

# HAZAI PVY IZOLÁTUMOK LEVÉLTETŰ ÁTVITELÉBEN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK MOLEKULÁRIS JELLEMZÉSE

## A kutatás tudományos előzményei (irodalmi áttekintés)

A burgonya Y vírus (*Potato virus Y*, PVY) az egész világon elterjedt, nagy gazdasági jelentőséggel bíró vírus, a növényvírusok legnagyobb csoportjának, a *Potyvirus* nemzetségnek (*Potiviridae* család) típus faja (Shukla és mtsai 1994). Legfontosabb gazdanövényei a *Solanaceae* családba tartoznak, mint például a burgonya, dohány, paradicsom és a paprika. Szabadföldi körülmények között elsősorban levéltetű átvitelrel terjed nem-perzisztens módon, ezért a levéltetű átvitel hatékonysága jelentős tényező a járványok kialakításában. A vírus növényen belüli terjedése, annak sebessége szintén szerepet játszik az epidemiákban, hiszen a fertőzés kiindulásának feltétele a vírus gyors szisztémizálódása a forrás növényben. Széles elterjedése egyúttal eltérő izolátumok megjelenését eredményezte, melyek a gazdanövényen okozott tünetekben, szerológiai tulajdonságukban és levéltetű-átviteli képességükben különböznek. Törzsekbe való besorolásuk, csoportosításuk is ezek alapján történt (de Bokx és Huttinga 1981). A burgonyáról izolált PVY törzseket három fő csoportba osztották. Korábban az O törzs (PVY<sup>O</sup>) volt a legelterjedtebb (Siegvald 1984), majd a dohányon érnekróvizist okozó új N törzs (PVY<sup>N</sup>), melynek magyarországi megjelenését Szirmai írta le először (Szirmai 1958). A hagyományos felosztásnak megfelelő harmadik csoportba, C törzs (PVY<sup>C</sup>), olyan izolátumokat soroltak eredetileg, amelyek nem képesek levéltetű átvitelrel terjedni (Boonham és mtsai 2002). Beczner és munkatársai (1984) az 1980-as években a világon elsőként izoláltak és jellemeztek egy új hazai PVY törzset, amely az addig ismert törzsektől eltérően a burgonya gumón okozott nekrotikus gyűrűs foltosságot (PVY<sup>NTN</sup>). Ezt a törzset később a PVY<sup>N</sup> csoportba sorolták szerológiai és biológiai vizsgálatok alapján (Blanco-Urgoit és mtsai 1998). A PVY törzsek fenti csoportosítása azonban mára túlhaladottá vált, mivel problémák merültek fel egyes új izolátumok ill. törzsek besorolásával (Chrzanowska 1991, Kerlan és mtsai 1999, Glais és mtsai 2002). A vírus nagyfokú rekombinációs (ill. hibridizációs) képessége szükségessé tette a törzsek elkülönítéséhez molekuláris virológiai vizsgálatok alkalmazását (Singh 1998, Weilguny és Singh 1998, Romero és mtsai 2001, Walsh és mtsai 2001, Boonham és mtsai 2002, Nie és Singh 2002a, b, Szemes és mtsai 2002). Singh és munkatársai (2008) összefoglalták a burgonyát fertőző PVY törzsek besorolásával és csoportosításával kapcsolatos problémákat, kérdéseket.

A PVY genomja egy pozitív egyszálú RNS-ből áll, amely egy poliproteint kódol. Ezt három, a vírus által kódolt proteínáz vág el a tíz funkcionális fehérjére. Ezek közül a vírus átvitelben a segítő komponens (helper component, HC) és a köpenyfehérje (coat protein, CP) vesz részt. A két fehérje szerepére a levéltetű átvitel képességét elvesztő, deficiens mutáns potyvírusok vizsgálata derített fényt, miután a többszöri mechanikai vírus átvitelt (passzálás) követően a vírust nem lehetett átvinni levéltetűvel (Watson 1960, Kassanis 1961, Swenson és mtsai 1964). Govier és Kassanis (1974) kísérleteikkel igazolták, hogy a vírus vektor által történő gazdanövénybe juttatásában "segítő fehérjék" közreműködnek, ún. hidat képezve a vírus részecske és a vektor között ("híd hipotézis").

A potyvírusok genomját közel kétezer CP alegység burkolja. A virion külső felületén helyezkedik el a CP amino-terminális vége, amely nagy változatosságot mutat, és a konzervált karboxil-terminális vég. Közöttük egy belső, 215-227 aminosavból álló, a karboxil-terminális véghez hasonlóan erősen konzervált rész található (Shukla és Ward 1989). A vektor átvitelben szerepet játszó CP motívumnak a felszínen kell elhelyezkednie, hogy a HC-vel vagy a levéltetű szájszervében elhelyezkedő receptorral kölcsönhatásba léphessen. Az amino-terminális vég konzervált szakaszainak részletes tanulmányozása során Harrison és Robinson (1988) a levéltetű átvittel terjedő és olyan (mutáns) izolátumokat hasonlítottak össze, amelyek nem vihetők át levéltetűvel. A szerzők találtak egy aszparaginsav-alanin-glicin-ből álló motívumot (DAG), amely a levéltetűvel átvihető izolátumokban igen magasfokú konzerváltságot mutatott a levéltetű átvittel nem terjedő izolátumoktól eltérően. Később több potyvírus esetében bizonyították, hogy a megváltozott DAG szekvencia a felelős a levéltetű átviteli képesség hiányáért. A DAG motívum szerepének fontosságát a levéltetű átvitelben közvetlenül bizonyították teljes genom hosszúságú fertőző klónok és mesterséges mutáns vírusok előállításával (Atreya és mtsai 1990). A DAG motívum DAE-re történt mutációja a dohány érfoltosság vírus (*Tobacco vein mottling virus*, TVMV) CP régiójában a levéltetű átvitel képességének elvesztését okozta, míg egy DTG motívummal rendelkező izolátum esetében DAG motívumra történt mutáció helyreállította ezt a képességet a cukkini sárga mozaik vírus (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) fertőző klónjánál (Gal-On és mtsai 1990). Baulcombe és munkatársai (1993) levéltetű átvittel nem terjedő burgonya-X vírus (*Potato virus X*, PVX) CP-ének megfelelő szakaszát kicserélték a DAG motívumra (rekombináns vírust hoztak létre). Amennyiben a levéltetvek előzőleg működőképes HC forráson táplálkoztak, sikeresen átvitték a rekombináns vírust egy PVY-fertőzött növényre.

Urcuqui-Inchima és munkatársai (2001) részletes áttekintést nyújtanak a potyvírusok fehérjéinek szerepéről, működéséről. A HC-Pro multifunkcionális protein részt vesz a levéltetű és virion közötti kölcsönhatás kialakításában. Az egyes levéltetű fajok eltérő mértékben képesek a potyvírusokat átvinni. Különböző vírus-HC-Pro kombinációval táplálkozó levéltetvek vizsgálata alapján összefüggést találtak azzal, hogy adott HC-Pro mennyire volt képes visszatartani adott viriont a rovar szájszervében. A HC-Pro vektor átvitelt szabályozó régiójának meghatározása érdekében a HC-Pro-ban történt mutációk HC-Pro és virionok vagy a CP és a levéltetű szájszerve közötti kölcsönhatásra gyakorolt hatását vizsgálták (Blanc és mtsai 1998). Minden potyvírus tartalmaz egy nagyfokban konzervált tetrapeptidet a HC-Pro amino-terminális végén egy cisztein gazdag motívumon belül: lizin-izoleucin/leucin-treonin/szerin-cisztein (KITC). A PVY egyik természetes mutánsa (PVY<sup>C</sup>), amely KITC motívumában lizin helyett glutamin fordul elő (EITC), nem vihető át levéltetűvel. A PVY<sup>C</sup> HC-Pro a kísérletek szerint ugyanolyan mértékben kötötte meg a virionokat vagy a CP-t, mint a PVY HC-Pro. Immunogold jelölést alkalmazva transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgálva a levéltetű szájszervét kimutatták, hogy a KITC motívumban a K mutációja (E-re) megakadályozta a HC-Pro és a szájszerv kölcsönhatását.

A HC-Pro középső régiójában a prolin-treonin-lizin (PTK) motívum azon mutációi, amelyek a vírus levéltetűvel történő átvitelének csökkenéséhez vagy megszűnéséhez vezettek, egyben megszüntették a HC-Pro kötődését a virionokhoz. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a HC-Pro virionokhoz kötődését lehetővé tevő régió nem az amino-terminális végen van.

Az ezeken a szakaszokon történő bármilyen (akár egy aminosavat érintő) változás a levéltetű átvitel hatékonyságát csökkenti, vagy akár annak teljes képtelenségéhez vezet (Atreya és mtsai 1990, 1991, Canto és mtsai 1995, López-Moya és mtsai 1999, Sasaya és mtsai 2000, Moreno és mtsai 2005).

A HC-Pro másik, epidemiológiai szempontból fontos funkciója a genomamplifikációval és a növényen belüli szisztémikus terjedéssel kapcsolatos, és a központi szekvenciához köthető. Mind a gazdanövény szállítóedényeibe való be-, mind az onnan történő kilépéshez szükséges a HC-Pro működése, noha ennek mechanizmusa nem ismert.

A sikeres fertőzés feltétele a növényi védekezőrendszer "áttörése". A növény természetes vírus elleni védekező mechanizmusa a szöveiteibe, sejtjeibe bejutó idegen RNS-ek szekvenciaspecifikus lebontása, a géncsendesítés. Működő HC-Pro jelenléte elnyomja a géncsendesítést és helyreállítja az amplifikációt. A HC-Pro a növény védekező rendszerével

aktivitásának egy meghatározott pontján interferál. Nem található irodalmi adat arra nézve, hogy az egyes eltérő PVY törzseknél és izolátumoknál van-e különbség a géncsendesítő képességükben. Irodalmi adatok csak mesterséges mutánsok vizsgálata alapján születtek (Kasschau és Carrington 2001). A vizsgálatok szerint a HC-Pro központi doménjében található olyan részek, amelyek megváltoztatása érintette a szupresszor aktivitást.

Korábbi munkánkban (Basky és Almási 2005a, b) két burgonyáról izolált, eltérő csoportba tartozó PVY törzs esetében végeztünk levéltetű átviteli vizsgálatokat. A PVY<sup>O</sup> csoportba tartozó PVY-5 és a PVY<sup>N</sup> csoportba sorolt PVY-98 törzs között jelentős különbségeket találtunk; a vizsgált levéltetű fajok közül jóval több bizonyult a PVY-98 vektorának. Ezért ezekkel az izolátumokkal és egy korábban izolált magyar PVY törzssel végeztünk molekuláris vizsgálatokat.

Levéltetű faj	PVY-98	PVY-5
<i>Aphis rumicis</i>	-	-
<i>A. sambuci</i>	-	-
<i>A. spiraephaga</i>	+	-
<i>A. spiraecola</i>	+	-
<i>A. fabae</i>	+	-
<i>A. fabae cirsiacanthoides</i>	+	+
<i>A. pomi</i>	+	-
<i>Brevicoryne brassicae</i>	-	-
<i>Myzus persicae</i>	+	+
<i>M. cerasi</i>	+	+
<i>M. ligustri</i>	+	+
<i>Diuraphis noxia</i>	+	-
<i>Sitobion avenae</i>	-	-
<i>Schizaphis graminum</i>	+	-
<i>Ropalosiphum padi</i>	+	-
<i>Macrosiphum rosae</i>	+	-

## Az elvégzett kísérletek eredményei

### *A levéltetű átvitelben szerepet játszó motívumok szekvencia vizsgálata*

A Komárom, Berzence, Darnózseli, Sajópüspöki, Balkány, Szentlőrinc és Kisvárdai környéki vetőburgonya táblákról begyűjtött növénymintákat vírusizolálás céljából *Nicotiana tabacum* cv Xanthi-nc teszt növényekre inokuláltuk, majd a tüneteket mutató növényekből *Myzus persicae* levéltetűvel átviteli kísérleteket végeztünk. A dohányon látható tünetek, az ELISA vizsgálatok eredményei, valamint a levéltetűvel való átvitel hatékonysága alapján 3 PVY törzset választottunk ki további vizsgálatok céljára.

Az ELISA szerológiai módszerrel azonosított PVY-5, PVY-111, PVY-98 és PVY-NTN törzseket csak levéltetű átvitelrel tartottuk fenn. Az izolátumok HC-Pro génjét és a köpenyfehérje gén részét kiemeltük, és felszaporítottuk. A PCR termékek bázissorozatát, az adott vektorba klónozást követően, meghatároztuk. A PVY-98 és a PVY-5 izolátumok szekvencia adatait egymással és a hazánkban molekulárisan elsőként jellemzett PVY-H (Thole és mtsai 1993) - a Beczner és munkatársai által 1984-ben izolált N csoportba tartozó PVY<sup>NTN</sup> törzs - nukleotid sorrendjével hasonlítottuk össze a 2. ábrán és az 1., 2. táblázatokban.

1. ábra. A segítő fehérje (helper component, HC-Pro) aminosav szekvenciája a PVY-98 és a PVY-5 izolátumok esetében.

PVY-5	1	<b>GVMDSMVQFSSAESFWKGLDGNWAQMRYPDHTCVAGLPVEDCGRVAAIMTHSILPCYKI</b>
PVY-98	1	<b>GVMDSMVQFSSAESLWKGLDGNWAQMRYPDHTCVAGLPVEDCGRVAAIMTHSILPCYKI</b>
PVY-5	61	<b>TCPTCAQQYANLPASDLLKILHKHASDGLNRLGADKDRFVHVKKFLTILEHLTEPVDLSL</b>
PVY-98	61	<b>TCPTCAQQYANLPASDLLKILHKHASDGLNRLGADKDRFVHVKKFLTILEHLTEPVDLSL</b>
PVY-5	121	<b>EIFNEVFKSIGEKQOSPFKNLNINLNFFLKGKENTAREWQVAQLSLELARFQKNRTDNI</b>
PVY-98	121	<b>EIFNEVFKSIGEKQOSPFKNLNINLNFFLKGKENTAREWQVAQLSLELARFQKNRTDNI</b>
PVY-5	181	<b>KKGDISFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNYFEEIDPAKGY</b>
PVY-98	181	<b>KKGDISFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNYFEEVDPAKGY</b>
PVY-5	241	<b>SAYENRLHPNGTRKLAIGNLIVPLDLAEFRRKMKGDYKRQPGVSKKCMSSKDGNYVYPCC</b>
PVY-98	241	<b>SAYDNRLHPNGTRKLAIGNLIVPLDLAEFRRKMKGDYKRQPGVSKKCTSSKDGNYVYPCC</b>
PVY-5	301	<b>CTTLDDGSAVESTFYPPTKKHLVIGNSGDQKYVDLPKGNSEMLYVARQGFYINIFLAML</b>
PVY-98	301	<b>CTTLDDGSAVESTFYPPTKKHLVIGNSGDQKYVDLPKGNSEMLYIARQGFYINIFLAML</b>
PVY-5	361	<b>INISEEDAKDFTKKVRDMCVPKLGWPTMMDLATTCAQMKIFYPDVHDAELPRILVDHET</b>
PVY-98	361	<b>INISEEDAKDFTKKVRDMCVPKLGWPTMMDLATTCAQMKIFYPDVHDAELPRILVDHET</b>
PVY-5	421	<b>QTCHVVDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELES DIKH YRVG</b>
PVY-98	421	<b>QTCHVVDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELES DIKH YRVG</b>

A megegyező szakaszokat fekete háttérben fehér betűvel jelöltük, az eltéréseket fehér háttérrel kiemeltük. A levéltetű átvitelben szerepet játszó KITC és PTK motívumokat szürke háttérrel jelöltük.

1. táblázat. A segítő fehérje (helper component, HC-Pro) nukleinsav (diagonális felett)- és aminosav-sorrend (diagonális alatt) homológia foka (%) a PVY-98, PVY-5 és a PVY-H törzsek esetében.

HC-Pro	PVY-5	PVY-98	PVY-H
PVY-5		97,99	98,56
PVY-98	98,93		99,14
PVY-H	99,57	98,93	

2. ábra. A köpenyfehérje (CP) aminosav szekvenciája a PVY-98, a PVY-5 és a PVY-H törzsek esetében.

PVY-H CP	1	GNDTIDAGG <b>STKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIKAITSKMRMPKSK</b>
PVY-98CP	1	GNDTIDAGG <b>STKKDAKQEQGSIQPHLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIKAITSKMRMPKSK</b>
PVY-5CP	1	GNDTIDAGG <b>SSKDDAKAEQDSIQLNLNKGGKDKDVNAGTSGTHTVPRIKAITSKMRMPKSK</b>
PVY-H CP	61	GA <b>AVLN</b> LK <b>HL</b> LLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI
PVY-98CP	61	GATVLNLEHL <b>L</b> LLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI
PVY-5CP	61	GATVLNLEHL <b>L</b> LLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAV <b>RM</b> AYDIGET <b>V</b> MP <b>T</b> VMNGLMVWCI
PVY-H CP	121	ENGTSPNINGVWVMMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY
pvy-98CP	121	ENGTSPNINGVWVMMDGDEQVEY <b>PV</b> KPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMR <b>X</b> KKEPY
pvy-5CP	121	ENGTSPN <b>V</b> NGVWVR <b>K</b> DGDEQVEY <b>PW</b> NP <b>I</b> VENAN <b>P</b> TLRQIMAHFSDVAEAYIEMR <b>T</b> K <b>K</b> DPY
PVY-H CP	181	MPRYGLVRNLRDGSLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAAL <b>KS</b> AQ <b>S</b> R <b>L</b> FLDGGIS
PVY-98CP	181	MPRYGL <b>I</b> RNLRDGSLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAAL <b>KS</b> AQ <b>P</b> RLFLDGGIS
PVY-5CP	181	MPRYGL <b>I</b> RNLRD <b>V</b> GLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAAL <b>R</b> SAQ <b>P</b> RLFLDGGIS
PVY-H CP	241	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM
PVY-98CP	241	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM
PVY-5CP	241	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM

A megegyező szakaszokat fekete háttérben fehér betűvel jelöltük, az eltéréseket fehér háttérrel kiemeltük. A levéltetű átvitelben szerepet játszó DAG motívumot szürke háttérrel jelöltük.

2. táblázat. A köpenyfehérje (CP) nukleinsav (diagonális felett)- és aminosav-sorrend (diagonális alatt) homológia foka (%) a PVY-98, PVY-5 és a PVY-H törzsek esetében.

CP	PVY-5	PVY-98	PVY-H
PVY-5		91,38	90,38
PVY-98	93,63		97,5
PVY-H	92,88	97,75	

A PVY-98 és a PVY-5 törzs segítő fehérjéinek HC-Pro nukleinsav bázissorrendje és aminosav sorrendje nagy hasonlóságot mutatott; nukleinsav szinten 98%-os, aminosav szinten 99%-os homológiát tapasztaltunk (1. táblázat, 1. ábra). A PVY levéltetű átvitelében szerepet játszó KITC és PTK motívum megtalálható, és teljesen azonos volt mindegyik törzs esetében (1. ábra).

A köpenyfehérje vizsgálata során nagyobb eltéréseket kaptunk, ami a gén nagyobb variabilitását mutatja. Nukleinsav szinten 91%-os, aminosav szinten 94%-os hasonlóságot mutatott a két törzs (2. táblázat, 2. ábra). A levéltetű átvitelét meghatározó DAG motívum (2. ábra) azonban mindegyik törzs esetében azonos volt. Az általunk izolált PVY-98 és PVY-5 törzsekkel végzett levéltetű átviteli kísérletekben nagy különbségek mutatkoztak a két törzs között (Basky és Almási 2005a, b). A PVY-98 törzset 12 levéltetű faj hatékonyan terjesztette a 16 vizsgált faj közül, míg a PVY-5 törzset csak 4 faj volt képes átvinni. Ezért feltételeztük, hogy a két törzs HC-Pro és CP fehérjéinek aminosav sorrendje - a levéltetű átvitel meghatározó szakaszokon - eltér egymástól. A kísérleteink bizonyították, hogy a levéltetű átvitelben szerepet játszó HC-Pro és CP motívumokban a két vírustörzs egyáltalán nem tér el, ezért feltételezzük, hogy a vektor hatékonyság eltéréseiért a HC-Pro és CP fehérje többi szakaszában talált aminosav különbségek (1., 2. ábra), illetve egyéb tényezők felelősek. Dombrovsky és mtsai (2007) *in vitro* bizonyították cukkini sárga mozaik vírus HC-Pro és *Myzus persicae* szájszervének kutikula fehérjeje közötti kapcsolódást. Mivel ez a kapcsolat a potyvírusokra általánosan értelmezhető, kísérleteink nyomán feltételezzük, hogy a kutikula fehérjéhez történő kapcsolódást egyéb tényezők, - például a fehérje ösztötlése, vagy térbeli szerkezete - befolyásolhatnak.

#### *A géncsendesítés vizsgálata transzgénikus növényekben*

Kísérleteinkben a kiválasztott, szekvenciájukban eltérő izolátumok (PVY-5 és PVY-98) HC-Pro génjét agrobaktérium vektorba (pBIN61S) klónoztuk és agrobaktériumba transzformáltuk, úgy hogy a fehérje első aminosavát start kodonra (metioninra) cseréltük, illetve a végére stop kodont terveztünk. A zöld fluoreszcens proteinnel (green fluorescent protein, GFP) transzformált transzgénikus növények segítségével vizsgáltuk a szuppresszor aktivitást. A GFP transzgénikus növényeket koinfiltráltuk GFP-t tartalmazó agrobaktériumokkal, és a kiválasztott klónokkal. Az infiltráció helyén a transzgénikus növényben a géncsendesítési mechanizmus miatt a GFP mRNS-ek elbomlanak; kialakul a növény levelén a lokális csendesítés, majd később a csúcsi leveleken a szisztemikus csendesítés. Abban az esetben, ha a GFP infiltrálással együtt HC-Pro-t tartalmazó agrobaktériumokat is bejuttattuk a növény levelébe, a HC géncsendesítés szuppressziója következtében az infiltrálás helyén UV fényben az infiltrált folt zölden fluoreszkált, az infiltrált levélen nem alakult ki a lokális csendesítésre utaló vörös gyűrű, sem szisztemikus csendesítés nem jött létre a PVY-98 és a kontroll PVY-H referencia izolátum helper

komponensét tartalmazó klónnál. Mind a PVY-98, mind a PVY-H HC-Pro esetén a fluoreszkálás mértéke megegyező volt. A PVY-5 izolátumnál nem volt szuppresszió, a fehérje működésképtelen volt.

Alapfeltételezésünk az volt, hogy az eltérő szekvenciákat tartalmazó izolátumok vagy eltérő vírustörzsek HC-Pro-ját vizsgálva különbségeket fogunk találni az UV megvilágításban fluoreszkáló foltok fényintenzitásában. Az izolátumok eltérő szekvenciája alapján összehasonlítva a fényintenzitásbeli különbségekkel következtetéseket vonhatunk le avval kapcsolatban, hogy mely szekvencia változás ill. a HC-Pro mely része vesz részt a géncsendesítés szuppressziójában. A két vizsgált izolátum között ennyire eltérő eredményeket kapjunk, felvetette azt a lehetőséget, hogy klónozás illetve a PCR során az agrobaktériumba építéskor nem változtak-e meg az izolátumok szekvenciái. Ezért az agrobaktérium vektorban lévő klónok szekvenciáit újra meghatároztuk, majd aminosav szekvenciára fordítottuk, és összehasonlítottuk az eredeti szekvenciákkal (3.ábra). Az összehasonlításakor jól megfigyelhető volt, hogy megtörtént az első aminosav cseréje metioninra, ami a tervezett start kodon volt. Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy a PVY-5 izolátumnál a 400. aminosav helyén a szekvencia megváltozása stop kodont eredményezett. Így a fehérje karboxi-terminális vége nem íródott át, és ezért vált működésképtelenné a fehérje.



### 3. ábra Az eredeti és az agrobaktérium vektorból származó aminosav szekvenciák összehasonlítása

PVY-5	1	GVMDSMVQFSSAESLFWKGLDGNWAQMRYPTDHTCVAGLPVEDCGRVAATMTHSILPCYKI
PVY-98	1	GVMDSMVQFSSAESLWKGLDGNWAQMRYPTDHTCVAGLPVEDCGRVAATMTHSILPCYKI
PVY-98agro	1	MVLDSMVQFSSAESLWKGLDGNWAQMRYPTDHTCVAGLPVEDCGRVAATMTHSILPCYKI
PVY-5agro	1	MVLDSMVQFSSAESLFWKGLDGNWAQMRYPTDHTCVAGLPVEDCGRVAATMTHSILPCYKI
PVY-5	61	TCPTCAQQYANLPASDLLKILHKHASDGLNRLGADKDRFVHVKKFLTILEHLTEPVDLSL
PVY-98	61	TCPTCAQQYANLPASDLLKILHKHASDGLNRLGADKDRFVHVKKFLTILEHLTEPVDLSL
PVY-98agro	61	TCPTCAQQYANLPASDLLKILHKHASDGLNRLGADKDRFVHVKKFLTILEHLTEPVDLSL
PVY-5agro	61	TCPTCAQQYANLPASDLLKILHKHASDGLNRLGADKDRFVHVKKFLTILEHLTEPVDLSL
PVY-5	121	EIFNEVFKSIGEKQOSPFKNLNILNNFFLKGKENTAREWQVAQLSLELARFQKNRTDNI
PVY-98	121	EIFNEVFKSIGEKQOSPFKNLNILNNFFLKGKENTAREWQVAQLSLELARFQKNRTDNI
PVY-98agro	121	EIFNEVFKSIGEKQOSPFKNLNILNNFFLKGKENTAREWQVAQLSLELARFQKNRTDNI
PVY-5	121	EIFNEVFKSIGEKQOSPFKNLNILNNFFLKGKENTAREWQVAQLSLELARFQKNRTDNI
PVY-5	181	KKGDISFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGOEYHAKRFFSNYFEEIDPAKGY
PVY-98	181	KKGDISFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGOEYHAKRFFSNYFEEVDPAKGY
PVY-98agro	181	KKGDISFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGOEYHAKRFFSNYFEEVDPAKGY
PVY-5agro	181	KKGDISFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGOEYHAKRFFSNYFEEIDPAKGY
PVY-5	241	SAYENRLHPNGTRKLAIGNLIVPLDLAEFRRKMKGDYKRQPGVSKKCMSSKDGNYVYPCC
PVY-98	241	SAYDNRLHPNGTRKLAIGNLIVPLDLAEFRRKMKGDYKRQPGVSKKCTSSKDGNYVYPCC
PVY-98agro	241	SAYENRLYPNGTRKLAIGNLIVPLDLAEFRRKMKGDYKRQPGVSKKCTSSKDGNYVYPCC
PVY-5agro	241	SAYENRLHPNGTRKLAIGNLIVPLDLAEFRRKMKGDYKRQPGVSKKCMSSKDGNYVYPCC
PVY-5	301	CTTLDDGSAVESTFYPPTKKHLVIGNSGDQKYVDLPGKNSEMLYVARQGFYINIFLAML
PVY-98	301	CTTLDDGSAVESTFYPPTKKHLVIGNSGDQQYVDLPGKNSEMLYVARQGFYINIFLAML
PVY-98agro	301	CTTLDDGSAVESTFYPPTKKHLVIGNSGDQQYVDLPGKNSEMLYVARQGFYINIFLAML
PVY-5agro	301	CTTLDDGSAVESTFYPPTKKHLVIGNSGDQKYVDLPGKNSEMLYVARQGFYINIFLAML
PVY-5	361	INI SEEDAKDFTKKVRDMCVPKLGTPWPTMMDLATTCAQMKIFYPDVHDAELPRILVDHET
PVY-98	361	INI SEEDAKDFTKKVRDMCVPKLGTPWPTMMDLATTCAQMKIFYPDVHDAELPRILVDHET
PVY-98agro	361	INI SEEDAKDFTKKVRDMCVPKLGTPWPTMMDLATTCAQMKIFYPDVHDAELPRILVDHET
PVY-5agro	361	INI SEEDAKDFTKKVRDMCVPKLGTPWPTMMDLATTCAQM*-----
PVY-5	421	QTCHVVDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELES DIKH YRVG
PVY-98	421	QTCHVVDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELES DIKH YRVG
PVY-98agro	421	QTCHVVDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELES DIKH YRVG
PVY-5agro	400	-----

Az ábrán fekete háttérrel az azonosságokat, fehér és szürke háttérrel a különbségeket jelöltük. Piros háttérrel a KITC és PTK motívumok láthatók, melyek a levéltetű átvitelben játszanak szerepet. A \* stop kodon, - az át nem írt aminosavakat jelöli.

Hasonló eredményeket kaptak Varrelmann és munkatársai (2007), amikor egy másik potyvírusnál a HC-Pro fehérjében mutációs változásokat hoztak létre a karboxi-terminális végen.

A szekvenciában további változások is megfigyelhetők voltak néhány helyen (1. ábra). A potyvírusoknál a szekvencia megváltozása, stop kodon kialakulása a vírus működésképtelenségéhez vezet, a poliprotein típusú transzláció miatt. Így biztosan tudható, hogy a klónozás során történt változás, ill. az eredeti vírusszekvenciában nem voltak meg a funkcióképességet megszüntető változások.

Későbbiekben tovább fogjuk folytatni a vizsgálatokat új klónok elkészítésével.

## Irodalomjegyzék

- Atreya, C.D., Raccach, B., Pirone, T.P.(1990): A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* 178: 161-165.
- Atreya, P.L., Atreya, C.D. and Pirone, T.P. (1991): Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7887-7891.
- Basky, Zs. és Almási, A. (2005a): A PVY<sup>O</sup> és a PVY<sup>N</sup> törzseinek összehasonlító vizsgálata vektorhatékonyság és transzlokáció szempontjából. *Növényvédelem* 41 (6): 233-246.
- Basky, Zs. and Almási, A. (2005b): Differences in aphid transmissibility and translocation between PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>O</sup> isolates. *J. Pest Sci.* 78, 67-78.
- Baulcombe, D.C., Lloyd, J., Manoussopoulos, I.N., Roberts, I.M., Harrison, B.D. (1993): Signal for potyvirus-dependent aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and the effect of its transfer to potato virus X. *J. Gen. Virol.* 74: 1245-1253.
- Beczner, L., Horváth, J., Romhányi, I. and Förster, H. (1984): Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Res.* 27: 339-352.
- Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. and Pirone, T.P. (1998): Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virology* 79:3119-3122.
- Blanco-Urgoit, B., Tribodet, M., Leclere, S., Ponz, F., Perez de San Roman, C., Legorburu, F.J., Kerlan, C. (1998): Characterisation of potato virus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. *European Journal of Plant Pathology* 104, 811-819.
- Boonham, N., Walsh, K., Preston, S., North, J., Smith, P., Barker, I. (2002): The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>C</sup> strains using RT-PCR. *J. Virol. Meth.* 102: 103-112.
- Canto, T., López-Moya, J.J., Serra-Yoldi, M.T., Díaz-Ruíz, J.R. and López-Abella, D. (1995): Different helper component mutations associated with lack of aphid transmissibility in two isolates of potato virus Y. *Phytopathology* 85(12): 1519-1524.
- Chrzanowska, M. (1991): New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY<sup>N</sup>) found recently in Poland. *Potato Res.* 34: 179-182.
- De Bokx, J.A. and Huttinga, H. (1981): Potato virus Y. Descriptions of plant viruses, No. 242. *Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol.*, Kew, UK.

- Dombrovsky, A., Gollop, N., Chen, S., Chejanovsky, N. and Raccach, B. (2007): *In vitro* association between the helper component-proteinase of zucchini yellow mosaic virus and cuticle proteins of *Myzus persicae*. J. Gen. Virology 88:1602-1610.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A., Raccach, B. (1990): Nucleotide sequence of zucchini yellow mosaic virus capsid-coding gene and its expression in *Escherichia coli*. Gene 87: 273-277.
- Glais, L., Tribodet, M. and Kerlan, C. (2002): Genomic variability in *Potato virus Y* (PVY): evidence that PVY<sup>N</sup> W and PVY<sup>NTN</sup> variants are single to multiple recombinants between PVY<sup>O</sup> and PVY<sup>N</sup> isolates. Arch. Virol. 147: 363-378.
- Govier, D.A., Kassanis, B. (1974): A virus induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. Virology 61: 420-426.
- Harrison, B.D., Robinson, D.J. (1988): Molecular variation in vector-borne plant viruses: Epidemiological significance. Philos. Trans. R. Soc. London Biol. 321: 447-462.
- Kasschau, K.D., Carrington, J.C. (2001): Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. Virology 285: 71-81.
- Kassanis, B. (1961): The transmission of potato aucuba mosaic virus by aphids from plants also infected by potato virus A and Y. Virology 13: 93-97.
- Kerlan, C., Tribodet, M., Glais, L. and Guillet, M. (1999): Variability of potato virus Y in potato crops in France. J. Phytopathology 147: 643-651.
- López-Moya, J.J., Wang, R.Y. and Pirone, T.P. (1999): Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. J. Gen. Virology 80:3281-3288.
- Moreno, A., Hébrard, E., Uzest, M., Blanc, S. and Fereres, A. (2005): A single amino acid position in the helper component of cauliflower mosaic virus can change the spectrum of transmitting vector species. J. Virology 79: 13587-13593.
- Nie, X., Singh, R. (2002): A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of *Potato virus Y* by uniplex and multiplex RT-PCR.. J. Virol. Meth. 104: 41-54.
- Romero, A., Blanco-Urgoiti, B., Soto, M.J., Fereres, A. and Ponz, F. (2001): Characterization of typical pepper-isolates of PVY reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. Virus Res. 79: 71-80.
- Sasaya, T., Torrance, L., Cowan, G. and Ziegler, A. (2000): Aphid transmission studies using helper component proteins of *Potato virus Y* expressed from a vector derived from *Potato virus X*. J. gen. Virol. 81: 1115-1119.

- Shukla, D.D., Ward, C.W. (1989): Structure of potyvirus coat protein and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Adv. Virus Res.* 36: 273-315.
- Shukla, D.D., Ward, C.W. és Brunt, A.A. (1994): *The Potyviridae*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Siegyvald, R. (1984): The relative efficiency of some aphid species as vectors of potato virus Y<sup>0</sup> (PVY<sup>0</sup>). *Potato Research* 27, 285-290.
- Singh, R.P. (1998): Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. *J. Virological Methods* 74: 125-138.
- Singh, R.P., Valkonen, J.P.T., Gray, S.M., Boonham, N., Jones, R.A.C., Kerlan, C. and Schubert, J. (2008): Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch. Virology* 153:1-13.
- Swenson, K.G., Sohi, S.S., Welton, R.E. (1964): Loss of transmissibility by aphids of bean yellow mosaic virus. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 57: 378-382.
- Szirmai, J. (1958): A burgonya Y-vírusának érbarnulást okozó törzse dohánykulturákban. *Növénytermelés* 7, 341-350.
- Thole V., Dalmay T., Burgyán J. and Balázs E (1993) Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene*,123:149–156.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A., Bernardi, F. (2001): Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74: 157-175.
- Varrelmann, M., Maiss, E., Pilot, R. and Palkovics, L (2007): Use of insertion scanning linker mutagenesis for functional mapping of *Plum pox virus* helper component proteinase suppressor of gene silencing. *Journal of General Virology* 88: 1005-1015.
- Weilguny, H., Singh, R.P. (1998): Separation of Slovenian isolates of PVY<sup>NTN</sup> from the North American isolates of PVY<sup>N</sup> by 3-primer PCR. *J. Virological Methods* 71: 57-68.
- Walsh, K., North, J., Barker, I., Boonham, N. (2001): Detection of different strains of Potato virus Y and their mixed infections using competitive fluorescent RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 91, 167-173.
- Watson, M.A. (1960): Evidence for interaction or genetic recombination between potato virus Y and C in infected plants. *Virology* 10: 211-232.