

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK VÍRUSHORDOZÁSÁNAK VIZSGÁLATA

KARTALI TÜNDE

TÉMAVEZETŐK:

DR. CSERNETICS-NYILASI ILDIKÓ, TUDOMÁNYOS MUNKATÁRS
PROF. DR. PAPP TAMÁS, EGYETEMI TANÁR

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

2022

Bevezetés

Mikóvírusoknak nevezzük a gombákat fertőző vírusokat. A szakirodalomban fellelhető adatok alapján a legtöbb azonosított gombavírus kettősszalú RNS (dsRNS) genommal rendelkezik, melyekről általánosságban elmondható, hogy genomjuk két nagyobb, legtöbbször átfedő, nyitott leolvasásikeretet (ORF) tartalmaz. Az 5' proximális ORF kódolja a kapszidfehérjét (CP) míg a 3' proximális ORF az RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp) génnek felel meg. Gyakoriságban a (+)egyszálú RNS (ssRNS) vírusok következnek, majd a (-)ssRNS-genommal rendelkezők. A gombavírusok szinte kivétel nélkül csak intracelluláris transzmisszió során tudnak terjedni, extracelluláris úton elméletileg nem képesek fertőzni. Eredetüket tekintve két hipotézist tartanak számon, melyek közül az „ősi koevolúciós elmélet” feltételezi, hogy a mikóvírusok és a gombák közötti kapcsolat ősi eredetű, és a mikóvírusok a gazdaszervezetekkel együtt fejlődtek. A „növényi vírus hipotézis” szerint a vírusok eredetileg növényvírusok voltak, majd a növényekből kerültek át a gombasejtekbe. A gazdaszervezetben okozott változásokat tekintve a mikóvírusok általában tünetmentesek (kriptikusak) vagy látens fertőzéseket okoznak, amelyek csak bizonyos körülmények között nyilvánulnak meg a gomba fenotípusában. Ugyanakkor egyre több olyan mikóvírust azonosítanak, melyek jelenléte a gazdagombát hipo-, illetve hipervirulenssé teszi vagy a gomba fenotípusában idéz elő változást. Ezen tulajdonságaik miatt intenzíven kutatják őket a biológiai védekezésben történő potenciális szerepükért.

Mikóvírusokat azonosítottak már szinte az összes gombacsoportban, mégis túlnyomó többségüket az Ascomycota és a Basidiomycota törzsekben detektálták. Nemrégiben Myers és munkatársai (2020) rávilágítottak arra, hogy a bazális gombák (úgynevezett „non-Dikarya” gombák csoportja) között is magas a vírusfordozási arány, ugyanis az általuk vizsgált 333 izolátum 21,6%-a bizonyult vírusfordozónak. Csoportunk korábban már vizsgálta egyes járomspórás gombafajok vírusfordozását és néhányukban (*Mucor*, *Rhizopus*, *Umbelopsis*, *Gilbertella* fajok) azonosított dsRNS-elemeket, illetve víruspartikulumokat (VLP), azonban a detektált fragmentumok pontos meghatározása és részletesebb vizsgálata nem történt meg.

Célkitűzések

Mivel a járomspórás gombák vírushordozása kevésbé kutatott terület az Asco- és Basidiomycota törzsekhez képest, szükségesnek véltük a bazális gombák ezen csoportját is megvizsgálni e szempontból.

Munkánk során a következő konkrét célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. A vírushordozás vizsgálata a Mortierellomycotina altörzs *Mortierella*, *Dissophora*, *Gamsiella* és *Lobosporangium*, valamint a Mucoromycotina altörzs *Umbelopsis*, *Mucor*, *Rhizopus* és *Lichtheimia* nemzetségeiben az extrakromoszómális dsRNS-elemek jelenlétének kimutatása által;
2. A detektált dsRNS-vírusgenomok szekvenálása, a szekvenciák részletes molekuláris vizsgálata, a vírusok genomszerveződésének meghatározása és elemzése, az újonnan azonosított mikovírusok jelenlétének igazolása az adott gombaizolátumban, valamint a VLP-k izolálása és vizsgálata;
3. Az azonosított gombavírusok filogenetikai viszonyainak feltérképezése.

Alkalmazott módszerek

Mikrobiológiai eljárások:

- ✓ Baktérium- és gombatörzsek tenyésztése táptalajon
- ✓ Baktérium- és gombatörzsek tenyésztése folyadék kultúrában

Molekuláris biológiai módszerek:

- ✓ Gomba össznukleinsav-tisztítás
- ✓ dsRNS-tisztítás CF-11 cellulóz kromatográfiával
- ✓ Agaróz gélelektroforézis
- ✓ Enzimátikus kezelések
- ✓ dsRNS és DNS izolálása agaróz gélből
- ✓ cDNS-szintézis dsRNS-fragmentumokról
- ✓ Polimeráz láncreakció (PCR) technikák

- ✓ DNS-fragmentumok klónozása
- ✓ *E. coli* sejtek transzformálása
- ✓ Plazmid DNS tisztítása
- ✓ DNS szekvenálás
- ✓ dsRNS-vírusok teljesgenom-szekvenálása (WGS)
- ✓ Vírusszerű partikulumok tisztítása
- ✓ A VLP-k transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálata
- ✓ Northern-hibridizációs kísérletek

Nukleotid és aminosav-szekvencia adatok elemzése:

- ✓ Nukleotid-szekvenciák analízise, összehasonlítása, a nukleotid-szekvenciákból származtatott aminosav-szekvenciák megállapítása
- ✓ A vírusok genomszerveződésének meghatározása és elemzése
- ✓ Filogenetikai elemzés

Eredmények

Új dsRNS-hordozó törzsek azonosítása a járomspórás gombák különböző nemzetségeiben

Munkánk során összesen 195 izolátumot vizsgáltunk meg dsRNS-hordozás szempontjából, ezek közül 30 az *Umbelopsis*, 4 a *Mucor*, 31 a *Rhizopus*, 10 a *Lichtheimia*, 114 a *Mortierella*, 4 a *Dissophora*, 1 a *Gamsiella* és 1 a *Lobosporangium* nemzetség tagja volt. A vizsgált törzsek közül 35 bizonyult vírushordozónak, összesen 7 *Umbelopsis*, 4 *Mucor*, 7 *Rhizopus*, 2 *Lichtheimia*, 1 *Dissophora* és 14 *Mortierella* izolátumban detektáltunk dsRNS-molekulákat. Munkánk során szinte mindegyik nemzetségben azonosítottunk új dsRNS-hordozó izolátumokat (kivételesen a *Lobosporangium* és a *Gamsiella*), emellett a *Lichtheimia* nemzetségben először detektáltuk dsRNS-fragmentumok jelenlétét. Az azonosított extrakromoszómális elemek mindegyikénél igazoltuk a detektált fragmentumok dsRNS-természetét.

A különböző Mucoromycota gombákban detektált mikovírusok azonosítása, illetve a vírusok genomszerveződésének meghatározása és elemzése

Összesen 39 vírusgenomot azonosítottunk a 35 vírushordozó izolátumban. A detektált gombavírusok szekvenciáinak kiértékelésével és genomszerveződésének meghatározásával megállapítottuk, hogy az azonosított vírusok dsRNS-, (+)ssRNS- vagy (-)ssRNS-genommal rendelkeznek. Közülük 30 a *Totiviridae*, 2 a *Narnaviridae*, 1 az *Endornaviridae* családba tartozik, illetve felfedeztünk 6 olyan (-)ssRNS-genommal rendelkező vírust, melyek hovatartozása jelenleg még nem tisztázott.

Az *Umbelopsis* nemzetség esetében csak dsRNS-genommal rendelkező vírusokat azonosítottunk, összesen 15, a *Totiviridae* családba tartozó vírust. Az *U. ramanniana* három különböző izolátumában is detektáltunk vírusokat, ezeket közül az NRRL 1296 öt (UrV1, UrV2, UrV3, UrV4, UrV5), a CBS 478.63 három (UrV6a, UrV7, UrV8a), míg a CBS 243.58 izolátum egy (UrV6b) új vírust tartalmazott. További két-két mikovírust detektáltunk az *U. gibberispora* CBS 109328 (UgV1, UgV2) és *U. dimorpha* CBS 110039 (UdV1a, UdV2) törzsekben, illetve az *U. angularis* CBS 603.68 (UrV8b) és *U. versiformis* CBS 473.74 (UdV1b) egy-egy vírust figyeltünk meg, melyek a korábban leírt *U. ramanniana* CBS 478.63 (UrV8a) és *U. dimorpha* CBS 110039 (UdV1a) izolátumokban azonosított vírusok genomvariánsai.

Az új, *Totiviridae* családba sorolt vírusok között több esetben is detektáltunk olyanokat, melyek translációs mechanizmusa némiképp eltér az adott nemzetségre jellemzőtől. A *Totivirus* nemzetségre a programozott -1 riboszómális leolvasásikeret-eltolódás (FS) a jellemző, míg a legtöbb újonnan azonosított vírusról a ritka +1 (vagy -2) riboszómális FS következtében valósul meg az RdRp translációja.

A *Mucor* nemzetségből csak azt a négy izolátumot vizsgáltuk tovább részletesen, melyeknél korábban már detektáltuk a dsRNS-genommal rendelkező vírusok jelenlétét. Összesen öt új vírust írtunk le. Mindkét *M. hiemalis* f. *hiemalis* izolátum ugyanazon gombavírust tartalmazza, mely a *Mucor hiemalis* vírus 1 (MhV1) nevet kapta. Így a WRL CN(M) 122 izolátum az MhV1a, míg az NRRL 3624 izolátum az MhV1b genomvariánst hordozza. A *M. hiemalis* f. *corticola* NRRL 3617 izolátumban egy (MhV2), míg a *M. hiemalis* f. *corticola* NRRL 3616 esetében két új vírust azonosítottunk (MhV3 és MhV4). Az újonnan

detektált vírusok mindegyike a *Totiviridae* családba tartozik. Az MhV1a/b vírusoknál megfigyeltünk egy szokatlan jelenséget, ugyanis annak ellenére, hogy a *Victorivirus* nemzetséghez tartoznak, mégsem a nemzetségre jellemző kapcsolt terminációs-reiniciációs mechanizmus révén történik a fehérjék translációja, hanem a korábban említett programozott –1 riboszómális FS révén.

A *Mucor* és *Umbelopsis* nemzetségbe tartozó vírushordozó izolátumokban Northern-hibridizációs kísérletekkel is igazoltuk a detektált vírusok jelenlétét a gazdagombában, illetve a több dsRNS-fragmentumot tartalmazó mintázatok esetében azt is vizsgáltuk, hogy az adott vírusgenom melyik dsRNS-fragmentumnak feleltethető meg. Emellett néhány vírushordozó izolátum esetében TEM segítségével igazoltuk a VLP-k jelenlétét is. A *M. hiemalis* f. *hiemalis* WRL CN(M) 122 és NRRL 3624 izolátumokban 35 nm átmérőjű VLP-eket, a *M. hiemalis* f. *corticola* NRRL 3617 izolátumban pedig 33 nm átmérőjű VLP-eket azonosítottunk. A *M. hiemalis* f. *corticola* NRRL 3616 és az *U. ramanniana* NRRL 1296 izolátumoknál, melyekben több vírust detektáltunk (MhV3 és MhV4, illetve UrV1–UrV5), különböző méretű VLP-eket figyeltünk meg (NRRL 3616: 33–36 nm, NRRL 1296: 50 és 35 nm), ami alátámasztja az adott gombatorzsek kevert vírusfertőzését.

A *Rhizopus* nemzetségbe tartozó vírushordozó izolátumoknál magas volt a kevert fertőzés aránya, szinte minden izolátumban több, különböző genomtípusú vírust azonosítottunk. Ez alól kivételt képeznek a *R. oryzae* FSU 8743 és a *R. lycococcus* FSU 9996 izolátumok, melyek csak 1-1 dsRNS genommal rendelkező, a *Totiviridae* családba tartozó vírust tartalmaztak (RoV1a, RoV1b). Ugyanakkor a *R. microsporus* SZMC 13640 izolátum esetében két (–)ssRNS-genomú vírust detektáltunk (RmNSRV1a, MpA1), melyekről egyelőre annyit tudtunk megállapítani, hogy a *Bunyavirales* rendbe tartozó vírusokhoz hasonlíthatnak, mivel a rendre jellemző RdRp-domént sikerült azonosítani. A *R. oryzae* NCAIM F.00617 izolátumban szintén két vírust írtunk le, egyik a (–)ssRNS-vírusok csoportját bővíti (RmNSRV1b), míg a másik a *Totiviridae* családba tartozik (RoV1c). A *R. oryzae* MUFS R5 törzs esetében egy kevésbé szokványos gombavírus jelenlétét tudtuk igazolni, mely az *Endornaviridae* családba tartozik (RoEV1). Ugyanezen törzsben egy dsRNS-genomú, a *Totiviridae* családba tartozó mikovírust is detektáltunk (RoV2). A *R. oryzae* NRRL 1526 izolátumban azonosítottuk a legtöbb vírusgenomot, ebben az izolátumban két (–)ssRNS-vírust (RoNSRV1, MpA2) és két *Totiviridae* családba

tartozó vírust (ScDSRV3a, UrV6c) azonosítottunk. Három új vírust detektáltunk a *R. microsporus* var. *oligosporus* NRRL 2710 izolátumban, ahol az egyik (RmNSRV2) (-)ssRNS-genommal rendelkezik, míg kettő (RmV1a, RmV2) a *Totiviridae* családba tartozik.

A *Lichtheimia* nemzetség két törzsében (*L. hyalospora* FSU 10162 és *L. ramosa* FSU 10166) összesen 4 vírust azonosítottunk, ezek közül kettő a *Totiviridae* (LhV1, RmV1b) és kettő a *Narnaviridae* (LhMV1, LrNV1) családba tartozik.

Az azonosított gombavírusok filogenetikai viszonyainak vizsgálata

Az újonnan leírt vírusok rokonsági viszonyainak feltérképezése érdekében filogenetikai törzsfákat készítettünk, ami az adott családba tartozó NCBI génbankban található vírusok RdRp-szekvenciáin alapul.

A *Narnaviridae* családba két általunk azonosított vírus tartozik, melyeket a *Lichtheimia* nemzetség két izolátumában detektáltunk. Az LhMV1 a *Mitovirus*, míg az LrNV1 a *Narnavirus* nemzetségbe tartozik.

Az *Endornaviridae* családba került a *R. oryzae* MUFS R5 izolátumban detektált RoEV1, melyről a filogenetikai elemzést követően megállapítottuk, hogy az *Alphaendornavirus* nemzetségbe sorolható.

A legtöbb általunk meghatározott vírusgenom a *Totiviridae* családon belül négy különálló és jól definiált csoportot alkot. Így a *Victorivirus* nemzetségbe kilenc (RoV1a, RoV1b, RoV1c, RmV2, UrV2, MhV1a, MhV1b, MhV2, MhV3), a *Totivirus* nemzetségbe tizenegy (UrV1, UrV4, UrV7, UrV8a, UrV8b, UgV1, UgV2, UdV1a, UdV1b, UdV2, MhV4), a még nem kategorizált totivírusok csoportjába nyolc (LhV1, RoV2, SsDSRV3a, UrV3, UrV5, UrV6a, UrV6b, UrV6c) és egy teljesen új csoportba két vírus (RmV1a, RmV1b) tartozik.

Kutatásunk során hat olyan (-)ssRNS genomú vírust is detektáltunk, melyek jelenleg egyik ismert és definiált víruscsaláddhoz sem tartoznak. Ezek az MpA1, MpA2, RmNSRV1a, RmNSRV1b, RoNSRV1 és az RmNSRV2 vírusok, melyek az RmNSRV2 kivételével nagy valószínűséggel a *Bunyavirales* rendbe sorolhatók az ide tartozó vírusokkal mutatott hasonlóságuk alapján.

Summary

Mycoviruses mostly have double-stranded RNA (dsRNA) genome and they can be transmitted only intracellularly. In some cases, mycoviruses can be responsible for the effect of hypo or hypervirulence, however most of the fungal viruses are asymptomatic in their hosts, so their presence often remains unexplored. Based on recent studies mycovirus-harboring are very common among fungi, however our knowledge about them is still very limited, especially in Mucoromycota fungi.

Our aim was the detection and molecular characterisation of the dsRNA fragments in different fungal strains belonging to the phylum Mucoromycota.

We have screened 195 isolates belonging to 8 genera and we have detected 7 dsRNA-harboring isolates in *Umbelopsis*, 4 in *Mucor*, 7 in *Rhizopus*, 2 in *Lichtheimia*, 1 in *Dissophora* and 14 in the *Mortierella* genus. All the examined genera contain dsRNA-harboring isolates, except *Lobosporangium* and *Gamsiella*. In addition, we have identified dsRNA-harboring isolates for the first time in the *Lichtheimia* genus. We have found 39 virus genomes in 35 mycovirus-harboring isolates. Based on the identified mycoviral sequences and their genome organization, the newly detected viral genomes are diverse, representing dsRNA, (+)ssRNA or in some cases (-)ssRNA genomes. The identified viruses could be classified into the *Totiviridae*, *Narnaviridae*, and *Endornaviridae* families, with 30, 2 and 1 viral genomes, respectively. We have also discovered six viruses with (-)ssRNA genomes whose taxonomic classification is not clarified yet.

The presence of the identified viruses was also revealed by Northern blot analyses in the virus-harboring *Mucor* and *Umbelopsis* isolates, and in those strains which contained several dsRNA fragments we also examined which dsRNA fragment can correspond to a given viral genome. The presence of VLPs was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) in the purified extracts of each *Mucor* strain as well as in the *U. ramanniana* NRRL 1296 isolate.

Our results clearly show that the prevalence of mycoviruses is substantially higher within the Mucoromycota than it was previously thought. A high diversity of the newly described viruses was also observed, as viruses with different genome organization belonging to different viral families have been

detected. In several cases, isolates from different fungal genera contain genome variants of the same viral species suggesting the possibility of horizontal virus transmission between distinct fungal isolates. Thus, there is an obvious need for the more comprehensive examination of the so-called early-diverging lineages of fungi, including Mucoromycota.

A FOKOZATSZERZÉS ALAPJÁT KÉPZŐ PUBLIKÁCIÓK:

Referált folyóiratokban megjelent publikációk:

Kartali T, Nyilasi I, Szabó B, Kocsubé S, Patai R és mtsai (2019) Detection and molecular characterization of novel dsRNA viruses related to the *Totiviridae* family in *Umbelopsis ramanniana*. *Front Cell Infect Microbiol* 9: 249. **IF: 4,123**

Kartali T, Nyilasi I, Kocsubé S, Patai R, Polgár TF és mtsai (2021) Characterization of four novel dsRNA viruses isolated from *Mucor hiemalis* strains. *Viruses* 13: 2319. **IF: 5,048**

Összesített impakt faktor: 9,171

Konferencia összefoglalók:

Kartali T, Szabó B, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Papp T (2016) Screening of dsRNA elements in *Mortierella* species. In: Márialigeti K (ed) A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2016. évi nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium: Absztraktkötet: 29-30.

Kartali T, Szabó B, Tóth É, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Papp T (2016) Kettősszálú RNS elemek járomspórás gombákban (DsRNA Elements in Zygomycetes Fungi). Kihívások, okok és lehetséges válaszok a mezőgazdaság és a vidék fejlesztésében, Hódmezővásárhely, Magyarország, Tudományos előadás.

Kartali T, Szabó B, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Papp T (2016) DsRNA elements in polyunsaturated fatty acid producing *Umbelopsis* species. In: Škrbić B (ed) 18th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Book of abstracts, Újvidék, Szerbia: University of Novi Sad, p. 116.

Kartali T, Szabó B, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Papp T (2016) Detection of virus-like elements in different *Umbelopsis* species. In: Gácsér A, Pfeiffer I, Vágvölgyi Cs (eds) 5th CESC 2016 Central European Summer Course on Mycology and 2nd Rising Stars in Mycology Workshop: Biology of pathogenic fungi Szeged, Magyarország, JATE Press, 74 p. p. 43.

Kartali T, Shahab D, Nyilasi I, Hatvani L, Kredics L és mtsai (2017) Detection of different dsRNA patterns in various fungal isolates. *Acta Microbiol Imm H* 64(1): 131-132.

Kartali T, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Sávai G, Kredics L, Papp T (2018) Isolation and molecular determination of dsRNA viruses in Mucoromycota fungi. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése és a XIII. Fermentációs Kollokvium: Absztraktfüzet: 28.

Kartali T, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Kredics L, Papp T (2018) Detection and molecular characterisation of a dsRNA virus in the filamentous fungus, *Umbelopsis ramanniana*. In: Bielen A, Ježić M, Jurak I, Škorić D, Tomaić V (eds) Power of Viruses: Programme and Abstracts Zagreb, Horvátország: Croatian Microbiological Society, p. 51.

Kartali T, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Patai R, Polgár FT és mtsai (2019) Molecular characterization of dsRNA genomes of viruses isolated from *Umbelopsis* isolates. *Acta Microbiol Imm H* 66: 149-150.

Kartali T, Nyilasi I, Sávai G, Kocsubé S, Patai R és mtsai (2020) Molecular characterization of novel dsRNA viruses isolated from different zygomycete fungi. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium: Absztraktfüzet: p. 16.

Kartali T, Nyilasi I, Sávai G, Kocsubé S, Patai R és mtsai (2020) Detection and molecular characterization of novel dsRNA viruses isolated from different Zygomycete fungi. In: 15th European Conference on Fungal Genetics (ECFG15): Program and Abstracts: Fungal genetics, host pathogen interaction and evolutionary ecology, pp. 254-255.

Kartali T, Nyilasi I, Kocsubé S, Patai R, Polgár FT és mtsai (2021) Description of five novel mycoviruses belonging to the *Totiviridae* family in four different *Mucor hiemalis* strain. *Acta Microbiol Imm H* 68: 78.

Egyéb közlemények: MTMT azonosító: 10053000

Társszerzői nyilatkozat

Alulírottak, Dr. Csernetics-Nyilasi Ildikó és Prof. Dr. Papp Tamás kijelentjük, hogy Kartali Tünde szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Kartali T, Nyilasi I, Szabó B, Kocsubé S, Patai R, Polgár TF, Nagy G, Vágvölgyi Cs, Papp T (2019) Detection and molecular characterization of novel dsRNA viruses related to the *Totiviridae* family in *Umbelopsis ramanniana*. *Front Cell Infect Microbiol* 9: 249.

Kartali T, Nyilasi I, Kocsubé S, Patai R, Polgár TF, Zsindely N, Nagy G, Bodai L, Lipinszki Z, Vágvölgyi Cs, Papp T (2021) Characterization of four novel dsRNA viruses isolated from *Mucor hiemalis* strains. *Viruses* 13: 2319.

címmel megjelent közleményekben. A publikációkban közölt eredményeket tudományos fokozat (PhD) megszerzésére a társszerzők nem használták fel és ezt a jövőben sem teszik.

Szeged, 2022. március 09.

Dr. Csernetics-Nyilasi Ildikó

Prof. Dr. Papp Tamás