

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Növénykórtani Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

**Hazai burgonya S vírus (*Potato virus S*, PVS) izolátum komplett genomjának
molekuláris vizsgálata és rokonsági viszonyainak feltérképezése**

Zámbó Ágnes
Növényorvos MSc, II. évfolyam

Konzulens: Pájtli Éva, tudományos segédmunkatárs
Dr. Palkovics László, tanszékvezető egyetemi tanár

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

1. Felhasznált rövidítések	4
2. Bevezetés	5
3. Célkitűzés.....	6
4. Irodalmi áttekintés.....	7
4.1. A PVS elterjedése a világon.....	7
4.2. Tünetek a természetes gazdanövényeken	8
4.3. A PVS teszt növényei	8
4.4. Természetes terjedési módjai	9
4.5. A <i>Betaflexiviridae</i> család és a <i>Carlavirus</i> nemzetség általános jellemzése	10
4.6. A PVS általános jellemzése	11
4.7. Az Andesi és közönséges törzs jellemzése	15
4.8. PVS izolátumok változékonysága, jellemzése	16
4.9. Rekombináció	17
5. Anyag és módszer.....	19
5.1. Vizsgálatok helye	19
5.2. Vizsgálatok anyaga	19
5.2.1. Vírus izolátum.....	19
5.2.2. Növények	19
5.2.3. Baktérium törzsek	19
5.2.4. Plazmidok.....	19
5.2.5. Oligonukleotid indítószekvenciák (primerek)	19
5.2.6. Vegyszerek, enzimek, kitek	21
5.3. Vizsgálatok módszere	21
5.3.1. Mechanikai átvitel.....	21
5.3.2. Össznukleinsav kivonás levélszövetből.....	21
5.3.3. RT-PCR.....	21
5.3.3.1. cDNS szintézis	21
5.3.3.2. PCR	22
5.3.4. Gélelektroforézis.....	24
5.3.5. A PCR-termékek klónozása	24
5.3.6. A plazmid tisztítása és az inzert ellenőrzése	25
5.3.7. Klónok tisztítása szekvenálásra	26
5.3.8. A szekvenanciaanalízishez felhasznált programok.....	28

6. Eredmények és következtetések	29
6.1. A magyar PVS izolátum jellemzői.....	29
6.2. Teljes köpenyfehérje-szekvencia vizsgálat	29
6.3. Teljes genomszekvencia vizsgálat	30
6.4. Rekombinációs vizsgálatok.....	34
7. Összefoglalás.....	37
8. Köszönetnyilvánítás	38
9. Irodalomjegyzék.....	39
10. Mellékletek.....	44

1. Felhasznált rövidítések

aa	aminosav (amino acid)
A, C, G, T	adenin, citozin, guanin, timin
bp	bázispár
cDNS	komplementer DNS
CP	köpenyfehérje (coat protein)
DAS-ELISA	kettősellenanyag-szendvics-ELISA (double antibody sandwich ELISA)
DNS	deoxiribonukleinsav
dNTP	deoxiribonukleotid
ELISA	enzimhez kötött ellenanyagvizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
for	forward
kDa	kilodalton
kb	kilobázis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	nukleotid
ORF	nyílt leolvasási keret (Open Reading Frame)
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PVS	burgonya S vírus (<i>Potato virus S</i>)
PVS^A	burgonya S vírus Andesi törzs (Andean strain)
PVS^{-CS}	burgonya S vírus <i>Chenopodium quinoa</i> -n szisztemizálódó törzs
PVS^O	burgonya S vírus közönséges törzs (Ordinary strain)
rev	reverse
RdRp	RNS-függő RNS-polimeráz (RNA-dependent RNA polymerase)
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz transzkripció
RT-PCR	reverz transzkripció-polimeráz láncreakció
ssRNS	egyszálú RNS
TGB	hármás gén blokk (triple gene block)
UTR	nem kódoló régió

2. Bevezetés

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

A burgonyának számos vírusos betegsége van. Az 1950-es években hazánk területére külföldi fajtákkal érkezett burgonya Y vírus dohány érnekrózis törzs az akkoriban használatos burgonya fajtáink gazdaságos termesztését lehetetlenné tette (Horváth, 2009). Wolf és Horváth szerint Magyarországon a burgonya levélsodródás vírus (*Potato leafroll virus*) és a burgonya Y vírus (*Potato virus Y*) okoz leggyakrabban járványt. A két vírus gazdasági jelentősége a termésmennyiség csökkenésének előidézésében illetve a szaporítóanyag előállítás során a vetőgumó minőségleromlásában nyilvánul meg (Wolf és Horváth, 2002).

A vírusok elleni védekezés lehetséges módjai közé tartozik a rezisztens fajták használata. Magyarországon a kereskedelmi forgalomban kapható burgonyafajták vírusfertőzéssel szembeni rezisztenciája illetve toleranciája- a legtöbb fajta esetében- a következő vírusokra terjed ki: burgonya Y vírus , burgonya levélsodródás vírus, burgonya X vírus (*Potato virus X*), burgonya A vírus (*Potato virus A*) (Ábrahám, 2009). A burgonya vírusos betegségeivel szembeni sikeres védekezés alapja az adott vírus etiológiájának, szekvenciaadatainak minél szélesebb körű ismerete a megbízható diagnózis céljából.

Wetter szerint a burgonya S vírus (*Potato virus S*, PVS) az egész világon az egyik legelterjedtebb a burgonyát fertőző vírusok közül (Wetter, 1971). A vírus fő gazdanövénye a burgonya (de Bruyn Oubouter, 1952). A PVS egyik törzse nagyon sok burgonyafajtán nem okoz látható tüneteket, illetve egyes fajtákon csak nagyon enyhe szimptómák jelennek meg (Vaughan és mtsai., 1956). A vírus jelenlétének gazdasági jelentőségét az adja, hogy 10-20%-kal csökkenti a termésmennyiséget (Wetter, 1971). Emiatt a vírus terjedésének megállítása, illetve a vírusmentes szaporítóanyag előállítása kardinális kutatási téma lehet a jövő burgonyatermesztésében.

3. Célkitűzés

Magyarországon a burgonya S vírus viszonylag kevésbé kutatott kórokozó. Sajnálatos módon nem állnak rendelkezésre a víusról szekvencia adatok hazánkban.

Kísérleteink elsődleges célja egy magyarországi PVS izolátum genetikai állományának klónozása, teljes nukleinsav szekvenciájának meghatározása és közzététele a nemzetközi adatbázisban. A vizsgálatok további részében célul tűztük ki- a szekvencia adatok birtokában- a hazai izolátum nukleotid szekvenciájának összehasonlítását a nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal.

Továbbá terveink között szerepelt a rokonsági kapcsolatokat tükröző filogenetikai törzsfák elkészítése, amely segítségével információt kaphatunk a magyar vírusizolátum rokonsági kapcsolatairól.

Korábbi vizsgálatok során a kutatók megállapították, hogy a PVS izolátumok között rekombinációs események történtek (de Sousa Geraldino Duarte és mtsai., 2012). A rekombináció létrejötte jobb adaptálódási képességekkel rendelkező vírusgenotípusok kialakulását eredményezheti, ami újabb nehézségek elé állítja a növényvédelmi szakembereket. Kísérleteink során a rekombinációs vizsgálatok elvégzését is feladatunknak tekintettük.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. A PVS elterjedése a világon

A burgonya S vírus jelenlétéről először Hollandiában számoltak be 1951-ben (de Bruyn Oubouter, 1952). A vírus első leírása óta eltelt időben a világ számos pontján születtek publikációk, melyek a PVS jelenlétéről tudósítanak. Rozendaal és Brust kimutatták, hogy a vírus gyakorlatilag minden európai burgonya termesztő területen jelen van, valamint az Amerikai Egyesült Államokban, Wisconsinban is megtalálták (Rozendaal és Brust., 1955).

1959-ben új-zélandi kutatók arról számoltak be, hogy PVS-t izoláltak 3 termesztett burgonya fajtában: 'Aucklander Short Top', 'Arran Banner' és 'Dakota' fajtákban (Thomson, 1959). A kísérlet során a korábbi vizsgálatoknak ellentmondó eredményeket kaptak. Yarwood és Gold szerint a PVS *Cyamopsis tetragonoloba* növényen lokális léziót okoz (Yarwood and Gold, 1955). Ennek ellenére az Új-Zélandon végzett kísérletekben a PVS izolátum nem okozott ilyen tüneteket ezen a tesztnövényen. Ez az eredmény már az 1950-es évek végén okot adott arra, hogy a kutatók azt feltételezzék, a vírusnak több törzse is létezhet.

Japánban kiterjedt vizsgálatokat folytattak burgonya növényekkel, és megállapították, hogy sok más burgonya vírussal együtt a PVS is megtalálható a vizsgált mintákban. Ezek a vírusok évről évre átkerülnek az újabb szaporítóanyagba, ezáltal folyamatosan csökkentve a termésmennyiséget. A növekvő gond miatt olyan anyanövényeket szerettek volna előállítani, amelyek vírusmentesek. Emiatt 11 burgonya fajtát vizsgáltak meg ELISA, RT-PCR és microarray módszerrel. A 11 vizsgált fajtából 9 fajtában mutatták ki a PVS-t. A PVS-nél nagyobb mennyiségben csak a *Potato virus M* fordult elő, ezt a vírust az összes vizsgált fajtában megtalálták. A PVS-t tekintve 6 fajta tünetmentes volt, a maradék 5 fajtán pedig levélfoltosság volt megfigyelhető (Maoka és mtsai., 2010).

Iránban 2011-ben jelent meg egy publikáció, amelyben 240 burgonya mintát vizsgáltak meg, melyeket 2005 és 2008 között gyűjtöttek különböző iráni tartományokból. A vizsgált 240 mintából 44-ben fordult elő PVS, ez 18,2 %-os előfordulási gyakoriságnak felel meg. A vizsgálatok-melyek során DAS-ELISA tesztet végeztek - kimutatták, hogy 12 PVS izolátum fordult elő a mintákban (Salari és mtsai., 2011). Ezen kívül még számos országban jelentek meg publikációk a PVS jelenlétével kapcsolatban pl.: Taszániában és Ausztráliában (Lambert és mtsai., 2012), Brazíliában (de Sousa Geraldino Duarte és mtsai., 2012), Szíriában (Chikh Ali és mtsai., 2008). A publikációk mennyisége és földrajzi elterjedtsége is azt mutatja, hogy a PVS valóban előfordul számos országban, és ismerve azt a tényt, hogy akár 20%-os a termésveszteséget is képes okozni, számítanunk kell rá, hogy előbb vagy utóbb jelentősebb gondot fog okozni a világ burgonyatermesztésében.

4.2. Tünetek a természetes gazdanövényeken

A PVS természetes gazdanövényköre a burgonya (*Solanum tuberosum*) (de Bruyn Oubouter, 1952) és a pepino (*Solanum muricatum*) (Dolby és Jones, 1988), ezen kívül a *Lycopersicon* nemzetség egyes fajaiban is megtalálható a kórokozó (Horváth, 1972). A burgonya legtöbb fajtáján tünetmentes, de egyes fajtákon előfordulhatnak szimptómák. Ezek a tünetek a következők lehetnek: levéldefomáció, levélér-besüppedés és bronzfoltosság (Dolby és Jones, 1987). A vírus másik törzse erősebb tüneteket indukál: korai előregedés, lombhullás, nekrotikus léziók, hajtásgörbülés és torzulás alakul ki a fertőzött növényeken (Slack, 1983). 1973-ban, Peruban is izoláltak PVS-t különböző burgonya fajtákból, a fertőzött növények enyhe mozaikos tüneteket, sárgulást és bronzos elszíneződést mutattak az alsóbb leveleken (Hinostroza-Orihuela, 1973).

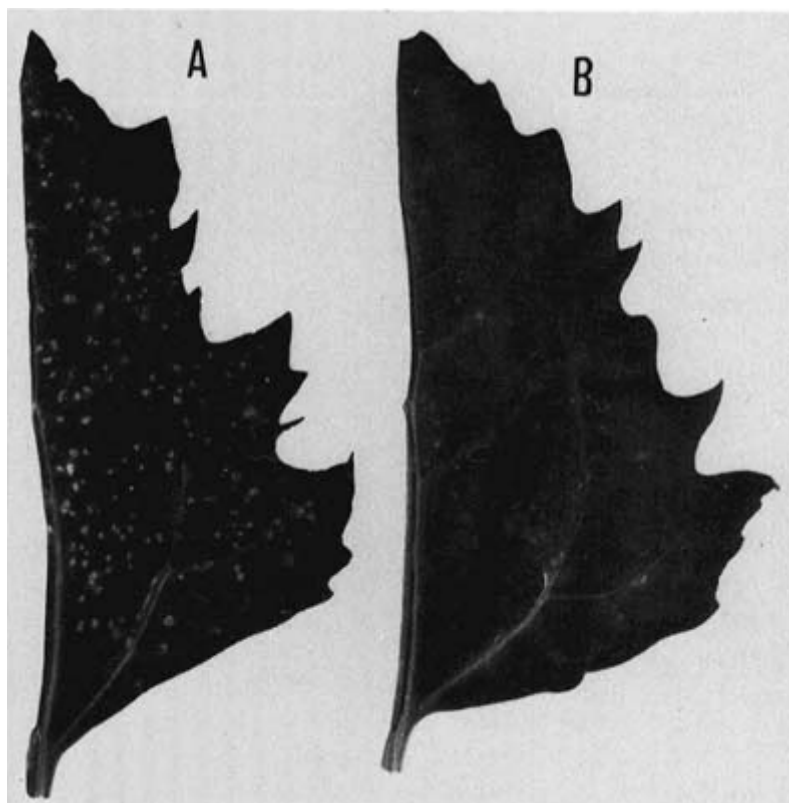
Horváth 1972-es vizsgálataiban számos paradicsomfajt vizsgált meg: *Lycopersicon glandulosum*, *L. hirsutum*, *L. humboldtii*, *L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium*, *L. pyriforme*, *L. racemiflorum*, *L. racemigerum*, *L. esculentum* cv. Red Cherry. A növényeket mechanikai úton inokulálták PVS izolátummal. Az eredmények szerint csak a *L. glandulosum*, *L. hirsutum*, *L. peruvianum* növényfajok voltak fogékonyak, de ezeken a növényeken is tünetmentes maradt a fertőzés. A vírus jelenlétét *Chenopodium album* teszt növényre történt visszaizolálás, illetve szerológiai tesztek segítségével mutatták ki. A vírus maggal nem terjedt át a következő nemzedékbe (Horváth, 1972).

4.3. A PVS teszt növényei

A PVS teszt növényeinek nagy része a *Solanaceae* családból kerül ki: *Nicotiana debneyi*, *N. tabacum*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *Datura metel* és *Physalis floridana*. *N. debneyi* növényen mozaikot és a levélér-besüppedést okoz, míg *N. tabacum* fajon fajtától függ a megjelenése. 'White burley' illetve 'Samsun. N' fajtán mozaikot okoz, azonban 'Turkish' fajtán nem jelennek meg szimptómák. *N. glutinosa* fajon mozaik foltok megjelenése figyelhető meg a fertőzés hatására. *N. clevelandii*, *Datura metel* és *Physalis floridana* fajon tünetmentes marad a fertőzés, vagy nem sikerült a kísérletek során a vírust visszaizolálni. A *Chenopodiaceae* család tagjai közül *Chenopodium amaranticolor*-on nekrotikus lokális léziót, *C. quinoa*-n és *C. album*-on klorotikus lokális léziót indukál a vírus jelenléte (Salari és mtsai., 2011). A PVS *N. plumbaginifolia* növényen tűszúrászerű lokális léziókat okoz (Fletcher, 1996).

A vírus két törzsének elkülönítése kezdetben a *Chenopodium quinoa*-n okozott tünetek alapján történt. Az Andesi törzs ezen a teszt növényen szisztemikus tüneteket okoz, míg a

közönséges törzs nem. Hiruki 1975-ben végzett vizsgálatai során két PVS izolátumot használt fel. A tesztnövény a *C. quinoa* volt, az egyik izolátum (A) a tesztnövényen 14 nappal az inokulálást követően lokális léziók megjelenését indukálta, míg a másik izolátum esetében (B) ezek a tünetek nem voltak megfigyelhetők (1. ábra) (Hiruki, 1975).



1. ábra: PVS izolátum okozta tünet *C. quinoa*-n („A” levél) (Hiruki, 1975 nyomán).

A kutatók további megfigyelései szerint a vírus Andesi törzse *Cyamopsis tetragonoloba* növényen nem okoz tünetet, de a közönséges törzs nekrotikus léziókat indukál (Slack, 1983). Fletcher szerint viszont ezen a növényfajon mindkét törzs nekrotikus lokális léziókat okoz (Fletcher, 1996). *Lycopersicon* fajokon is végeztek kísérletet, és *L. esculentum* fajtákon az Andesi törzs szisztemikus foltosságot okozott (Fletcher, 1996).

4.4. Természetes terjedési módjai

A PVS mechanikai úton terjed, vegetatív szaporítóanyag útján átvihető, maggal azonban nem (Lin és mtsai., 2009). A PVS ún. Andesi törzse levéltetűvel átvihető nem perzisztens módon, míg a vírus közönséges törzse nem. A tanulmányok azt mutatják, hogy a vírus nem igényli a helper komponens jelenlétét a levéltetűvel történő átvitelhez, mint ahogy ez jellemző a *Potyvirus* nemzetség tagjaira (Slack, 1983). További vizsgálatok során azt figyelték meg, hogy az Andesi

törzs mechanikai úton és levéltetvekkel is könnyebben terjed, mint a közönséges törzs (Rose, 1983; Slack, 1983; Wardrop és mtsai., 1989). A levéltetű fajok közül a lehetséges vírusvektorok a következők lehetnek: *Aphis fabae*, *A. nasturtii*, *Myzus persicae* és *Rhopalosiphum padi* (Lin és mtsai., 2009). 1996-ban végeztek kísérleteket abból a célból, hogy megállapítsák, a vírus valóban átvihető levéltetűvel. A tesztnövény *C. quinoa* volt, két PVS izolátumot használtak fel: *Solanum tuberosum* 'Record' fajtából származó izolátumot, mely szisztemikus foltosságot okozott *C. quinoa*-n és *S. tuberosum* 'Maris Court' fajtából származó izolátumot, amely *C. quinoa*-n lokális tüneteket indukált. A felhasznált levéltetű faj a *Myzus persicae* és *Aulacorthum solani* volt. A kísérlet során csak a 'Record' fajtából származó izolátumot tudták átvinni. (Fletcher, 1996).

2012-ben Brazíliában is végeztek kísérleteket a levéltetűvel történő átvittel kapcsolatban. *Myzus persicae* és *Aphis gossypii* levéltetű fajokat használtak fel a kísérletekben. Mindkettő vizsgált levéltetű faj esetében sikeres volt a transzmisszió. *C. quinoa* növényről történő átvitel szintén ugyanerre a növényre a *M. persicae* esetében 46,6%-os átviteli arányt figyeltek meg, míg burgonya növényre csak 20%-os volt az átviteli arány. Megfigyelték, hogy amikor burgonya növényeket használtak inokulum forrásként az átviteli hatékonyság 11,6 és 10% volt *C. quinoa*-ra és *S. tuberosum*-ra. A másik levéltetű faj, az *Aphis gossypii* alacsonyabb vírusátviteli hatékonyságot mutatott: 13,3 és 3,3% *C. quinoa* és burgonya növények esetében, amennyiben *C. quinoa* volt az inokulum forrása. Ez a levéltetű faj burgonyáról burgonyára nem volt képes a vírus átvitelére, és *C. quinoa* növényre is csak nagyon alacsony százalékban volt hatékony az átvitel (3,3%) (de Sousa Geraldino Duarte és mtsai., 2012).

4.5. A *Betaflexiviridae* család és a *Carlavirus* nemzetség általános jellemzése

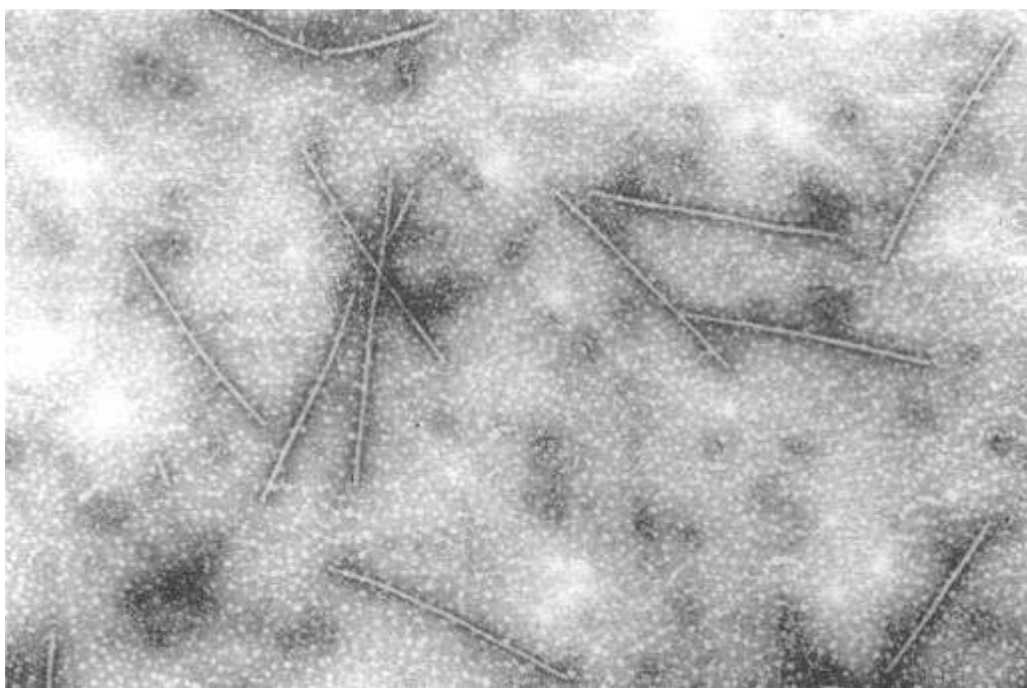
A *Betaflexiviridae* az International Committee on Taxonomy of Viruses által 2009-ben létrehozott, növényi vírusokat tartalmazó család. A *Betaflexiviridae* családba tartozó nemzetségek: *Carlavirus*, *Citrivirus*, *Capillovirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* illetve további 5 vírusfaj tartozik a családba, amelyeket eddig még nem soroltak nemzetségekbe (Carstens, 2009).

Gazdanövénykörüket tekintve a családba tartozó vírusok meglehetősen különböznek egymástól: lág- és fásszárú, egy- és kétszikű növényfajokat széles körben fertőznek, de az egyes vírusfajok gazdanövényköre limitált. A *Foveavirus*, *Capillovirus*, *Vitivirus* és *Trichovirus* nemzetség tagjai főleg vagy kizárólagosan csak fás növényeket fertőznek meg. A családba tartozó vírusfajok mechanikai inokulációval átvihetők. Sok vírusnak nincs ismert gerinctelen állat, illetve gombavektora, de az ismert, hogy egyes trichovírusok atka által terjednek. A vírus partikulumok felhalmozódása a növényi sejten belül a citoplazmában történik. A vírusok többsége viszonylag enyhe tüneteket okoz a gazdanövényein (Adams és mtsai., 2004).

A *Carlavirus* nemzetség tagjainak virionjai fonál alakúak, 610-700 nm hosszúak, 12-15 nm átmérőjűek, helikális szimmetriával rendelkeznek. A genom pozitív egyszálú RNS, 7,4-8,5 kb nagyságú és 6 ORF-et tartalmaz, amelyek a virális replikázt, a mozgási fehérjét (TGB), a köpenyfehérjét és a nukleinsavkötő szabályozó fehérjét kódolják. A köpenyfehérje 31-36 kDa nagyságú. Az egyes fajok természetes gazdanövényköre egy vagy néhány fajra terjed ki. A legtöbb faj levéltetvekkel átvihető nem perzisztens módon, de a *Cowpea mild mottle virus* esetében a dohányliszteske (*Bemisia tabaci*) a vírus vektora (Badge és mtsai., 1996). A legtöbb faj mechanikai úton átvihető, azonban három, hüvelyes növényt fertőző vírus (*Pea streak virus*, *Red clover wein mosaic virus* és *Cowpee mild mottle virus*) maggal is terjed. Egyes vírusok elterjedését a földrajzi előfordulás korlátozhatja, de ezek vegetatív szaporítóanyaggal nagy távolságokra terjedhetnek (Adams és mtsai., 2004).

4.6. A PVS általános jellemzése

A PVS a *Betaflexiviridae* család tagja, azon belül pedig a *Carlavirus* nemzetséghez tartozik (Carstens, 2009). A virionok flexibilis fonál alakúak (2. ábra), a vírusrészecskék $610-710 \times 10^{-15}$ nm nagyságúak (Lin és mtsai., 2009; Mackenzie és mtsai., 1989).



2. ábra: A *potato virus S* elektronmikroszkópos képe (Fletcher, 1996 nyomán).

A vírus partikulumok pozitív egyszálú RNS-t tartalmaznak, mely megközelítőleg 8400 nukleotidból áll (Fletcher, 1996). A genom az 5'-végen sapka struktúrával, míg a 3'-végen poliadenilált régióval rendelkezik. A vírusgenom 6 nyílt leolvasási keretet (ORF) tartalmaz (3.

ábra). Az ORF1 a replikázt kódolja (Matousek és mtsai., 2005); az ORF2, ORF3 és ORF4 alakítja ki a triple gene block-ot (hármás gén blokk, TGB), melynek a sejtről sejtre történő mozgásban van szerepe (Morozov és mtsai., 1989); az ORF5 és ORF6 a köpenyfehérjét, illetve a 11K fehérjét kódolja. A kutatások azt bizonyítják, hogy az ORF6 felelős a carlavírusok levéltetvekkkel történő átviteléért (Foster és mtsai., 1992; Foster, 1991). Az ORF2 által kódolt fehérje 25 kDa nagyságú és tartalmazza az NTPáz/helikáz domént, az ORF3 által kódolt fehérje 12 kDa nagyságú és két hidrofób régióval rendelkezik (Lin és mtsai., 2009). Az ORF4 egy 7 kDa nagyságú fehérjét kódol, amelynek N-terminális része hidrofób tulajdonságú. A hidrofób régiók az ORF3 és ORF4-ben a kutatások szerint az intracelluláris mozgásban vesznek részt (Ju és mtsai., 2005; Morozov és mtsai., 1987; Schepetilnikov és mtsai., 2005). Az ORF5 34 kDa nagyságú fehérjét kódol, amely átfedésben van az ORF6-tal, mely a ciszteinben gazdag nukleinsav-kötő fehérjét (NABP) kódolja. Ez a fehérje felelős a levéltetűvel történő átvitelért, a géncsendesítésért és részt vesz a replikációban is (Chiba és mtsai., 2006; Gramstatt és mtsai., 1990).



3. ábra: A burgonya S vírus genomtérképe és a kódolt fehérjék elhelyezkedése a genomon. 233K: metiltranszferáz, helikáz, polimeráz; 25K: NTPáz, helikáz domén, TGBp1; 12K: TGBp2; 7K: TGBp3; 34K: köpenyfehérje; 11K: nukleinsav-kötő fehérje.

A vírus fehérjék genomiális és két szubgenomiális RNS-ről (2,5 kb; 1,5 kb) transzlálódnak. A replikáz közvetlenül a genomiális RNS-ről, a TGB a hosszabb szubgenomiális RNS-ről íródik át. A kisebbik szubgenomikus RNS a köpenyfehérje és a 11K fehérje kódolásában vesz részt (Foster és mtsai., 1992). A köpenyfehérje kódoló régiót megelőző (upstream) 101 nukleotidból álló szakasz transzláció hatékonyságot növelő (viral translational enhancer, VTE) tulajdonsággal rendelkezik. Ez a szakasz tartalmaz egy olyan konzervált régiót CCTTTAGGTT, mely a triple gene block 25K kódoló régiója előtt is megtalálható és ez a szekvencia a *Carlavirus* nemzetség más tagjaira is jellemző. A transzlációt szabályozó tulajdonságot deléciós vizsgálatokkal bizonyították, ahol a konzervált régiót viszont érintetlenül hagyták (Turner és Foster, 1997).

Nagyon sok növényi vírusnemzetség kódol ún. triple gene block-ot (TGB, hármas gén blokk), ami egy konzervált genomrészlet. A TGB a vírusok növényben sejtről sejtbe történő, illetve azok hosszú távú mozgásában vesz részt. A TGB alapú transzport rendszer 3 fehérje együttműködését jelenti, amelyek a virális genomot szállítják a plazmodezmához, és segítik annak belépését a szomszédos sejtbe (Sergey és mtsai., 2003). A TGB 3 részlegesen átfedő ORF-ből áll (Morozov és mtsai., 1987), ez a 3 ORF a következő fehérjéket kódolja: TGBp1, TGBp2 és TGBp3 a genomon való elhelyezkedésük szerint számozva (Solovyev és mtsai., 1996). A fertőzött cDNS mutációs vizsgálatainak eredménye alapján elmondható, hogy mindhárom TGB fehérje esszenciális a vírus mozgási folyamataiban (Petty és mtsai., 1990)

Matousek 2005-ben határozta meg egy PVS izolátum genomjának teljes szekvenciáját (Matousek és mtsai., 2005), korábban csak a vírus 3'-vég szekvenciájáról voltak információk (Mackenzie és mtsai., 1989), illetve a PVS genom restrikciós analízisének eredménye volt elérhető (Monis és de Zoeten, 1990). Mackenzie és mtsai a PVS 3'-vég 3553 nukleotidból álló szekvenciáját határozták meg. Megállapították, hogy a 33K fehérjét kódoló gén a virális köpenyfehérje kódolásáért felelős. A nukleotid szekvenciából levezetett 70 aminosavból álló szekvencia a PVS köpenyfehérjéjének központi régiójából 59%-os egyezést mutatott a *Potato virus X* analóg régiójával. A részleges 41K nyílt leolvasási keret a PVX és *White clover mosaic virus* virális replikáz C-terminális részével mutatott homológiát. A vizsgálat további részében a 7K, 12K és 25K nyílt leolvasási kereteket is összehasonlították más vírusok leolvasási kereteivel. Az eredmények szerint ezek az ORF-ek szignifikáns szekvencia egyezést mutattak a potexvírusok egyes tagjaival (Mackenzie és mtsai., 1989).

Monis és munkatársai 1990-ben végzett kísérleteik során a PVS Andesi törzsének RNS-ét jellemezték. Megállapították, hogy a vírus RNS-e poliadenilált, ez a *Potato virus M*-re is jellemző, amely szintén a *Carlavirus* nemzetség tagja (Matthews, 1979). A vizsgálataik során nem detektáltak nagy molekulású fehérje prekuzort az *in vitro* transzlációs folyamat során, ez az eredmény azt mutatja, hogy a transzlációs stratégia során a proteolitikus folyamatban nem történik poliprotein

szintézis, mint ahogy ez a folyamat jellemző a *Potyvirus* és *Comovirus* nemzetség tagjaira (Goldbach és mtsai., 1986).

4.7. Az Andesi és közönséges törzs jellemzése

Jelenleg két ismert törzse van a PVS-nek: a közönséges törzs (PVS^O, PVS ordinary strain) és az Andesi törzs (PVS^A, Andean strain). A PVS^A első leírása 1973-ban történt. A kísérletek során perui burgonya fajtákat vizsgáltak meg, a növények különböző tüneteket mutattak, mint pl.: szisztémikus mozaik foltok és sárgulás. Az izolátumok *Chenopodium quinoa* teszt növényen szisztémikus szimptomákat okoztak. A PVS^O törzssre ez nem volt jellemző, mert ebből a törzsből származó izolátumok lokális léziókat indukálnak *C. quinoa*-n (Hinostroza-Orihuela, 1973). A közönséges törzs mellett az Andesi törzs létezését bizonyította egy 1983-ban megjelent publikáció is. Slack és munkatársai *Solanum tuberosum* 'Red La Soda' fajtában detektáltak egy olyan PVS izolátumot, mely levéltetűvel átvihető volt és *C. quinoa*-n a klorotikus lokális léziók kialakítása után szisztémizálódott a növényben (Slack, 1983). A közönséges törzs izolátumai biológiailag különböznek az Andesi törzstől a *Chenopodium quinoa*-n okozott tüneteket tekintve. Az Andesi törzs elnevezés onnan ered, hogy ezt a típust korábban csak Dél-Amerika Andok régiójában találták meg. Az újabb kutatások azonban bebizonyították, hogy a szisztémikusan fertőző típus Európában, USA-ban és Új-Zélandon is előfordul (Cox és mtsai., 2010). Az Andesi törzs több tünetet okoz a leveleken, mint a közönséges törzs és könnyebben átvihető levéltetűekkel is. A biológiai tulajdonságokban való eltérést a két törzs között a CP N-terminális régió aminosavainak különbségének tulajdonítják, a nukleotid kötő fehérje 11K és 7K fehérje szekvenciákban (Foster, 1991; Foster és mtsai., 1992; Matousek és mtsai., 2000), ezt a feltételezést azonban az újabb kutatások nem támasztják alá (Cox és mtsai., 2010). Matousek kísérleteiben megállapította, hogy a közép-európai PVS izolátumok között vannak olyanok, melyek szisztémikusan fertőzik a *C. quinoa*-t, de sokkal közelebbi viszonyban vannak a PVS^O törzsszel (Matousek és mtsai., 2005). Emiatt a kutatók újabb törzs létrehozását ajánlották, a PVS^{O-CS}-t, amely szisztémikus tüneteket okoz *C. quinoa*-n, de ez a törzs ne tartozzon bele az Andesi törzsbe (Cox és mtsai., 2010).

2012-ben megjelent egy publikáció, ami arról számolt be, hogy találtak egy olyan PVS^A izolátumot Brazíliában, amely az eddig leírt PVS^A-tól molekuláris tulajdonságait tekintve különbözik. Az izolátum szekvenciáját összehasonlították a GenBank-ban fellelhető 4 másik izolátummal és a nukleotid szekvencia egyezés 79 és 81% közötti volt, míg a korábban leírt 4 izolátum egymáshoz képest 90 és 97% közötti egyezést mutatott. A teljes genomanalízis bebizonyította, hogy a Brazíliából származó izolátum a PVS^A törzshöz tartozik, de a korábban leírt ebbe a törzsbe tartozó izolátumoktól különbözik. Ennek valószínűleg az az oka, hogy ez az első

PVS^A izolátum Dél-Amerikából, amelynek a teljes nukleotid szekvenciáját meghatározták és ez az izolátum más evolúciós útvonalon fejlődött, mint az európai PVS izolátumok (de Sousa Geraldino Duarte és mtsai., 2012).

4.8. PVS izolátumok változékonysága, jellemzése

Korábban született egy publikáció azzal kapcsolatban, hogy a PVS izolátumok szekvencia variabilitása a közép-európai izolátumokat tekintve igen nagyfokú, amennyiben a genom 3' végi jellemzőit vesszük figyelembe (Matousek és mtsai., 2000). Több vizsgálatot is végeztek abból a célból, hogy a *C. quinoa*-t szisztemikusan fertőző közép-európai PVS izolátumok molekuláris jellemzőit megtudják. A PVS^O és PVS^{CS} (*Chenopodium*-on szisztemizálódó) törzsek köpenyfehérje vezető és kódoló régióit felhasználva vizsgálták a két törzs közötti hasonlóságot immunocapture RT-PCR módszerrel. A két törzs a köpenyfehérje 5' végi részében különbözött egymástól. A filogenetikai vizsgálatok alapján a PVS^{CS} közelebbi rokonságban áll a PVS^O törzs európai izolátumaival és távolabb helyezkedik el az Andesi törzstől (Matousek és mtsai., 2005).

Matousek és munkatársai 2005-ben három PVS izolátum teljes nukleotid szekvenciáját határozták meg. A három PVS izolátum: Leona, Vltava és Kobra teljes szekvenciáját meghatározták, a szekvencia összehasonlítás során 8%-os különbséget találtak az izolátumok között. A PVS replikázán a domének elhelyezkedése illetve azok jellemzői megfelelnek a *Carlavirus* nemzetség más tagjainál tapasztaltakkal (Matousek és mtsai., 2005).

Lin és munkatársai 2009-ben végeztek kísérleteket PVS izolátumok molekuláris jellemzésének céljából. A vizsgált két PVS izolátum fitoftóra (*Phytophthora infestans*) rezisztens burgonyából származott. A kutatók megfigyelték, hogy ezek a burgonyák fogékonyabbak a PVS fertőzésre. Ennek a jelenségnek a megértésének céljából meghatározták a két PVS izolátum teljes szekvenciáját. A két izolátum közötti szekvencia egyezés 98%-os volt. A korábban leírt PVS izolátumok közül a Leona és Vltava izolátumokkal 91 és 94%-os egyezést mutatott. Filogenetikai fát készítettek a PVS köpenyfehérje aminosav szekvenciájának alapján, és kiderült, hogy a két izolátum a vírus közös törzsébe tartozik, valamint közeli rokonságban áll egy szíriai izolátummal (Lin és mtsai., 2009).

Iránban folytatott vizsgálatokban tizenkét PVS izolátum teljes köpenyfehérje és 11K gén szekvenciáját határozták meg. A köpenyfehérje 885 nukleotidját és a 11K gén 282 nukleotidból álló szekvenciáját határozták meg. A GenBank-ban megtalálható adatokkal összehasonlították az izolátumokat a vírus köpenyfehérjét tekintve. A vizsgálat eredménye 92,5 és 100% közötti egyezéseket mutatott. A 11K gén nukleotid szekvencia egyezés 93,5 és 100% közötti volt. A filogenetikai analízis egyértelműen jelezte a két ismert PVS törzs jelenlétét. A köpenyfehérje és

11K fehérje 2 nagy blokkja, ami 11 és 8 aminosavból tevődik össze, nem mutattak homológiát, ami a biológiai különbséget igazolhatja a két PVS törzs között. Egyik iráni PVS izolátum sem fertőzte szisztémikusan a *C. quinoa* tesztnövényt (Salari és mtsai., 2011). Ezek az eredmények támogatják Cox és munkatársainak korábbi elképzelését, miszerint nem a köpenyfehérje és a 11K gén N-terminális részében fellelhető különbségek okozzák a szisztemizálódási képességét a vírusnak a *C. quinoa* tesztnövényen (Salari és mtsai., 2011; Cox és mtsai., 2010), mint ahogy azt korábban a kutatók feltételezték (Foster, 1991; Foster és mtsai., 1992; Matousek és mtsai., 2000; Matousek és mtsai., 2005).

4.9. Rekombináció

A rekombináció olyan evolúciós folyamat, amely lehetővé teszi új vírus variánsok kialakulását. Számos külső tényező hat a vírusokra, amelyekhez alkalmazkodniuk kell pl.: a klíma- és környezetváltozás. A rekombináció segítségével gyorsabban képesek kialakulni előnyös vírus genotípusok, mint a klonális populációkban, illetve a kialakult káros mutációk könnyebben javíthatók (Drake és Holland, 1999) (Elena és Moya, 1999).

A növényi vírusok esetében a természetes rekombináció létrejöttét számos esetben igazolták pl.: *Potyvirus* nemzetség (Djilani-Khouadja és mtsai., 2010), *Luteovirus* nemzetség (Gibbs és mtsai., 1995), *Nepovirus* nemzetség (Le Gall és mtsai., 1995), *Cucumovirus* nemzetség és *Bromovirus* nemzetség (Boonham és mtsai., 2005; Fraile és mtsai., 1997; Galvino-Costa és mtsai., 2011), és a *Carlavirus* nemzetség (Singh és mtsai., 2008) egyes tagjainál. 2005-ben végeztek kísérleteket növényi RNS vírusokban bekövetkező rekombinációs események gyakoriságának meghatározása céljából. Az eredmények szerint, a vizsgált 36 növényi pozitív egyszálú RNS (+ssRNS) vírusfajból 12 esetében tudtak kimutatni rekombinációs eseményt. A vizsgált 14 potyvírus közül 8 faj esetében tudták bizonyítani, hogy történt rekombináció. A genomszekvencia összehasonlítások során a vizsgált szekvenciák több mint 1/3-ában figyeltek meg rekombinációs eseményt, azonban kevésbé gyakori volt a jelenség a filogenetikailag egymástól távol álló törzsek esetében. A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a rekombináció relatív közönséges folyamat némely +ssRNS vírusban, és megfelelően magas gyakorisággal történik ahhoz, hogy az evolúciós változások egyik forrása legyen (Chare és Holmes, 2005).

Brazíliában rekombinációs vizsgálatokat végeztek PVS izolátumokat tekintve, és az eredmények azt mutatják, hogy Vltava izolátum rekombináns, a szülői szekvenciák hordozói a Leona és a D00461 izolátumok. Ez az első olyan publikáció, amely a PVS törzsek rekombinációjáról tudósított. A vizsgálatot végző kutatók attól tartanak, hogy a rekombinációs

folyamat olyan új PVS törzsek kialakulását eredményezheti, melyek jobb adaptálódási és versengési képességgel fognak rendelkezni (de Sousa Geraldino Duarte és mtsai., 2012).

5. Anyag és módszer

5.1. Vizsgálatok helye

A vizsgálatokat a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar, Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában végeztük.

5.2. Vizsgálatok anyaga

5.2.1. Vírus izolátum

A vizsgált PVS izolátumot a 89.243-as jelöléssel fertőzött *in vitro* burgonya formájában a Pannon Egyetem, Burgonyakutatási Központja bocsátotta rendelkezésünkre.

5.2.2. Növények

A vírus felszaporítására és fenntartására, magról szaporított, fitotronban nevelt (24 °C, 16 óra fény szakasz) 6 hetes *Nicotiana debney* növényeket használtunk. Az inokulálást követően a tesztnövényeket szintén fitotronban neveltük.

5.2.3. Baktérium törzsek

A klónozáshoz az *Escherichia coli* DH5α és JM109-es törzsét használtuk.

5.2.4. Plazmidok

A PCR fragmenteket pGEM-T Easy (Promega) plazmid vektorba ligáltuk, melyet a Bio-Science Kft. szállított.

5.2.5. Oligonukleotid indítószekvenciák (primerek)

Az NCBI adatbázisban található burgonya S vírus nukleinsav szekvenciái alapján terveztük meg a primereket. A felhasznált oligonukleotidok szintézisét az IDT (Bio-Science Kft.) végezte.

1. táblázat: A vizsgálatokhoz felhasznált primerek

Primer neve	Szekvencia	Oladási hőmérséklet (T _m)	Gén
PVS1 régió			
PVS1. for	5'-GATAAACACTCCCGAAAATAATT-3'	48,6 °C	UTR
PVS1579. rev	5'-CCTTCTGTGCACATACTATCCACG-3'	55,3 °C	ORF1
PVS2 régió:			
PVS1530. for	5'-GCATAGATTTTCAGCGGATCAAGTT-3'	56,9 °C	ORF1
PVS2776. rev	5'-CCCCTGTGAAGTGCGAGATG-3'	55,3 °C	ORF1
PVS3 régió:			
PVS2663. for	5'-GATGCCCACCACACACGAGA-3'	56,4 °C	ORF1
PVS4608. rev	5'-ACCATTCCTCACCAAGTTCAACAA-3'	56,4 °C	ORF1
PVS4 régió:			
PVS4535. for	5'-GAGGGTGATCCGTGGTTGAAA-3'	56,0 °C	ORF1
PVS6765. rev	5'-CAACAATTGGCAGTGTACTCCTAGTG-3'	56,0 °C	ORF3
PVS5 régió:			
PVS6666. for	5'-ATATTGTGCCCTGATGCCACTTAC-3'	56,0 °C	ORF2
PolyT2. rev	5'CGGGGATCCTCGAGAAGCTTTTTTTTTT TTTTTTT-3'	68,9 °C	UTR

2. táblázat: A vizsgálatokhoz felhasznált szekvenáló primerek

Primer neve	Szekvencia	Oladási hőmérséklet (T _m)	Gén
PVS173. rev	5'-GTAGCAAAACCAGGCGAAGTTATC-3'	55,4 °C	ORF1
PVS1105. rev	5'-CACTTGGCTCTGGGCACATC-3'	55,3 °C	ORF1
PVS3300. for	5'-GCAAGGATCATATTGAGCATTGTAAG-3'	55,3 °C	ORF1
PVS5138. for	5'-GACAATCGGTTTCAGGGATGCG-3'	58,9 °C	ORF1
PVS6010. rev	5'-CCCGGGACACTATGAACAATATWG-3'	57,6 °C	ORF2
PVS7101. for	5'-CCGGCTAGTCAATTGCGA-3'	52,0 °C	ORF4
PVS7149. for	5'-GGGCCGTTGAAGCACCTTTAG-3'	57,5 °C	ORF4

PVS7882. rev	5'-GCAGCCCCATTAGTCACATAATCG-3'	58,5 °C	ORF5
PVS8400. rev	5'-TGCGAAACTCTGACTTTGCAC-3'	52,0 °C	3'UTR

A primerek nevében a számok az AJ863509 hivatkozási számú Leona nevű vírusizolátum genomján elfoglalt helyüket jelölik.

5.2.6. Vegyszerek, enzimek, kitek

A kísérletek során felhasznált oldatokhoz és táptalajokhoz különböző, kereskedelmi forgalomban kapható vegyszereket használtunk (Duchefa, Merck, Sigma-Aldrich, Reanal, VWR). A reverz transzkriptázt, a DNS-polimerázt, a dezoxiribonukleotidokat (dNTP) a Biocenter (Fermentas), a GelRed fluoreszcens festéket (Biotium) az Izinta szállította. Az RNS izoláláshoz a SpectrumTM Plant Total RNA Kit-et a Sigma-Aldrich-től, a PCR-fragment tisztításhoz, a High Pure Purification Kit-et a Roche-től, a szevenálásra küldött plazmidok tisztítására, a Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit-et a Bio-Rad-tól szereztük be.

5.3. Vizsgálatok módszere

5.3.1. Mechanikai átvitel

Az *in vitro* burgonya présnedvével *N. debney* teszt növényeket inokuláltunk. A táptalajtól megtisztított növényekhez 1:5 arányban 0,05 M kálium-foszfát-puffert (62,3 g/l Na₂HPO₄·2H₂O; 20,4 g/l KH₂PO₄; pH: 7,2) adtunk és jégben hűtött dörzsmozsárban végzett homogenálással állítottuk elő az inokulumot. Abrázívumként celitet (10-40 µm) használtunk, mellyel megszórtuk a dohány növények 3-3 levelét, majd a beszórt levelek felületét bekentük az inokulummal.

5.3.2. Össznukleinsav kivonás levélszövetből

Az össznukleinsav kivonást SpectrumTM Plant Total RNA Kit-tel végeztük, a gyártó utasítása szerint. A mintákat az inokulációt követő 3. héten, a dohány növények csúcsi leveleiből vettük.

5.3.3. RT-PCR

5.3.3.1. cDNS szintézis

Az össznukleinsav kivonatból, mely a vírus RNS-eket is tartalmazta, az antiszensz primer (polyT₂) felhasználásával reverz transzkripció (RT) során állítottuk elő a PVS nukleinsavával komplementer cDNS első szálát.

A 10 µl végtérfogatú reakcióelegy:

össznukleinsav	4 µl
100 µM antiszensz primer (polyT ₂)	1 µl
5X RT puffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3, 25°C-on), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	2 µl
5 mM-os dNTP Mix	1 µl
RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (200 u/µl)	0,5 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 u/µl)	0,25 µl
desztillált víz	1,25 µl

Az össznukleinsavat az antiszensz primer jelenlétében 65 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd az elegyet 5 percen keresztül jégen hűtöttük. Ezt követően adtuk hozzá a reakcióelegy többi komponensét, ezután 30 percen át tartó reverz transzkripció következett 50 °C-on, majd 85 °C-on 5 perc alatt inaktiváltuk az enzimet. A cDNS-t azonnal felhasználtuk, vagy -20 °C-on tároltuk.

5.3.3.2. PCR

A cDNS szintézist követően a vírusgenomot öt átfedő régióban megsokszoroztuk a PCR optimalizálásával, az 1. táblázatban szereplő antiszensz és szensz primerek segítségével. A PCR-t Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 készülékben végeztük.

A PCR-analízis 50 µl végtérfogatú reakcióelegye:

cDNS	3 µl
10x Taq puffert (750 mM Tris-HCl pH: 8,8; 200 mM (NH ₄)SO ₄ ; 0,1 % Tween 20)	5 µl
25 mM-os MgCl ₂	3 µl
5 mM-os dNTP Mix	2 µl
20-20 µM antiszensz és szensz primer	1-1 µl
Taq DNS polimeráz (5 u/µl)	0,5 µl
desztillált víz	34,5 µl

PCR-ek paraméterei:

PVS1 régió:

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),

3. 50 °C 30 másodperc (primer kötődés),
4. 72 °C 2 perc (láncosszabbítás),
5. 72 °C 7 perc (láncosszabbítás).

A 2., 3. és a 4. lépés 30 cikluson keresztül ismétlődik.

PVS2 régió:

A reakció paraméterei:

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),
3. 56 °C 30 másodperc (primer kötődés),
4. 72 °C 2 perc (láncosszabbítás),
5. 72 °C 7 perc (láncosszabbítás).

A 2., 3. és a 4. lépés 30 cikluson keresztül ismétlődik.

PVS3 régió:

A reakció paraméterei:

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),
3. 57 °C 30 másodperc (primer kötődés),
4. 72 °C 2 perc (láncosszabbítás),
5. 72 °C 7 perc (láncosszabbítás).

A 2., 3. és a 4. lépés 30 cikluson keresztül ismétlődik.

PVS4 régió:

A reakció paraméterei:

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),
3. 57 °C 30 másodperc (primer kötődés),
4. 72 °C 2,5 perc (láncosszabbítás),
5. 72 °C 7 perc (láncosszabbítás).

A 2., 3. és a 4. lépés 30 cikluson keresztül ismétlődik.

PVS5 régió:

A reakció paraméterei:

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),
3. 50 °C 30 másodperc (primer kötődés),
4. 72 °C 2 perc (láncosszabbítás),
5. 72 °C 7 perc (láncosszabbítás).

A 2., 3. és a 4. lépés 30 cikluson keresztül ismétlődik.

5.3.4. Gélelektroforézis

A PCR-terméket GelRed nukleinsav festéket tartalmazó 1%-os TBE-agaróz gélben, 1xTBE elektroforézis-puffer (89 mM Tris-HCl; 89 mM bórsav; 2, 5 mM EDTA pH: 8,3) jelenlétében választottuk el, és áteső UV fényben tettük láthatóvá (UVP, BioDoc-It™ System).

5.3.5. A PCR-termékek klónozása

A további vizsgálatok céljából a fragmentumokat High Pure Purification Kittel tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően. A tisztított PCR-terméket ampicillin rezisztencia gént tartalmazó pGEM-T Easy Vektorba kapcsoltuk. A ligálás (az inzert és a plazmid összekapcsolása) négy órán át, szobahőmérsékleten (20-24 °C) történt.

A 10 µl végtérfogatú reakcióelegy:

tisztított PCR-termék	3 µl
pGEM-T Easy Vektor (25 ng/µl)	1 µl
2x ligáz puffert (60 mM Tris-HCl (pH: 7,8); 20 mM MgCl ₂)	5 µl
2,5 u T4 DNS ligáz (2,5 u/ µl)	1 µl

A ligálást követően a rekombináns plazmidot *E. coli* DH5α, vagy JM 109-es kompetens sejtekbe juttattuk (transzformálás). A kompetens sejtek előállítását és a hősokkos transzformálást Sambrook és munkatársai (1989) által kidolgozott módszer szerint végeztük. A 10 µl ligátumot 50 µl, 10 percig jégen kiolvasztott kompetens baktérium-szuszpenzióval elegyítettük, majd 20 percen keresztül jégen tartottuk. Ezután 1 percen keresztül 42 °C-os száraz blokkos termosztátban inkubáltuk, majd 2 percig jégre helyeztük, utána 300 µl antibiotikum-mentes, folyékony LB táptalaj (10 g/l tripton; 5 g/l élesztőkivonat; 10 g/l NaCl; pH: 7.2) hozzáadását követően 1 órán keresztül ráztuk, 37 °C-on, 200 rpm fordulatszámmal. Ezt követően 100 µl-nyi szuszpenziót ampicillin

tartalmú szilárd LB/IPTG+X-Gal táptalajon szélesztettünk (10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat; 10 g/l NaCl; 10 g/l agar; 50 µg/ml ampicillin; szélesztés előtt a lemez felszínén 10 µl (100 mM/ml) IPTG-t és 40 µl (20 mg/ml) X-Galt oszlattunk szét).

A kész lemezeket egy éjszakán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk. A táptalajon csak azok a baktérium sejtek tudtak felszaporodni, melyek ampicillin rezisztencia gént hordoztak. A ligálás sikerességét kék-fehér szelekcióval ellenőriztük. Azok a baktérium kolóniák, melyekben az inzert beépülése megtörtént és így a plazmidban lévő enzim működésképtelenné vált, fehér színűek lettek, míg azok, amelyekben az inzert nem épült be a plazmidba, kék színűek voltak. Ezek után steril fogpiszkáló segítségével, minden lemezről 4-6 db fehér színű telepet oltottunk le. A fogpiszkálóval egy kolóniát leemeltünk, amit egy masterplate-hez érintettünk, majd 2 ml 50 µl/ml ampicillin tartalmú, folyékony LB táptalajt tartalmazó üvegcsőbe tettünk. A lezárt üvegcsövet egy éjszakán át, 37 °C-on ráztunk, 200 rpm fordulatszámmal. Az eredeti kolóniák felszaporítását szolgáló masterplate-et egy éjszakán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk.

5.3.6. A plazmid tisztítása és az inzert ellenőrzése

A sikeres ligálás ellenőrzéséhez a plazmidot Sambrook és munkatársai (1989) által kidolgozott módszer szerint izoláltuk: a baktérium sejt kultúrákat az egész éjszakán keresztül tartó, 37 °C-on történő rázatást követően Eppendorf csőbe töltöttük, és 3 perces (szobahőmérsékleten, 13 400 rpm fordulatszámon) centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottuk. A pellethez, ami a baktériumsejteket tartalmazza 200 µl „A” oldatot (sejt szuszpendáló oldat: 15 mM Tris-HCl pH: 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM glükóz) adtunk, és 5 percig állni hagytuk. A továbbiakban 400 µl „B” oldatot (sejt lízáló oldat: 0,2 M NaOH, 1% SDS) adtunk az elegyhez, és kézi rázás útján biztosítottuk az elegy homogenitását. A következő lépésként 300 µl „C” oldatot (semlegesítő oldat: 3 M nátrium-acetát; 11,5% ecetsav) adtunk az Eppendorf cső tartalmához, és kézi rázást követően 5 percen keresztül jégen hagytuk, majd 5 perces centrifugálással távolítottuk el a felesleges sejtalkotókat. A centrifugálást követően a felülúszót egy tiszta Eppendorf csőbe helyeztük, majd 5 perces centrifugálás következett. A felülúszót egy tiszta csőbe öntöttük, majd 600 µl izopropanolt adtunk az elegyhez, kézi rázással biztosítottuk a DNS kicsapódását, majd újabb 5 perces centrifugálás következett. A felülúszó elöntése után 200 µl „D” oldatot (0,1 M nátrium-acetát pH: 7,0; 50 mM Tris-HCl pH: 8,0) adtunk a pellethez, majd 5 percig állni hagytuk. A kézi rázást követően 400 µl abszolút etanol hozzáadásával ismételten biztosítottuk a nukleinsavak kicsapódását. Újabb 5 perces centrifugálás következett, majd a felülúszót elöntöttük, a pelletet pedig 15 percig vákuum koncentrátorban szárítottuk. A szárítást követően a pelletet 25 µl RNáz TE-ben (10 mM Tris pH: 7,6; 1 mM EDTA; 10 µl (10 mg/ml) RN-áz) oldottuk vissza.

Az inzert beépülésének sikerességét FastDigest *EcoRI* (10 perc, 37 °C inkubálás) enzimmel történő hasítást követően 1%-os TBE agaróz gélen való futtatással ellenőriztük.

5.3.7. Klónok tisztítása szekvenálásra

A szekvenálásra kiválasztott klónokat a masterplate-ről, 3x2 ml 50 µl/ml ampicillin tartalmú, folyékony LB táptalajt tartalmazó üvegcsőbe tettük. A lezárt üvegcsövet egy éjszakán át, 37 °C-on rázattuk, 200 rpm fordulatszámmal. Szekvencia meghatározáshoz a plazmidot Quantum Prep Plasmid Miniprep Kittel a gyártó utasításainak megfelelően izoláltuk. A tisztított plazmidok koncentrációját NanoDrop 2000c spektrofotométerrel mértük. A tisztított klónokat, Szegeden BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetben szekvenáltattuk.

Vizsgálataink során az NCBI-ban megtalálható összes PVS köpenyfehérje szekvenciát felhasználtuk (3. táblázat) a szekvenanciaanalízishez.

3. táblázat: A köpenyfehérje szekvenanciaanalízishez felhasznált izolátumok.

NCBI azonosító	Izolátum	Származási hely	Vírustörzs	Publikálta
GU369814	-	India	PVS ⁰	Nem publikált
GU144328	Sam-13	Skócia, UK	PVS ⁰	Foster és Mills, 1992
DQ786653	-	India	PVS ⁰	Nem publikált
GU256061	Indian	India	PVS ⁰	Nem publikált
HQ875135	HAM.KA.20	Irán	PVS ⁰	Salari és mtsai., 2011
HQ875133	ESF.FA.19	Irán	PVS ⁰	Salari és mtsai., 2011
AB364945	3-5 ^f	SzírIA	PVS ⁰	Chikh Ali és mtsai., 2008
HQ875132	AZA.TA.6	Irán	PVS ⁰	Salari és mtsai., 2011
HQ875140	KER.SA.28	Irán	PVS ⁰	Salari és mtsai., 2011
HQ875137	KER.JL.6	Irán	PVS ⁰	Salari és mtsai., 2011
GU319951	Dutch ^b	Hollandia	PVS ⁰	Dolby és Jones, 1987
GU233455	-	Ny-Ausztrália	PVS ⁰	Cox és mtsai., 2010
GU319946	WAKip1 ^c	Ny-Ausztrália	PVS ⁰	Cox és mtsai., 2010
GU319948	WAMd	Ny-Ausztrália	PVS ⁰	Cox és mtsai., 2010
GU319945	WAFL	Ny-Ausztrália	PVS ⁰	Cox és mtsai., 2010
GU319943	WADel1 ^c	Ny-Ausztrália	PVS ⁰	Cox és mtsai., 2010
GU319942	TAS05-09 ^c	Tasmania	PVS ⁰	Cox és mtsai.,

				2010
GU233454	-	Ausztrália	PVS ⁰	Cox és mtsai., 2010
GU319949	WAPC ^c	Ny-Ausztrália	PVS ⁰	Cox és mtsai., 2010
AJ889246	Hangzhou	Kína	PVS ⁰	Nem publikált
GU319944	WADel2	Ny-Ausztrália	PVS ⁰	Cox és mtsai., 2010
HQ875136	KER.JI.4	Irán	PVS ⁰	Salari és mtsai., 2011
HQ856834	KHO.FA.2	Irán	PVS ⁰	Salari és mtsai., 2011
HQ875141	KHO.CH.3	Irán	PVS ⁰	Salari és mtsai., 2011
AF493950	Ordinary (BoonO) ^f	-	PVS ⁰	Boonham és mtsai., 2003
GU319952	Exodus ^b	Hollandia	PVS ⁰	Dolby és Jones, 1987
AY512653	-	Kína	PVS ⁰	Nem publikált
Y15611	KACP1N ^f	Csehország	PVS ⁰	Matousek és mtsai., 2000
GU319953	Code 24 ^b	Hollandia/Németország	PVS ⁰	Dolby és Jones, 1987; Foster és mtsai., 1990
Y15610	VLCP2N ^f	Csehország	PVS ⁰	Matousek és mtsai., 2000
Y15609	VLCP1N ^f	Csehország	PVS ⁰	Matousek és mtsai., 2000
Y15616	VLCP2 ^f	Csehország	PVS ⁰	Matousek és mtsai., 2000
Y15615	Aschersleben	Németország	PVS ⁰	Matousek és mtsai., 2000
Y15613	ASCP12 ^f	Németország	PVS ⁰	Matousek és mtsai., 2000
Aj863509cp	Leona	Németország	PVS ⁰	Matousek és mtsai., 2000
HQ875139	KER.LA.15	Irán	PVS ⁰	Salari és mtsai., 2011
AY687337	-	Kína	PVS ⁰	Nem publikált
Y15612	KACP2N ^f	Csehország	PVS ⁰	Matousek és mtsai., 2000
HQ875138	KER.LA.12	Irán	PVS ⁰	Salari és mtsai., 2011
Y15625	Kobra ^f	Csehország	PVS ⁰	Matousek és mtsai., 2000
FJ813513cp	Id4106-US	USA	PVS ⁰	Lin és mtsai., 2009
AB364946	6-2 ^f	SzírIA	PVS ⁰	Chikh Ali és mtsai., 2008
FJ813514	IdDef-US	USA	PVS ⁰	Lin és mtsai., 2009
FJ813512cp	WaDef-US	USA	PVS ⁰	Lin és mtsai., 2009
PVU74375	-	Dél-Korea	PVS ⁰	Nem publikált
GU319947	WAKip2	Ny-Ausztrália	PVS ⁰	Cox és mtsai., 2010

GU233453	QLDKip ^c	Ausztrália	PVS ^O	Cox és mtsai., 2010
GU319954	TAS1 ^c	Tasmánia	PVS ^O	Cox és mtsai., 2010
GU319950	TASPF ^c	Tasmánia	PVS ^O	Cox és mtsai., 2010
GU144323	137	Nagy-Britannia	PVS ^O	Nem publikált
GU144325	139	Nagy-Britannia	PVS ^O	Nem publikált
GU144322	136	Nagy-Britannia	PVS ^O	Nem publikált
GU144327	144	Nagy-Britannia	PVS ^O	Nem publikált
GU144326	143	Nagy-Britannia	PVS ^O	Nem publikált
GU144324	138	Nagy-Britannia	PVS ^O	Nem publikált
HQ875142	KER.SO.21	Irán	PVS ^O	Salari és mtsai., 2011
GU144330	Sam-24	Nagy-Britannia	PVS ^O	Nem publikált
DQ315387	Hebei	Kína	PVS ^O	Nem publikált
GU144329	Sam-23	Nagy-Britannia	PVS ^O	Nem publikált
HQ875134	FA.SI.14	Irán	PVS ^O	Salari és mtsai., 2011
PVU74376	-	Dél-Korea	PVS ^O	Nem publikált
EF397748	Ar-43	Irán	PVS ^O	Nem publikált
EF397751	Ha-107	Irán	PVS ^O	Nem publikált
EF397752	Kh-55	Irán	PVS ^O	Nem publikált
EF397750	Kh-55	Irán	PVS ^O	Nem publikált
S45593	Orion ^f	Nagy-Britannia	PVS ^O	Foster és Mills, 1992
Y15614	KBCP2 ^{c,f}	Csehország	PVS ^O	Matousek és mtsai., 2000
AJ863510cp	Vltava	Csehország	PVS ^A	Matousek és mtsai., 2005
D00461.1	-	Kanada	PVS ^A	Mackenzie és mtsai., 1989
FJ643622	Andean (India) ^g	India	PVS ^A	Nem publikált
AF493951	-	Nagy-Britannia	PVS ^A	Boonham és mtsai., 2003

5.3.8. A szekvenciaanalízishez felhasznált programok

A szekvenciák páronkénti összehasonlításához az EMBOSS Needle, Pairwise Sequence Alignment-et használtuk. A szekvenciák összeillesztéséhez és elemzéséhez a CLC DNA Workbench 6.6 (CLC Bio, Cambridge, MA; Knudsen és mtsai.) és a MEGA 5.1 (Tamura és mtsai., 2011) software csomagokat használtuk. A Maximum likelihood, UPGMA (Unweighted Pair Group Method) analíziseket használtuk a filogenetikai törzsfák készítésekor. A rekombinációs vizsgálatokhoz az RDP3 (Martin és mtsai., 2010) és a TOPALI v2 (Milne és mtsai., 2004) program csomag PDM (Probabilistic Divergence Measures) alkalmaztuk (ablak méret=200 nt, ablak elmozdulásának mérete=10 nt), 95%-os szignifikancia szinten.

6. Eredmények és következtetések

6.1. A magyar PVS izolátum jellemzői

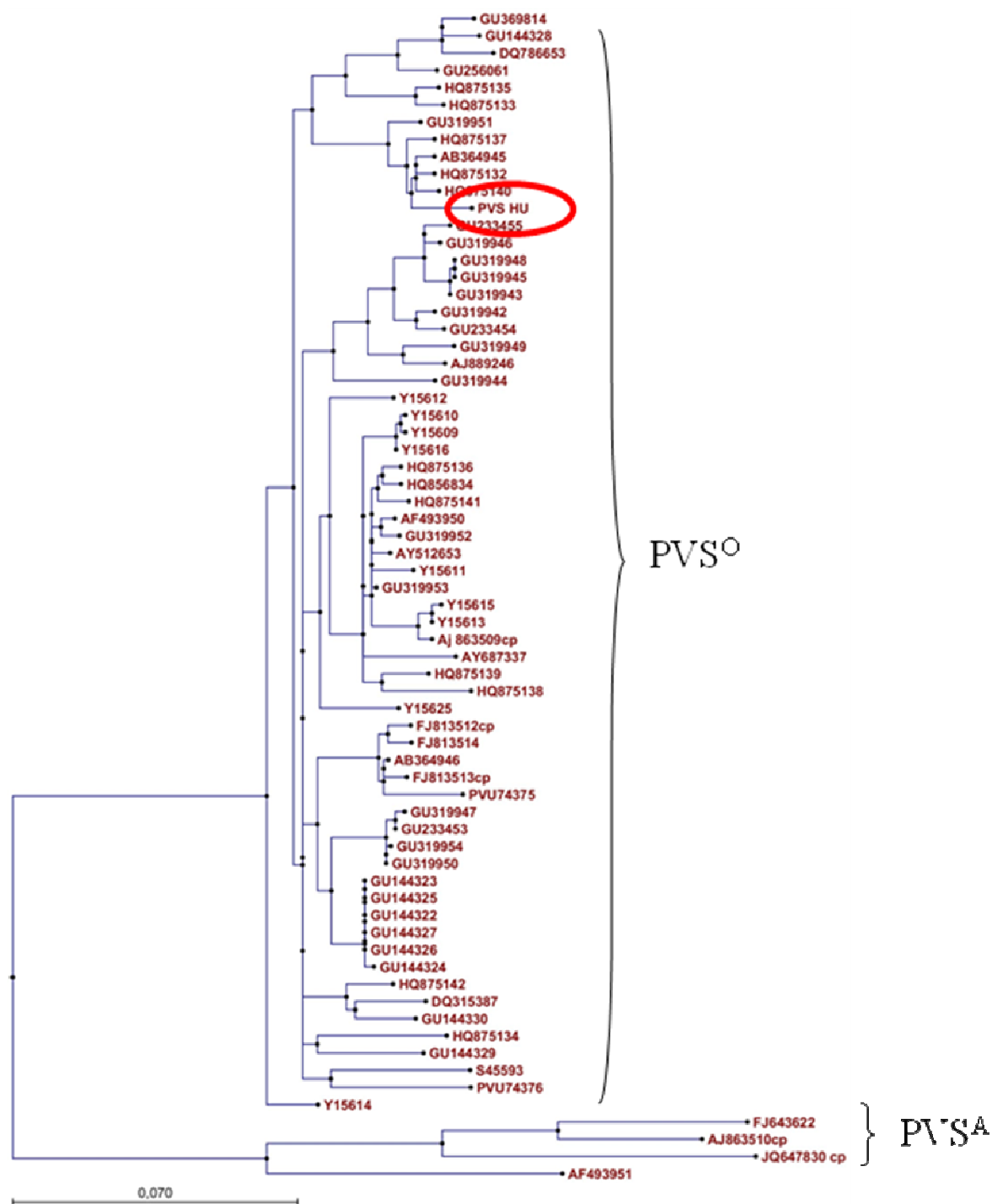
A vizsgált magyar PVS izolátum (PVS HU) 8485 nukleotid hosszúságú és 6 ORF-et tartalmaz, amely az NCBI-ban megtalálható PVS izolátumok felépítésének megfelel.

Gén	Elhelyezkedése a genomon
5' UTR	1-62
ORF1	63-5987
ORF2	5977-6715
ORF3	6686-7009
ORF4	6976-7173
ORF5	7226-8098
ORF6	8099-8380
3' UTR	8381-8485

A teljes szekvenciát (1. melléklet) a nemzetközi adatbázisba elküldtük, feldolgozása és az azonosító szám megérkezése folyamatban van.

6.2. Teljes köpenyfehérje-szekvencia vizsgálat

A nemzetközi adatbázisban megtalálható összes komplett PVS köpenyfehérje gén szekvenciájára elkészítettük a filogenetikai törzsfát, és összehasonlítottuk a magyar izolátummal. Megállapítottuk, hogy a magyar izolátum a PVS^O törzsbe tartozik. A köpenyfehérje régió vizsgálatakor a PVS HU egy szíriai és két iráni izolátummal mutatja a legközelebbi rokonságot (4. ábra), ezek alapján Salari és munkatársai (2011) által leírt tizenöt PVS^O genotípus csoport közül a PVS^O-1-be sorolhatjuk izolátumunkat.



4. ábra: Az NCBI adatbázisban található komplett köpenyfehérje nukleotid szekvenciák filogenetikai törzsfája. A törzsfá Maximum likelihood módszerrel készült.

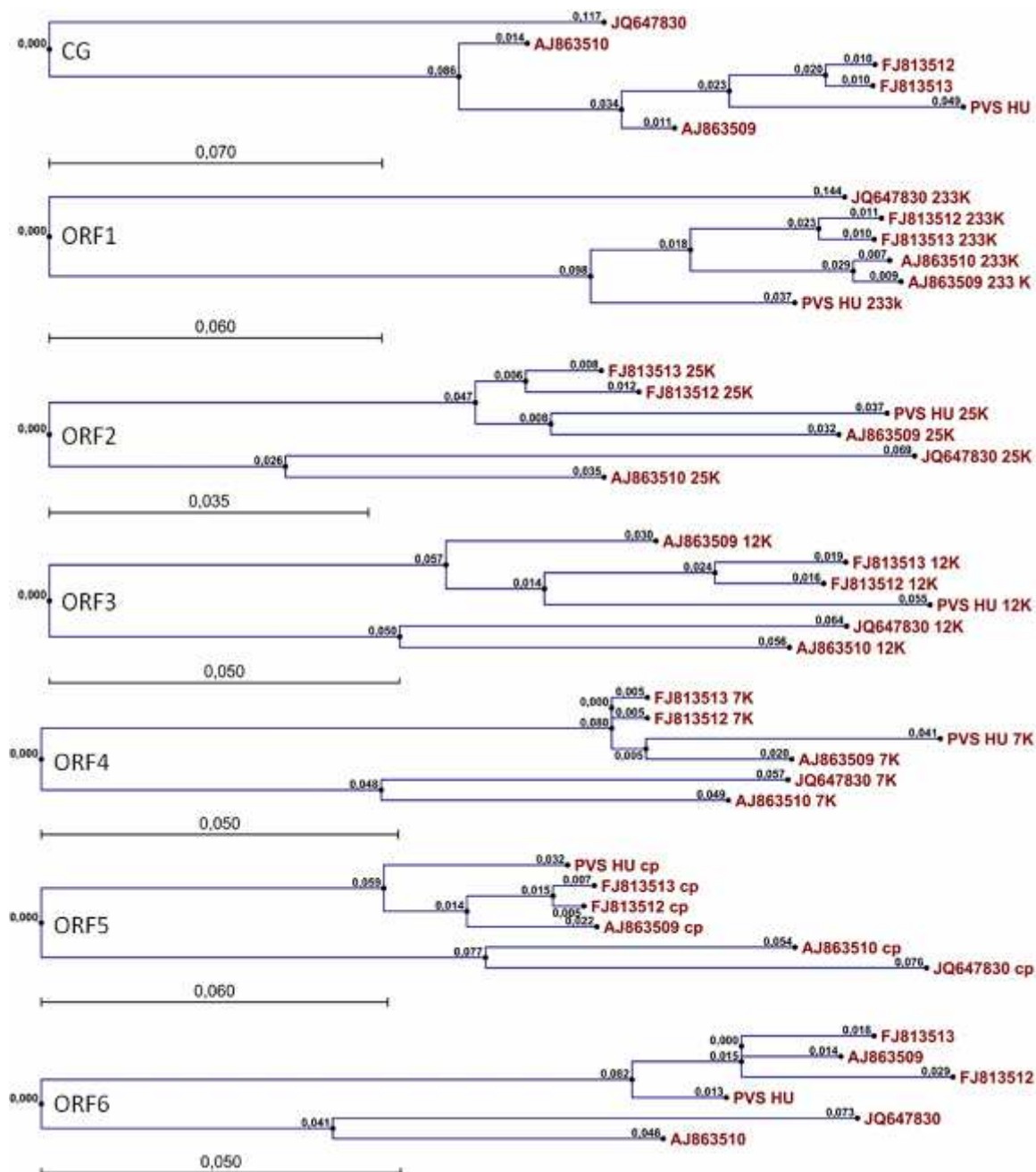
6.3. Teljes genomszekvencia vizsgálat

A nemzetközi adatbázisban megtalálható teljes PVS genomokat vizsgálva a magyar izolátum a többitől jól elkülönülten, de a legközelebbi rokonságban két amerikai izolátummal áll. Izolátumunk 92,63%, ill. 92,74%-os homológiát mutat az előbb említett 2 szekvenciával, egyben ezek állnak filogenetikailag legközelebb a magyar izolátumhoz. A további eredmények: 92,31%-os

homológia a német izolátummal, 89,39%-os homológia a cseh izolátummal és mindössze csak 78,61%-os homológia a brazil izolátummal, ami 1828 nukleotid különbséget jelent a teljes genom összehasonlítását tekintve. A két amerikai izolátum egymással 97,99%-os homológiát mutat (5. ábra).

A PVS HU izolátum a nem kódoló és kódoló részek részletes vizsgálata alapján is jól elkülönül más izolátumoktól. Nukleotid szinten az 5' UTR-t tekintve 95% fölötti homológiát mutat az európai és az észak-amerikai izolátumokkal, és csak 91,95%-os homológiát a brazillal. Az ORF1-et tekintve rendkívül alacsony (76,9%) a homológia a brazil izolátummal, míg az európai és észak-amerikai izolátumokkal 90% körüli. Az ORF2 régióban a magyar izolátum az európai izolátumok közül már csak a Leona-val mutat 90% fölötti hasonlóságot. Az ORF3-tól az ORF6-ig a PVS HU a Vltava izolátummal is csak a brazil izolátumhoz hasonló alacsony szintű egyezés figyelhető meg, ami rekombinációs eseményre enged következtetni (4. táblázat).

A de Sousa Geraldino Duarte és munkatársai (2012) által megfigyelt konzervatív aminosav motívumok a magyar izolátumban megegyeznek a PVS^O izolátumokban fellelhetőekkel, azaz az ORF3-ban H₇₃A₇₆P₉₇ és az ORF6-ban D₄E₂₃V₂₆N₂₇A₄₅I₆₅Q₈₆.



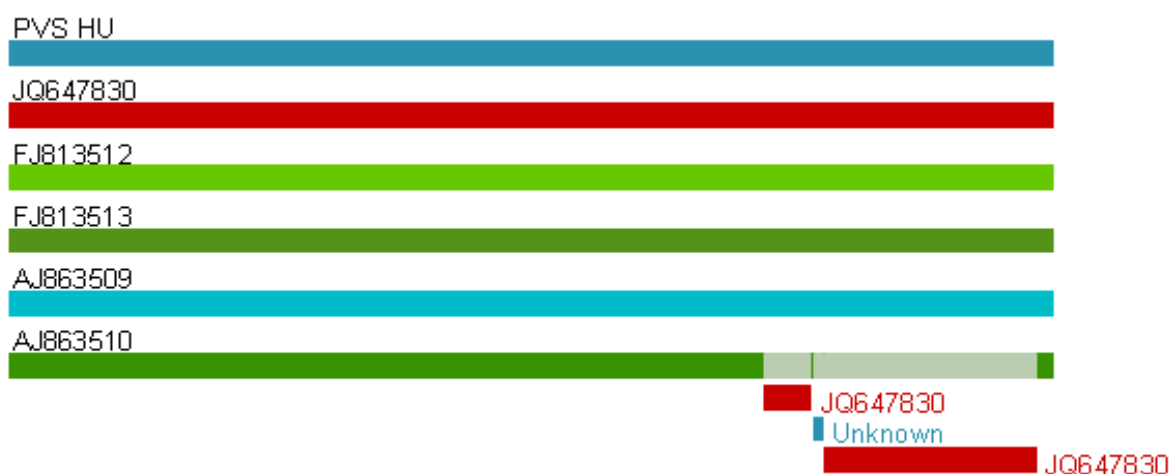
5. ábra: Filogenetikai törzsfák a komplett nukleotid szekvenciák vizsgálatával (CG=komplett genom, ORF1-ORF6). A törzsfa UPGMA módszerrel készült. PVS HU: magyar izolátum; JQ64783: brazil izolátum; FJ813512: amerikai izolátum (A); FJ813513: amerikai izolátum (B); AJ863509: német izolátum; AJ863510: cseh izolátum.

4. táblázat: A PVS HU izolátum összehasonlítása az NCBI adatbázisban található komplett PVS szekvenciákkal. [Az izolátumok kódoló és nem kódoló régióinak nukleinsav (nt) és aminosav (aa) szintű szekvenciáinak hasonlóság értékei %-ban találhatók a táblázatban.]

Izolátum	Genom mérete	CG	5'UTR	ORF1		ORF2		ORF3		ORF4		ORF5		ORF6		3'UTR
	nt	nt	nt	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt
FJ813512	8485	92,74	96,8	92,1	94,2	94,4	95,9	91,1	97,2	95,0	97,0	93,8	95,9	94,4	93,6	99,0
FJ813513	8485	92,63	96,8	91,9	94,3	94,5	97,1	90,8	97,2	93,5	95,5	93,7	96,3	95,4	94,7	99,0
AJ863509	8478	92,31	95,2	91,5	92,8	93,6	97,1	91,4	96,3	94,0	97,0	93,4	96,3	96,5	97,9	99,0
AJ863510	8464	89,39	95,2	91,7	90,3	87,0	94,7	82,3	94,4	82,1	82,1	81,0	93,5	82,8	81,9	94,1
JQ647830	8485	78,61	91,9	76,9	84,3	84,7	94,2	82,3	96,5	81,8	89,4	79,8	93,2	82,3	86,2	92,2

6.4. Rekombinációs vizsgálatok

A rekombinációs vizsgálatot az NCBI-ban megtalálható komplett genomokkal elvégeztük. Az RDP egyszerre kilenc különböző algoritmust futtat (RDP, GENECONV, Boot Scan, MaxChi, Chimaera, SiScan, Phylpro, LARD, 533Seq), melyek közül mind más paraméterre fekteti a hangsúlyt. A programot napjainkban leginkább HIV (*Human immunodeficiency virus*) rekombinációs változatok kutatására használják, azonban tapasztalataink szerint a potyvírusok ilyen típusú vizsgálatához is kiválóan alkalmazható. A PVS-sel kapcsolatos vizsgálataink eltérő eredményeket mutattak a rekombinációs esemény tekintetében. Abban az esetben, amikor mind az öt NCBI-ban található teljes szekvenciát felhasználtuk a rekombinációs vizsgálatokhoz, az analízis eredménye megegyezett de Sousa Geraldino Duarte és munkatársai által leírt eredményekkel, miszerint a cseh izolátum rekombináns, és a rekombinációjában a brazil izolátum vesz részt (de Sousa Geraldino Duarte és mtsai., 2012). A rekombináldott régió a brazil izolátum köpenyfehérje régiójából származik, ami a levéltetvekkel történő átvitelért felelős (6. ábra).



6. ábra: Rekombinációs vizsgálatok, PVS HU (PVS) izolátummal, RDP3 program csomaggal az összes NCBI-ban található komplett PVS szekvenciára. PVS HU: magyar izolátum; JQ64783: brazil izolátum; FJ813512: amerikai izolátum (A); FJ813513: amerikai izolátum (B); AJ863509: német izolátum; AJ863510: cseh izolátum.

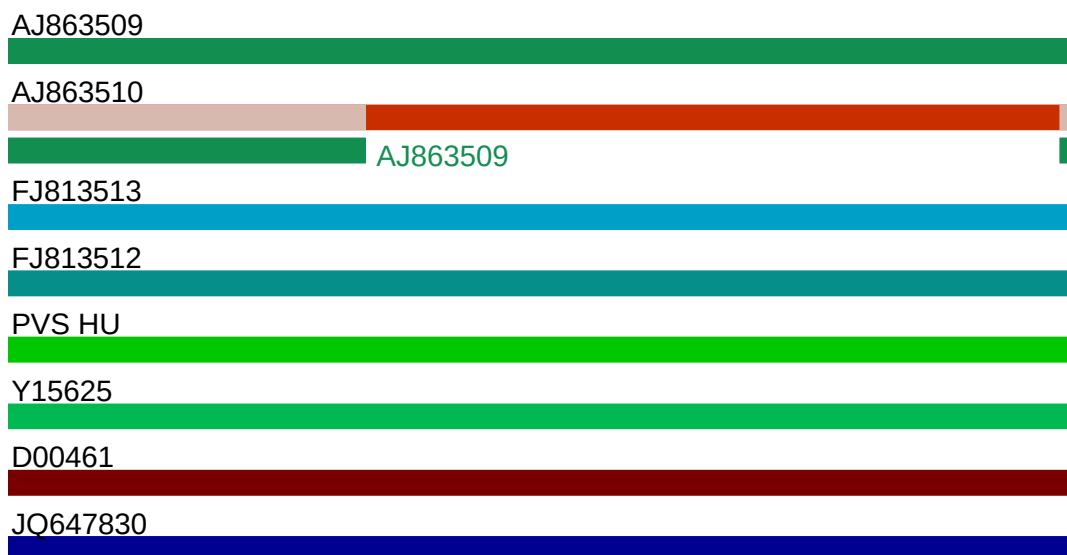
Amikor vizsgálatunkhoz a brazil izolátumot nem használtuk fel, akkor a magyar izolátum részt vett a Leona (német) és a Vltava (cseh) ORF1 régiójának rekombinációjában. A német izolátum töréspontja a 1204-1313 nukleotid pozíció között található. A major szülői rész az egyik amerikai izolátum (FJ813512) (94,1%), a minor szülői rész a PVS HU izolátum (93,6%). A cseh izolátum rekombinációjában a töréspont a 1114-1313 bázis között helyezkedik el (amerikai

izolátum (FJ813512) major szülői rész: 93,7%, PVS HU minor szülői rész: 94%). Ebben a vizsgálatban kimutatható még további két töréspont. Az egyik közvetlenül a szekvencia elején, 1-63-ig, a másik a 6146-os pozíciótól a szekvencia legvégéig helyezkedik el, ebben az eseményben a szekvencia eredetét ismeretlen eredetűnek jellemezhetjük. A szekvencia legelején elhelyezkedő rekombináldott régió nagysága az 5' UTR régió nagyságának felel meg. (7. ábra).



7. ábra: Rekombinációs vizsgálatok, PVS HU izolátummal, RDP3 program csomaggal az adatbázisban található komplett szekvenciák felhasználásával a brazil szekvencia kivételével. PVS HU: magyar izolátum; FJ813512: amerikai izolátum (A); FJ813513: amerikai izolátum (B); AJ863509: német izolátum; AJ863510: cseh izolátum.

Elvégeztük a rekombinációs vizsgálatot a Y15625 (cseh) és a D00461 (kanadai) szekvencia darabokkal kiegészítve is. Ebben a vizsgálatban nem a teljes genommal, hanem csak a genomnak egy darabjával végeztük a vizsgálatokat. Az analízis során ugyanazt az eredményt kaptuk, mint de Sousa Geraldino Duarte és munkatársai (2012). Viszont a cseh izolátumban a 8389. nukleotidtól a szekvencia legvégéig még egy töréspont található, ahol szintén a német izolátum a minor szülői rész (99%) és a kanadai a major szülői rész (100%). Ebben az esetben a PVS HU nem vesz részt a rekombinációban (8. ábra). A rekombinációs analízisben a nukleotid pozíciók a PVS HU szerint értendők.



8. ábra: Rekombinációs vizsgálatok, PVS HU izolátummal, RDP3 program csomaggal az adatbázisban található komplett szekvenciák és a Y15625, D00461 izolátumok szekvencia analízise. AJ863509: német izolátum; AJ863510: cseh izolátum; FJ813513: amerikai izolátum (B); FJ813512: amerikai izolátum (A); PVS HU: magyar izolátum; Y15625: cseh (Kobra) izolátum; D00461: kanadai izolátum; JQ647830: brazil izolátum.

7. Összefoglalás

Magyarországon a burgonya S vírus (*Potato virus S*, PVS) viszonylag kevésbé kutatott kórokozó és nem állnak rendelkezésre a víusról hazai szekvencia adatok sem. Célul tűztük ki egy magyarországi vírusizolátum genetikai állományának klónozását, teljes nukleinsav szekvenciájának meghatározását és közzétételét a nemzetközi adatbázisban. A hazai izolátum nukleotid szekvenciáját összehasonlítottuk a nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal és elkészítettük a rokonsági kapcsolatokat tükröző filogenetikai törzsfákat, valamint a rekombinációs vizsgálatokat. A magyar PVS izolátum szekvenciájának közzététele az NCBI-ban folyamatban van.

A magyar burgonya S vírus izolátum (PVS HU) 8485 bp hosszúságú és 6 ORF-et tartalmaz. A PVS^O törzsbe, azon belül a PVS^O-1 genotípus csoportba tartozik. A teljes genomot vizsgálva a legközelebbi rokonságot két amerikai izolátummal mutatja. Izolátumunk 92,63% ill. 92,74%-os homológiát mutat az előbb említett két izolátum szekvenciáival, egyben ezek voltak filogenetikailag legközelebb a magyar izolátumhoz. A PVS HU 92,31%-os homológiát mutat a Leona izolátummal, 89,39%-os homológiát a Vltava izolátummal és mindössze csak 78,61%-ot a brazil izolátummal, ami 1828 nukleotid különbséget jelent a teljes genom összehasonlítását tekintve. Nukleotid szinten, az 5' UTR-t tekintve a homológia 95% fölötti az európai és az észak-amerikai izolátumokkal, és csak 91,95%-ot a brazillal. Az ORF1-et tekintve rendkívül alacsony (76,9%) a homológia a brazil izolátummal, míg az európai és észak-amerikai izolátumokkal 90% körüli. Az ORF2 régióban a magyar izolátum az európai izolátumok közül már csak a Leona-val mutat 90% fölötti hasonlóságot, és az ORF3-tól az ORF6-ig a Vltava-val is csak a brazil izolátumhoz hasonlóan alacsony szintű az egyezés, ami rekombinációs eseményre enged következtetni.

A rekombinációs vizsgálatot elvégeztük az NCBI-ban megtalálható komplett genomokkal. A vizsgálatok során eltérő eredményeket kaptunk a rekombinációs esemény tekintetében. Abban az esetben, amikor a brazil izolátumot nem használtuk fel az analízishez, akkor a magyar izolátum részt vesz a Leona és a Vltava izolátum ORF1 régiójának rekombinációjában. A rekombinációs forró pontok ismerete nem csak a vírus evolúciója miatt fontos, hanem a vírus megbízható diagnosztizálása szempontjából is.

További vizsgálatok elvégzését tervezzük a rekombinációs eredmények kibővítése céljából. Terveink között szerepel újabb magyar PVS izolátumok teljes nukleotid szekvenciájának meghatározása, és több PVS izolátum szekvenciájának részleges meghatározása is.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek, Pájtli Évának, a Növénykórtani tanszék tudományos segédmunkatársának, aki a kísérletek során rengeteg szakmai segítséget nyújtott, tanácsaival, észrevételeivel segítette dolgozatom megírását.

Külön köszönettel tartozom dr. Palkovics Lászlónak, a Növénykórtani Tanszék tanszékvezetőjének, aki lehetővé tette, hogy bekapcsolódjak a tanszéken folyó kísérletekbe, mindvégig figyelemmel kísérve segítette és irányította munkámat, és kritikai észrevételeivel hozzájárult dolgozatom elkészüléséhez.

Szeretném megköszönni a Pannon Egyetem, Burgonyakutatói Központ munkatársainak, hogy rendelkezésünkre bocsátották a kísérlet alapját képező izolátumot.

Továbbá szeretném megköszönni a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar, Növénykórtani Tanszék valamennyi munkatársának szakmai tanácsait, munkám során a segítségüket.

A projekt megvalósítását az NKTN-TECH-09-A3-2009-0210, a TÁMOP- 4.2.1./B-09/1-KMR-2010-0005 és a TÁMOP- 4.2.2./B-10/1-2010-0023 pályázatok támogatták.

9. Irodalomjegyzék

1. Adams M. J., Antoniw J. F., Bar-Joseph M., Brunt A. A., Candresse T., Foster G. D., Martelli G. P., Milne R. G., Fauquet C. M. (2004). The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*. 149: 1045-1060.
2. Ábrahám É. B. (2009). Fajta és öntözés hatása a burgonya termésmennyiségének és minőségének alakulására mezőszégi talajon. Doktori értekezés. Debrecen. 6-10, 34-38.
3. Badge, J., Brunt A., Carson R., Dagless E., Karamagiogli M., Philips S., Seal S., Turner R., Foster G. D. (1996). A carlavirus-specific PCR primer and partial nucleotide sequence provides further evidence for the recognition of *Cowpea mild mottle virus* as a whitefly transmitted carlavirus. *European Journal of Plant Pathology*. 102: 305-310.
4. Boonham N., Walsh K., Smith P., Madagan K., Graham I., Barker I. (2003). Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *Journal of Virological Methods*. 108: 181-187.
5. Boonham N., Walsh K., Preston-Bonnet J., Fraile A., Sacristan S., Malpica J. M., Garcia-Arenal F. (2005). Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus. *Virology*. 332: 359-368.
6. Carstens E. B. (2009). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*. 155: 133-146.
7. Chare E. R., Holmes E. C. (2005). A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Archives of Virology*. 151: 933-946.
8. Chiba M., Reed J. C., Prokhnevsky A. I., Chapman E. J., Mawassi M., Koonin E. V., Carrington J. C., Dolja V. V. (2006). Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology*. 346: 7-14.
9. Chikh Ali M., Maoka T., Natsuaki K. T. (2008). The occurrence of potato viruses in Syria and the molecular detection and characterization of Syrian *Potato virus S* isolates. *Potato Research*. 51: 151-161.
10. Cox B. A., Jones R. A. C. (2010). Genetic variability in the coat protein gene of *Potato Virus S* isolates and distinguishing its biologically distinct strains. *Archives of Virology*. 155: 1163-1169.
11. de Bruyn Oubuter M. P. (1952). A new potato virus. *Proceedings of the Conference on Potato Virus Diseases, Wageningen-Lisse 1951*, 83-84.

12. de Sousa Geraldino Duarte P., Galvino-Costa S. B. F., Figueira A. R., Paula Riberio S. R. R. (2012). Complete genome sequence of the first Andean strain of *Potato virus S* from Brazil and evidence of recombination between PVS strains. *Archives of Virology*. 157: 1357-1364.
13. Djilani-Khouadja F., Tribodet M., Kerlan C., Fakhfakh H. (2010). Incidence of potato viruses and characterization of *Potato virus Y* variability in late season planted potato crops in Northern Tunisia. *European Journal of Plant Pathology*. 126: 479-488.
14. Dolby C. A., Jones R. A. C. (1987). Occurrence of the Andean strain of *potato virus S* in imported potato material and its effects on potato cultivars. *Plant Pathology*. 36: 381-388.
15. Dolby C. A., Jones R. A. C. (1988). The relationship between the Andean strain of *Potato virus S* and *Pepino latent virus*. *Annals of Applied Biology*. 112: 231-234.
16. Drake J. W., Holland J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 96: 13910-13913.
17. Elena S. F., Moya A. (1999). Rate of deleterious mutation and the distribution of its effects on fitness in *Vesicular stomatitis virus*. *Journal of Evolutionary Biology*. 12: 1078-1088.
18. Fletcher J. D. (1996). *Potato virus S*^A - characteristics of an isolate from New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 24: 335-339.
19. Foster G. D., Meehan B. M., Mills P. R. (1990). A comparison of the nucleotide sequence homologies between isolates of the Andean and ordinary strains of *Potato virus S* and their relationship to other carlaviruses. *Virus Genes*. 4: 257-360.
20. Foster G. D. (1991). Molecular variation between ordinary and Andean strains of *Potato virus S*. *Research Virology*. 142: 413-416.
21. Foster G. D., Mills P. R. (1992). The 3'-nucleotide sequence of an ordinary strain of *Potato virus S*. *Virus Genes*. 6: 213-220.
22. Fraile A., Alonso-Prados J. L., Aranda M. A., Bernal J. J., Malpica J. M., Garcia-Arenal F. (1997). Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of tripartite RNA plant virus. *Journal of Virology*. 71: 934-940.
23. Galvino-Costa S. B. F., Figueira A. R., Camargos V. V., Geraldino P. S., Hub X. J., Nikolaeva O. V., Kerlan C., Karasev A. V. (2011). A novel type of *Potato virus Y* recombinant genome, determined for the genetic strain PVY^E. *Plant Pathology*. 61: 388-398.
24. Gibbs M. (1995). The luteovirus supergroup: rampant recombination and persistent partnerships. In: Gibbs A.J., Calisher C. H., Garcia-Arenal F. (eds). *Molecular basis of virus evolution*. Cambridge University Press, Cambridge. 351-368.
25. Goldbach R. W. (1986). Molecular evolution of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 24: 289-310.

26. Gramstatt A., Courtpozanis A., Rohde W. (1990). The 12 kDa protein of *Potato virus M* displays properties of a nucleic acid-binding regulatory protein. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 276: 34-38.
27. Hinostroza-Orihuela A. M. (1973). Some properties of *Potato virus S* isolated from Peruvian potato varieties. *Potato Research*. 16: 244-250.
28. Hiruki C. (1975). Factors affecting bioassay of *Potato Virus S* in *Chenopodium quinoa*. *Phytopathology* 65:1288-1292.
29. Horváth, J. (1972): Symptomless *Lycopersicon* host plants for *Potato virus S*. *American Potato Journal*. 49: 339-342.
30. Horváth J. (2009). Burgonyakutatás Magyarországon nemzetközi kitekintéssel: múlt, jelen, jövő. *Növénytermelés*. 58: 135-183.
31. Ju H. J., Samuels T. D., Wang Y. S., Blancaflor E., Payton M., Mitra R., Krishnamurthy K., Nelson R. S., Verchot-Lubicz J. (2005). The *Potato virus X* TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiology*. 138: 1877-1895.
32. Knudsen B., Knudsen T., Flensburg M., Sandmann H., Heltzen M., Andersen A., Dickenson M., Bardram J., Steffensen P. J., Mønsted S., Lauritzen T., Forsberg R., Thanbichler A., Bendtsen J. D., Görlitz L., Rasmussen J., Tordrup D., Værum M., Nygaard Ravn M., Hachenberg C., Fisker E., Dekker P., de Meza J., Hein A-M. K., Buur Sinding J., Quorning J., Hvam K., Mikkelsen S., Liboriussen P., Grydholt J., Handberg H., Bundgaard M., Joecker A., Simonsen M., Nielsen P. D. R., Joecker A., Fleischer P., Jakobsen J., Juul S., Appelt U., Fejes A. CLC Bio, Cambridge, MA. CLC DNA Workbench version 6.6.
33. Lambert S. J., Scott J .B., Pethybridge S. J., Hay F. S. (2012). Strain characterization of *Potato virus S* isolates from Tasmania, Australia. *Plant Disease*. 96: 813-819.
34. Le Gall O. L., Lanneau M., Candresse T., Dunez J. (1995). The nucleotide sequence of the RNA-2 of an isolate of the English serotype of *Tomato black ring virus*: RNA recombination in the history of nepoviruses. *Journal of General Virology*. 76: 1279-1283.
35. Lin Y. H., Druffel K. L., Whitworth J., Pavek M. J., Pappu H. R. (2009). Molecular characterization of two *Potato virus S* isolates from late-blight-resistant genotypes of potato (*Solanum tuberosum*). *Archives of Virology*. 154: 1861-1863.
36. Mackenzie D. J., Tremaine J. H., Stace-Smith R. (1989). Organization and intervirial homologies of the 3'-terminal portion of *Potato virus S* RNA. *Journal of General Virology*. 70: 1053-1063.
37. Maoka T., Sugiyama S., Maruta Y., Hataya T. (2010). Application of cDNA macroarray for simultaneous detection of 12 Potato Viruses. *Plant Disease* 94: 1248-1254.

38. Martin D. P., Lemey P., Lott M., Moulton V., Posada D., Lefevre P. (2010). RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26: 2462–2463.
39. Matousek J., Schubert J., Dedic P., Ptacek J. (2000). A broad variability of *Potato virus S* (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 22: 29-37.
40. Matousek J., Schubert J., Ptáček J., Kozlová P., Depic P. (2005). Complete nucleotide sequence and molecular probing of *Potato virus S* genome. *Acta Virology*. 49: 195-205.
41. Matthews R. E. (1979). Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*. 12: 129-296.
42. Milne I., Wright F., Rowe G., Marshall D. F., Hushmeier D., Guire G. (2004). TOPALI: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics* 20: 1806-1807.
43. Monis J., de Zoeten G. A. (1990). Characterization and translation studies of *Potato virus S* RNA. *Phytopathology*. 80: 441-445.
44. Morozov S. Yu., Lukashova L. I., Chemov B. K., Skryabin K. G., Atabekov J. G. (1987). Nucleotide sequence of open reading frames adjacent to the coat protein cistron in *Potato virus X* genome. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 213: 438-442.
45. Morozov S. Y., Dolja V. V., Atabekov J. G. (1989). Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *Journal of Molecular Evolution* 29: 52-62.
46. Petty I. T., French R., Jones R. W., Jackson A. O. (1990). Identification of *Barley stripe mosaic virus* genes involved in viral RNA replication and systemic movement. *European Molecular Biology Organization Journal*. 9: 3456-3457.
47. Rose D. G. (1983). Some properties of an unusual isolate of *Potato virus S*. *Potato Research*. 26: 49-62.
48. Rozendaal A., Brust J. H. (1955). Proceedings of 2nd Conference Potato Virus Diseases. Wageningen-Lisse. 1954: 120-133.
49. Salari K., Massumi H., Heydarnejad J., Pour A. H., Varsani A. (2011). Analysis of Iranian *Potato virus S* isolates. *Virus Genes*. 43: 281-288.
50. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. A. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
51. Schepetilnikov M. V., Manske U., Solovyev A. G., Zamyatnin A. A. Jr., Schiemann J., Morozov S. Y. (2005). The hydrophobic segment of *Potato virus X* TGBp3 is a major

- determinant of the protein intracellular trafficking. *Journal of General Virology*. 86: 2379-2391.
52. Sergey Yu., Morozov S. Y., Solovyev A. G. (2003). Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology*. 84: 1351-1366.
 53. Singh A. K., Mahinghara B. K., Hallan V., Ram R., Zaidi A. A. (2008). Recombination and phylogeographical analysis of *Lily symptomless virus*. *Genes* 36: 421-427.
 54. Slack S. A. (1983). Identification of an isolate of the Andean strain of *Potato virus S* in North America. *Plant Disease*. 67: 786-789.
 55. Solovyev A. G., Savenkov E. I., Agranovsky A. A., Morozov S. Yu. (1996). Comparisons of the genomic cis-elements and coding regions in RNA β components of the hordeiviruses *Barley stripe mosaic virus*, *Lychnis ringspot virus* and *Poa semilatent virus*. *Virology* 219: 9-18.
 56. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
 57. Thomson A. D. (1959). *Potato viruses A and S* in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 2: 702-706.
 58. Turner R., Foster G. D. (1997). Deletion analysis of a translational enhancer upstream from the coat protein open reading frame of *Potato virus S*. *Archives of Virology*. 142: 167-175.
 59. Vaughan E. K., van Slogteren D. H. M. (1956). *Potato virus S* in Oregon. *American Potato Journal*. 33: 218.
 60. Wardrop E. A., Gray A. B., Singh R. P., Peterson I. F. (1989). Aphid transmission of *Potato virus S*. *American Journal of Potato Research*. 66: 449-459.
 61. Wetter C. (1971). *Potato virus S*. No. 60 in: Descriptions of plant viruses. Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied Biologists, Kew, England.
 62. Wolf I., Horváth S. (2002). A vírusfertőzés hatása a vetőburgonya minőségére. In: Georgikon Tudományos Napok. 306-310.
 63. Yarwood, C. E., Gold A. H. (1955). Guar as a local lesion host of *Potato virus S*. *Plant Diseases Reporter*. 39: 622.

10. Mellékletek

1. melléklet: A magyar burgonya S vírus izolátum komplett genomszekvenciája

```
PVS HU  GATAAACACTCCCGAAAATAATTTGATTTAAAGAACGCGACAGTTCAATCAAATTACTTAACATGGCA
PVS HU  CTTACTTACAGAAGTCCAATCGAGGAAGTGTAAACACTACTAGAGCCTAATGCTCAATCCCTAATTTG
PVS HU  CAACGTCGCCACCAGCAGCTTTCAAGAGAGTGAGAAAGATAACTTCGCCTGGTTTTGCTACCATGTGT
PVS HU  CAGCTAGCGCAAAAGAACACCTTAGCAGAGCAGGAATTTACCTAAGCCCCCTACTCAGGGTATCCTCAT
PVS HU  TCCCACCCGGTGTGCAAGACATTGGAATAATTACCTACTGTACAAAGTCTACCCCCACTTGTAAATAA
PVS HU  CACCTTTTATTTCTAGGAATAAAGAATTCAAGCTCAATTTTCTTAAGAAGAGAATCAAAACAATGA
PVS HU  GCATGATTCAAGCTATAAATAGGTATGTGTGCAGCGCCGATAAATTCGATATGGTAATGAGTTCGTG
PVS HU  ATCAAATTCGGCGCAGCTTCGCCGAACCAAGCGACACCATGGTTATTCACCTGGATCCAGCCTTCGG
PVS HU  TGATCTCTTACCGAACATAAAGAGGGATTCTAATCTCTTCTTTCACGATGAATGCATTATTGGGAAA
PVS HU  AGAACCAGTTGATCCACTTCTTGAACAATGCAGACCCAATACATGCTTGTGCACCATTTGTGACCCA
PVS HU  ACAGAGATATTCTTGGGGCCCGACGTTCTTGAATCCGTGGGCATATGAGTTCGAGATTAGAGAGA
PVS HU  CAAACTGCTCTTTTACCCAGATGGGTGCGTAGTGAAGGCTACGAGCAGCCAGTCAACTGTGGGTATC
PVS HU  TCCTCCGCACTAGAAAGATATTGCTAAGGGATGGTACCATGTACAGCGTTGATTTAGTATGCAGCAAA
PVS HU  TTTGCCCATCACCTAATAGCAATCACCAGGGCGATTGTATCACCCCGACTTACCGTAGCTTCGGTCC
PVS HU  TTTTGAGGCTATTAAAAGTGCGGGCTTGCAAGGGATAAGCAAGGGTAGGCCTAAATCTATCTGTAC
PVS HU  CGTGCCACATGATTTTCGCGTCTATACAGGTACTTACGGTCTTTAAAGAAACCCGACAAGCAGTCCGCA
PVS HU  ATGGCAAAATTTCTCGCAGATGTGCCAGAGCCAAGTGGTACATGATAAGGTTTATTGAGGAACAGT
PVS HU  CGACCTGATAATCAACACTGGCACTTTGAGGGTCATGATCGATGCAGAAATTACGCAAAAATTTTTTTG
PVS HU  GTAATCTGGGTCTGGCCCTACCGGCTACTCTCGCGTCAAAGATCAAAGTACTCGTGTGTAGCTTA
PVS HU  GAAGCCTTCATAGCCTCGCTTGAGCCGCTTGTCTGTTGATTGCGAACTGCAAAACCATCTCGCGGGCGT
PVS HU  ACCGCTGGCGCAACTGTTGTTCAAGTGAATCGCCCGATGATCCCCCTGAAGATACAATTAAGCAATGG
PVS HU  ATAGGAAGTGGGTGAGTAGTGGCAGCATGTTGTGCGACAGAGTCCCGGCACCTTACCGTGGGAACATG
PVS HU  TGGAGCGAAACATCCCGCGCAATGAGCTTTTGGAGCATAGATTTTCAGCGGGTCAAGTTTCTGAGAGG
PVS HU  GCTGATGGAATTTGACGTGGATAGCATGTGCACAGAAGGCTTGCAACCCCGTGAATTTTGAAGCTT
PVS HU  ACATGGCTCAGGTCGCGTGTGCTCGCTCCTTGGGCTCGCGTTGATTAAGTGCTTAAGTGTGCTG
PVS HU  GAGTATGCTGAGGTGGCCCGGATAGTGAGTAACACACGTTTGATTGATGTGCTCTTCATCGCTGGGGA
PVS HU  CCTCCGTTGGTTTCGCGCTACCCGACATTCCAGGTATAACGTTAAGTTCTTGGACGAAACAGCCGACT
PVS HU  GGGCGAGGTACAAAAGTGAGTTGAGTGCACAGTATGCGAAGCCCAAGGAATAGGTATATGAGT
PVS HU  TATCTCCAAAACACCGTGTACAGCTTTCACGGGTGGGGGCACGGTGGTTCGTTTGACCCGAGCTACTG
PVS HU  TTGCGAAGATGACTCTGAGGCCATCCACTGTGACTACAGTGTGGCCAATCATCCCGAAGCTGCACCAA
PVS HU  TAAATTTGAAAGAATTTTGGCCCAAGGAACCGGGATAAGGAGAGCGTTGGAATGCACATGTGGGATG
PVS HU  CAATCTGCAACAAGGGTGTAGCGTTCCCGCGGAACACGGGTTCAATTTGGAGATGGGGGTTCAGG
PVS HU  TAAGCGTGTCTGCGTGGTATTGCAAGAGTCAGATTGGTTATACATCTGGAGCTGTTTGCCTAAGAAAT
PVS HU  TGGGCTGGCCAAAGATGGTTAAGCCAGTGGATGGAATTCATGAAATAGATGAGGCGTACTACAATGGC
PVS HU  ATGCTAGCCCAAGAACTTCCTGCTGGCGGAGTCTAGAGTGTGAAGTGAATGATGGCAGTTTGTTCGT
```

PVS HU CACGGGCTCAAATGTGGCCATAGCTGAAGTTGGAGGCCAGTCCCAGGTTTCAATTGGTTGTGGCAG
 PVS HU GGACTGGGCAGTTGTTGCTAGGATTTGGGGATTTCATGAAGTGCCTGGTCCGTGTTGGCGCGATCAC
 PVS HU CATCTCCATGTGCGCTGTAGCGAAATGTGCGGGACCTCATTTATCTTCAGGCAGGTTAAGGTGTCAGA
 PVS HU TCCAGTGGTGAATGCTCCAGTAGTGCAAATTCAGCGCCTACCTCAACAGCAGATGCAGGGAGGTCTA
 PVS HU AGCTCAATGAGTATGATGCCACCACACAGAGAAGGGGTTGCTGTGCATGCGCCCGAAAGTGCCCT
 PVS HU GAAACAAAGAAGTTCCATAGAGTGCCCAATGCAGGTGGTGGGATTGCTTTTGGCTGGCCATCTCGCA
 PVS HU CTTACAGGGGTGAGCGTGCAAGATATGAAACAGGGATTGCAACAGCTGGAGTGGGAGAGTGACGCAT
 PVS HU TCAGCGCCGAATTGGCTTTGCAGTTGAAGCCACAAGTCTGGGCTGAAGAGGAGGCCATCATCGCGACA
 PVS HU AGTAAGCAATACCGGTACAGGATCGTGGTGTGAGCGCCGATACAGAGCAAAAGTTATTTATAGCCC
 PVS HU GAAGTGTGAGGTAGTGCACTCCATGGTTCTCTACCACGCCGAGGTCACTTTGAGGCAGCTTTGCCCC
 PVS HU GGAATGACTGCGTGCTTGTGCTGTTGCGTCTGTCTTGCGAGGCGAGTTGAAGAAGTGCTTTTGGATC
 PVS HU CTAGGCGCACAAATTGGGTAAAGATTCTTCAAGATGTGCTGAAGGGTGAAGGAATTGATCGGACAA
 PVS HU GTTGGCTGTGGTTTTTGAACCTCTTTGATATCTCGGCACATATACACGCAGAGGGTGAGGTTTTCTGTGA
 PVS HU TAAACTCTGAAGGTAGATTGCAATGGCACATTCAACTGAGCAAGGATCATATTGAGCATTGTAAGAGT
 PVS HU AAACCGATGGGAATAACCAAGTTCACAAGTGTGCATGATGCTAGCTGTGAGATTAAAGCAGGAGACACT
 PVS HU CGCCATGCTGAAAGCTATGTGCACGTTACTACCGTACAAACCATGTGAGCTTAGAGCAAAAGTGCTCG
 PVS HU CTGATAGCTTGAATGCTGGTAGTACTGGGGTCTCTGCGACGAGTTGTTCAATAAGGTGCGGAATTTG
 PVS HU CTTGAGGCAAAATGAGGGGCGACTGCAAGAGAGTGTAGAGAAGTAGGTTGCTTACTAGGAACCTTTTG
 PVS HU AGCTGGGAAGAGCATGGTCTTTAGAAAAGTGCTAAATGGCAATCTTGGGAAGAGTATCATCTACGTAT
 PVS HU CCCCAAGGAAGCATCTGGCTGATTCAATGAGCTTGTGAAGTCTATCAAGCAGCAGGAGGAGCA
 PVS HU GCGAGCGTACAAGGATTCCGCACCTTTCACATTGAGAGAGCGCTTTTGAAGAGCGCGCAATTTAGGCC
 PVS HU AGATGCGACGATCATCATTGATGAGATTGAGCTGTTCCCGCCAGGTTACTTGGATCTATTTCCATGT
 PVS HU TGGCACCAACGGGGGTGCACATGTTCTGGTGGGTGATCCGTGCCAAAGCGACTATGACTCAGAAAAA
 PVS HU GACCGGAACCTGTTTCAAGCCATGAAATCCGACATCAATCTTCTGTTGGATGATGCGGACTATGATTT
 PVS HU CAATTGCAGGAGTCGTAGATTCAAGGATAAGCTTTTTGATGGCCGTTTCCATGCTTAATGGGACCCA
 PVS HU TGGAAAGGGAGCCGTCCAAGTTCACAATCATTGAGGGAGTTGAAAAATTGAAAGCTATTCACTCGCAT
 PVS HU GCTGAAGTTGTTTAGTATCTCTATTGATGAAAAGAAGATAGTGCAGACTTACTTCTGAGCTCTTG
 PVS HU CCATTGCTTCACTTTTGGAGAAATCCACCGGATGACATACAAGTCTGGGGTGATACTGATTACAGACA
 PVS HU CTTACACAATACACAGTGAGAGGAGGTAACTGCCCTGAGTGGTTCTCACATTCAATCGCCTTC
 PVS HU GTGAATGCAACCGAGGAAACATCCAGTTGGTAACCAGGCTATATCAGAATAGGGTCCTAGGTCGATT
 PVS HU TTTGCTCAAAACGGCAAGATTGAAGACCTTAAGATGTTGTTGCTGATAGGCCATGCTTTAAAGAAG
 PVS HU GATTTGGGGGCGAAAGGATTGGCGCAGATGAGGGCAAGAGAGATTCAAGTTGGAGGGTGATCCGTGG
 PVS HU TTGAAAACAATGCTAGATCTACTACAGAAAGAGGATCAGGAGGAGGTTGAGGAGGCAGTTGTTGAAC
 PVS HU TGGTGAGGAATGGTTTCGCACACATTTGCCGCAATGCGAGCTGGAGGGTGTGAGGGCAAGGTGGGTTG
 PVS HU AGAAGATATTGGCAAAAGAAGTCCGTGAGAAAAGGATGGGACTATTGGTCTCTGAGCAATTCACAGAT

4 780 4 800 4 820
 PVS HU GAGCATTCAAAGCAGTTGGGGAAGCAAAATCACAAATGCCGCCGAGAGGTTGAAACAATCTACCCAGC
 4 840 4 860 4 880
 PVS HU GCACAGAGCTGCAGACACAGTCACTTTCATCATGGCTGTGAGGAAAAGATTGAGGTCTTCGGACCCAA
 4 900 4 920 4 940 4 960
 PVS HU TTAGAGAGAGTGCAAAGCTCCGGGCTGCGGAGATGTATGGGCCCTTCCTACTGAAAGAATTCTCTCAAG
 5 000 5 020 5 040 5 060
 PVS HU CATGTGTCACTGAAACCAATGCATGATACGAGAATGATGGCTGAAGCAAAGTTTGATTTGAGGAGAA
 5 080 5 100 5 120 5 140 5 160
 PVS HU GAAGACGCAGAAGAGCGCAGCCACAATTGAGAACCACAGCAACAGATCTTGTAGGGACTGGCTGGCCG
 5 180 5 200 5 220 5 240 5 260
 PVS HU ACATGAGTATGGTATTCTCGAAGTCTCAACTCTGCACGAAGTTTGACAATCGGTTTCAGGGATGCGAAA
 5 280 5 300 5 320 5 340 5 360
 PVS HU GCAGCGCAAACCATTTGCTGTTTCCAACATAGCGTCTTATGCCGCTTTCACCGTACATGAGGTACAT
 5 380 5 400 5 420 5 440 5 460
 PVS HU CGAAAAGAACTCAATGAAGTATTGCCAGCGAGGTTTTACATTCATTGAGTAAAGGCTTGGAGAGT
 5 480 5 500 5 520 5 540 5 560
 PVS HU TAAATAAATGGGTATAGAGTCCAAGTTTCGACGGTTGTGCGCAGAGTCTGACTATGAAGCCTTTGAC
 5 580 5 600 5 620 5 640 5 660
 PVS HU GCTAGTCAAGACCACTACATAGTGGCGTTTGAGCTAGCATTGATGAGGTATTGCGCTTGCCTCAATGA
 5 680 5 700 5 720 5 740 5 760
 PVS HU TCTCATAGAGGATTACAAGTACATCAAAACGCACCTGGGCTCAAAGTTGGGGAATTTTGCCATAATGC
 5 780 5 800 5 820 5 840 5 860
 PVS HU GCTTCTCTGGTGAGGCTAGCACCTTCTTGTTCACACAATGGCCAATATGCTTTTCACATTCCTAAGA
 5 880 5 900 5 920 5 940 5 960
 PVS HU TACAAGCTGAAAGGGGATGAGCGGATATGCTTTGCTGGTGATGACATGTGCCCAATAGGGCACTATT
 5 980 6 000 6 020 6 040 6 060
 PVS HU CATTAAAGGATACTCATGAAGGCTTCTCAAGAACTTAAGTTGAAGGCGAAGGTTGATAGAACAACCC
 6 080 6 100 6 120 6 140 6 160
 PVS HU GACCAAGTTTCTGTGGTGGAGCTTGTGCTCAGATGGAATTTACAAAAGCCGACGCTGGCTTTGAG
 6 180 6 200 6 220 6 240 6 260
 PVS HU AGACTCTGTATTGCCAAGGAAACAGCCAATTAGCCAATTGCATTGATAACTATGCGATTGAGGTATC
 6 280 6 300 6 320 6 340 6 360
 PVS HU ATACGCCCTACAAGCTCGGGGAGAGGATTAAGGAGCGCATGTGACAGGAGGAACTGGATGCGCTTCTACA
 6 380 6 400 6 420 6 440 6 460
 PVS HU ATTGTGTGAGGGTGACCATCAAGCATAAGCATTACTGAAGTCTGAGATCCGCTGTGTGTATGAAGAT
 6 480 6 500 6 520 6 540 6 560
 PVS HU ATTTGATAGCTTAGGTAATCAGCTTAGTAGTATTGAATATATGGATGTGTTTTTGCAAAATTTGAATA
 6 580 6 600 6 620 6 640 6 660
 PVS HU AATACAAGTTTGAGCGTGTAGTAGTACTTTAAATAAACCAATAGTTGTTTCATAGTGTCCCGGGAGCT
 6 680 6 700 6 720 6 740 6 760
 PVS HU GGTAAGAGTTCCGCTATTCGGGAATTGCTTAAGTTGGATAGTAGGTTTGAGTGCATTACTCGTGGCCG
 6 780 6 800 6 820 6 840 6 860
 PVS HU GCCTGATATCCGAATCTAGAGGGGGCTTCATCAAGGCTGAGCGCAGTGGGGAGAATAAGTTGCTGC
 6 880 6 900 6 920 6 940 6 960
 PVS HU TGGTCGATGAGTACATAGAAGGGCGGTCCAGAGGACGCCCTTTGCAATCTTTGCCGATCCACTTCAG
 6 980 7 000 7 020 7 040 7 060
 PVS HU AGTACCTCTGTGAGCCCATACCGAGCACACTTCATCAAGACATTGAGTCATCGCTTTGGCAAGTGTAC
 7 080 7 100 7 120 7 140 7 160
 PVS HU CGCTTCCCTTCTGAGAGACTTGGTTGGGACGTACAGGCAGAAAGTCAAGATTCAGTTTCAGATCGCAG
 7 180 7 200 7 220 7 240 7 260
 PVS HU ATATCTTCACAGTTGACCTAGGGATACCAATTGTATCTTCGAGCCTGAAGTTGGAGAGTTACTGAGG
 7 280 7 300 7 320 7 340 7 360
 PVS HU AGCCACGGTGTGAGGCAAGCTGCATTGGTGAGGTGCGTGGGGCTACTTTCGAACACGTGACCTTCGT
 7 380 7 400 7 420 7 440 7 460
 PVS HU CACTTCTGAGAACGCCCCACTGGTTGATAAGGCTGCTGCTTTTCGGTGCTTAACAAGACACACTAAGA
 7 480 7 500 7 520 7 540 7 560
 PVS HU GCTTGCTCATATTGTCCCTGATGCCACTTACACCGCCACCTAACTATATAGGGTTATACATTGCAGC
 7 580 7 600 7 620 7 640 7 660
 PVS HU AGCTTTAGGAGTCTCCCTTGCCTCGTGGTACCACTGTTCACTAGGAGTACACTGCCAATTGTTGGGG
 7 680 7 700 7 720 7 740 7 760
 PVS HU ATTTCGAGCACAACTCCACACGGGGGACGGTACCGCGACGGTACCAAAGCTATTGATTACTTCAAA
 7 780 7 800 7 820 7 840 7 860
 PVS HU CCCGCTAAACTGAATTCTGTTGAGCCTGGTAATCACTGGTACGCCAGCCTTGGTTGCTAGTTCTGCT
 7 880 7 900 7 920 7 940 7 960
 PVS HU TCTAGTCGCGCTCATCTGCTTATCGGGGCGTCAATGCTCCATGCTGTCCAAGGTGCAACCGAGTGCACA
 7 980 8 000 8 020 8 040 8 060
 PVS HU GTGCTTAATGGTATTTCATCTTGGCATTGCGGCTAAGTTGGTATGCGCTCAGGCCAGGGAACACAAGCT
 8 080 8 100 8 120 8 140 8 160
 PVS HU GCGTTCTGCTCATCACTGGGGAATCAGTTTCGACTAGTCAATTGCGAGCTTACAAGAGATTTAGTGGAA

PVS HU GCTGTAGCAACATTGGGCCCCGTTGAAGCACCTTTAGGTTTCACAGGTAAGAGTTTCAATAAACTGTCCC
 PVS HU ACAGAGAAAAATGCCGCCCAAACCGGATCCAACAAGCTCAGGTGAGACACCACAGGCAATACCGCTTGT
 PVS HU GCCGCCGCCCGGAATGTAGAGGAGCATAGGGTTGGCCCAAGTGAAGGGCCTAGGCAGAATGAAGAGG
 PVS HU CCATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGATTGATTGAACCTCATGGCCTCGAAAAGGCATAATTCAACATTG
 PVS HU AGCAACATCTCTTTTCGAGATAGGTAGGCCCTCACTTGAGCCGACTCCTGAGATGCGGAGGAATCCGGA
 PVS HU GAATCCATACTCGCGGTTTCGATCGATGAGCTGTTCAAAATGGAAATCCGATCTGTGTCCAGTAACA
 PVS HU TGGCGAACACCGAGCAAAATGGCGCAAATTACTGCTGACATCGCTGGACTTGGGGTCCCTACTGAACAC
 PVS HU GTTGCTGGGGTTATACTGAAAGTGGTGATCATGTGTGCAAGTGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCC
 PVS HU AGCTAGGACCGTGGAGTTCCCAACAGGCGCAGTGCCCTTGGATTGATCATTGCAATCATGAAGAACC
 PVS HU GCGCGGGATTGAGAAAAAGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCGTGTGAATTACATGCTAGTTTCAAGAT
 PVS HU AGACCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAATGCACGCTTCGCCGCAATTGACACATT
 PVS HU TGATTATGTGACTAATGGGGCAGCAATTCAGCCCGTAGAGGGGCTCATACGCAGGCCACACCTGAGG
 PVS HU AAACAATAGCTCACAAATGCCCAAGAGTATGGCGATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCC
 PVS HU AACACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTAATGCGAT
 PVS HU CAACCAATGAAGGCAGACCGTTTAGCTATGTTGTTATTGTGTGTCTATCGACTGGGATATATTTTGCC
 PVS HU AGTTGAAGTTTGTGTAATAATAAGCCTAAGTGCAGGTCCAGTTTCTGGGGCGCTTCCACTTACG
 PVS HU CTCGTAAGCGGAGGGCCCGCAGCATTGGGCGTTGCTGGCGATGTTATCGTGTCTATCCACCTATTTGT
 PVS HU AATTCTAAGTGTGATAATAGAACATGCCGTCCAGGCATTAGTCAAAATTATAAAGTAGTGACTTTTCAT
 PVS HU TCQGGGTTGGAGTAACTGAGGTGATACCACCCACGGTGCAAAGTCAGAGTTTCGCATAAAACTTAAAT
 PVS HU AATATATAAGTGTGCAACTATAAAGAAAAATATGTTTTTAAATATTTTAGCAT