

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Növényélettan és Növényi Biokémia tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

Beet cryptic virus 2 kvázispéciesz spektrum térképezése céklában

Győrfi Viktória Zs.

Kertészmérnök BSc. III. évfolyam

Konzulensek: Dr. Szegő Anita, egyetemi adjunktus
Hinel Sándor, PhD hallgató

Budapest, 2013

Tartalomjegyzék

ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:	4
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. A kriptikus vírusok a gazdaszervezetben és azon kívül	6
2.2. A horizontális géntranszfer	8
2.3. Kvázispéciesz jelensége	10
2.4. A Beta nemzetség kriptikus vírusai	11
3. CÉLKITŰZÉS	16
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
4.1. Növényanyag:	17
4.2. Reagensok	17
4.3. Nukleinsav tisztítási és izolációs eljárások	17
4.4. Gélelektroforézis	20
4.6. Reverz transzkripció és PCR reakció	21
4.7. Szekvencia analízis	23
4.8. Koncentráció mérés	24
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	25
5.1. Koncentráció eredmények	25
5.2. Cékla <i>Beet cryptic virus 2</i> dsRNS2 (RdRp) kódoló régiójának lefedése	28
5.3. Cékla <i>Beet cryptic virus 2</i> dsRNS1 (CP1) kódoló régiójának lefedése	30
5.4. Cékla <i>Beet cryptic virus 2</i> , dsRNS3 (CP2) kódoló régiójának részleges lefedése	32
5.5. Céklából izolált BCV2 RdRp és CP1 aminosav szekvenciájának összehasonlítása a közeli rokon vírusfajokkal	34
5.6. Kísérlet kriptikus vírus homológ szekvenciák azonosítására cékla genomi DNS-ből	36
6. ÖSSZEFOGLALÁS	38

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	39
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	40

Alkalmazott rövidítések jegyzéke:

A	Adenin
BCV1	<i>Beet cryptic virus 1</i>
BCV2	<i>Beet cryptic virus 2</i>
BCV3	<i>Beet cryptic virus 3</i>
bp	Bázis pár
C	Citozin
cDNS	Komplementer (complementer) DNS
CP	Köpenyfehérje (coat protein)
dsRNS	Duplaszálú (double-stranded) RNS
G	Guanin
kbp	Kilobázispár
MQ	milliQ ioncserélt víz
NIRVS	Non-retroviral Integrated RNA Virus Sequence
PCR	Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
RdRp	RNS-függő RNS-polimeráz (RNA-dependent RNA polymerase)
U	Uracil, enzimeknél: Unit
VCV	<i>Vicia cryptic cirus</i>
WCCV1	<i>White clover cryptic cirus 1</i>

1. Bevezetés

A vírusok felfedezése Dmitrij Ivanovszkij nevéhez fűződik, aki 1892-ben végzett kísérletei során TMV –vel (Tobacco mosaic virus) fertőzött dohánylevelek levélével újra tudott fertőzni, annak ellenére, hogy azokat már átszűrte baktérium szűrőn. A vírusok neve is innen ered a latin virus, azaz méreg szóból, hiszen a szűrletben jelen voltak, de az akkor látható legkisebb élőlények a baktériumok voltak, tehát úgy gondolták csak valamilyen méreganyag okozhatja a betegséget. Természetesen az elektronmikroszkóp felfedezésével és az azóta eltelt száz év kutatásainak köszönhetően immár sokkal több információval rendelkezünk róluk. Egy fajta kivételek az élőlények mai definíciója alól. Obligát paraziták, életjelenségeket csak a gazdaszervezetben mutatnak, nincs önálló anyagcseréjük, embereket, állatokat, növényeket és a baktériumokat megbetegítő genetikai információk. Az olyan rendkívül gyorsan terjedő vírusokra, mint például a HIV, a különböző influenzák, valamint a fentebb már szereplő TMV-re, és ez valóban igaz is az ismert vírusok legtöbbszörére. Ám a kivételek kivételei a növényi kriptikus vírusok, hiszen a fertőzött növényben, tüneteket nem okozva bújnak meg, mesterségesen nem lehet velük fertőzni (például átoltással, fertőzött levélnedvvel), és így a tesztnövényre gyakorolt hatásukat sem tudjuk vizsgálni. Ami nem, hogy káros lenne a növényre, hanem egy 2005-ben Nakatsuka-Akune és munkatársai által végzett kísérlet arra enged következtetni, hogy a fertőzött növények egyfajta evolúciós előnyt szereznek „egészséges” társaikkal szemben. Igen alacsony, $\leq 1\mu\text{g/g}$ levélszövet koncentrációban fordulnak elő (Boccardo és mts., 1987), így a gazdanövényből nehézkes a kinyerésük, tehát a tudomány mai állása szerint számukat és elterjedésüket megbecsülni sem tudjuk. Ennek ellenére gyakoriságukról valamelyest képet kaphatunk azon fajaik listájáról, amelyek már szerepelnek az NCBI genetikai bankjában. Íme kettő a legfrissebb eredmények közül: *Alphacryptovirus JF-2012* (Liang, Y., 2012-07-12) és *Persimmon cryptic virus* (Morelli, M., 2012-04.26). Éppen ezért a változatos elterjedés miatt fontosak a virális genommal végzett összehasonlító kísérletek, amelynek alapján a kriptikus vírusok rokonsági köreiről átfogóbb képet kaphatunk (Ghabrial, 1998.). Jelenleg a Partitiviridae család morfológiai jegyeken alapuló rendszertana revízió megy keresztül (Lesker és mts, 2011), mely alapján javasolják a *Beet cryptic virus 2*-nek a Betacryptovirus nemzetségből az Alphacryptovirus nemzetségbe sorolását, mely nemzetséget két részre, (I) és (II), osztanának a gombákban előforduló Partitivirus nemzetség tagjaihoz való aminosav szekvencia homológia alapján.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A kriptikus vírusok a gazdaszervezetben és azon kívül

A kriptikus vírusok felfedezése általában a véletlennek köszönhető más patogének utáni célzott kutatásokban. Olyan szimbiotikus kapcsolatot voltak képesek kialakítani a gazdaszervezetekkel közös evolúciójuk során, amelyben a vírus generatív úton (pollennel vagy maggal) öröklődik az utódokra, így tünetmentesen jelen van a gazdaszervezet születésétől annak haláláig (Hull, 2002). Mivel mindez idő alatt koncentrációjuk alacsony, több kutatócsoport is megkísérelte már eltávolításukat a gazdaszervezetből, ám ezen kísérletek eredményeit, vagyis hogy tényleg sikerült-e eliminálni őket, nem tekinthetjük bizonyító erejűnek az akkor alkalmazott eljárások nem megfelelő érzékenysége miatt (Stanarius és mts., 1989.).

Vizsgálatukat tovább nehezíti, hogy az olyan vírusátviteli módokkal, melyek miatt a növénytermesztés során is könnyen „fertőzhetjük” az alanyokat (mechanikai úton, sebeken keresztül szövetnedvvel, oltással ahol a fertőzött szövetéből hatol át az egészségesbe) sikertelenek a kriptikus vírusoknál. A többi fertőző, szubmikroszkópikus, biotróp, genetikai információt tartalmazó nukleoproteinhez hasonlóan a gazdaszervezeten kívül mozgásképtelenek, de mivel a klasszikus átviteli módok nem alkalmazhatóak esetükben arra következtethetünk, hogy nem rendelkeznek a sejtek közötti transzportot lehetővé tevő transzportfehérjével (Boccardo és mts., 1987.). Tehát a növényen belül nem terjedhetnek szét sejtről sejtre, majd a szállító nyalábokon keresztül sem szisztematizálódhatnak, hanem elfogadottan a sejtek osztódása során kerülnek át másik sejtbe. Mint minden vírus, táptalajon nem tenyészthetőek, hiszen a gazdaszervezet mechanizmusai nélkül szaporodásképtelenek.

Szerkezetük jellegzetessége (32-34 nm átmérőjű izometrikus vírusrészecskék, és egyenként 1-3 kbp hosszúságú dsRNS szegmensek) is felhívta a kutatók figyelmét a vírusok e fajaira. Általánosan a duplaszálú RNS vírusok igen elterjedtek az élővilágban, gombákban, növényekben, állatokban egyaránt fellelhetőek. Növények esetén a vírusok döntő többsége RNS vírus (Dodds és mts., 1984). A növények nukleinsav szinten több minőség biztosítási rendszerrel is rendelkeznek. Ilyen rendszer az NMD (nonsense-mediated mRNA decay), mely a domináns negatív hatású csonka fehérjét kódoló, korai stop kodont tartalmazó mRNS-eket felismeri és lebontja. Ezt a mechanizmust növényekben 2009-ben Mérai Zsuzsanna doktori értekezésében vizsgálta, és úgy

találták, hogy az addigi elmélet, mely szerint az eukarióták közös őse egy primitívebb NMD-vel rendelkezett, majd a későbbiekben alakult a ma emlősökben fellelhető rendszer is, hibás és ősből, konzerváltabb a ma fellelhető formája. A kriptikus vírusokat láthatóan ez a mechanizmus nem ismeri fel, tehát a gazdaszervezet valahol sajátjának tekinti az mRNS-eit.

Általánosságban tehát elmondható, hogy étkezési célra termesztett növények körében valósultak meg inkább a kutatások. A mai napig nyitvatermőkben mindössze a *Pinus sylvestris* fajban és bizonyos *Abies* fajokban keresték a kriptikus vírusokat (Flechmann és mts., 1990.; Veliceasa és mts., 2005). Többszörösen publikált jelenség, hogy bizonyos kriptovírusok a genomot kódoló virális RdRp mellett két köpenyfehérjét kódoló szegmenssel rendelkezik (Boccardo és Candresse 2005,a és b; Salem és mts., 2008; Szegő, 2009.), ám ez még mindig nem a szokványos kódoló kapacitás kihasználása (Hull, 2002.). Az utóbbi két évtized kutatásainak köszönhetően egyre több három genom szegmenssel rendelkező kriptovírust fedeztek föl, mint például a *Raphanus sativus cryptic virus 1* (Chen és mts., 2006,a.), a *Fragaria chiloensis cryptic virus* (Tzanetakis és mts., 2008.), a *Rosa multiflora cryptic virus* (Salem és mts., 2008). Ilyen továbbá a dolgozatomból is fontos *Beet cryptic virus 2* (Szegő, 2009).

1995-ben Oh és Hillman, igaz csak egyetlen kriptikus vírus vizsgálata alapján, azt a hipotézist állította fel, hogy a gazdanövényt fertőzött endofita gombák oltották be a vírussal vagy fordítva, a gazdaszervezetből kerültek a gombákban is replikálódni képes genomi szegmensek. Időközben 2006-ban és 2007-ben megjelentek olyan összehasonlító publikációk (Chen és mts., 2006,a és b; Blawid és mts., 2007.), melyekben világossá vált, hogy a kriptikus vírusok az egyszálú növényi RNS vírusokra alig, míg a Partitiviridae család gombavírus tagjaihoz annál inkább hasonlóságot mutatnak.

Ezt igazolta idén Liu Huiquan és kutatócsoportja is, mely *in silico* tanulmányozták a kriptikus vírusokat. Vagyis a cDNS könyvtárakban és az EST szekvencia analízishez használt eukarióta organizmusokban megőrzött vírus szekvenciákra, amelyek rejtve maradtak eddig a kutatók előtt, kidolgoztak egy olyan klónozási eljárást, mellyel a teljes vagy részleges szekvencia bioinformatikai eszközökkel hozzáférhetővé vált. Ennek eredményeképp 119 vírusokra emlékeztető szekvenciát sikerült azonosítaniuk Partitiviridae, Totiviridae, Endornaviridae, Chrysoviridae családokból, ezek közül sokaknak eukarióta származást tulajdonítottak, de ismert hordozó nélkül. Munkájuk

rávilágított, hogy az idáig leírt kriptikus vírus fajokon kívül sok új duplaszálú RNS-sel rendelkező vírus hosszú ideig együtt fejlődött a gazdaszervezetek csoportjaival, sőt ezek között horizontális géntranszferrel átjárásuk is biztosított. Tehát például a gombák a növényeknek adhatták tovább vírusaikat.

Elterjedésükre további remek példa az idén publikált *Alphacryptovirus JF-2012* szekvencia (Liang és mts., 2012.), melyet egy algafajból, a *Chlorella vulgaris*-ből sikerült a kínai kutatóknak kimutatni.

2.2. A horizontális géntranszfer

A horizontális géntranszfer jelenségéről 2010-ben szintén Liu Huiquan és munkatársai tettek közzé egy összefoglaló cikket, melyben a nyilvános genom adatbázisokban kutatva olyan köpenyfehérjékre (a vírusok azon fehérjéje, amelyek egymással összekapcsolódva egy burkot, azaz viriont alkotnak, mely a nukleinsavat körülveszi) és RNS függő RNS polimeráz homológokra bukkantak az eukarióta organizmusok genom szekvenciájában (növényekben, gombákban, ízeltlábúakban, fonálférgekben és puhatestűekben), melyek feltehetően a toti- és partitivírusokból származnak. Vagyis általánosan a horizontális géntranszferrel sodródó génszakaszok iránya sejtekből vírusokba tart, de ritkán előfordul a vírusokból a hordozó sejtek felé, kivéve a retrovírusok és néhány DNS vírus esetén. De a PCR amplifikációk és szekvenálások, valamint a vírusok és hordozó szekvenciák közötti csomópontok lefedettségének összehasonlítható bizonyítékai azt engedik feltételezni, hogy ezek a virális homológok valódiak és jelen vannak az eukarióta genomokban. Ezen túl bizonyítják, hogy néhány átvitt gén megőrződött, továbbá ki is fejeződött ezen organizmusokban, ez azt is jelentheti, hogy ezen virális gének működő képesek az említett genomokban. Tehát eredményeik azt mutatják, hogy a virális dsRNS gének horizontális átvitele elterjedt az eukarióták között, ami hasznos új gének kifejlődését jelentheti, vagyis lehetséges, hogy az RNS vírusok fontos szerepet játszanak az eukarióták evolúciójában.

Ugyan ebben az évben, ugyan ezzel kapcsolatban Sotaro Chiba és munkatársai tették közzé eredményeiket miszerint a nem retrovirális RNS szekvenciákat találtak gerincesekben és gombákban, de növényekben nem. Továbbá a hasonlóan endogenizált NIRVS (non-retroviral integrated rna virus sequences), amelyek a növényi kromoszómák pozitív szálú, negatív szálú és duplaszálú RNS vírusaiból származnak. Ezeket a

szekvenciákat nyilvános adatbázisokban keresve találták meg és a legtöbb ilyen NIRVS-t növényi DNS-ek direkt molekuláris analízisével találták meg. A legelterjedtebbek köztük a Partitiviridae család köpenyfehérje génjeihez hasonlók. E családnak dsRNA genomja van, ide tartoznak a növényeket és a gombákat fertőző családtagok is. Például az RnPV2 gombavírus köpenyfehérjéje hasonlít legjobban az *Arabidopsis thaliana* ILR 2-höz, amiről úgy gondolják, hogy az indol-3-ecetsav, azaz a fitohormon auxin működését szabályozza, valamit szerepe van a fém transzportban is. Tehát, nem csak hogy megőrződött a növényi genomban, hanem ki is fejeződik ott, ezzel a növény alapvető életfolyamatait befolyásolja. Potenciálisan integrálódhattak és napjainkban is integrálódhatnak a gazdanövény genomjába, ott részt vehetnek, vehettek bizonyos növényi fajok feltáratlan fejlődéstörténeti szakaszaiban.

Idén, 2012-ben Yue és kutatócsoportja bejelentette, hogy genom analíziseik során a *Physcomitrella platensis* moha genomjában kimutatható ötvenhét géncsalád, amelyek prokariótákból, vírusokból vagy gombákból származnak. Ezekből sok géncsalád szárazföldi vagy zöld növények őseibe került át horizontális génátvitel útján. Kimutatható továbbá, hogy ezek a gének részt vesznek olyan alapvető a növényi szervezetet felépítő mechanizmusokban, mint a xilém képződésében, a nitrogén újrahasznosításában, valamint a keményítő és különféle növényi hormonok szintézisében. Mindez arra utal, hogy a növények korai evolúciójában ez az esemény gyakran dinamikus ütemben előfordulhatott, sőt alapvető szerepet tölthetett be áttelepülésükben a vízi környezetből a szárazföldibe.

Ezen cikkek alapján is elmondható, hogy az eddigi genetikai kutatások igen komoly problémája, hogy a kutatók csak azt találhatják meg az adott genomban, amit keresnek. A technikai korlátok ezáltal nagyban befolyásolják az eredményeket. Tehát rendkívül fontos az evolúció megértésének szempontjából, a már ismert genomok összehasonlító elemzése.

A kriptikus vírusok kapcsolata a gazdaszervezettel tisztázatlan, de 2006-ban Nakatsukasa-Akune és munkatársai a WCCV1 köpenyfehérjéjét a *Lotus japonicus*-ban túlexpresszáltatva megfigyelték, hogy az gátolja a nodulációt, de egyúttal a fehérje védelmet biztosít más fertőzések ellen, egy immunválaszt indukálva és ezen keresztül az abszicinsav mennyiségét is befolyásolja. Ez alapján feltételezhetjük, hogy együttélésük szimbiotikus.

Változatosságukról a gazdanövényen belül a *Vicia* kriptikus vírusról végzett kísérlet mutatott rá, de arra is, hogy képtelenek voltak a kutatók mutánsokat előállítani a növényből izolált vírusból. Ezen vírusok köpenyfehérjéje szintén nagyfokú hasonlóságot mutat a gazdaszervezet *Vicia* fehérjéivel, és bár nem bizonyított, feltételezhetjük, hogy evolúciós együttélésük során tökéletesen alkalmazkodtak egymáshoz, tehát a növényre hatással van a benne rejlő vírus genomja.

Ezért választottuk dolgozatomban témájaként a *Beet cryptic virus 2*-t, célból, hogy ezen két köpenyfehérjével is rendelkező vírus szekvenciájának analízisével bepillantást nyerhessünk a *Beta* nemzetségben előforduló BCV2 izolátumokkal való hasonlóságára.

2.3. Kvázispéciesz jelensége

A vírusok természetes úton igen gyorsan mutálódnak, hiszen ismereteink szerint nem rendelkeznek olyan beépített replikáció védelmi mechanizmusokkal, mint bármely sejt, legyen az növényi vagy állati eredetű. Az olyan halálos betegségek, mint az AIDS, gyógyítása pontosan azért ütközik akadályokba, mert a genomja nagy százalékban egyezik a gazdaszervezettel, tehát fertőzésükkor speciális kezelésre lenne szükség. Mindazonáltal a gyors mutálódás olyanná teszi őket, mintha teljes populációkkal akarnánk felvenni a harcot.

A fertőzés során a vírusmutánsok komplex és dinamikus eloszlása, azaz a vírus kvázispéciesz spektruma fő szerepet játszik a változó környezethez való alkalmazkodásukban és populációjuk fennmaradását segíti. Replikációjuk során elkerülhetetlenül keletkeznek mutáns egyedek, de nem a rosszul végzett átírás melléktermékei, ahogy a néhány éve elvégzett kísérletek bizonyítékai mutatják. A mutáns populáció rész vesz a tünetek kialakításában, a domináns szekvenciák kihatnak a kisebb számban jelenlévőkre. Mindazonáltal genomjuk tartalmaz olyan „emlékező” szakaszokat, amelyek tükrözik a múltbeli vírus evolúciós történetének lenyomatát. A túlzott mértékű mutálódás a vírus eliminálódásával járhat. Mindez még hozzájárul a vírusok véletlen génsodródásához és befolyásolja hosszú távú jövőbeli evolúciós folyamatait is (Domingo és mts., 2006.)

A kísérleti eredmények azt bizonyítják, miszerint az RNS vírus populációk kvázispéciesz rendszerekből állnak. Erről született publikáció 1971-ben, Eigen számol be elsőként erről a kutatással megalapozott elméletről, amely egy olyan rendszert vázol fel, ami kis pontossággal replikálódik. Általa megérthető a Föld korai életformáinak

önszerveződése és alkalmazkodása. Az RNS vírusok magas mutációs rátája és a kvázispéciesz spektrum dinamikája szorosan összefügg mind a vírusos megbetegedésekkel, mind az antivirális gyógyítási stratégiákkal. Ezt a koncepciót további biológiai rendszerekre is alkalmazzák, mint például a rákos megbetegedések kutatása, amelyben már sejt szintre emelkedik ez a rendkívül gyors mutálódás (Más és mts., 2010)

Ugyanebben az év márciusában megjelent Edward C. Holmes cáfolata, amely pontatlan eredményekre hivatkozik, és Eigen félreértelmezésének tulajdonítja Más cikkét, továbbá szerinte a természetes RNS vírusokra nem alkalmazható az elmélet.

2.4. A Beta nemzetség kriptikus vírusai

Felfedezésükre 1977-ben került sor (Kassanis és mts., 1977.), három típusukat ekkor különítették el őket számokkal *Beet cryptic virus 1*-re, *Beet cryptic virus 2*-re, *Beet cryptic virus 3*-ra. Igen korán, már 1993-ban Xie és munkatársai közölték az első részleges vírusszekvenciát közülük, mely a *Beet cryptic virus 3*-é volt és egyben az első részleges kriptovírus szekvencia is. Azóta elterjedtségük mértékét is tudjuk, hiszen kimutatták már őket mángoldból (*Beta vulgaris* L. var. *vulgaris* L.), cukorrépából (*Beta vulgaris* varietas *altissima*), takarmány répából (*Beta vulgaris* varietas *crassa*), *Beta maritima*-ból, *Beta macrocarpa*-ból (Boccardo és mts., 1987.) és a kísérletünk szempontjából fontos céklából (*Beta vulgaris* convarietas *crassa* provarietas *conditiva*). Egy gazdanövény tartalmazhatja akár mindhármat is, de mindig elkülöníthetőek maradnak egymástól (Antoniw és mts., 1986).

2.4.1. BCV 1

A *Beet cryptic virus 1* virionokban két dsRNS molekula van jelen. A dsRNS1 ($M_r 1,36 \cdot 10^6$) *in vitro* transzlációja során egy 67 kDa, a dsRNS2 ($M_r 1,15 \cdot 10^6$) transzlációja során pedig egy 52 kDa becsült molekulaméretű fehérje szintetizálható. A szintetizált fehérjék reaktivitását BCV1-specifikus ellenanyaggal vizsgálták meg, és azt találták, hogy a BCV1-specifikus antiszérummal a kisebb protein mutat immunológiai reakciót. Ezen adatok alapján feltételezték, hogy a BCV1 genom nagyobb szegmense az RNS-függő RNS-polimerázt (RdRp), a kisebb pedig a virális köpenyfehérjét (CP) kódolja (Accotto és mts., 1987).

Szegő Anita és munkatársai a *Beet cryptic virus 1* genom jellemzésére klónozták a dsRNS1 és dsRNS2 szegmenseknek megfelelő cDNS-eket és meghatározták a teljes

szekvenciájukat (Szegő, 2009). A BCV1 dsRNS1 2008 bp, a dsRNS2 1798 bp hosszúságú. Ezen szekvenciák a GenBank adatbázisban EU489061 és EU489062 azonosítókkal hozzáférhetők. A dsRNS1-en egy 1851 nt hosszúságú folyamatos nyílt leolvasási keretet (ORF) azonosítottak, ami egy 616 aminosavból álló fehérjét kódol, 72,5 kDa számított molekulamérettel. Ez a protein a GenBank adatbázisban található szekvenciák közül a *Partitiviridae* család vírusainak RNS-függő RNS-polimerázaival mutatja a legnagyobb hasonlóságot, továbbá azonosítható rajta a kriptikus vírusok RdRp-jére jellemző valamennyi konzervált aminosav motívum. Mivel az azonosított a motívumok a fehérje polimeráz funkciójának betöltéséhez fontosak, valószínűsíthető, hogy a dsRNS1 által kódolt fehérje a virális RdRp (Bruenn, 1993).

A kriptikus vírusok egymáshoz való viszonya a putatív RNS-függő RNS-polimerázok összehasonlításával jellemezhető a legjobban. A BCV1 RdRp-t más kriptovírusok polimeráz szekvenciáival összehasonlítva azt találták, hogy a lóbabban azonosított *Vicia cryptic virus* (Blawid és mts., 2007), ill. a fehérherében előforduló *White clover cryptic virus 1* (Boccardo és Candresse, 2005a) ill. a sárgarépában detektált *Carrot cryptic virus* (Willenborg és mts., 2009) RdRp szekvenciáit 80 %-ban építik fel azonos aminosavak. Mind a négy szekvencia 616 aminosavból áll és folytonossági hiány nélkül írhatók egymás alá. A többi növényi kriptovírus RdRp-jével ennél sokkal kisebb mértékű (20-25 %-os) hasonlóság figyelhető meg. A dsRNS2 pozitív szálán egy nagy, 1470 nukleotid hosszúságú, és két kisebb putatív ORF található, a negatív szálon szintén két kisebb leolvasási keret található. A nagy ORF egy 489 aminosavból álló fehérje kódolásáért felelős, melynek számított molekulamérete 53,4 kDa. Tömegspektrometriás analízissel kimutatták, hogy a dsRNS2 kódolja a virális köpenyfehérjét (Szegő, 2009, doktori értekezés). Ez a protein a *Partitiviridae* család vírusainak köpenyfehérjéivel mutatja a legnagyobb hasonlóságot, bár ez a hasonlóság az RdRp-nél megfigyelt értékeknél mindenképpen kisebb mértékű. A nagyobb heterogenitás ellenére több olyan konzervált aminosav régiót is azonosítottak a BCV1, WCCV1, VCV, *Raphanus sativus cryptic virus 1*, *Amasya cherry disease-associated partitivirus* és *Cherry chlorotic rusty spot-associated partitivirus* vírusok köpenyfehérjeiben, amelyek a többi kriptikus vírus köpenyfehérjéjében nem vagy csak részben mutathatók ki. A konzervált régiók szerepének azonosítása még nem történt meg, de e régiók különböző vírusokban való megőrződése funkcionális jelentőségüket valószínűsíti (Chen és mts., 2006b).

A BCV1 és a VCV, ill. WCCV1 genomok hasonlósága nemcsak a fehérjékre terjed ki, hanem a dsRNS genom 5' és 3' nem transzlálódó régiói esetén is felfedezhető (Szegő, 2009, doktori értekezés). Különösen az RdRp által történő specifikus felismerést és a dsRNS szegmensek együttes kapszidálódását biztosító 5' UTR-ek esetén figyelhető meg jelentősebb homológia (Strauss és mts., 2000). A terminális szekvenciák konzerváltak (5' GATCAAAAGA), és a szekvenciák analízise során azonosították a *Partitiviridae* család 5' UTR-eiben szintén megtalálható CAA és CAAA motívumokat (Strauss és mts., 2000; Coutts és mts., 2004). Az ismétlődő CAA régiók szerepét a dohánymozaik vírus genom jellemzése során határozták meg először, úgy tűnik, hogy a transzláció korrekt iniciációjában vesznek részt. (Zaccomer és mts., 1995). A 3' UTR-ek a dsRNS1 genom szegmenseknél szintén rendkívül hasonlóak, a dsRNS2-ek különböző gazdaszervezetekben azonban nagyobb variabilitást mutatnak. A dsRNS tartalmú vírusoknál a dsRNS molekula 3' nem kódoló vége tartalmazza a replikáz enzim felismerő helyét. A legtöbb vírus esetében a genom replikációját egy replikációs enzim-komplex végzi, ami a vírus által kódolt RNS-függő RNS-polimeráz mellett változatos gazda faktorokat is tartalmaz. Arról nincsenek ismereteink, hogy a kriptikus vírusok replikációja pontosan milyen mechanizmus szerint történik, de azt tudjuk, hogy kicsi a genomjuk kódoló kapacitása, ezért nagy a valószínűsége annak, hogy a replikációjukhoz a vírus által kódolt RNS-függő RNS-polimeráz mellett feltehetőleg gazdafehérjéket is igénybe kell venniük, amihez előnyös lehet a gazdához való nagyfokú alkalmazkodás. Ez eredményezheti akár azt is, hogy a különböző fajok kriptovírusainak a köpenyfehérjét kódoló szegmensek 3' végei jobban heterogének lettek, emellett megőrizték a replikáz enzim felismerő helyeit, mivel bizonyítottan replikálódnak (Szegő és mts., 2009, a doktori értekezést idézve).

2.4.2. BCV 3

A *Beet cryptic virus 3* vírus genomja szintén két dsRNS molekulából áll, melyek ~1740 és ~1600 bp hosszúak (Xie, 1992). A BCV3 virionokban a BCV1 vírustól eltérően a dsRNS2 szegmens kódolja a virális RdRp-t és a dsRNS1 a köpenyfehérjét. Xie és munkatársai klónozták, majd szekvenálták a BCV3 replikázát kódoló dsRNS2 jelentős részét, amelyen egy 1431 bázispáros, 478 aminosavat kódoló nyílt leolvasási keretet és több RdRp motívumot is azonosítottak (Xie és mts., 1993).

2.4.2. BCV 2

A *Beet cryptic virus 2* vírusokról kevesebb irodalmi adat állt a rendelkezésünkre, mint a BCV1-ről, ráadásul ezek az eredmények sokszor nem voltak egységesek. Natsuaki és munkatársai (1986) két genomi dsRNS ($MW\ 0,94 \cdot 10^6$ és $0,87 \cdot 10^6$) jelenlétét publikálták. Ezzel szemben Kühne és munkatársai (1986) két köpenyfehérje molekulát azonosítottak, és ha elfogadjuk azt az elméletet, hogy a kriptovírus dsRNS-ek monocisztronosak akkor a két köpenyfehérjét kódoló gén mellé egy harmadik, az RdRp-t kódoló genomi szegmensre van szükség. Szegő Anita és munkatársai kísérleteik során egyértelműen bebizonyosodott, hogy a genom három dsRNS-ből áll, melyek közül kettő, feltehetőleg azonos méretük miatt, a gélelektroforézis szokásos körülményei között nem válik el egymástól. A *Beet cryptic virus 2* genom jellemzésére klónozták a dsRNS1-3 szegmenseknek megfelelő cDNS-eket, és meghatározták a teljes szekvenciájukat: a dsRNS1 1589 bp, a dsRNS2 1575 bp, a dsRNS3 pedig 1522 bp hosszúságú (Szegő, 2009).

A dsRNS2 pozitív szálán egyetlen, 1428 nt hosszúságú ORF-t (ORF1) azonosítottak, ami 475 aminosavból álló, 54,2 kDa molekulaméretű fehérje kódolásáért felelős. A szegmens negatív szálán is található két kisebb leolvasási keret. Az ORF1 által meghatározott aminosav szekvencia a *Partitiviridae* család növényi vírusai közül a *Black raspberry cryptic virus*, a *Pepper cryptic virus 1*, a *Pyrus pyrifolia partitivirus* és a *Beet cryptic virus 3* RNS-függő RNS-polimerázaihoz hasonló, 65-70 %-ban (Tzanetakis és Martin, 2007; Valverde és Gutierrez, 2008; Osaki és mts., 1998; Xie és mts., 1993). Ennél a fehérjénél, a BCV1 RdRp-hez hasonlóan, szintén tudtak azonosítani a kriptikus vírusok RdRp-jére jellemző konzervált aminosav motívumokat (Bruenn, 1993), így megállapítható, hogy a dsRNS2 által kódolt fehérje a virális polimeráz.

A dsRNS1 szegmens pozitív szálán azonosítottak egy 1281 nt hosszúságú ORF-t, mely egy 426 aminosavból álló, 49,1 kDa molekulatömegű fehérjét kódol. A tömegspektrometriás analízissel kiderítették, hogy a nagyobb köpenyfehérjét a dsRNS1 kódolja, mivel a ~36 kDa becsült molekulatömegű protein 30 %-os szekvencia egyezést mutatott a dsRNS1 cDNS-ből levezetett fehérjével. A virionokban előforduló másik köpenyfehérjét (~33 kDa) a dsRNS3 kódolja, az azonosított protein szekvenciák 11 %-ban fedik le az ORF1 által kódolt 393 aminosavból felépülő fehérjét. Az eredményekből arra következtettek, hogy a BCV2 viriont két, ~36 illetve ~33 kDa becsült

molekulatömegű fehérje építi fel, melyeket a dsRNS1 és -3 genomi szegmensek kódolnak (Szegő, 2009).

A dsRNS-ek 5'-végein itt is egy konzervált felismerő szekvenciát (5' AGAATTA) találtak, ami teljesen eltér a BCV1-nél azonosított szekvenciától. Megegyezik azonban a *Beet cryptic virus 3*, a *Black raspberry cryptic virus* és a *Pyrus pyrifolia partitivirus* RdRp-t kódoló genom szegmenseinek 5' terminális végeivel, tehát nemcsak az RdRp-t kódoló gének között fedezhető fel hasonlóság e vírusok között, hanem a nemkódoló régiók között is. A konzervált terminális régió kívül a dsRNS1 és -2 5' UTR-ei között már nem figyelhető meg jelentősebb szekvencia hasonlóság, és a BCV1 jellemzésénél kiemelt CAA régiók is hiányoznak. További különbség még, hogy a BCV2-nél a 3'-végeken nem azonosítottak poly(A)-véget (Szegő, 2009).

3. Célkitűzés

A cékla, és közeli rokonai mind fontos gazdasági növények. Kísérletemben célul tűztam ki a BCV2 genomi dsRNS-einek izolálását és lehetőleg, egymást átfedő cDNS szakaszokkal meghatározom az RdRp és a CP1 szekvenciáját, valamint lehetőség szerint a CP2 szekvenciájának egy részét is, lehetséges változások után kutatva a nukleotid és aminosav szekvenciákban egyaránt.

A kísérletet inspirálta, hogy Szegő Anita már mángoldból – amiben csak a BCV1 található meg, céklában csak a BCV2 – meghatározta az RdRp és részben CP-t kódoló szegmensek nukleotid szekvenciáit. Meglepő módon kísérlete rámutatott, hogy a mángold BCV1 RdRp majdnem 90 nukleotidban eltér a cukorrépában fellelhetőhöz képest, viszont ez az aminosavak szintjén csupán 6 cserét okozott. A mángold CP-nél is hasonló képet tudott kimutatni.

A cukorrépában fellelhető, Szegő Anita által meghatározott szekvenciájú BCV 2 szekvenciákra tervezett primereket felhasználva célunk volt a BCV2 RdRp és CP1 teljes kódoló régiójának lefedése, átfedő PCR termékekkel, illetve a CP2 részleges lefedése is. Tekintve, hogy az irodalomban eddig nagyon kevés adat áll rendelkezésre az azonos kriptovírus fajok közeli gazdanövényben fellelhető szekvenciáját illetően, ezek a kutatások szükségesek, mivel így minden bizonnyal tisztázódhatnak a gazdaspecifitász kérdései is.

További célul tűztük ki a kapott szekvenciák összehasonlító elemzését a legközelebbi rokon vírusfajokkal (*Raphanus sativus cryptic virus 3*, *Alphacryptovirus JF-2012*, a *Beet cryptic virus 3*, a *Beet cryptic virus 2*, a *Persimmon cryptic virus*, *Mulberry cryptic virus 1* és a *Pepper cryptic virus 1- és 2*).

Egy további, nagy célunk volt az esetlegesen endogenizálódott kriptikus vírus szekvenciák azonosítása a cékla növény genomi DNS-éből is, mivel az utóbbi pár évben egyre több és több ilyen, endogenizálódott vírusszekvenciát azonosítanak magasabb rendű eukarióta élőlényekből; ez pedig a horizontális géntranszfer sokkal gyakoribb előfordulását valószínűsíti, mint az eddig elfogadott tényállás, sőt, egyesek szerint már ezen endogenizálódott szekvenciák nagyban részt vehettek a gazda szervezetek evolúciós fejlődésében, esetlegesen a változó környezethez való adaptálódásban is.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Növényanyag:

Kísérletünkben vizsgált növényünk a Caryophyllales rend, Amaranthaceae családjába tartozó *Beta vulgaris* convarietas *crassa* provarietas *conditiva* zöldség kertészeti célra termesztett három fajtája volt.

Az Alto fajtát a Soroksári botanikus kert és Tangazdaság zöldségtermesztési ágazatában termesztették 2011 nyarán, láthatóan egészséges példányok voltak Kiss Krisztiánétól.

A Bíborhenger és a Biborgömb szabadföldön házi kertben termesztették ugyan ebben az időszakban. A Zöldségtermesztési tanszék munkatársától, Szabó Annától kaptuk és 2011. november 10-én került fagyasztásra.

4.2. Reagensok

A kísérletben használt legtöbb molekuláris biológiai reagensünk a Thermo Scientific (korábban Fermentas) International Inc. (Litvánia) terméke, az ettől való eltérést a megfelelő helyen külön jelöljük.

4.3. Nukleinsav tisztítási és izolációs eljárások

4.3.1. Nukleinsav izolálás

0,1 g levelet dörzsmozsárban elszívófülke alatt eldörzsölünk 300 µl pegGOLD Trifasttal (Fokozottan veszélyes! 1 ml-e bőrön át halálos, de ennél kevesebbje is komoly égési sérüléseket okoz.), ezzel feltárjuk a sejtek tartalmát, majd további 700 µl-t adtunk hozzá és egy 1,5 ml-es eppendorfba töltjük a teljesen homogén szuszpenziókat.

A fázisok szétválasztásához öt perces szobahőmérsékletű inkubálás után 200 µl kloroformot pipettázunk rá (szintén fülke alatt). Alaposan összevortexeljük, öt percig állni hagyjuk, majd öt percig 12000 rpm-en és 18°C-on lecentrifugáljuk. A felső fázisból 500 µl-t óvatosan, hogy ne szívjunk bele az alsóbb rétegekbe, új 1,5 ml-es eppendorfba töltjük és 1 ml-ig izopropanolt adagolunk hozzá. Itt egy éjszakára -20°C-on fagyasztásra került, de az eredeti recept 10 perc jégen tartást javasolt.

A kioldás után 10 percig 12000 rpm-en 4°C-on centrifugáltuk, hogy a körülbelül 1 ml felülúszót leszívassuk a csapadékról, ami a tisztítatlan teljes RNS kivonatunk. 1 ml 70%-os etanollal (vagy 300 µl MQ vízzel, és 700 µl abszolút etanollal) 10 percig

12000 rpm-en 4°C hőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, majd egy percre visszatesszük a centrifugába, hogy a maradékot is le tudjuk szívni. Ezután inkubátorban 37°C-on nyitott kupakkal szárítjuk, amíg minden csepp az eppendorf oldaláról és a csapadékról elpárolog. Ha ezzel is megvagyunk 55°C-ra melegített 30 µl MQ vízben, erős vortexeléssel visszaoldottuk és -20°C-on további feldolgozásig tároltuk.

4.3.2. Teljes RNS tartalom izolálása

A fagyasztott leveleket (össztömeg 200 g) turmixgépbe tettük és 520 ml EBA-SDS pufferrel (1000 ml-hez: 100ml 500mM Tris-HCl pH 8; 100 ml 500mM EDTA pH 8; 10 ml 100% β-merkaptotanol; 640 ml mQ) alaposan összeturmixoltuk, az így nyert szuszpenziót Erlenmeyer lombikban 20 percig ráztuk.

Ezután, a habzásra való hajlama miatt eddig kimaradt, 80 ml SDS-t is hozzáadva 2,5 dl-es centrifuga csövekbe osztottuk szét és 5000 rpm-en 18°C-on 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót tiszta csőbe töltöttük, egy térfogatnyi kloroformot adtunk hozzá, alaposan vortexeltük, és a fentebb leírtak szerint centrifugáltuk.

Ezt megismételtük még egyszer, majd egy térfogatnyi izopropanollal -20°C-on fagyasztásra került felhasználásig.

Felolvasztás után 6500 rpm-en előre 4°C-ra hűtött fugában centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítva a csapadékot 5 ml MQ-ban oldottuk vissza.

4.3.3. Nukleinsav tisztítás

A mintákat 10 ml MQ vízben oldottuk vissza, két csőben 20 ml 65°C „1.” jelű pufferrel (2% CTAB (pH 8,0), 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl) fél órán keresztül 65°C-on inkubáltuk.

Ezután ekvivalens mennyiségű (20 ml) kloroform-izoamilalkohollal (ezzel az esetleges fehérje maradványokat kicsaptuk) vortexeltük, 4500 rpm-en 18°C-on negyed óráig centrifugáltuk. A felső fázist új csőbe tettük 4 ml „2.” jelű pufferrel (5% CTAB, 0,35 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 20mM EDTA), egy térfogatnyi kloroform-izoamilalkohollal, vortexeltük és megismételtük a centrifugálást. Ismét csak új csőben a felülúszóhoz három térfogatnyi „3.” jelű puffert (1% CTAB, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA) adtunk, alaposan összeráztuk és egy éjszakára állni hagytuk szobahőmérsékleten.

Lecentrifugáltuk (3500 rpm, 18°C, 6 perc), a csapadékhoz pedig adtunk 2 ml „4.” jelű puffert (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 1 M NaCl) és inkubáltuk 65°C-on 10 percet és további két térfogatnyi abszolút etanollal egy órán keresztül 4°C-on hagytuk. Itt újabb centrifugálás következett (4500 rpm, 18°C, 15 perc), és még egy (5000 rpm, 18°C, 15 perc) 5 ml 70%-os etanollal. Eztán már csak annyi dolgunk maradt, hogy az összes folyadékot eltávolítsuk a csapadékról 37°C-os nyitott fedeles inkubálással, és 5 ml 65°C-os mQ-ban visszaoldjuk.

Ezt a tisztítási folyamatot megismételtük az eltárolt teljes nukleinsav izolátumokkal, és amelyikből magasabb koncentrációt tudtunk elérni ebből dolgoztunk tovább.

4.3.4. CF11 Oszlopkromatográfia

A virális dsRNS-t a növény teljes nukleinsav kivonatából CF-11 oszlopkromatográfiával tisztítottuk (Dodds és mts., 1984). 2 g CF-11 oszloptöltet 33,6 µg dsRNS elválasztására használható. Az 1xSTE/15% EtOH-ban duzzasztott és ekvilibrált CF-11 töltetet a minta felvitele után 15 %-os etil-alkohol tartalmú 1x STE-oldattal (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,0), 1 mM EDTA) mostuk addig, amíg az átfolyó abszorbanciája el nem érte az alapvonalat, közben ügyeltünk rá hogy a töltet mindig ellepje a puffert.

A dsRNS eluálásához 1x STE-oldatot használtunk. Mind mosáskor, mind eluáláskor (ez utóbbit kétszer végeztük el) 500 µl-es frakciókat szedtünk és folyamatosan mértük a koncentráció változását 260 nm-nél spektrofotométerrel. A dsRNS-t tartalmazó frakciókat DE 52 anioncserélő oszlopon koncentráltuk és 2 M NaCl oldattal eluáltuk. A nukleinsavat Na-acetátos – etanolos kicsapás után Milli-Q vízben oldottuk vissza, majd a tisztítás eredményét nem-denaturáló gélelektroforézissel (30%-os AA) ellenőriztük.

4.3.5. DNáz I emésztés

1 µg DNS tartalmú mintához 1 µl DNáz I (1 U/ µl), 4 µl 10x DNáz puffer, MQ vízzel kiegészítve az adott térfogatra. 37°C-on húsz percen át vízfürdőbe tettük, majd kloroformozás (2 térfogatnyi kloroformot adunk a mintához 12000 rpm-en 6 percig centrifugáltuk, a felülúszót leszívtuk és a folyamatot megismételtük) után alkoholosan kicsaptuk.

4.3.6 RNáz A emésztés

Az 5.6.fejezetben szükségessé vált a totál nukleinsav minták RNáz A kezelése. A kezeléskor 10 µg/ml koncentrációban alkalmaztuk a használatra kész pufferban (50mM Tris-HCl pH 7.4 és 50% glycerol) tárolt enzimet. Az RNáz A kezelés 37 °C-on húsz percen át zajlott. Kezelés után a mintát a DNáz I emésztés után alkalmazott módon tisztítottuk meg az enzimtől.

4.3.6. Alkoholos kicsapás

A mintánkhoz 0,1 térfogatnyi 3M nátrium acetátot és 2,5 térfogatnyi -20°C abszolút etanolt adtunk, majd pár másodpercre folyékony nitrogénbe mártottuk. 15 percig 13000 rpm-en 4°C-on lecentrifugáltuk, hogy a felső fázist eltávolíthassuk és a csapadékhoz 500 µl 70%-os etanolt adhassunk. Azonos fugálást követően és a felső fázis ismételt eltávolítása után további egy perccel a maradékot is leszívtuk. A csapadékot tartalmazó eppendorf csöveket öt percig 37°C-on nyitott kupakkal inkubáltuk, az immár száraz anyaghoz 32 µl 55°C-os MQ vizet adtunk.

4.4. Gélelektroforézis

4.4.1. Agaróz gélelektroforézis

A PCR termékekből 10-10 µl-t 1%-os 30 ml agaróz gélen futtattuk meg 1 x LB futtató puffer (1 x TBE-ben 40% glicerol) 5 µl-ével, és 3 µl Gene Ruler 100 bp DNS Ladder-rel 80 V-on. Ellenőrző futtatás esetén 1x TAE, a visszaizoláláshoz TAE-t gélt használtunk.

4.4.2. Poliakrilamid gélelektroforézis

30%-os AA gél (10 ml-hez): mérőpohárba bemértünk: 1,65 ml 30% AA; 6,25 ml MQ; 2 ml 5xTBE; 70 µl 10% APS; 3,25 µl TEMED. (Az utolsó kettőt csak a legvégén szabad hozzá adni, mert azonnal elkezd szilárdulni!) Amikor elkészült beletöltöttük a futtató kádba, elhelyeztük benne a fésűt, és a pohár alján maradó keveréken figyeltük mikor szilárdult meg, ekkor kivettük a fésűt és a zsebekbe töltöttük a mintákat, 1xTBE pufferrel futtattuk.

4.4.3. Immunoblott eljárás:

Az 5%-os PAA (30 (akrilamid): 0,8 (biszakrilamid), 89 mM Tris-HCl, 89 mM bórsav (pH 8,3), 2,5 mM EDTA) gélen elektroforézissel elválasztottuk méret szerint a dsRNS-t.

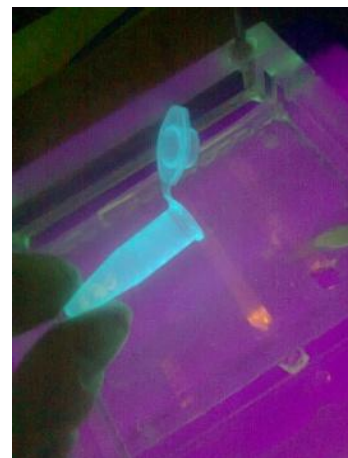
Előkészületként a hasznos gélfelületnek megfelelően vágunk membránt, melyre a blottolás folyamán felvisszük a mintát a gélről, valamint ugyanekkora szűrőpapír darabokat. A blot készülékben ezeket úgy helyeztük el, hogy két réteg blottoló oldattal (amit a futtatáshoz használtunk) nedvesített szűrőpapírra került a gél, erre fektettük a membránt, majd újabb két réteg szűrőpapírt és még egy kevés puffert adtunk hozzá.

A készülék lezárása után harmincöt percig áramra kapcsoltuk, ennek hatására a gélre föl vitt RNS molekulák a membránhoz kötődtek, de még fixálásuk szükséges. Ehhez a megadott idő letelte után külön edénybe helyeztük a membránt és egy órán át ráztattuk BSA in PBS pufferben (0,2 g heringsperma; 40 ml 1xBSA in PBS), amivel rögzítettük a membránon a dsRNS szegmenseket.

Hozzáadtuk az elsődleges ellenanyagot (J2 jelzésű 10ml; 20 ml BSA), majd és még 20 ml 1xPBS+ 20 ml 0,1% TritonX 100 egy órán át rázatva mostuk. A mosófolyadék leöntése után hozzáadjuk az F(ab')₂ ellenanyagot és egy órán keresztül rázatva rajtahagyjuk. Az előhíváshoz 70 µl BCIP, 90 µl NTB, 100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂ keverékében fél órán át rázatjuk.

4.5.4. Visszaizolálás gélből

A nukleinsav visszaizolálást a Calbiochem-Novabiochem Novagen Kittel, a Bio-Basic Inc. EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kittel, Macherey-Nagel, Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up, korábban Nucleo Spin Extract II Kittel végeztük, minden esetben követve a gyártó utasításait és a tisztított nukleinsavat 32 µl-ben MQ vízben oldottuk vissza.



1. ábra: A nukleinsav kivágása gélből

4.6. Reverz transzkripció és PCR reakció

4.6.1 cDNS szintézis

Mivel RNS-ről nem lehet PCR terméket készíteni, így reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizálunk, ami pontos mása az eredeti szekvenciáknak. A könnyebb bemérés érdekében master mix-et készítettünk (ahány a mintáknak szükséges, plusz egy térfogatnyi) egy 1,5 µl-es eppendorf csőbe, amit hét 0,2 µl –es PCR csövekbe

szétosztottunk (megfelelő mennyiségű cső tartalmazza a templátunkat, egy cső pedig a pozitív kontrollt).

A denaturációhoz szükséges: 1 µl 10 µM REV primer; 1 µl 10 µM FOR primer; 1 µl DMSO; 2 µl templát (11,3 ng/µl dsRNS), MQ vízzel kiegészítettük, úgy hogy csővenként 20-20 µl térfogatunk legyen.

A mintákat 99°C-on tartjuk 5 percig, amíg a dsRNS denaturálódik a primerek jelenlétében, közben elkészítettük a master mixet a reverz transzkripcióhoz:

4 µl 5xFirst Stand puffer; 1 µl 10 mM dNTP; 1 µl 0,1 DTT; 8,85 µl mQ; 0,15 µl SSIII enzim (SuperScript III reverz transzkriptáz, Invitrogen) (ez utóbbit szigorúan a legvégén szabad csak hozzáadni, hogy stabil maradjon). Csővenként szétosztva 42°C-on tartjuk 90 percig.

4.6.2. PCR reakció

A PCR reakciót a Bio-Rad T100 Thermal Cycler típusú készülékében végeztük. Enzimünk a High Fidelity Taq polimeráz volt.

PCR készülékkel a cDNS-ünkről készült terméket felszaporítottuk, ehhez szintén master mixet készítettünk: 0,5 µl 10 mM dNTP; 2,5 µl 10x HF Taq puffer; 0,5 µl REV primer; 0,5 µl FOR primer; 15,85 µl mQ; 0,15 µl 5 U HF Taq polimeráz és a következő protokollt alkalmaztuk: denaturáció 95°C öt perc, majd 95°C harminc másodperc, bekötődéshez $X^{\circ}\text{C}$ (X = az alkalmazott primer kombinációtól függően: az alacsonyabb T_m pontú primerhez igazítva) harminc másodperc, polimerizáció 72°C harmincöt másodperc, ezt az utóbbi három lépést negyvenszer ismételve. Végül a vég polimerizáció 72°C-on öt perc, majd végtelenítve 12°C-on tartás, amíg ki nem vettük a készülékből.

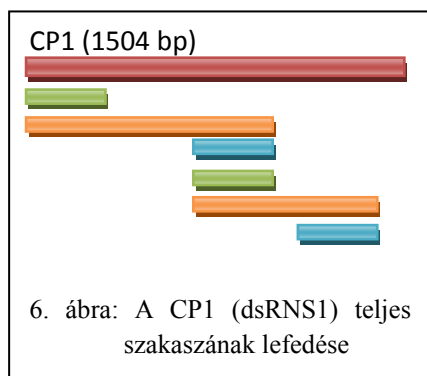
4.6.3. Felhasznált primerek

A vírus szekvencia nagysága (~2 kbp) miatt, valamint a jobb lefedettség biztosítása érdekében két részletre osztottuk, azokat pedig egy forward és egy reverz primerrel amplifikáltuk fel.

	RdRp-a	RdRp-b
forward	NP52 (18-37 bp; $T_m=48^{\circ}\text{C}$) 5' AAAACTGCAGTTCTAGAAAGACGGGA GTCA	NP45 (712-733 bp; $T_m=50^{\circ}\text{C}$) 5' CTTCTAGAAGGAACTTCAGCGG

reverz	NP93 (811-830 bp; T _m =48°C) 5' CCCTTGGTGTACGAAATTAG	NP94 (1527-1546 bp; T _m =50°C) 5' ATTGAGGTATGGATGCTGAT
	CP1-a	CP1-b
forward	NP91 (794-813 bp; T _m =51°C) 5' CTACTCGACTTCAAGCAAGG	NP89 (66-86 bp; T _m =50°C) 5' AACGCTTTATTGTTTCGTACA
reverz	NP92 (1575-1594 bp; 51°C) 5' AGGGCTGTATAGTCCCTCAG	NP90 (868-887 bp 50°C) 5' TTCCAAGAATGTAAGGTGCT
	CP2-a	CP2-b
forward	NP89 (611-630 bp; T _m =51°C) 5' TCATTTTCAGCCGACTACAGA	NP122 (1-21 bp; T _m =47°C) 5' AGAATTTTCACCTTAGTCTCAG
reverz	NP99 (1257-1294 bp; 51°C) 5' TGGTGTCTCAGTTCTGGTTG	NP123 (806-825 bp; 47°C) 5' CATAGGAAACCAAGCATAAG

1. táblázat: A BCV 2 szakaszaihoz felhasznált primerek



A lefedettséget a CP1 esetén jeleníti meg a 6. ábra. Bordó színnel jelöltük a lefedni kívánt szakaszt, zölddel a forward, kékkel a reverz primereket, és végül narancssárgával a kívánt termékeket. A cDNS duplaszállának 5' végeihez kötöttek be a primerek és onnan egymással ellentétes irányban kezdték meg a termék szintetizálását, így megkétszerezve annak

hatékonyságát. A termékek méretét úgy határoztuk meg, hogy azok között átfedés legyen, a szintézis kezdeti és végi esetleges hibákat kizárhatjuk, az analízis során ezeket a nukleotid eltéréseket figyelmen kívül hagyhattuk.

A *Beet cryptic virus* 2 mindhárom szakaszánál ugyan így jártunk el, de a CP2-b jelű szegmensét a dolgozat elkészültéig nem sikerült előállítani.

4.7. Szekvencia analízis

A BCV 2 CP1, CP2, és RdRp szegmensekről HF Taq polimerázzal készült PCR termékek nukleotid sorrendjét a Semmelweis Egységügyi Kft. (1085, Bp Üllői út 26.) határozta meg, ABI 3100 Genetic Analyzer szekvenáló készülékkel (Applied Biosystems, USA). A kromatogramokat a Chromal Lite programmal, a szekvenciákat a

Geneious Pro 5.5.6 –tal, és a Vector NTI Advance 11 (Invitrogen Co.; Lu és Moriyama, 2004) programokkal analizáltuk.

A nukleotid és aminosav szekvenciák azonosításához az NCBI BLAST online szoftverét (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) használtuk.

4.8. Koncentráció mérés

A méréseket a NanoDrop (Bioscience, Budapest) készülékkel, valamint a Shimadzu UV-160A spektrofotométerrel.

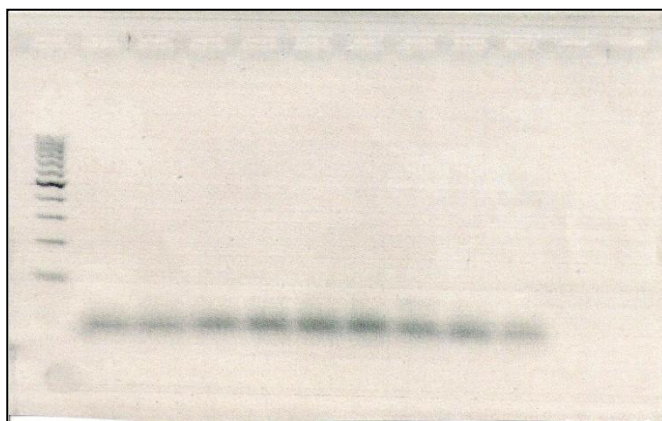
5. Eredmények és értékelésük

5.1. Koncentráció eredmények

5.1.1. Az Alto céklafajta

Az Alto céklafajtával végzett teszt kísérlet során hatszor 0,1 g levélből, a cukorrépara kidolgozott módszerrel a 2. táblázatban feltüntetett teljes RNS koncentrációkat értük el. A levelek kimérésénél ügyeltünk rá, hogy minden minta különböző levelekből származzon.

	ng/μl	Összesen (ng/ml)
1. minta	3	600
2. minta	2,16	432
3. minta	5,44	1088
4. minta	3,24	648
5. minta	3,4	680
6. minta	4,24	848
2. táblázat: A mért koncentrációk		



7. ábra: Gélelektroforézis eredménye Alto céklafajtán

Ezen adatok alapján, amiket 260 nm-en mért abszorbanciával számítottunk ki, 1-1 μl-t használtunk minden mintából templátnak a reverz transzkripcióhoz, majd a cDNS tisztítása után 5-5 μl-t a PCR reakcióhoz. A kísérlet során BCV2 dsRNS1 (CP1) 800 bp-os szegmensére tervezett primerekkel (NP91 és NP92), majd 0,7%-os agaróz gélen megfuttattuk, melynek eredményét a 7. ábra mutatja be. Az ábrán bemutatott gél szerint az Alto fajta nem tartalmaz BCV 2-t, így szükségessé vált új céklafajtákat bevonni a kísérletbe, melyek a Bíborgömb és a Bíborhenger nevű fajták voltak.

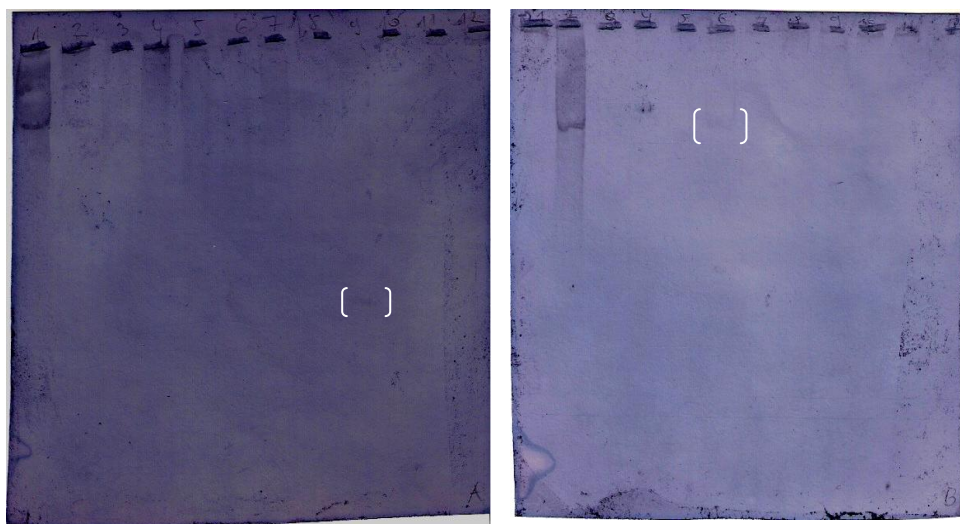
5.1.2. A Bíborgömb és a Bíborhenger céklafajták

Minkét fajtánál végigcsináltuk az Altonál leírtakat, de a mintákból tíz-tíz μl-t megfuttattunk 30% akrilamid gélen majd imunoblott eljárással tettük láthatóvá az eredményt (8.ábra), aminek alapján a Bíborgömb fajtát választottuk ki a nagyobb kivonat készítéshez.

Bíborgömb	ng/μl	Összesen (ng/ml)	Bíborhenger	ng/μl	Összesen (ng/ml)
1, minta	15,8	3160	1, minta	22,68	4536
2, minta	25,8	5160	2, minta	22,44	4488
3, minta	19,32	3864	3, minta	16,56	3312
4, minta	22,72	4544	4, minta	18,64	3728
5, minta	9,68	1936	5, minta	19,69	3992
6, minta	18,24	3648	6, minta	21,56	4312

3. táblázat: A Bíborgömb és a Bíborhenger
fajták koncentrációi

Minkét fajtánál végigcsináltuk az Altonál leírtakat, de a mintákból tíz-tíz μl-t megfutattunk 30% akrilamid gélen majd imunoblott eljárással tettük láthatóvá az eredményt (8.ábra), aminek alapján a Bíborgömb fajtát választottuk ki a nagyobb kivonat készítéshez.

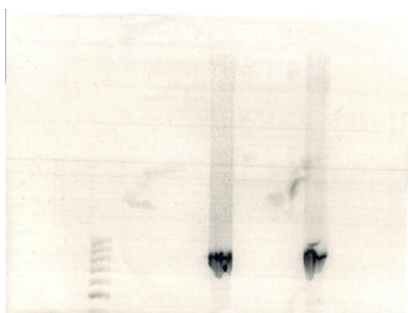


8. ábra: Az immunoblott eredménye. Jobb oldalon a
Bíborgömb fajta, bal oldalon a Bíborhenger

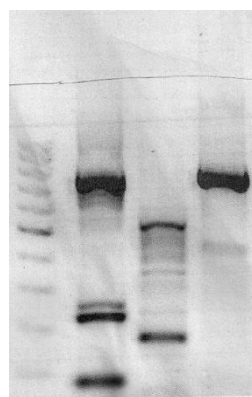
5.1.3. Teljes nukleinsav izolálás

A 200 g levélből készített nukleinsav kivonatunk megfeleztük és egy tisztítási eljárásnak vetettük alá (Halász és Geösel). Mivel az így kinyert tisztított nukleinsavunk 3,5 ng-t összesen, így a másik felével is megismételtük az eljárást ahol immár 42,04 ng koncentrációt mértünk, melyet a 9. ábra mutat be. Az ábrán a

A töményebb oldat 2,4 µl-ből készítettünk a BCV 2 RdRp első szakaszára, a terméket 1xTBE gélen, Novagen kittel visszaizoláltuk és mivel mindössze 3,5ng/µl mértünk NanoDroppal a maradék 48 µl-ben összesen nem érte el az 1 µg-ot, vagyis a szekvenálásra elküldhető mennyiséget. Ezért inkább úgy döntöttünk, hogy kitisztítjuk a dsRNS-t és reverz transzkripció, majd PCR reakcióval felsokszorozzuk a megfelelő szegmenseket.



9. ábra: Teljes tisztított nukleinsav kivonat gélképe



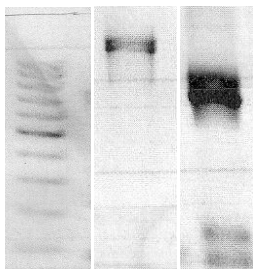
10. ábra: Sorrendben a CP1-a, a CP2-a és az RdRp-a PCR termékei

5.1.4. CF11 oszlop kromatográfia és DNáz emésztés

33,6 ng nukleinsavunkból, ami 8 ml-ben volt oldva a kisebbik oszlopon kétszer átbocsátva összesen 2336,6 ng duplaszálú RNS-t nyertünk ki, legalábbis a rendszerre kapcsolt spektrofotométer alapján. Ám a teszt poliakrilamid gél futtatás alapján kiderült, hogy ez 300 ng-hoz közeli érték, ráadásul DNS anyaggal szennyezett.

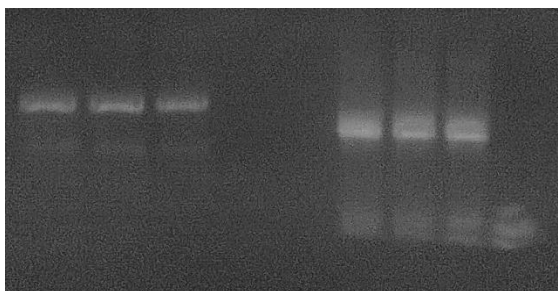
A teljes mennyiséget DNáz kezeltük, alkohollal kicsaptuk, majd Nanodroppal mértük, így a tisztított tényleges koncentrációnk 330 ng 28 µl-ben oldva, ennek 150 ng-ból kezdtük meg a specifikus primerekkel a CP1-a, CP2-a és az RdRp-a jelű szakaszainak reverz transzkripcióját (szakaszonként 50-50 ng). A 10. ábrán látható, az első, a-jelű szegmensekről készült PCR termékek 1%-os agaróz gélen megfuttatva.

5.2. Cékla *Beet crytic virus 2* dsRNS2 (RdRp) kódoló régiójának lefedése



11. ábra: balról jobbra: Marker; RdRp-a; RdRp-b jelű szakaszáról készült PCR termékek

A CF11 oszlopkromatográfiával tisztított dsRNS-ből reverz transzkripciót, majd PCR reakciót állítottunk össze az RdRp-a és -b szakaszának megfelelő primerpárokkal. Így, mivel a BCV2 dsRNS2 fehérjekódoló régiója a 100. nukleotidtól az 1524-ig tart, sikeresen le tudtuk a két átfedő PCR termékkel azt fedni. Konkrétan a 18. nt-től az 1546-ig.



12. ábra: Bal oldalt: az RdRp-a, jobb oldali zsebekben az RdRp-b jelű szakasza és a második szakaszban feltűnő nem várt termék

A 12. ábrán bemutatott gélképen nem kerülte el a figyelmünket, hogy az RdRp mindkét szakaszára egy igen hasonló terméket is kaptunk a várt mellett. Feltételezésünk szerint a quasispecies jelenségével magyarázható a nem várt termék jelenléte.

A megfelelő, 800 bp-os szegmenseket kivágtuk és visszaizoláltuk a gélből, majd, mivel nem érték el az 1 µg-os összmennyiséget, re-PCR-t készítettünk, természetesen High Fidelity Taq polimerázt használva itt is, majd a termékeket megfelelően tisztítottuk, ezután elküldtük szekvenálásra.

A Chromas Lite programmal átvizsgáltuk részletesen a kromatogramot mindkét szakasz esetében, a szekvencia részeket a BLAST online programban nukleotid BLAST-tal azonosítottuk, hogy a BCV2 dsRNS2 genomjával mutatták a legnagyobb

szekvencia egyezést, melyet a 13. ábra mutat be részletesen. Az ábrán törekedtünk csak a nukleotid cseréket bemutatni, az egyező nukleotidokat, ahol lehetett, kihagytuk az ábrából. A keresés eredménye 5 darab nukleotid cserét adott ki a cukorrépából izolált RdRp-vel szemben. Az öt cseréből 3 okozott aminosav cseréket.

```

>  gb|HM560703.1| Beet cryptic virus 2 segment dsRNA2, complete sequence
                                     Length=1575

                Score = 2735 bits (3032), Expect = 0.0
            Identities = 1524/1529 (99%), Gaps = 0/1529 (0%)
                Strand=Plus/Plus

Query  61      CGTCCTACGTGTTACTTCAACATCAGGACAATCAACAACACGAGTATACAAGTTTCAC 120
          |||
Sbjct  78      CGTCCTACGTGTTACTTCAACATCAGGACAATCAACAACACGAGTATACAAGTTTCAC 137

Query  121     CGAAGATCTCGAGGAGACGATTATACTCACCACACGTGGTCAGGAGAGATCCTGAAGT 180
          |||
Sbjct  138     CGAAGATCTCGAGGAGACGATTATACTCACCACACGTGGTCAGGAGAGATCCTGAAGT 197

Query  181     TACCTATGAAGACACCTTCGCAAAGAAGGAGTTGCTAAGCAGGTATCCAGCACTGTATGA 240
          |||
Sbjct  198     TACCTATGAAGACACCTTCGCAAAGAAGGAGTTGCTAAGCAGGTATCCAGCACTGTATGA 257

Query  361     AGCGATCACTAAAGTGACAGAAAGTTTACATAGCCTTCCAACGTGAGGGCATTCTATGT 420
          |||
Sbjct  378     AGCGATCACTAAAGTGACAGAAAGTTTACATAGCCTTCCAACGTGAGGGCATTCTATGT 437

Query  901     CAAGAGCAAGATTACGTTTCCAAACCTGGAAACAGAGCAAGCGTTCGAAATCTCAAGACA 960
          |||
Sbjct  918     CAAGAGCAAGATTACGTTTCCAAACCTGGAAACAGAGCAAGCGTTCGAAATCTCAAGACA 977

```

13. ábra A Céklából izolált BCV2 RdRp szekvenciájának (Query) összehasonlítása a cukorrépából izolálttal (Sbjct). Zölddel kiemelve a start kodon, sárgával jelölve a csendes mutációk, kékkel pedig az aminosav cserét okozók.

Ezt követően az aminosavak szintjén is elvégeztük az analízist, melynek eredményét a 14. ábra mutatja be. A Geneious programmal aminosavakra lefordított szekvenciánkat protein BLAST keresésnek vetettük alá (14. ábra).

```

>  gb|ADP24757.1| RNA-dependent RNA polymerase [Beet cryptic virus 2]
                                     Length=475

Score = 983 bits (2542), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
      Identities = 472/475 (99%), Positives = 474/475 (99%), Gaps = 0/475 (0%)

Query  1      MRTINNYEYTSFTEDLEETNYTHPHVVRDPEVTYEDTFAKKELLSRYPALYENLIRGWS 60
          |||
Sbjct  1      MRTINNYEYTSFTEDLEETNYTHPHVVRDPEVTYEDTFAKKELLSRYPALYENLIRGWS 60

Query  61      RSYTGTGQHLRAIMQYATPNTNFSECVQHAYTKAITKVTESLHSLPTVRAFNVLEELDLI 120
          |||
Sbjct  61      RSYTGTGQHLRAIMQYATPNTNFSECVQHAYTKAITKVTESLHSLPTVRAFNVLEELDLI 120

Query  121     PYESSSSAGYTYRGVKGPHGENHMQAIKTAKAVLWSVIKDDGEGIEHVIDTYVPDVGYT 180
          |||
Sbjct  121     PYESSSSAGYTYRGVKGPHGENHMQAIKTAKAVLWSVIKDDGEGIEHVIDTYVPDVGYT 180

Query  181     RTQLTDLREKMKVRGVWGRAFYILLEGTSAPPLLEAFANSNTFFHIGKDPTVSVPYLIS 240
          |||
Sbjct  181     RTQLTDLREKMKVRGVWGRAFYILLEGTSAPPLLEAFANSNTFFHIGKDPTVSVPYLIS 240

```

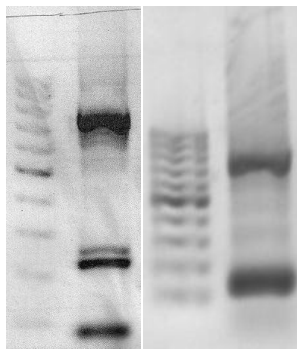
Query	241	YTKGQAPWLTAIDWQAFDATVSRFEINAAFDIIKSKITFPN	PETEQA	FEISRQLFIHKKL	300	
		YTKGQAPWLTAIDWQAFDATVSRFEINAAFDIIKSKITFPN	ETEQA	FEISRQLFIHKKL		
Sbjct	241	YTKGQAPWLTAIDWQAFDATVSRFEINAAFDIIKSKITFPN	LETEQA	FEISRQLFIHKKL	300	
Query	301	AAPNGKIYRIHK	GISG	SYFTSI	IGSVNRLRIEYLWNLKFNRGPKVCFTQGDDSLIGDD	360
		AAPNGKIYRIHK	GIPSGSYFTSI	IGSVNRLRIEYLWNLKFNRGPKVCFTQGDDSLIGDD		
Sbjct	301	AAPNGKIYRIHK	GIPSGSYFTSI	IGSVNRLRIEYLWNLKFNRGPKVCFTQGDDSLIGDD	360	
Query	361	ELYSPMDMAAFVKPLNWFINTSKSMTSKVPEAITFLGRSSLGGLNQ	RD	LKRLRLILPE	420	
		ELYSPMDMAAFVKPLNWFINTSKSMTSKVPEAITFLGRSSLGGLNQ	RD	LKRLRLILPE		
Sbjct	361	ELYSPMDMAAFVKPLNWFINTSKSMTSKVPEAITFLGRSSLGGLNQ	RD	LKRLRLILPE	420	
Query	421	YPVTSGDISAFRANSIWRDSGSTSQILHEIANALRRKYGIAKEQDVPRYL	RPWKA	475		
		YPVTSGDISAFRANSIWRDSGSTSQILHEIANALRRKYGIAKEQDVPRYL	RPWKA			
Sbjct	421	YPVTSGDISAFRANSIWRDSGSTSQILHEIANALRRKYGIAKEQDVPRYL	RPWKA	475		

14. ábra A Cékla BCV2 RdRp aminosav szekvenciája (Query) összehasonlítva a cukorrépából izolálttal (Sbjct). Sárgával jelölve az eltérések a cukorrépa RdRp-vel szemben. Zölddel kiemelve a *Partitiviridae* család RdRp-jének motívumai, benne lilával a motívumokban változatlan aminosavak

A 14. ábrán látható, hogy egy aszparaginsav (D) aszparaginra (N) változott, ez a 20. aminosav a szekvenciában, a GAU triplet AAU-re cserélődött. A 112. aminosav pedig aszparaginsavra változott aszparaginról, az AAU triplet GAU-ra cserélődött ki. Nem zárható ki, hogy kompenzatorikus mutációról van szó ez esetben. A 228. aminosav pedig leucinról prolinra cserélődött, ami a CUG kodon CCG-re változásával következett be. Ezek a változások nem érintik a *Partitiviridae* család RdRp motívumait. A közeli rokon fajokkal való összehasonlítást az 5.5. fejezetben tárgyaljuk.

5.3. Cékla *Beet cryptic virus 2 dsRNS1 (CP1)* kódoló régiójának lefedése

A CF11 oszlopkromatográfiával tisztított dsRNS-ből – hasonlóan, mint az RdRp esetében – reverz transzkripciót, majd PCR reakciót állítottunk össze a CP1-a és -b szakaszának megfelelő primerpárokkal. Így, mivel a BCV2 dsRNS1 – összesen 1598 bp – fehérjekódoló régiója a 113. nukleotidtól az 1390-ig tart, sikeresen le tudtuk a két átfedő PCR termékkel azt fedni. Konkrétan a 70. nt-től az 1594-ig



15. ábra: A CP1-a (balra) és -b (jobbra) jelű szakaszok PCR termékei, 0,7%-os TBE gélen elválasztva

A 15. ábrán látszik, hogy szintén több, nem specifikus terméket kaptunk a várt 800 bp-os termékek mellett, ezért, csak úgy, mint az RdRp esetében, itt is visszaizoláltuk a megfelelő méretűeket, és annak érdekében, hogy elérjük a szekvenálásra küldhető mennyiséget, HF Taq polimerázt használva, re-PCR-t készítettünk és a megfelelő szakaszokat visszaizoláltuk gélből, kitisztítottuk és így küldtük el szekvenálásra.

Szintén a Chromas Lite programmal átvizsgáltuk részletesen a kromatogramot mindkét szakasz esetében, a szekvencia részeket nukleotid BLAST-tal azonosítottuk, melyek a BCV2 dsRNS1 genomjával mutatták a legnagyobb szekvencia egyezést, melyet a 16. ábra mutat be részletesen. Az ábrán szintén törekedtünk csak a nukleotid cseréket bemutatni, az egyező nukleotidokat, ahol lehetett, kihagytuk az ábrából. A keresés eredménye 7 darab nukleotid cserét adott ki a cukorrépából izolált CP1-el szemben, melyből mindössze kettő okozott aminosav cserét a fehérjében. Ezt a 17. ábra mutatja be.

>  **gb|HM560702.1| Beet cryptic virus 2 segment dsRNA1, complete sequence**
Length=1598 Score = 2715 bits (3010), Expect = 0.0 Identities = 1517/1525 (99%), Gaps = 0/1525
(0%) Strand=Plus/Plus

Query	361	CGCGTGGTTCTGGGACACGCAATACTGCATACGCGAAAGCGTAAGAAA	ATTGTCAGGCAC	420
Sbjct	430	CGCGTGGTTCTGGGACACGCAATACTGCATACGCGAAAGCGTAAGAAA	ATTGTCAGGCAC	489
Query	421	TGCCTACAACCAGCATTTACAGAGGACCTCAACCTCATCTCCCTAA	ATATGATCCGTT	480
Sbjct	490	TGCCTACAACCAGCATTTACAGAGGACCTCAACCTCATCTCCCTAA	ATATGATCCATT	549
Query	721	CTGGCTACTCGACTTCAAGCAAGGCAATGCCTATGCTTGGTTTCCGTTTGAATCCAACCTT		780
Sbjct	790	CTGGCTACTCGACTTCAAGCAAGGCAATGCCTATGCTTGGTTTCCGTTTGAATCCAACCTT		849
Query	841	ACCCGAGACGAAGACCAATACAGCACTGGACCCACAATGATCCCCCTCTAAACACAGA		900
Sbjct	910	ACCCGAGACGAAGACCAATACAGCACTGGACCCACAATGATCCCCCTCTAAACACAGA		969
Query	1021	GCCAAGAGTTACTACCTCAACACAGCGAAGAACAAGCGCAAGAAAGATGCTGCACCAGA		1080
Sbjct	1090	GCCAAGAGTTACTACCTCAACACAGCGAAGAACAAGCGCAAGAAAGATGCTGCACCAGA		1149

16. ábra: A Céklából izolált BCV2 CP1 szekvenciájának (Query) összehasonlítása a cukorrépából izolálttal (Sbjct). Sárgával jelölve a csendes mutációk, világoskékkel pedig az aminosav cserét okozók

Ezt követően az aminosavak szintjén is elvégeztük az analízist, a Geneious programmal aminosavakra lefordított szekvenciánkat protein BLAST keresésnek vetettük alá (17. ábra). Az ábrán itt is csak a változásokat emeljük ki, a közeli rokon fajokkal való részletesebb szekvencia összehasonlítást az 5.5 fejezetben tárgyaljuk.



gb|ADP24756.1| viral protein 1 [Beet cryptic virus 2]

Length=426 Score = 890 bits (2300), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.

Identities = 424/426 (99%), Positives = 425/426 (99%), Gaps = 0/426 (0%)

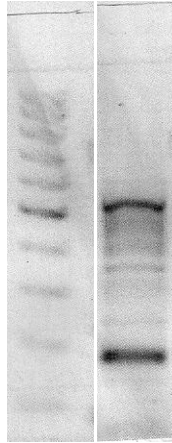
Query	241	PFESNFTELDLVAPYILGIPCTPRLGPRDEDHYQHWTHNDPPL	TDGNIILNPLAYVRSS	300
		PFESNFTELDLVAPYILGIPCTPRLGPRDEDHYQHWTHNDPPL	TDGNIILNPLAYVRSS	
Sbjct	241	PFESNFTELDLVAPYILGIPCTPRLGPRDEDHYQHWTHNDPPL	TDGNIILNPLAYVRSS	300
Query	301	ERKFFGNAEYRTMEYNSYTQNFAYMPRVTTST	AKNKRKKDAAPEQLSTGQGDGSSSSK	360
		ERKFFGNAEYRTMEYNSYTQNFAYMPRVTTST	AKNKRKKDAAPEQLSTGQGDGSSSSK	
Sbjct	301	ERKFFGNAEYRTMEYNSYTQNFAYMPRVTTST	AKNKRKKDAAPEQLSTGQGDGSSSSK	360

17. ábra: A Cékla BCV2 CP1 aminosav szekvenciája (Query) összehasonlítva a cukorrépából izolálttal (Sbjct). Sárgával jelölve az eltérések a cukorrépa CP1-el szemben.

A 17. ábrán látható, hogy a 284. aminosav, cukorrépában szerin (S), céklában aszparaginra (N) változott, az AGC triplet AAC-re cserélődött. A 334. aminosav, cukorrépában glutamin (Q), céklában prolinra (P) változott, a CAA kodon CCA-ra cserélődött ki.

5.4. Cékla *Beet cryptic virus 2*, dsRNS3 (CP2) kódoló régiójának részleges lefedése

A szintén CF11 oszlopkromatográfiával tisztított dsRNS-ből – hasonlóan, mint az RdRp és CP1 esetében – reverz transzkripciót, majd PCR reakciót állítottunk össze a CP2-a és -b szakaszának megfelelő primerpárokkal. A BCV2 dsRNS3 – összesen 1522 bp – fehérjekódoló régiója a 127. nukleotidtól az 1305-ig tart. Viszont a CP2-b jelű szakaszt nem sikerült felamplifikálnunk, így csak a CP2-a jelűvel dolgoztunk tovább. A 18. ábrán látható a CP2-a szakaszára specifikus primerekkel előállított PCR termék, feltűnő, hogy itt is, mint a többi szegmensnél, több, nem specifikus terméket kaptunk, így a specifikus ~500 bp-os terméket kivágtuk a gélből, visszaizoláltuk és re-PCR-t készítettünk, itt is HF Taq polimerázt használva. A termékeket gélen megfuttattuk és kitisztítottuk, így már elérve a szekvenálásra küldhető mennyiséget. A kapott szekvencia kromatogramját átnéztük, majd nukleotid BLAST-ot használva azonosítottuk, hogy a BCV2 dsRNS3-hoz mutatja a legnagyobb egyezést. A kapott ~500 nukleotidnyi szakaszon négy bázispár cserét találtunk, melyet a 19. ábra mutat be részletesen. Ezek közül a cserék közül viszont, amikor lefordítottuk aminosavra és protein BLAST-ot hajtottunk végre, nem találtunk az aminosavakban eltérést, ezt a 20. ábra mutatja be részletesen. Ez esetben tehát csak csendes mutációkról beszélhetünk.



18. ábra: Balra: 100bp DNS marker; Jobbra: CP2-a jelű szakaszból készült PCR termék agaróz gélen elválasztva

> **gb|HM560704.1| Beet cryptic virus 2 segment dsRNA3, complete sequence Length=1522**

Score = 908 bits (1006), Expect = 0.0 Identities = 509/513 (99%), Gaps = 0/513 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query	121	CAGGCTGGCTACTAGACTATGACGGAACCGATGCTTATGCTTGGTTTCCTATGGA	180
Sbjct	773	CAGGCTGGCTACTAGACTATGACGGAACCGATGCTTATGCTTGGTTTCCTATGGA	832
Query	181	ACTACAATATGTGCGATTAAATCGCCCTCACATTCTCGCTACGCCCTGCACAGCGAAAT	240
Sbjct	833	ATTACAATATGTGCGATTAATCGCCCTCACATTCTCGCTACGCCCTGCACAGCGAAAT	892
Query	361	GAACAATTGACAGAGAACTACACTGTCAATTTTCCTGAGCTTCTAAAGCCAAGAGACA	420
Sbjct	1013	GAACAATTGACAGAGAACTACACTGTCAATTTTCCTGAGCTTCTAAAGCCAAGAGACA	1072

19. ábra: A Céklából izolált BCV2 CP2 részleges szekvenciájának (Query) összehasonlítása a cukorrépből izolálttal (Sbjct). Sárgával jelölve a csendes mutációk

A 19. ábrán szintén nem az egész, 513 bp nukleotid hosszúságú szekvenciánkat mutatjuk be, hanem csak azokat a részeket, ahol az eltéréseket tapasztaltuk. Az protein BLAST eredményét pedig a 20. ábra mutatja be részletesen.

> **gb|ADP24758.1| viral protein 2 [Beet cryptic virus 2]Length=393**

Score = 358 bits (918), Expect = 5e-121, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 170/170 (100%), Positives = 170/170 (100%), Gaps = 0/170 (0%)

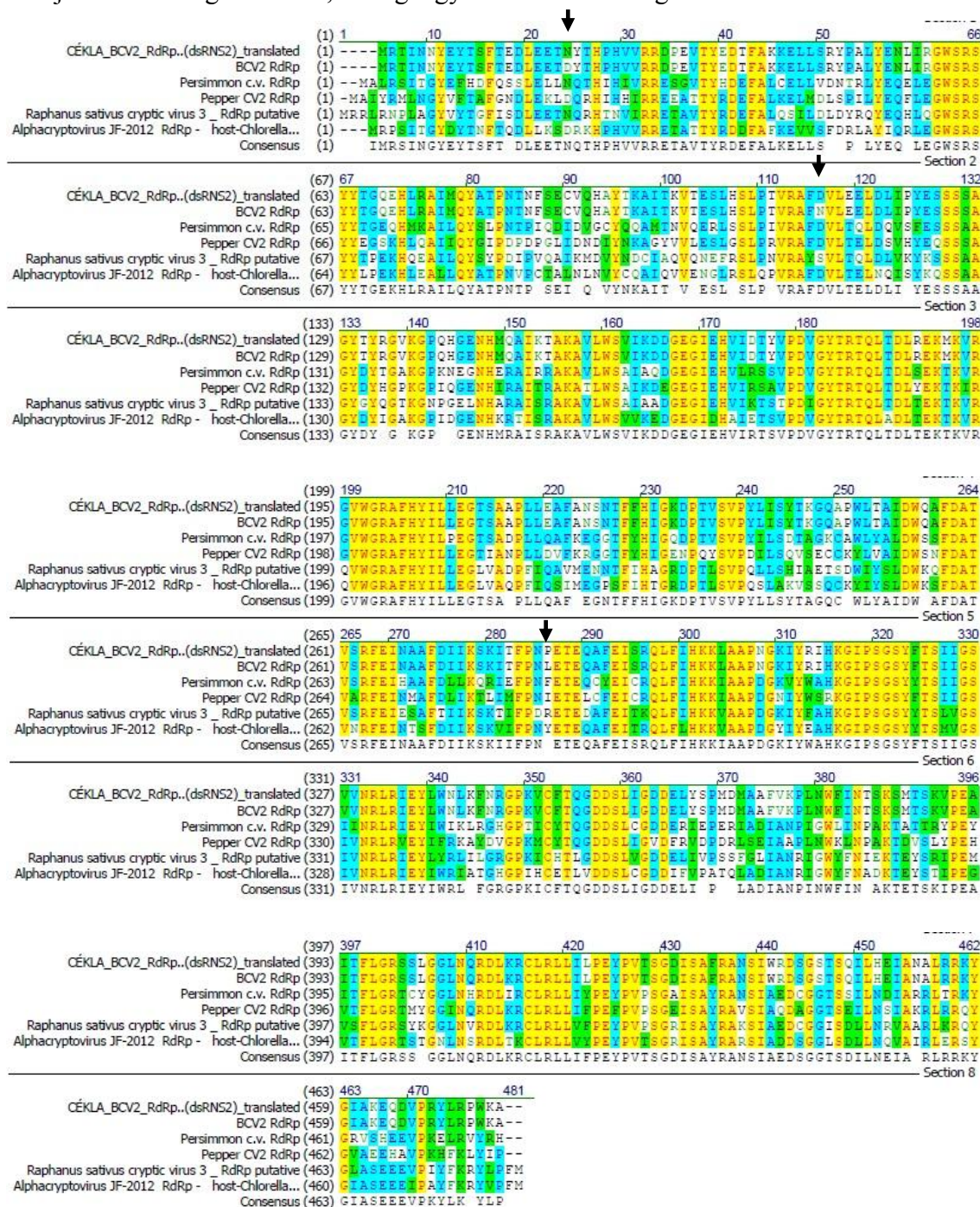
Query	1	HRITGAFTTRPNVMDLVSLMDDPNSGWSTVPLNTNVFGRPGWLLDYDGTDAYAWFPMENN	60
		HRITGAFTTRPNVMDLVSLMDDPNSGWSTVPLNTNVFGRPGWLLDYDGTDAYAWFPMENN	
Sbjct	177	HRITGAFTTRPNVMDLVSLMDDPNSGWSTVPLNTNVFGRPGWLLDYDGTDAYAWFPMENN	236
Query	61	YNMCDLIAPHILATPCTAKLGIYDADIWQNCPGNIPITATTARTARRESERRFYGSAETR	120
		YNMCDLIAPHILATPCTAKLGIYDADIWQNCPGNIPITATTARTARRESERRFYGSAETR	
Sbjct	237	YNMCDLIAPHILATPCTAKLGIYDADIWQNCPGNIPITATTARTARRESERRFYGSAETR	296
Query	121	TIEQRNYTVNFPELLKPRDTGARALVTTTQRASTSGSVEPTTGAQPEPET	170
		TIEQRNYTVNFPELLKPRDTGARALVTTTQRASTSGSVEPTTGAQPEPET	
Sbjct	297	TIEQRNYTVNFPELLKPRDTGARALVTTTQRASTSGSVEPTTGAQPEPET	346

20. ábra: A Cékla BCV2 CP2 részleges aminosav szekvenciája (Query) összehasonlítva a cukorrépből izolálttal (Sbjct).

5.5. Céklából izolált BCV2 RdRp és CP1 aminosav szekvenciájának összehasonlítása a közeli rokon vírusfajokkal

5.5.1 Cékla BCV2 RdRp aminosav szekvenciájának összevetése a közeli rokonokkal

A céklából izolált BCV2 RdRp szekvenciákat összehasonlítottuk az aminosavak szintjén a legközelebbi, legnagyobb hasonlóságot mutató rokonokkal.



21. ábra: Aminosav szekvenciák összehasonlítás a BCV2 legközelebbi rokonaival, fekete vastag nyíllal jelölve a céklában megváltozott aminosavak pozíciója

Ezt azért tettük, hogy megvizsgáljuk, vajon a céklában tapasztalt aminosav cserék közül fellelhető-e néhány, vagy esetleg mind, a rokonokban, tekintve, hogy ezek a cserék nem érintették a *Partitiviridae* család RdRp motívumait. Az összehasonlítást, a protein BLAST alapján a legnagyobb egyezést mutató rokonok, a cukorrépa *Beet cryptic virus 2*, a *Persimmon cryptic virus*, a *Pepper cryptic virus 2*, a *Raphanus sativus cryptic virus 3* és az *Alphacryptovirus JF-2012* RdRp szekvenciáival végeztük, melyet a 21. ábra mutat be részletesen.

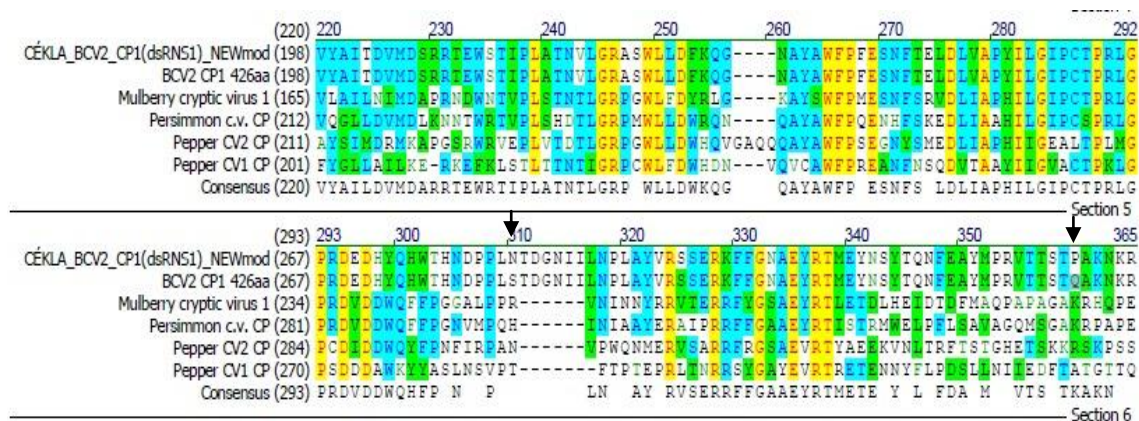
Az ábrából kiderül, hogy a 20. pozícióban lévő csere – aszparaginsav helyett aszparagin – a közeli rokonokban is vagy aszparagin (N) vagy aszparaginsav (D), sőt a legközelebbi rokonban a kakiszilva kriptikus vírusban pont N, ahogy a céklában is, valamint a retek kriptikus vírus 3-ban is. A paprika kettes számú kriptikus vírusában és az új, zöldalgából izolált vírusban viszont D. Ez arra enged következtetni, hogy a fehérje ezen pozíciójában ugyanolyan valószínűséggel lehet aszparagin és aszparaginsav is, vélhetően nem veszti el a fehérje a funkcióját, hanem a gazdaszervezethez – céklához – való alkalmazkodottság mértékét jelezheti.

A 112. pozícióban tapasztalt csere is ezt támasztja alá. Ott cukorrépában aszparagin volt, viszont ez céklában aszparaginsavra változott. A közeli rokonokban ebben a pozícióban főleg az aszparaginsav a domináns aminosav, mind a *Persimmon* -, *Pepper cryptic virus 2*, valamint az *Alphacryptovirus JF-2012*-ben is. Egyedül a retek harmas jelű vírusában találunk szerin aminosavat ebben a pozícióban. Megállapítható tehát, hogy ez a csere is evolúciós előnyt biztosíthat a vírusnak a cékla növényfajban.

A harmadik aminosav csere a 282 pozícióban, cukorrépában leucin, céklából prolint mutattunk ki. Ebben a pozícióban, tekintve a rokon fajok szekvenciáit, nagyon variábilis e pozíció, egyik fajban sem található meg ugyanaz az aminosav. Ez által feltételezhetjük, hogy ez a csere sem okozza a polimeráz enzimfehérje inaktiválódását, hanem valószínűleg valamiféle evolúciós előnyt biztosíthat annak.

5.5.2 Cékla BCV2 CP1 aminosav szekvenciájának összevetése a közeli rokonokkal

A céklából izolált BCV2 CP1 aminosav szekvenciáját is összehasonlítottuk a protein BLAST alapján legnagyobb hasonlóságot mutató rokon vírusfajokkal. Ezek a – cukorrépából izolált BCV2 CP1-et nem számítva – a *Mulberry cryptic virus 1*, a *Persimmon c.v.*, és a *Pepper c.v. 1* és *2* köpenyfehérjéi. Az összehasonlítást a 22. ábra mutatja be részletesen.



22. ábra: Aminosav szekvenciák összehasonlítás a BCV2 legközelebbi rokonaival, fekete vastag nyíllal jelölve a céklában megváltozott aminosavak pozíciója

A 22. ábrán láthatóan csak az aminosav cserék szempontjából fontosabb régiót mutatjuk be. Az első aminosav csere szerinről (S) aszparaginra (N) történt. A többszörös aminosav összehasonlítás alapján ez a régió nem konzervált szakasz ezen kriptikus vírusok köpenyfehérjéiben. Továbbá a paprika kettes számú vírusában e pozícióban szintén aszparagin lelhető fel. Az összehasonlítás alapján ennél az aminosav cserénél is arra következtethetünk, hogy evolúciósan vélhetően előnyösebb volt a vírus köpenyfehérjének a céklában a fentiek szerint módosulnia.

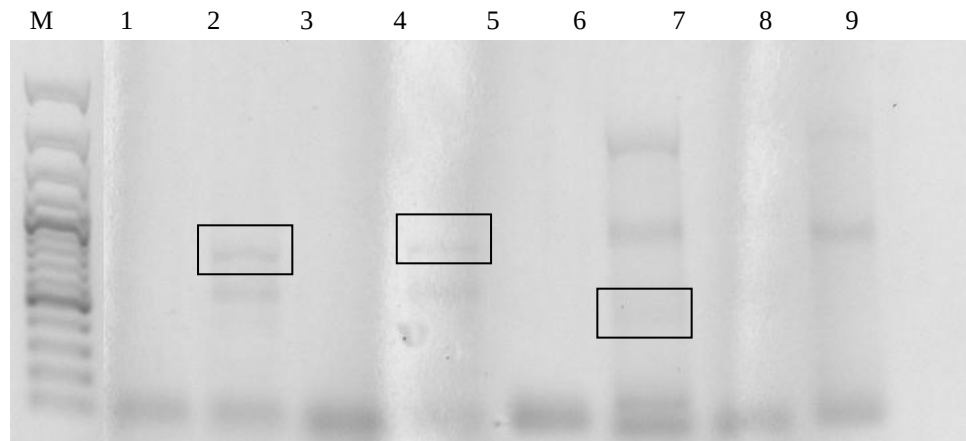
A második aminosav csere glutaminról (Q) prolinra (P) történt. A közeli rokon vírus fajokban e pozícióban a leginkább fellelhető aminosav a lizin (K), viszont a paprika egyes számú kriptovírusában alanin (A) és a cukorrépából kimutatott BCV2 CP1- ben glutamin. Következtetésként levonható, hogy ez a csere sem érint nagyon konzerválódott fehérje régiót, motívumot, tehát feltételezhetően valamiféle előnyt biztosít a vírusnak az adott gazdaszervezethez való alkalmazkodásban.

5.6. Kísérlet kriptikus vírus homológ szekvenciák azonosítására cékla genomi DNS-ből

Az eddigi irodalmi adatokra támaszkodva kísérletet tettünk arra, hogy ki tudunk-e mutatni virális homológ szekvenciát a cékla genomi DNS-éből. Ebben a kísérletben az Anyag és Módszer fejezetben említett minden primerpárral megkíséreltük felamplifikálni e szegmenseket, hagyományos PCR technika alkalmazásával. Kísérletünkben nem csupán a totál nukleinsav kivonatból készítettük el a PCR reakció elegyet, hanem DNáz I és RNáz A emésztést is végeztünk. Azt vártuk, hogy a kezelés nélküli totál nukleinsav kivonatból, valamint az RNáz A kezeltből kimutassuk a várt

méretű fragmenseket. A DNáz I kezelt mintákat kontrollként használtuk, ott nem vártuk az adott szegmensek amplifikációját.

Ez a kísérlet tudományos diákköri dolgozatom keretében még nem zárult le, hanem nagyon is folyamatban van. Eddigi eredményként megemlíthető azonban, hogy sikerült kimutatni a CP1-b és a CP2-a jelű fragmenseknek megfelelő méretű szakaszokat, melyeket a 23. ábra mutat be.



23. ábra: M: 100bp Plus marker (1000. bp után: 1200bp, 1500bp, 2000bp, 3000bp); 1: CP1-b negatív PCR kontrol; 2: CP1-b totál nukleinsavból; 3: CP1-b DNáz I kezelt; 4: CP1-b RNáz A kezelt; 5: CP2-a negatív PCR kontrol; 6: CP2-a totál nukleinsavból; 7: CP2-a DNáz I kezelt; 8: CP2-a RNáz A kezelt; 9: üres zseb

A 23. ábrán látható, 1%-os agaróz gélen elválasztva, a cékla genomi DNS-éről készült PCR eredménye. Az ábrán jól látható, bár halványan, hogy a CP1-b jelű (~800 bp) szakaszt sikerült amplifikálni, és itt is, csak úgy, mint a reverz transzkripció után készült PCR-nél, több termék is látható (lásd: 15. ábra). A CP2-a jelű (~500 bp) szakaszt is sikerült, bár ezt is halványan, amplifikálni genomi DNS-ből, itt a várt, közel 500 bp-os fragmens felett is voltak termékeink, 1000 és 2000 bp körül. Továbbá ezen szakasz az RNáz A kezelt mintákból sokkal gyengébb jelet mutatott.

Természetesen további célunk, hogy ezt a kísérletet megismételjük, és a kapott, általunk megfelelő mérettartományba eső, szegmenseket megszekvenáltassuk, hiszen csak az lehet – az RNáz A kezelés mellett – az endogenizálódott kriptovirális szekvencia igazi bizonyítása.

6. Összefoglalás

A növényi kriptikus vírusok napjainkig kivételt képeznek a vírusok között, mivel látható tüneteket nem okoznak, így jelenlétük legtöbbször rejtve marad. Evolúciós eredetüket homály fedi és gazdanövénnel való kölcsönhatásuk mibenléte nem ismert. A legújabb eredmények szerint vélhetően a horizontális géntranszfer során kerülhettek a növénypatogén gombákból a növényi sejtekbe. Kutatócsoportunkban Szegő Anita és munkatársai meghatározták a BCV1 és a BCV2 vírus teljes szekvenciáját (Szegő, 2009). A tanszék eddigi munkafolyamatait folytatva a *Beet cryptic virus 2* genomi dsRNS szegmenseit sikeresen izoláltuk a Bőrgömb nevű céklafajtából.

A céklából izolált BCV2 RdRp és CP1 fehérjekódoló régióját sikeresen lefedtük két-két, High Fidelity Taq polimerázzal készült PCR termékkel. A céklából izolált RdRp szekvencia kódoló régiójában 5 nukleotid eltérést mutattunk ki a cukorrépa BCV2-höz képest, ezek közül 3 okozott aminosav cserét. Ezen aminosav cserék nem érintették a Partitiviridae családra jellemző RdRp motívumokat. A céklából izolált CP1 szekvencia kódoló régiójában 7 nukleotid cserét mutattunk ki, mely közül mindössze kettő okozott aminosav cserét és egyik sem konzervált régióban található. A céklából izolált CP2-a jelű szegmens közel 500 bázispáros szekvenciáját is meghatároztuk, melyben 4 nukleotid cserét tapasztaltunk a cukorrépa BCV2 CP2-höz képest, de ezek egyike sem okozott aminosav cserét, mind csendes mutáció csupán.

Kísérletet tettünk endogenizálódott kriptovirális szekvenciák kimutatására is a cékla genomi DNS-éből, mely dolgozatom keretében még nem zárult le, de prediktálható – kriptikus vírusok nagy fokú elterjedtsége és a gazdanövénnel való hosszas együttélés révén –, hogy hamarosan teljes bizonyossággal jelenthetjük ki kriptovírus szekvenciák jelenlétét a növényi genomban.

Összefoglalóan megállapítható, hogy meghatároztuk a céklában található BCV2 RdRp és CP1 fehérjekódoló régiójának aminosav szekvenciáját, az eltéréseket összevetettük a legközelebbi rokon vírusokkal és elemeztük az aminosav cseréket. Továbbá meghatároztunk a CP2 1522 bp-os dsRNS-ének szekvenciájából 513 bp-t, ez közel lefedi a fehérje kódoló régió felét, viszont itt csak csendes mutációkra bukkantunk.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Lukács Noéminek, hogy csatlakozhattam a tanszék munkájához, és észrevételeivel irányította munkámat.

Köszönöm Dr. Szegő Anitának, hogy első konzulensemként megtanított a labormunka fortélyaira és gondoskodó türelemmel koordinált mindvégig.

Köszönöm konzulensemnek Hinel Sándornak, jelenlétét munkám kritikus, és kevésbé kritikus pillanataiban.

Köszönöm Dr. Halász Krisztiánnak, Dr. Pós Veronikának, Demián Emesének szakmai tanácsait, és a Budapesti Corvinus Egyetem Növényélettani és Növényi Biokémia Tanszék minden munkatársának segítségét.

9. Irodalomjegyzék

- ACCOTTO, GP., BRISCO, MJ., HULL, R. (1987): *In vitro* translation of double-stranded RNA genome from *Beet Cryptic Virus 1*. Journal of General Virology, 68:1417-1422.
- ANTONIO MÁS, C. LÓPEZ-GALÍNDEZ, I. CACHO, J. GÓMEZ, M. ANGEL MARTÍNEZ (2010.): Unfinished stories on viral quasispecies and darwinian views of evolution J.Mol.Biol. 397, 865-877
- ANTONIW, JF., LINTHORST, JM., WHITE, RF., BOL, JF. (1986): Molecular cloning of the double stranded RNA of Beet Cryptic Viruses. Journal of General Virology, 67: 2047-2051.
- BLAWID, R., STEPHAN, D., MAISS, E. (2007): Molecular characterization and detection of *Vicia cryptic virus* in different *Vicia faba* cultivars. Archives of Virology, 152(8):1477-1488.
- BOCCARDO, G., CANDRESSE, T. (2005a): Complete sequence of the RNA1 of an isolate of *White clover cryptic virus 1*, type species of the genus *Alphacryptovirus*. Archives of Virology, 150(2):399-402.
- BOCCARDO, G., CANDRESSE, T. (2005b): Complete sequence of the RNA2 of an isolate of *White clover cryptic virus 1*, type species of the genus *Alphacryptovirus*. Archives of Virology, 150(2):403-405.
- BOCCARDO, G., LISA, V., LUISONI, E., MILNE, RG. (1987): Cryptic plant viruses. Advances in Virus Research, 32:171-214.
- BRUENN, JA. (1993): A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. Nucleic Acids Research, 21:5667-5669.
- CHEN, L., CHEN, JS., LIU, L., YU, X., YU, S., FU, TZ., LIU, WH. (2006b): Complete nucleotide sequences and genome characterization of double-stranded RNA 1 and RNA 2 in the *Raphanus sativus-root cv. Yipinghong*. Archives of Virology, 151(5):849-859.
- CHEN, L., CHEN, JS., ZHANG, H., CHEN, SN. (2006a): Complete nucleotide sequences of three dsRNA segments from *Raphanus sativus-root cv. Yipinghong* with leaf yellow edge symptoms. Archives of Virology, 151(10):2077-2083.

- CHIBA S., KONDO H., TANI A., SAISHO D., SAKAMOTO W., et al. (2011) Widespread Endogenization of Genome Sequences of Non-Retroviral RNA Viruses into Plant Genomes. PLoS Pathog 7(7): e1002146. doi:10.1371/journal.ppat.1002146
- COUTTS, RH., COVELLI, L., DI SERIO, F., CITIR, A., ACIKGÖZ, S., HERNANDEZ, C., RAGOZZINO, A., FLORES, R. (2004): Cherry chlorotic rusty spot and Amasya cherry diseases are associated with a complex pattern of mycoviral-like double-stranded RNAs. II. Characterization of a new species in the genus *Partitivirus*. Journal of General Virology, 85:3399–3403.
- DODDS, JA., MORRIS, TJ., JORDAN, RL. (1984): Plant viral double-stranded RNA. Annual Review of Phytopathology, 22:151-168.
- DOMINGO, E., MARTÍN, V., PERALES, C., GRANDE-PÉREZ, A., GARCIA-ARRIAZA, J., ARIAS A. (2006): Viruses as quasispecies: biological implications CTMI 299: 51-82
- EIGEN, M. (1971): Selforganization of Matter and the Evolution of Biological Macromolecules. Die Naturwissenschaften 58. Jahrgang
- EDWARD C. HOLMES (2010): The RNA virus quasispecies: Fact or Fiction? J. Mol. Biol. 400, 271-273
- FLACHMANN, M., LESEMAN, DE., FRENZEL, B., KOENIG, R. (1990): Isometric virus-like particles in *Albies alba* Mill. and other *Albies* species: partial purification and improved detection by means of immunoelectron microscopy. Journal of Phytopathology, 129:193-202.
- GHABRIAL, SA. (1998): Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. Virus Genes, 16:119–131.
- HULL R (2002): In: Matthew's Plant virology. Academic Press, London p. 1001.
- KASSANIS, B., WHITE, RF., WOODS, RD. (1977): *Beet cryptic virus*. Phytopathologische Zeitschrift., 90:350-360.
- KÜHNE, T., SCHUBERT, J., STANARIUS, A., LEISER, RM. & PLOBNER, L. (1986): Purification and partial characterization of beet cryptic virus. Recent Results in Plant Virology, (23-27 March Reinhardsbrunn, Germany) pp.54-55.

- LIANG Y., FENG J., ZHANG Y. et. al. (2012) Research of the *Chlorella vulgaris* viruses, Unpublished.
http://www.paper.edu.cn/index.php/default/en_releasepaper/full_text/4465221
- LIU H., FU Y., JIANG D., LI G., XIE J., et al. (2010) Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes. *J Virol* 84: 11876–11887
- LIU H, FU Y., XIE J, CHENG J, GHABRIAL SA, et al. (2012) Discovery of Novel dsRNA Viral Sequences by In Silico Cloning and Implications for Viral Diversity, Host Range and Evolution. *PLoS ONE* 7(7): e42147. doi:10.1371/journal.pone.0042147
- MÉRAI ZSUZSANNA (2009): A korai stop kodon tartalmú mRNS-ek felismerésében és lebontásában szerepet játszó cisz és transz elemek azonosítása növényekben
 Doktori értekezés
- NAKATSUKASA-AKUNE, M., YIMASITHA, K., SHIMODA, Y., UCHIUMI, T., ABE, M., AOKI, T., KAMIZAWA, A., AYABE, S., HIGASHI, S., SUZUKI, A. (2005): Suppression of root nodule formation by artificial expression of the TrEnodDR1 (Coat Protein of *White clover cryptic virus 1*) gene in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 18(10):1069-1080.
- NATSUAKI, T., NATSUAKI, KT., OKUDA, S., TERANAKA, M., MILNE, RG., BOCCARDO, G., LUISONI, E. (1986): Relationships between the cryptic and temperate viruses of alfalfa, beet and white clover. *Intervirology*, 25(2):69-75.
- OH, CS., HILLMAN, BI. (1995): Genome Organization of a partitivirus from a filamentous ascomycete *Atkinsonella hypoxylon*. *Journal of General Virology*, 76:1461-1470.
- OSAKI, H., KUDO, A., OHTSU, Y. (1998): Nucleotide sequence of seed- and pollen-transmitted double-stranded RNA, which encodes a putative RNA-dependent RNA polymerase, detected from Japanese pear. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(11):2101-2106.
- SALEM, NM., GOLINO, DA., FALK, BW., ROWHANI, A. (2008): Complete nucleotide sequences and genome characterization of a novel double-stranded RNA virus infecting *Rosa multiflora*. *Archives of Virology*, 153(3):455-462.

- STANARIUS, A., MEYER, U., KÜHNE, T. (1989): Terms of cultivation influence amount of beet cryptic virus particles in sugar beet plants (*Beta vulgaris* var. altissima). Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz, 25(5):421-428.
- STRAUSS, EE., LAKSHMAN, DK., TAVANTZIS, SM. (2000): Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctonia solani*. Journal of General Virology, 81:549–555.
- SZEGŐ, A., (2009): A kriptikus és endornavírusok elterjedtsége, perzisztenciája és molekuláris jellemzése. Doktori értekezés
- TZANETAKIS, IE., MARTIN, RR. (2007): *Black raspberry cryptic virus*. Unpublished.
- TZANETAKIS, IE., PRICE, R., MARTIN, RR. (2008): Nucleotide sequence of the tripartite *Fragaria chiloensis* cryptic virus and presence of the virus in the Americas. Virus Genes, 36(1):267-72.
- VALVERDE, RA., GUTIERREZ, DL. (2008): Molecular and biological properties of a putative partitivirus from Jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología (Mexican Journal of Phytopathology) 26(1):1-6.
- VELICEASA, D., ENUNLU, N., KOS, PB., KOSTER, S., BEUTHER, E., MORGUN, B., DESHMUKH, SD., LUKACS, N. (2006): Detection of a new putative cryptic virus in *Pinus sylvestris* L. Virus Genes, 32: 177-186.
- WILLENBORG, J., MENZEL, W., VETTEN, H-J., MAISS, E. (2009): Molecular characterization of two alphacryptovirus dsRNSs isolated from *Daucus carota*. Archives of Virology, 154:541-543.
- XIE, WS. (1992): Studies on cryptic viruses in sugar beet and ryegrass. PhD. thesis. University of London.
- XIE, WS., ANTONIW, JF., WHITE, RF. (1993): Nucleotide sequence of Beet cryptic virus 3 dsRNA which encoded RNA-dependent RNA polymerase. Journal of General Virology, 74:1467-1470.
- YUE, J., HU, X., SUN, H., YANG, Y., HUANG J. (2012): Widespread impact of horizontal gene transfer on plant colonization of land. Nature communications 3:1152; DOI: 10.1038/ncomms2148

ZACCOMER, B., HAENNI, AL., MACAYA, G. (1995): The remarkable variety of plant RNA genomes. *Journal of General Virology*, 76:231-247.