physalis alkekengi* L.). *Plant Disease*, 99(6), 898-898, IF (2014): 2.742

Pájtli É., Eke S. and Palkovics L. (2015): First report of the Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) incidence on Liliium sp. in Hungary. *Plant Disease*, 99(9),1288., IF (2014): 2.742

Osztálylistás folyóiratban megjelent cikk

Tóbiás I., Kiss B., Pájtli É., Tholt G., és Salánki K. (2008): A búza törpülés vírus (wheat dwarf virus) árpa törzsének jellemzése és az átviteli kísérletek. *Növényvédelem* 44(11), 545-552.

Pájtli É., Nagy G., és Pájtli J. (2011): A mák védelme. *Növényvédelem* 47(4), 145-159.

Konferencia összefoglalók („abstract”)

Tóbiás I., Pájtli É., Tholt G., Zsiros L. R., Palkovics L. (2008): A búzatörpülés vírus (wheat dwarf virus) koncentráció változása árpában. XVIII. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum, Keszthely, 2008. január 30.-február 1., p 19.

Tóbiás I., Kiss B., Pájtli É., Tholt G., és Salánki K. (2009): A búzatörpülés vírus (wheat dwarf virus) árpáról izolált törzseinek jellemzése és átviteli kísérletek, 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2009. február 23-24., p 32.

Pájtli É. (2009): A búza törpülés vírus (wheat dwarf virus) etiológiai vizsgálata, XXIX. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Agrártudományi szekció, Gödöllő, 2009. április 6-8., p 245.

Salamon P., Wolf I., Pájtli É., Palkovics L. (2011): PVX-M3- Egy paprikáról (*Capsicum annuum* L.) származó deviáns burgonya X-vírus (Potato virus X) izolátum, 57. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2011. február 21-22., p 28.

Palkovics L., Wolf I., Pájtli É. and Salamon P. (2011): PVX-M3 – A deviant pepper isolate of Potato virus X. American Phytopathological Society-International Congress of Plant Pathology (APS-ICPP) Joint Meeting. Honolulu, Hawaii USA, 6-10 August. p 136

Palkovics L., Wolf I., Pájtli É. and Salamon P. (2011): PVX-M3 – A deviant pepper isolate of Potato virus X. *Phytopathology* 101(6, Supplement), p 136.

Pájtli É., Balotai B., Kiss E. és Palkovics L. (2012): Az őszirozsa sárgaság fitoplazma ('*Ca. Phytoplasma asteris*') járványos fellépése a salátatermesztésben, 2011-ben 58. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2012. február 21-22., p 96.

Pájtli É., Salamon P., Balotai B., Kopp A. és Palkovics L. (2013): A Turnip mosaic virus (TuMV) új gazdanövényei Magyarországon. 59. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2013. február 19-20., p 57.

Pájtli É., Eke S., Halász B. és Palkovics L. (2014): *Plantago asiatica* mosaic virus megjelenése Magyarországon liliomon. 60. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2014. február 18-19. p 55.

Salamon P., Pájtli É., Nemes K., Kis A., Salánki K., Palkovics L. (2014): Újabb adatok a *Physalis* fajokat spontán fertőző vírusokról Magyarországon. 60. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2014. február 18-19. p 70.

Végh A., Hevesi M., Pájtli É., Petrik K., Palkovics L. (2014): Hazai *Erwinia amylovora* izolátumok összehasonlítása molekuláris vizsgálat alapján. 60. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2014. február 18-19. p 118.

Sojnóczki A., Pájtli É., Reiter D., Farkas P., Fail J. (2014): Review of *Thrips tabaci* (Lindeman) Cytochrome C oxidase gene subunit I (Coi) sequences data. 4th Symposium on Palaearctic Thysanoptera, Vienna, Austria. Book of abstracts, 8th – 11th September 2014, p 39.

Pájtli É., Eke S. és Palkovics L. (2015): Egy hazai *Plantago asiatica* mosaic virus izolátum teljes genomjának jellemzése. 61. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2014. február 17-18. p 54.

Koncz L. S., Pájtli É. és Nagy G. (2015): Előzetes felvételezési adatok a kajszi gutaütésszerű elhalásáról Budapest környéki ültetvényekben. 61. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2014. február 17-18. p 61.

Varga T., Czotter N., Pájtli É., Burgyán J. és Várallyay É. (2015): RNS alapú diagnosztikai módszer kidolgozása és felhasználása alma ültetvények virológiai felmérésben. 61. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2014. február 17-18. p 97.