

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Pinczés Dóra

Budapest

2024



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

**A MOZGÁSI FEHÉRJE SZEREPE A CMV ÉS A PSV ELTÉRŐ
GAZDANÖVÉNYKÖRÉBEN ÉS A TÜNETEK
KIALAKULÁSÁBAN**

DOI: 10.54598/006060

Pinczés Dóra

Budapest

2024

A DOKTORI ISKOLA:

Megnevezése: **Kertészettudományi Doktori Iskola**

Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Vezetője: **Zámboriné Dr. Németh Éva**

tanszékvezető, egyetemi tanár, DSc

Kertészettudományi Intézet, Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezetők: **Dr. Salánki Katalin**

tudományos tanácsadó, DSc

Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet,
Növénykórtani Osztály

Dr. Palkovics László

egyetemi tanár, DSc

Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar

.....

Az iskolavezető aláírása

.....

A témavezetők jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	1
I. Bevezetés	3
II. Célkitűzés	4
III. Irodalmi áttekintés	5
3.1. A CMV és PSV általános jellemzése	5
3.1.1. A CMV és PSV részecske- és genomszerveződése.....	5
3.1.2. A CMV és PSV alcsoportjai	7
3.1.3. A CMV és PSV terjedése.....	8
3.1.4. A CMV és PSV MP jellemzése.....	9
3.1.5. A CMV és PSV gazdanövényköre	11
3.2. A CMV és PSV gazdanövénykört befolyásoló tényezők.....	14
3.2.1. Cucumovírusok rekombinációja, reasszortációja	14
3.2.2. A vírus-növény kapcsolat szerepe a gazdanövénykör meghatározásában	15
3.2.3. A Replikáz komplex patogenításban betöltött szerepe	16
3.2.4. A virális géncsendesítés szupresszor szerepe a patogenításban	17
3.2.5. A mozgási fehérje patogenításban betöltött szerepe.....	18
3.2.6. A CP patogenításban betöltött szerepe	19
3.2.7. Kevert fertőzések.....	20
3.2.8. Szatellit RNS-ek.....	21
IV. Anyag és módszer.....	23
4.1. Dolgozatban felhasznált anyagok.....	23
4.1.1. Növény anyag.....	23
4.1.2. Vírus izolátumok, fertőzőképes klónok	23
4.1.3. Baktérium törzsek és plazmidok	24
4.2. Dolgozatban alkalmazott módszerek.....	24
4.2.1. MP rekombináns fertőzőképes klónok elkészítése	24
4.2.2. <i>In vitro</i> transzkripció, inokulálás, virion tisztítás	30
4.2.3. MP-eGFP fúziós fehérjék készítése sejten belüli lokalizáció vizsgálatához.....	32
4.2.4. <i>Agrobacterium</i> transzformálás és <i>Agrobacterium</i> -közvetített tranziens génexpresszió	34
4.2.5. Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia	35
4.2.6. Statisztikai analízis, képfeldolgozás	36
4.2.7. Vírusok detektálása, RNS kivonás, cDNS, RT-PCR.....	36
4.2.8. eGFP detektálása, fehérjekivonás, Western blot analízis.....	38
V. Eredmények.....	39

5.1. CMV és PSV gazdanövénykörének és tüneteinek változatossága kertészeti termesztésben előforduló gazdanövényeken és virológiai kutatásokban használt teszt növényeken	39
5.2 Fertőzőképes RNS3 reasszortáns és MP rekombináns vírusok készítése és <i>Nicotiana benthamiana</i> teszt növény inokulálása.....	42
5.3 <i>Capsicum annuum</i> fertőzése RNS3 reasszortáns és MP rekombináns vírusokkal.....	49
5.4 CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációja <i>Nicotiana benthamiana</i> sejtekben.....	52
5.5 CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációja <i>Capsicum annuum</i> sejtekben.....	59
VI. Következtetések.....	63
VII. Új tudományos eredmények.....	67
VIII. Összefoglalás magyar és angol nyelven	68
8.1 Összefoglalás	68
8.2. Summary.....	69
IX. Köszönetnyilvánítás.....	71
Mellékletek.....	72
Irodalomjegyzék.....	72

Rövidítések jegyzéke

AMV	lucerna mozaik vírus (<i>Alfalfa mosaic virus</i>)
bp	bázispár
BMV	rozsнок mozaik vírus (<i>Brome mosaic virus</i>)
BYMV	bab sárga mozaik vírus (<i>Bean yellow mosaic virus</i>)
CAP	7-metilguanozin sapka (m ⁷ GpppG)
cDNS	komplementer DNS (complementer DNA)
CMV	uborka mozaik vírus (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CP	köpenyfehérje (coat protein)
CymRSV	cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (<i>Cymbidium ringspot virus</i>)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dpi	fertőzést követő napok száma (days post inoculation)
dsRNS	kettős szálú RNS (double-stranded RNA)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
GRV	földimogyoró rozettásodás vírus (<i>Groundnut rosette virus</i>)
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktozid
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani táptalaj/tápoldat
miRNS	mikro-RNS
MP	mozgási fehérje (movement protein)
nt	nukleotid
OD ₆₀₀	optikai denzitás (600 nm)
ORF	nyílt leolvasási keret (open reading frame)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PdAP	plazmodezma- kapcsolt fehérjék (PD-associated proteins)
PepMV	pepino mozaik vírus (<i>Pepino mosaic virus</i>)
PSV	földimogyoró satnyulás vírus (<i>Peanut stunt virus</i>)
PVY	burgonya Y vírus (<i>Potato virus Y</i>)
PTGS	poszt-transzkripcionális géncsendesítés (post-transcriptional gene silencing)

RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
satRNS	szatellit ribonukleinsav
siRNS	kis interferáló RNS (small interfering RNA)
SEL	a plazmodezma áteresztő képessége (size exclusion limit)
SMV	szója mozaik vírus (<i>Soybean mosaic virus</i>)
STV	déli paradicsom vírus (<i>Southern tomato virus</i>)
TAV	paradicsom magtalanság vírus (<i>Tomato aspermy virus</i>)
TMV	dohány mozaik vírus (<i>Tobacco mosaic virus</i>)
TNS	totál nukleinsav. össznukleinsav
TRSV	dohány gyűrűsfoltosság vírus (<i>Tobacco ringspot virus</i>)
tRNS	transzfer ribonukleinsav

I. Bevezetés

A vírusok szubmikroszkópikus kórokozók, a természetben mindenütt jelen vannak, így a növények vonatkozásában, mind a vadonélő fajok, mind a kultúrnövények esetén gondot okozhatnak, komoly veszélyt jelenthetnek a mezőgazdasági termesztésre. A vírusok esetén gyakori könnyen végbemenő mutációs és rekombinációs események, új fajok, izolátumok, akár rezisztenciatoró izolátumok megjelenéséhez vezetnek. A kultúrnövények vírusos megbetegedéseinek veszélyét jelentősen fokozza a szaporítóanyagok kontinensek és országok közötti könnyű mozgása, a környezeti feltételek főként a globális felmelegedés miatti változások, valamint a mezőgazdasági termékek nemzetközi importjának és exportjának növekedése. A növényi vírusok által okozott károk megjelennek a termés hozam csökkenésben, valamint a növényi termékek minőségének romlásában is, mely az egész bolygó élelmezésére kihatással van.

A növényi vírusok elleni védekezés napjainkig nagy kihívást jelent a mezőgazdaság számára. A molekuláris szintű növény-vírus kölcsönhatásokkal kapcsolatos ismereteink rohamosan bővülnek, amelyek által betekintést nyerhetünk abba, hogy a növényi vírusok a gazdanövény sejtjeibe jutva hogyan programozzák át annak működését, saját replikációjuk és növényben való terjedésük érdekében. Ezen mechanizmusok ismerete, megértése a biotechnológia fejlődésével új lehetőségeket kínál a növényi vírusok elleni védekezésre, rezisztens, ellenálló növények létrehozására.

A dolgozatban szereplő uborkamozzaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) és a földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) a legszélesebb és legváltozatosabb gazdanövénykörrel rendelkező nemzetség, a Cucumovírus nemzetség tagjai. A CMV a termesztett zöldség-növényeinket veszélyeztet leginkább, azon belül is a kabakosokat (*Cucurbitaceae*), a paprikát (*Capsicum Annuum* L.), és a paradicsomot (*Solanum lycopersicum* L.), míg a PSV leginkább pillangósvirágú növényeket fertőzi (*Fabaceae*). A két vírus nagyon hasonló genomszerveződése és aminosav sorrendje ellenére gazdanövénykörük jelentősen eltér.

Napjainkig már a cucumovírusok mindegyik fehérjét kódoló génjét azonosították patogenitásért felelős génként. A mozgási fehérje (MP) működéséről, valamint az MP növényi fehérjékkel való kapcsolatának pontos mechanizmusáról a rendelkezésre álló információk azonban hiányosak, ebben a dolgozatban ezt a tudásbázist szeretném bővíteni.

II. Célkitűzés

Munkánk során célul tűztük ki:

1. CMV és PSV gazdanövénykörének és tüneteinek vizsgálata kertészeti termesztésben előforduló gazdanövényeken és virológiai kutatásokban használt tesztnövényeken.
2. Fertőzőképes CMV és PSV klónok felhasználásával CMV és PSV RNS 3 reasszortáns és MP rekombináns vírusok létrehozása fertőzőképes *in vitro* vírus transzkriptumok felhasználásával, vírusok fertőzőképességének vizsgálata.
3. *Nicotiana benthamiana* Domin. és *Capsicum annuum* L. cv. Brody tesztnövények inokulálása a reasszortáns és rekombináns vírusokkal, a kialakult tünetek jellemzése, tünetbeli különbségek megfigyelése.
4. CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálata *N. benthamiana* Domin és *C. annuum* L. cv. Brody epidermisz sejtekben.
5. CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék növényi plazmodezmákkal való kolokalizációjának vizsgálata *N. benthamiana* sejtekben, plazmodezmákhoz való kötődés vizsgálata plazmolizált sejtekben.
6. CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék növényi plazmodezmákkal való kolokalizációjának vizsgálata *C. annuum* cv. Brody növények epidermisz sejtjeiben.

III. Irodalmi áttekintés

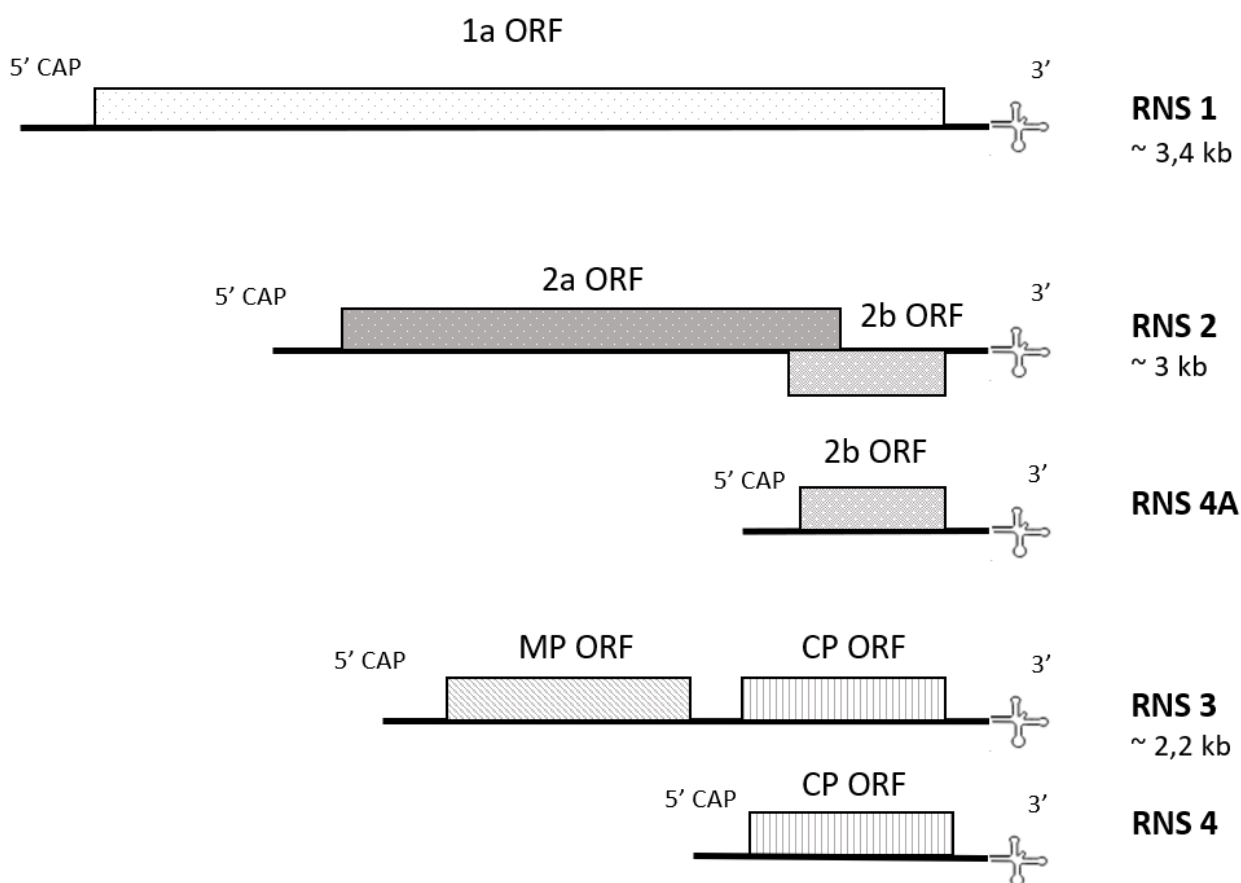
3.1. A CMV és PSV általános jellemzése

3.1.1. A CMV és PSV részecske- és genomszerveződése

A CMV és a PSV egyaránt a *Cucumovirus* nemzetség tagja, mely az *Alfamo*-, *Ilar*-, *Bromo*- és *Oleavirus* nemzetségekkel együtt a *Bromoviridae* családkhoz tartozik, mely több másik családdal együtt a *Nidovirales* rend tagja. A *Bromoviridae* családba több mint 10000 vírusfaj tartozik. Mezőgazdasági szempontból a *Bromoviridae* családon belül a *Cucumovirus* a legjelentősebb nemzetség (PRINGLE és MAYO, 1998)

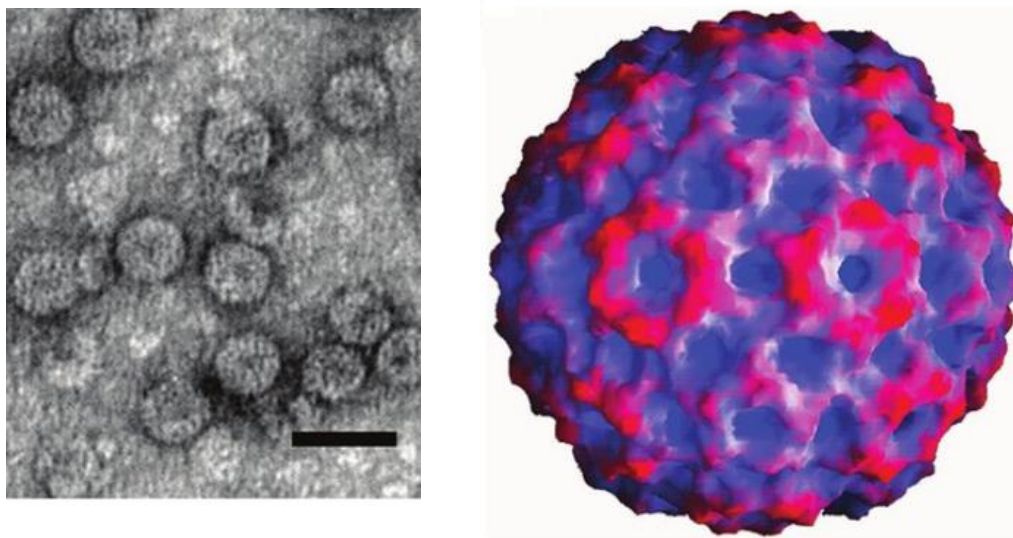
A CMV és a PSV a *Cucumovirus* nemzetségre jellemző genomszerveződéssel rendelkezik, osztott genomú, pozitív orientációjú, egy szálú RNS genommal rendelkező vírusok, három genomi RNS-ük és két szubgenomi RNS-ük van. Osztott genomjuk összességében hozzávetőleg 8 kilobázis (kb) méretű. A három pozitív orientációjú RNS szál, mindössze öt fehérjét kódol, melyek mindegyike több funkciót lát el. A vírus replikációjáért az 1a fehérje és a 2a fehérje felelős, melyeket az RNS1 és az RNS2 kódol (1. ábra) (HAYES és BUCK, 1990; NITTA és mtsai., 1988). Az RNS1 körülbelül 3,3 kb hosszúságú, RNS2 pedig 3 kb. A 2,2 kb hosszúságú RNS3 kódolja a vírus sejtről-sejtre terjedéséhez szükséges MP-t és a köpenyfehérjét (CP), mely a szubgenomi RNS4-ről transzlálódik és a vírus RNS becsomagolásán kívül a tünetek kialakításában és a vektor átvitelben betöltött szerepét is igazolták (1. ábra) (CANTO és mtsai., 1997; KAPLAN és mtsai., 1997; SUZUKI és mtsai., 1991; WEBER és BUJARSKI, 2015). A *Bromoviridae* családon belül kizárólag az *Ilarvirus* és *Cucumovirus* nemzetség rendelkezik egy 2b-nek nevezett ötödik fehérjével is, amit az RNS2 kódol és a 2a fehérje C-terminális régiójának egy részével átfed, azonban attól eltérő nyílt leolvasási keretből íródnak át (JI és DING, 2001; SHI és mtsai., 2002). A 2b fehérje fő funkciója a növényi géncsendesítés szuppresszió (BRIGNETI, 1998), de a gazdanövény specifikálásban, illetve a vírus hosszú távú mozgásában is igazolták a szerepét (DING és mtsai., 1995). A cucumovírusok genomi és szubgenomi RNS-einek az 5' végén 7-metil-guanozin sapka (CAP) található, 3' végén erősen konzervált régió található, ami tRNS szerű másodlagos szerkezetet vesz fel, és így a vírus replikációjánál az antiszenz szál promótereként szolgál (1. ábra) (JOSHI és mtsai., 1983; RIETVELD és mtsai., 1983). A virion a növényi sejtekbe kerülése után kicsomagolódik, majd a pozitív szálú RNS-ekről az RNS-ek 5' végén található fehérjék szintetizálódnak. A vírus replikáció negatív szálú RNS szintézissel veszi kezdetét, melyekről később a többi pozitív szálú RNS szintetizálódik.

A genomi RNS-ek mRNS-ként funkcionálnak vírusfehérjék transzlációjához, illetve a vírusreplikáció templatjaként is szolgálnak és a virionok kialakításában is részt vesznek. Az öt gén fehérje expressziójának mennyisége eltérő, legtöbb a CP-ből keletkezik, amit az 1a és 2a fehérjék követnek, a legkevesebb pedig a 3a fehérjéből transzlálódik. A fertőzés elején az MP expressziója magasabb, míg a CP-ből később íródik át nagyobb mennyiség (KWON és CHUNG, 2000).



1. ábra. *Cucumovirus* nemzetség genomszerveződésének sematikus ábrázolása

A CMV és PSV virionjának tulajdonságai *Bromoviridae* családra jellemzőek csomagt csúcsú ikozaéder alakúak, amely 29 nm átmérőjű, 180 egyforma CP alegységből épülnek fel. (2. ábra). A három pozitív szálú RNS három különböző partikulumba csomagolódik, a két szubgenomi RNS-el együtt (SALÁNKI és mtsai., 2018). A virionok alkotórészeikre bonthatóak detergenssekkel, vagy nagy koncentrációjú sóoldatokkal és érzékenyek RNázal való emésztésre a CP alegységek közötti laza illeszkedés miatt (SMITH és mtsai., 2000).



2. ábra. *Cucumovirusokra* jellemző víruspartikulum szerkezete, negatív kontrasztú elektronmikroszkópos felvétel (bal oldal) és térszerkezeti modellje (jobb oldal) Forrás: (BUJARSKI és mtsai., 2019).

3.1.2. A CMV és PSV alcsoportjai

A CMV izolátumokat nukleinsav sorrend homológia alapján I-es és II-es alcsoportokra osztjuk (WAHYUNI és mtsai., 1992), amelyek megfelelnek a DTL és ToRS csoportnak (DEVERGNE és CARDIN, 1973), illetve a C és B patotípusnak (DANIELS, 1992). Mind az I-es, mind a II-es alcsoportot leírták már Magyarországról (SZILASSY és mtsai., 1999). Az I. alcsoport izolátumai nukleotid szinten 88%-os hasonlóságot mutatnak míg a II-es alcsoport kevésbé heterogén, az izolátumok 96%-os azonosságot mutatnak (PALUKAITIS és GARCÍA-ARENAL, 2003). Az I-es alcsoport az RNS3 molekula 5' végi nem-kódoló régiójának nukleotid sorrendje alapján tovább osztható IA és IB csoportokra, melyek közül az IA izolátumok széleskörben elterjedtek az egész világon, míg az IB izolátumok jellemzően Ázsiában fordulnak elő (DEVERGNE és mtsai., 1981; ROOSSINCK és mtsai., 1999).

A cucumovírusok nemzetségébe tartozó vírusok között szerológiai és molekuláris szempontból a PSV a legheterogénebb kórokozó (PALUKAITIS és GARCÍA-ARENAL, 2003). Négy alcsoportba sorolhatók az izolátumok a vírusgenom nukleotid sorrend azonosság alapján, egy csoportba azok az izolátumok tartoznak, melyek nukleotid sorrendje 90%-nál nagyobb azonosságot mutat (HAJIMORAD és mtsai., 1999). Az I-es, illetve II-es alcsoport tagjait Észak-Amerikában írták le, az I-es csoport PSV-E izolátumról kapta elnevezését (E-eastern), a II-es

pedig a PSV-W izolátumról (W-western) (HU és GHABRIAL, 1998; MINK és mtsai., 1969; NAIDU és mtsai., 1995). A III. alcsoport izolátumai Kínából kerültek leírásra (XU és mtsai., 1998; YAN és mtsai., 2005). Magyarországon határoztak meg egy IV. alcsoportot melyhez akácról izolálták a PSV-t (KISS és mtsai., 2008).

3.1.3. A CMV és PSV terjedése

A növényi vírusok fertőzésének első lépése, hogy a növényi sejtekbe kerüljenek. A CMV és PSV mechanikai úton átvihetőek, afidofil vírusok, melyek legjelentősebb átviteli formája a levéltetvek általi átvitel, nem perzisztens módon (stylet-borne), vagyis a levéltetvek a felvett vírust rövid ideig képesek csak hatékonyan átvinni egy másik növényre. Közel 60 levéltetűfajt írtak le, amelyek képesek a CMV és PSV átvitelére (EDWARDSON és CHRISTIE, 2018; HEBERT, 1967).

A PSV leggyakoribb vektora a fekete bükköny levéltetű (*Aphis craccivora* Koch.), a spirea levéltetű (*Aphis spiraecola* Patch.) és a zöld őszibarack-levéltetű (*Myzus persicae* Suzler.) (HEBERT, 1967), míg a CMV jelentősebb vektorai a feketerepa-levéltetű (*Aphis fabae* Scopoli.), az uborka-levéltetű (*Aphis gossypii* Glover.) illetve a PSV-hez hasonlóan a zöld őszibarack-levéltetű (*Myzus persicae* Suzler.) (GILDOW és mtsai., 2008).

A CMV maggal való átvitelét több gazdanövénynél leírták (PALUKAITIS és mtsai., 1992), a mag felületén a CMV nem marad életképes, a virion instabilitása miatt. A mag belsejében képes fennmaradni, bab és spenót esetén jelenlétét az embrióban írták le (YANG és mtsai., 1997), majd később lencséről (MAKKOUK és ATTAR, 2003) és csillagfűtről (O'KEEFE és mtsai., 2007) is leírták a magátvitelt.

A PSV esetén maggal történő átvitel gazdaságilag nem jelentős, a fertőzött magból kelő csíranövények a csírázás után rövidesen elpusztulnak a fertőzés hatására, így nem tudják biztosítani a vírus további terjedését (TROUTMAN, 1966).

A CMV esetén élősködő gyomnövények, arankafélék (*Cuscuta* spp.) segítségével való terjedést is megfigyeltek, mely így rezervoárként és vektorként is fontos mezőgazdasági szempontból (TEOFANOVA és mtsai., 2022).

A vektorok segítségével, vagy egy sérülésen keresztül passzív módon a növényi sejtbe jutott vírus RNS kicsomagolódik, majd a vírus RNS-ekről fehérjék transzlálódnak, majd replikálódik a vírus. A gazdanövény megbetegítésének következő lépésben az elsődlegesen fertőzött sejtekből a

szomszédos sejtekbe kell átjutnia a vírusnak, ezt nevezzük sejtről-sejtre való terjedésnek, ami a növényi plazmodezmákon keresztül történik.

A cucumovírusok esetében elsődleges szerepe a sejtről-sejtre való terjedésben az MP-nek van, mely képes nukleinsavak, így vírus RNS kötésére, illetve a plazmodezmáknál lokalizálódva ideiglenesen megváltoztatja azok szerkezetét, növelve azok átjárhatóságát. A nukleoprotein-komplex ezeknek a folyamatoknak a következtében képes átjutni a plazmodezmán keresztül a szomszédos sejtbe (BOCCARD és BAULCOMBE, 1993; HULL, 2002). Az MP kölcsönhatásba lép a plazmodezma konformációját meghatározó molekulákkal, mint például a kallóz vagy különböző plazmodezma- kapcsolt fehérjék (PD-associated proteins, PdAPs) pl.: pektin metil-transzferáz, synaptotagmin, remorin (AMSBURY és mtsai., 2018; DOROKHOV és mtsai., 2019). A vírus sejtről-sejtre terjedésében a CP is szerepet játszik.

A vírus úgynevezett hosszú távú mozgása során, a növény távolabbi részeihez a szállítószöveteken keresztül jut el a vírus, ennek következtében alakul ki szisztemikus fertőzés. CMV virion formában mozog hosszú távon, de bizonyos esetekben becsomagolódni képtelen CMV mutánsok esetében is megfigyeltek hosszú távú mozgást (NG és mtsai., 2005; PIERRUGUES és mtsai., 2007). A cucumovírusok mozgásában meghatározó szerepe van az MP-nek és a CP-nek is (KAPLAN és mtsai., 1998). A vírus RNS nukleoprotein-komplex formában (RNS, CP, MP) jut a kísérősejtből a plazmodezmákon keresztül a rostacsó elemekbe. A rostacsó elemekben az MP leválik a komplexről, és összeépül a virion a vírus RNS és a CP részvételével, ilyen formában kerül a vírus a floémbe (BLACKMAN és mtsai., 1998).

3.1.4. A CMV és PSV MP jellemzése

A dolgozatban kísérleteink során főként a cucumovírus MP-t vizsgáltuk, így ezt a fehérjét jellemzem részletesebben. A 3a fehérje a cucumovírusok legrövidebb genomi RNS száláról, az RNS3-ről transzlálódik. A 3a fehérje a vírus MP-je, fő funkciója a vírus plazmodezmákon keresztül történő sejtek közötti mozgásának (sejtről-sejtre való terjedés) támogatása (BLACKMAN és mtsai., 1998). A cucumovírusoknál a vírus genom által kódolt, mind az öt fehérjének a funkcióját összefüggésbe hozták a vírus mozgásával (SALÁNKI és mtsai., 2018).

Az öt fehérje közül a CMV 3a fehérjét aminosav sorrend homológia alapján azonosították a vírus mozgási fehérjéjeként. A fehérje N-terminális régiójában van egy 33 aminosavból álló szakasz, ami konzervatív rész a növényi vírusok MP szekvenciájában (MUSHEGIAN és KOONIN, 1993). A 30-kDa nagyságú TMV MP volt az első olyan fehérje, amelyről bizonyították, hogy a

növényi vírusok külön fehérjét kódolnak a vírus növényi sejtek közötti mozgásának támogatására (DEOM és mtsai., 1987). A CMV 3a fehérje aminosav sorrendje a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 30K fehérjéjével homológ, így a '30K' szupercsaládba sorolják (MELCHER, 2000). A 30K szupercsaládba tartozó MP-k tartalmaznak egy 33 aminosav hosszú konzervált régiót, amely a PSV izolátumok esetében 0–8 aminosavban tér el a fajon belül, míg CMV esetén egy aminosavban (HU és GHABRIAL, 1998). A 30K szupercsaládba tartozó MP-re jellemző, hogy a növényi plazmodezmáknál lokalizálódnak, képesek RNS kötésére, és a plazmodezmák szerkezetének megváltoztatására, az F-aktin filamentumokkal kölcsönhatásba lépve, azok polimerizációjának gátlásával és elbontásukkal (HULL, 2002). A plazmodezmák átjárhatóságának (size exclusion limit, SEL) ideiglenes megnövelésével, elősegítik a nukleoprotein-komplex átjutását a szomszédos sejtbe (SU és mtsai., 2010). A plazmodezmához való eljutásért és azon való átjutásért az MP központi részén található cisztein és hisztidin aminosavakban gazdag „zinc-binding” domén a felelős (SASAKI és mtsai., 2006).

A cucumovírusok ribonukleoprotein komplex formában mozognak a növényi sejtek között, melyhez a 30K szupercsaládra jellemzően a MP nem csak a plazmodezmák méretét szabályozza, hanem RNS kötő tulajdonsággal is rendelkezik. A CMV MP *in vitro* nukleinsav kötő tulajdonságát LI és PALUKAITIS 1996-ban bizonyította (LI és PALUKAITIS, 1996). Később a 174–233 aminosav közötti régiót azonosították az RNS kötésért felelős szakaszként (VAQUERO és mtsai., 1997). Azonban a 174–233 aminosav régióban feltehetően több RNS kötő domén is jelen van, ugyanis a 160–200 vagy a 200–246 aminosav deléciója nem befolyásolta *in vitro* a fehérje RNS kötő tulajdonságát (YOU és mtsai., 1999). A CMV MP középső régiójában egy a membrán fehérjékre jellemző hidrofób domén helyezkedik el a 86–108 aminosavak között, mely konzervált régió 17 vírusnemzetség MP-jében (MELCHER, 2000; MUSHEGIAN és KOONIN, 1993). Ebben a doménben a 97. és 98. aminosavban történő mutáció esetén a vírus elveszítette fertőzőképességét (LI és mtsai., 2001). Az MP C-terminális végének 33 aminosav deléciója esetén a vírus nem képes szisztémikus mozgásra dohány növényben (KIM és mtsai., 2004), ugyanakkor a sejtről-sejtre terjedéshez ezeknél a mutánsoknál nem szükséges a CP.

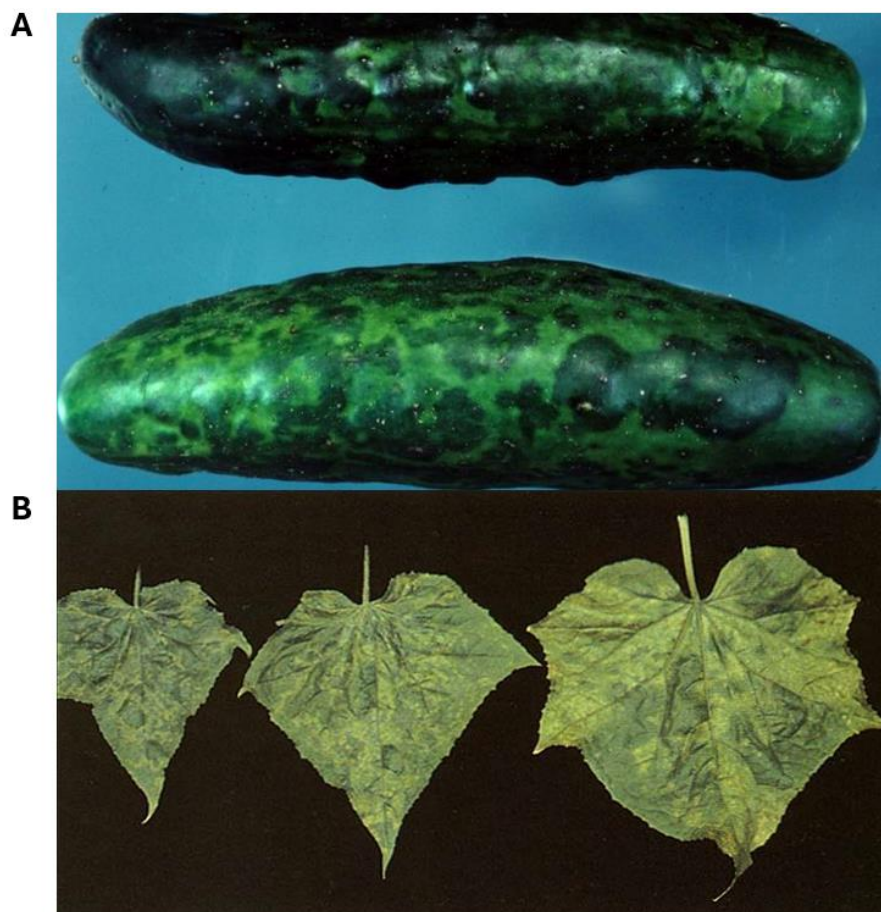
A CMV MP az úgynevezett tubulus-stratégiát alkalmazza a rövid távú mozgás során, ami jellemző a *Bromoviridae* családra. Az MP kis csövecskéket (tubulusokat) alakít ki, a plazmodezmák dezmotubulusai eltávolítása után, így ezeken keresztül a citoplazmában összeállt virion átjuthat a szomszédos sejtbe (CANTO és PALUKAITIS, 1999; HULL, 2002). Az MP N-terminális 20-as aminosav szükséges a 2a fehérjével való kölcsönhatáshoz. A kapcsolatban a 2a N-terminális 21-es aminosava és a GDD motívum játszik szerepet, a 2a fehérje pontos szerepe a

sejtről-sejtre terjedésben ugyanakkor nem tisztázott még (HWANG és mtsai., 2005, 2007). A CMV MP foszforilációját leírták transzgénikus dohánynövényekben, azonban a pontos foszforiláló aminosav pozíciókat még nem határozták meg (MATSUSHITA és mtsai., 2002), de a MP 28 Ser foszforilációja fontos szerepet játszik a MP plazmodezma lokalizációjában (2002; SÁRAY és mtsai., 2021).

3.1.5. A CMV és PSV gazdanövényköre

A CMV-t először az USA-ban kabakosokról írták le (DOOLITTLE, 1916), napjainkra már az egész világon leírták jelenlétét. A CMV genomja nagy változékonyságot mutat és jól tűri a mutációkat is mely tulajdonságok közre játszhatnak a széles gazdanövénykör kialakulásában (SCHNEIDER és ROOSSINCK, 2000). Magyarországon 1941-ben azonosították először (SZIRMAI, 1941). A cucumovírusok között a legszélesebb és legváltozatosabb gazdanövényköre van, 101 növénycsaládból, több mint 1200 gazdanövényét azonosították egyszikűek és kétszikűek köréből egyaránt, melyek közt gazdaságilag jelentős dísznövények, termesztett gyümölcsök, szántóföldi növények és főként nagy mezőgazdasági jelentőséggel bíró zöldségnövények szerepelnek, pl. paprika, paradicsom, uborka, cukkini, dinnye (EDWARDSON és CHRISTIE, 2018; FLASINSKI, 1995; TOMLINSON, 1987). Újabb kutatások leírták a CMV fertőzést bazídiumos gombák törzséből (*Rhizoctonia solani*), mely laboratóriumi körülmények között át is tudta adni a vírust, nem fertőzött burgonya növénynek (ANDIKA és mtsai., 2017). Később tömlősgombák törzséből *Colletotrichum acutatum*-ról is leírták, hogy képes benne replikálódni a CMV. Ezen eredmények fényében felmerült a növénypatogén gombák szerepe is a vírus terjesztésében (MASCIA és mtsai., 2019).

A CMV igen változatos tüneteket okozhat gazdanövénytől és izolátumtól függően. Legtöbb növényen a jellemző tünetek a levéllemezen megjelenő sárgás foltok, később jellegzetes mozaikos foltosság vagy apró nekrózisek, levelek deformációja, fejlődésben való visszamaradottság az egészséges levelekhez képest, fertőzött növények törpülése. Kabakosok esetén a levélnyel és az inda is visszamarad a fejlődésben. Termésdeformáció jelentkezik, dudorok és jellegzetes márványozottság is kialakulhat a terméseken (3. ábra). Paprika termésén színváltozásokat, a termés barnulását okozhatja (4. ábra).



3. ábra. A: CMV-vel fertőzött uborka termésen megjelenő tünetek

(Forrás: <https://extension.usu.edu/vegetableguide/cucumber-melon-pumpkin-squash/cucumber-mosaic-virus>), B: CMV-vel fertőzött uborka növényen megjelenő/kialakuló tünetek levélen (Forrás: <https://aggie-horticulture.tamu.edu/wp-content/uploads/sites/10/2011/11/mosaic2.jpg>)



4. ábra. CMV fertőzés tünetei paprika termésen (Fotó: Almási Asztéria)

Míg a CMV a fent említett széles gazdanövénykörrel rendelkezik, a PSV gazdanövényköre lényegesen szűkebb, a két vírus rokonsága és hasonló genomszerveződésük ellenére, a PSV gazdanövényköre főként a pillangósvirágúakra (Fabaceae) korlátozódik.

A PSV-t először földimogyoróról (*Arachis hypogea* L.) szintén az USA-ban, Virginia államban írták le. A vírussal fertőzött területeken akár 95%-kal is csökkent a termésmennyiség. A földimogyoró növény levelein és az egész növényre kiterjedő satnyulást, törpülést, mozaikos foltosodás megjelenését és a termések deformációját figyelték meg (5. ábra) (TROUTMAN, 1966).

A PSV földimogyorón kívül 16 növény családba sorolható 73 fajt fertőz szisztemikusan vagy lokálisan, melyek közül a legfontosabbak: szójabab (*Glycine max* L.), lucerna (*Medicago sativa* L.), bab (*Phaseolus vulgaris* L.), borsó (*Pisum sativum* L.), kínai bab (*Vigna unguiculata* L.), herefélék (*Trifolium* spp.), csillagfürt (*Lupinus luteus* L.), csattanó maszlag (*Datura stramonium* L.) új-zélandi spenót (*Tetragonia tetragonoides* L.), törökszegfű (*Dianthus barbatus* L.) (XU és mtsai., 1986).



5. ábra. PSV földimogyorón okozott tünetei (Forrás: Florida Division of Plant Industry , Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Bugwood.org)

Magyarországon a PSV jelenlétéről 1978-ban számoltak be először, vörösheréről (*Trifolium pratense* L.) izolálták (PSV-Tp) (BECZNER és mtsai., 1978). Később Magyarországról fehér akácról (*Robinia pseudoacacia* L.) izoláltak Rp-PSV-t, mely taxonómiaiilag távolinak bizonyult a vörösheréről izolált PSV-től. Akácon a fiatal hajtásokon mozaikos tüneteket és levéldeformációt figyeltek meg (KISS és mtsai., 2008). Mint vírus rezervoár kiemelkedő jelentőségű a fehér akác szerepe (XU és mtsai., 1994).

3.2. A CMV és PSV gazdanövénykörét befolyásoló tényezők

3.2.1. Cucumovírusok rekombinációja, reasszortációja

A *Bromoviridae* családon belül, a nemzetségek (*Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Ilarvirus*) kialakulásában jelentős szerepet játszott a rekombináció, és az osztott genommal rendelkező vírusok esetében, az egyes genomi RNS-ek átrendeződésével járó reasszortáció (CODOÑER és ELENA, 2008). A Cucumovírusokra jellemző a vírusgenom nagyfokú változékonysága, könnyen kialakulnak természetes körülmények között is, rekombináns és reasszortáns vírusok. Cucumovírusokra jellemző továbbá, a mutációkkal szembeni tolerancia, a fent említett folyamatokkal magyarázható széles elterjedésük és változatos gazdanövénykörük (SCHNEIDER és ROOSSINCK, 2000). Az RNS-ek közötti rekombinációs esemény bekövetkezése nem véletlenszerűen, hanem az úgynevezett stem-loop motívumoknál várható, melyek másodlagos szerkezetű motívumok (SUZUKI és mtsai., 2003).

White és mtsai. 1995-ben leírtak természetes körülmények között, babról (*Phaseolus vulgaris*) izolált reasszortáns cucumovírust, melynek genomja a PSV RNS1 és RNS2-ből és CMV RNS3-ból állt (WHITE és mtsai., 1995). CMV RNS2 és RNS3, a paradicsom magtalanság vírustól (*Tomato aspermy virus*, TAV) származó RNS1 és RNS2-vel sikeresen fertőz dohánynövényeket (*Nicotiana benthamiana*). Az inokulált dohány növényből a TAV RNS2, valamint CMV RNS2 és RNS3 mellett kimutattak egy rekombináns RNS2 molekulát, melynek a 3' vég 320 nukleotidja TAV eredetű míg a többi része CMV-ből származó. Így a rekombináns RNS2 a TAV RNS2 helikáz alegységét tartalmazta és a CMV RNS2 polimeráz alegységét (MASUTA és mtsai., 1998). A replikációhoz szükséges 1a és 2a fehérje kompatibilitása még vírusnemzetségeken belül is fajspecifikus. A CMV és PSV 1a és 2a fehérjéje együtt képes a vírus replikáció biztosítására, azonban ebben a kombinációban nem képződik szubgenomi RNS4 (SUZUKI és mtsai., 2003).

Leggyakrabban a genomi RNS-ek közül az RNS3 esetében történik rekombináció. CMV és TAV kevert fertőzés esetén a vizsgált RNS3 molekuláknak 9,6%-a volt rekombináns, az azonosított 28 rekombináns régió közül a többség az RNS szál 5', 3' végén vagy az MP-t kódoló régióban volt detektálható (DE WISPELAERE és mtsai., 2005). CMV MP egy másik cucumovírus, a TAV CP-vel kompatibilis, azonban a TAV nem képes a sejtről-sejtre való terjedésre, ha a TAV MP mellett a rekombináns vírus CMV CP-t tartalmaz. Amikor a C-terminális 33 aminosav deléció TAV MP mutánsal végezték el ugyanezt a kísérletet, így a vírus képes volt a sejtről-sejtre való terjedésre. MP C-terminális 33 aminosava volt a felelős a TAV MP és CMV CP fehérje közötti kompatibilitásért (SALÁNKI és mtsai., 2004). Egy másik *Bromoviridae* családba tartozó vírus, a BMV esetén is igazolták a CMV MP C-terminális 33 aminosav szükségességét a CP-vel való kompatibilitáshoz (NAGANO és mtsai., 2001). PSV esetén ismertek reasszortáns vírus izolátumok. PSV-BV-15 izolátum RNS1 molekulája a II. alcsoportba míg a RNS2 és RNS3 az I. alcsoportból származik (HU és GHABRIAL, 1998). Egy iráni izolátum PSV-I, RNS1 és RNS2 része a genomnak egyik létező alcsoportba sem tudták besorolni Northern blot hibridizáció segítségével, míg a RNS3 a II-es alcsoportból származott, így ebben az esetben is reasszortáció feltételezhető (HAJIMORAD és mtsai., 1999).

3.2.2. A vírus-növény kapcsolat szerepe a gazdanövénykör meghatározásában

A növénypatogén vírusok gazdanövénykörét és a gazdanövényeken kialakított tüneteket meghatározó mechanizmusok, növény-vírus komplex kölcsönhatásainak, fehérje-fehérje interakcióinak eredménye.

A növényi vírusfertőzés különféle gazdanövény válaszokat eredményezhet. Amennyiben növény-vírus kapcsolat kompatibilis, a vírus az egész növényt megfertőzi, szisztemikus fertőzést, tüneteket okozva. Inkompatibilis növény-vírus kölcsönhatás esetén, a gazdanövény különböző szinteken képes elkerülni a vírusfertőzést. Bizonyos esetekben a vírus nem tud kölcsönhatásba lépni a gazdanövény fehérjéivel, így nem képes replikálódni (HAMAMOTO és mtsai., 1997), vagy sejtről-sejtre terjedni, vagy a hosszú távú mozgásra (MISE és mtsai., 1993; RYU és mtsai., 1998). Növényi oldalról például a hiperszenzitív reakció (HR) során nekrotikus lokális léziók megjelenésével a vírusfertőzés lokalizálódik az elsődlegesen fertőzött sejtek környezetében.

A növény közvetlenül a vírusfertőzés után felismerhet úgynevezett effektorokat, amelyek aktiválják a növény védekező mechanizmusát. Különböző vírus-gazda kombinációkban, vagy az RNS-függő RNS polimerázt (ABBINK és mtsai., 2001; LES ERICKSON és mtsai., 1999), a CP-t

(BENDAHDANE és mtsai., 1995; GILARDI és mtsai., 2004) vagy az MP-t (MESHI és mtsai., 1989; SCHOLTHOF és mtsai., 1995; WEBER és mtsai., 1993) avirulencia-determinánsként azonosították, de a vírus RNS-ét is kimutatták már, mint avirulencia faktor (SZITTYA és BURGYÁN, 2001).

Cucumovírusok közül a CMV összes fehérjéről igazolták a patogenitásban betöltött szerepét különböző gazdanövényeken, azonban TAV és PSV esetén kevesebb információ áll rendelkezésünkre.

3.2.3. A Replikáz komplex patogenitásban betöltött szerepe

Az 1a fehérje replikációban betöltött szerepén kívül bizonyították, hogy felelős azért is, hogy a különböző CMV törzsek eltérő tüneteket alakítanak ki dohány növényen. A CMV-Ns törzse dohány növényen lokális nekrotikus léziókat okoz, míg Rs-törzs szisztemikus klorotikus mozaikos tüneteket alakít ki. A CMV-Ns 1a fehérje 461-es pozícióban levő aminosava arginin, amennyiben ezt ciszteinre cserélték a vírus képes volt szisztemizálódni dohány növényben, fordított esetben, CMV-Rs elveszítette fertőző képességét (DIVÉKI és mtsai., 2004; SALÁNKI és mtsai., 2007). A CMV-Fny és CMV-Sny cukkini növényen eltérő intenzitású tüneteket okoznak. Ezen eltérés felelőségének szintén az 1a fehérjét azonosították (GAL-ON és mtsai., 1994; ROOSSINCK és PALUKAITIS, 1990). A paprika *Com1* gén rezisztenciát biztosít a legtöbb CMV törzzsel szemben, azonban léteznek rezisztencia törő törzsek. CMV-P1 esetén a rezisztencia törő tulajdonság az 1a fehérje helikáz doménjéhez köthető. Az 1a helikáz doménnel kölcsönható növényi fehérjéket monitoroztak paprikában, aminek során formiát-dehidrogenáz (FDH) és a kalretikulin-3 prekursor (CRT3) volt elengedhetetlen a CMV-P1 fertőzés kialakulásához (CHOI és mtsai., 2016). Dohány növény Tcoil metiltranszferáz egy olyan növényi fehérje mely az 1a fehérjét metilálja annak metiltranszferáz doménjéhez közvetlenül kötődve. Ez a kapcsolat a két fehérje között CMV szisztemikus terjedéséhez köthető, Tcoil túlexpresszállása fokozta a vírus szisztemikus fertőzőképességét, míg Tcoil csökkent expressziója csökkentette a vírus fertőzőképességét a vírus replikáció és sejtről-sejtre való terjedés befolyásolása nélkül (KIM és mtsai., 2008).

A CMV legtöbb törzse szisztemikusan nem fertőzi a hüvelyeseket, ezeken a növényeken HR reakciót vált ki, lokális léziókat okoz, azonban az I. alcsoportban vannak hüvelyeseket szisztemikusan fertőzni képes törzsek is. A 2a fehérje 631. pozícióban levő fenilalanin és a 641-es pozícióban található alanin mutációja felelős a HR kialakulásért, ugyanis a tehénborsót (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) fertőzni képes B-CMV törzsnél ezekben a pozíciókban tirozin és szerin található (KIM és PALUKAITIS, 1997). A 2a fehérje szerepét a gazdaspecifikus, illetve vírus törzs

specifikus virulenciában alátámasztotta, hogy tökön (*Cucurbita pepo* L.) a 2a fehérje határozta meg a szisztemikus tüneteket. CMV-Fny 2a fehérje, amely a 276-os pozícióban izoleucint tartalmazott szisztemikus mozaik tüneteket okozott tökön, míg CMV-pf törzse, mely ezen aminosav pozícióban treonint tartalmaz, klorotikus tüneteket okozott. A tünetek eltérését a sejtről-sejtre való terjedés sebessége magyarázta, ezt befolyásolta a 2a fehérje 276-os aminosava (CHOI és mtsai., 2005). Két I-es alcsoportba tartozó CMV, a CMV-Fny és CMV-CB7 2a fehérje C-terminális régiójának deléciója csökkentette a vírus RNS felhalmozódását, és *Nicotiana glutinosa* L. tesztnövényen a tünetek enyhülését okozta (DU és mtsai., 2008). A CMV 2a fehérje C-terminális régiója csak az I-es alcsoportnál vesz részt a virulencia meghatározásában, és a vírus RNS akkumulációban, ezt II-es alcsoportú CMV-nél nem figyelték meg (DING és mtsai., 1995). (SIDDIQUI és mtsai., 2011)

3.2.4. A virális géncsendesítés szupresszor szerepe a patogenítésben

A cucumovírus 2b fehérjének szerepét igazolták a gazdanövény specifitás meghatározásában (DING és mtsai., 1995).

N. benthamiana növényeken 2b fehérjét nem expresszáló PSV nem befolyásolta a vírus replikációt, a 2b fehérje deléciója azonban hatással volt felsőbb levelekben történő vírusakkumulációra (NETSU és mtsai., 2008). A 2b fehérje nyílt leolvasási keretében történő változás befolyásolja a vírus sejtről-sejtre való terjedését, melyet CMV (SOARDS és mtsai., 2002), PSV (NETSU és mtsai., 2008) és különböző cucumovírus rekombinánsok (SHI és mtsai., 2003) esetén is vizsgáltak. A 2b fehérje deléciója gátolja a vírus szisztemikus terjedését tök, paprika, paradicsom és uborka gazdanövényeken, dohány és lúdfű esetében a szisztemikus tünetek mérséklődését okozza (DING és mtsai., 1995; LEWSEY és mtsai., 2009; MASCIA és mtsai., 2010; MASIRI és mtsai., 2011; SOARDS és mtsai., 2002; WANG és mtsai., 2004). CMV I-es és II-es alcsoport által okozott tünetbeli eltérést a 2b fehérjében való különbségek okozzák (SHI és mtsai., 2002). Ezek a felfedezések azt mutatják, hogy a 2b közvetett szerepet játszik a virulenciában azáltal, hogy elősegíti a hatékony szisztemikus vírusfertőzést. Egy enyhe tüneteket okozó CMV törzsből származó 2b fehérje expressziója önamagában nem okozott tüneteket, azonban TMV fertőzés tüneteit súlyosbította (SIDDIQUI és mtsai., 2011).

A cucumovírus 2b fehérje képes a tünetek befolyásolására a poszt-transzkripcionális géncsendesítésen (post-transcriptional gene silencing, PTGS) keresztül, amely egy növényi védekezőmechanizmus, egy kettősszálú RNS (double-stranded RNA, dsRNA) által indukált

szekvencia specifikus RNS degradációs folyamat. A növényi dicer enzim kettős szálú RNS molekulákra specifikus, hosszú dsRNS-eket emészt rövidebb (21–25 nukleotid) siRNS-ekre (interfering RNA), és miRNS-ekre (micro RNA) (21 nukleotid). Az miRNS-ek és siRNS-ek beépülnek a géncsendesítés végrehajtó komplexbe (RNA-induced silencing complex, RISC), így határozzák meg annak szekvencia specifikitását (MEISTER és TUSCHL, 2004; VANCE és VAUCHERET, 2001). A 2b fehérje kölcsönhatásba lép az RNS-csendesítő komplex fehérje- és RNS-komponenseivel is (INABA és mtsai., 2011; LEWSEY és mtsai., 2009; ZHANG és mtsai., 2006).

Számos tanulmány vizsgálta a 2b és a gazdanövény fehérjék közötti kölcsönhatásokat. A növényi CAT3 citoplazmatikus kataláz és az I-es alcsoportba tartozó CMV HL törzsének 2b fehérjéje között kölcsönhatást mutattak ki, amelynek köszönhetően szisztemikus nekrosis alakul ki *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Col 0 növényeken. A CAT egy antioxidáns enzim, amely közvetlenül bontja a hidrogén-peroxidot, a 2b fehérje és a CAT3 közötti kötődés csökkenti a CAT aktivitást, ami a hidrogén-peroxid felhalmozódását és sejthalált eredményez (INABA és mtsai., 2011). A 2b fehérjével való kapcsolatot *N. benthamiana* S11-es 30S riboszomális alegységgel is kimutattak, illetve további 11 növényi fehérjét azonosítottak *Arabidopsis thaliana*-ból (WANG és mtsai., 2017). A CM95 CMV izolátum 2b fehérje 46. pozíciójában lévő aminosav határozta meg a tünetek súlyosságát, ami az RNS csendesítés szuppresszálo aktivitással volt összefüggésben. 46-os pozícióban lévő argininnel rendelkező 2b rendelkezett erős lokális és szisztemikus géncsendesítő aktivitással, a ciszteint kódoló mutáns nem (GOTO és mtsai., 2007). A 2b fehérje konzervált részein található foszforilációs hely és sejtmagi lokalizációs szignálok is, melyek befolyással vannak a tünetek alakulására és az RNS csendesítés szuppresszióra is (LEWSEY és mtsai., 2010; NEMES és mtsai., 2014).

3.2.5. A mozgási fehérje patogenításban betöltött szerepe

A 3a fehérje összefüggésbe hozható a tünetek ciklikus megjelenésével. A CMV Fny törzzsel inokulált dohánynövények nem fertőzött felső levelein váltakozva jelentek meg mozaik, majd tünetmentes, majd ismét mozaikos fenotípusú levelek. A 3a fehérjét hozták összefüggésbe a tünetek ciklikus megjelenésével. Az 51-es pozícióban található aszparagin aminosav cseréje, lizinre, illetve a 240-es pozícióban található izoleucin cseréje, fenilalaninra megszüntette a tünetek ciklikus megjelenését, illetve a 3a erős akkumulációját okozták, ami arra utal, hogy tünetek megjelenését a 3a-közvetített vírusmozgás befolyásolta. (GAL-ON és mtsai., 1996). Tök növények fertőzésekor ugyanennek az aminosav pozícióknak és aminosavaknak a cseréje a 3a fehérjén a szisztemikus mozgás gátlását eredményezte (KAPLAN és mtsai., 1997). A 3a fehérje aminosav

mutációinak hatása a tünetekre gazdaspecifikus lehet. A 168-as pozícióban található izoleucin aminosavat is tüneteket meghatározó faktoraként azonosították cukkini növényen (CHOI és mtsai., 2005). A CMV MP-n négy fontos aminosav szekvencia pozíciót azonosítottak melyek a *cmv1* gén által biztosított rezisztencia áttöréséért felelősek sárgadinnyén (*Cucumis melo* L.). A II-es alcsoportú CMV izolátumok képesek fertőzni a rezisztenciával bíró sárgadinnyét, rezisztenciatörő és nem törő vírus kimérák segítségével sikerült azonosítani a SNNLL64-68HGRIA, R81C, G171T és A195I aminosav szekvenciában történő változásokat, melyek felelősek a rezisztencia áttörésért (GUIU-ARAGONÉS és mtsai., 2014).

3.2.6. A CP patogenitásban betöltött szerepe

A Cucumovírus CP is közrejátszik a gazdanövény specifikálásban is. CMV Y törzs CP lokális nekrotikus léziókat alakít ki *Arabidopsis thaliana* növények levelén (TAKAHASHI és mtsai., 2001). A CP 129-es aminosava sokat vizsgált pozíció a tünetek vonatkozásában. Először dohány növényen detektálták, hogy ebben a pozícióban található prolin halvány zöld mozaikos tünet fenotípust alakított ki, míg szerinnel klorotikus fenotípust figyeltek meg (SHINTAKU és mtsai., 1992). Később a 129-es pozícióban 16 különböző aminosav változat hatását vizsgálták a dohány növényeken kialakuló tünetekre. Összefüggést mutattak ki az aminosavak tulajdonságai és kialakult tünetek típusa között, a poláros, savas aminosavakra való csere (aszparaginsav, glutaminsav) halvány zöld mozaikos fenotípust okozott, míg poláros bázikus aminosavakra (lizin, hisztidin) való csere nekrotikus fenotípus megjelenését okozta. A poláros, töltés nélküli (cisztein, szerin, glutamin) aminosavakat hordozó mutánsok klorotikus tüneteket okoztak. Nem csak dohányon, hanem Új-zélandi-spenóton (*Tetragonia expansa* Pall.), balzsamkörtén (*Momordica charantia* L.) és földicseresznyén (*Physalis floridana* Rydb.) is megfigyelhetőek voltak ugyanezek a tünet fenotípusok (KOBORI és mtsai., 2002; MOCHIZUKI és OHKI, 2011).

A CP 192-es aminosavának aszparaginsavról lizinre történő mutációja a tipikus tünetektől eltérő szisztemikus nekrozist okozott. A 194-es pozícióban található leucin alaninra való cserélődése atipikus klorotikus tüneteket eredményezett nekrotikus foltokkal (LIU és mtsai., 2002). A 193-as aminosav lizin, szerinre vagy aszparaginra történő mutációja *Nicotiana glutinosa* növényen törpülésszerű tüneteket okozott (SZILASSY és mtsai., 1999). *N. tabacum* növényen, CMV Y törzsének CP-jében történő mutáció a 111-es és a 124-es pozíciókban található izoleucin treonin és valinra történő mutációja sárga, klorotikus tünetek helyett enyhe zöld klorozist indukált (SUGIYAMA és mtsai., 2000).

3.2.7. Kevert fertőzések

A növényvirológiai kutatások többsége egyedi fertőzési modellekre fókuszál, a fertőzés során a vírusokat és a kialakított tüneteket, a vírus-növény kapcsolatot egyedileg vizsgálja, azonban, a vírusok kevert fertőzésben való előfordulása rendkívül gyakori, olyannyira, hogy előfordulásuk természetes körülmények között inkább szabályszerűnek mondható, mint kivételnek. Kevert fertőzések több, vírus kölcsönhatásaként jönnek létre. Ezen kevert fertőzések során, a két (vagy több) fertőző vírus különböző kölcsönhatás típusok előfordulását eredményezheti, melyek szinergizmus és az antagonizmus között mozognak. A szinergizmus olyan kölcsönhatás, amelyben több vírus együttes fertőzése súlyosabb tüneteket okoz a gazdanövényen, vagy fokozódik a vírusok patogenitása és terjedésének sebessége, mint amit bármelyik vírus önmagában képes lenne kiváltani. Az antagonizmus ezzel ellentétes kölcsönhatás, amelyben két vagy több vírus együttes jelenléte gyengíti egymás fertőzőképességét vagy patogenitását. Növényi vírusok esetében ez azt eredményezheti, hogy az egyik vírus fertőzése gátolja a másik vírus replikációját vagy terjedését a növényben, csökkentve ezzel a betegség súlyosságát (SINGHAL és mtsai., 2021). Szinergizmus megfigyelhető az azonos nemzetségből származó vírusok között (RENTERÍA-CANETT és mtsai., 2011), valamint a különböző víruseszaládokhoz tartozó vírusok között (WANG és mtsai., 2009) is. A szinergikus kapcsolatok során a tünetek fokozódása mellett az egyik vagy mindkét vírus mennyiségének emelkedése is megfigyelhető, a növényi szövetekben. Az antagonizmus főként a gazdanövény, elsődleges vírusfertőzés által okozott védekező mechanizmusok aktiválódásának köszönhető. Tovább csökkentheti a vírus fertőzések hatékonyságát a gazdaerőforrásokért folytatott versengés, ami a vírusok csökkent mozgásképeséghez és replikációjához vezethet, ellentétben az egy vírus általi fertőzésekkel (ALVES-JÚNIOR és mtsai., 2009).

Természetes körülmények között a CMV gyakran előfordul kevert fertőzésekben más növénypatogén vírusokkal együtt. CMV potyvírusokkal együtt előfordulva gyakran a vírusok szinergizmusáról beszélhetünk, ilyenkor a gazdanövényen okozott tünetek súlyosabbak, mint amit a két vírus külön-külön fellépő fertőzése okozna. A potyvírusok esetében HC-Pro, P1/HC-Pro fehérjék esetén mutatták ki, hogy súlyosbítják a CMV patogenitását és növelik akkumulációját a fertőzött növényben (PRUSS és mtsai., 1997; WANG és mtsai., 2002). A déli paradicsom vírus (*Southern tomato virus*, STV) paradicsomot fertőző vírus, CMV-vel közösen előfordulva növelte a CMV mennyiségét, illetve a tünetek intenzitását a fertőzés korai szakaszában, azonban egy másik paradicsomot fertőző vírus, a pepino mozaik vírus (*Pepino mosaic virus*, PepMV) és a CMV együttes fertőzés antagonista kölcsönhatást eredményezett. A CMV mennyisége erős csökkenését és a növényen megjelenő tünetek enyhülését tapasztalták, a CMV egyedüli fertőzéséhez képest

(ELVIRA GONZÁLEZ és mtsai., 2021). A CMV-Fny burgonya Y vírussal (*Potato virus Y*, PVY) való kevert fertőzése paradicsomban megnövelte a CMV RNS koncentrációt, szinergizmust figyeltek meg, azonban fordított esetben, PVY szempontjából antagonsztikus a kapcsolat. A PVY replikációját csökkentette a CMV, amit a 2b fehérjéhez köthetünk (MASCIA és mtsai., 2010). CMV esetén több alkalommal figyelhetek meg szinergizmust kevert fertőzések esetén (HERRERA-VÁSQUEZ és mtsai., 2009; MURPHY és BOWEN, 2006; TAKESHITA és mtsai., 2012).

A PSV esetén kevés irodalmi adat áll rendelkezésre ebben a vonatkozásban, egy 2001-es vegetációs időszakban az USA-ban Indiana, Wisconsin és Kentucky államban végzett kísérletben 191 db szójababot vizsgáltak. Az ültetvényben azonosították a lucerna mozaik vírust (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), a bab sárga mozaik vírust (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV), PSV-t, a dohány gyűrűsfoltosság vírus (*Tobacco ringspot virus*, TRSV) és a szója mozaik vírus (*Soybean mosaic virus*, SMV) azonban kevert fertőzést egyáltalán nem figyeltek meg (CLARK és PERRY, 2002).

3.2.8. Szatellit RNS-ek

A CMV és a PSV által okozott fertőzés tüneteit a szatellit RNS-ek (satRNS) jelenléte is módosíthatja. Ezek körülbelül 330-405 nt hosszúságú, a CMV virionba becsomagolódnak de a vírus RNS-el nem homológ lineáris RNS-ek, amelyek képesek befolyásolni a vírus replikációját, patogenitását és a tünetek kialakulását. A működésükhöz szükséges fehérjéket, mint például a replikáz vagy a CP, nem kódolják, a CMV helper vírusét használják (ESCRIU és mtsai., 2000).

Kis méretük ellenére, a satRNS-ek nagy hatással lehetnek a helper vírus által okozott tünetekre, enyhíthetik azokat, de súlyosbíthatják is. A CMV satRNS-ére először 1970-es években lettek figyelmesek, egy Franciaországban pusztító paradicsom ültetvényekben feltűnő járvány során. CMV és a satRNS együttesen a növények teljes pusztulását okozták (KAPER és WATERWORTH, 1981). Szintén paradicsomról, Horvátországban is detektáltak egy CMV-vel együtt letális nekروزist okozó satRNS-t (ŠKORIC és mtsai., 1996). CMV(YW) izolátuma egyedi, a jellemző CMV tünetektől eltérő vonalmintázatú mozaik tüneteket indukál szisztemikusan fertőzött dohányleveleken, melynek oka a CMV mellett izolált sat-YW RNS volt (SATO és mtsai., 2000).

A CMV-hez hasonlóan PSV esetén is dokumentáltak satRNS-ek előfordulását. Dohány növényen három féle satRNS-t vizsgálva az egyik, (V-satRNS) nem befolyásolta a helper vírus, azaz a PSV által okozott tüneteket, azonban másik kettő (G-satRNS, WC-satRNS) vizsgált satRNS a tünetek gyengülését okozta (NAIDU, 1991).

A fentiekben bemutatott számtalan tényező befolyásolhatja a növénypatogén vírusok gazdanövénykörét, illetve a gazdanövényeken okozott változatos tüneteiket, tünetegyütteseket. A cucumovírusokon belül a CMV és a PSV gazdanövényköre jelentősen eltérő, annak ellenére, hogy genetikai állományuk és a kódolt fehérjék funkciói nagyon hasonlóak. A szakirodalomban található számos eset, amikor sikerült molekuláris szinten vizsgálni, egy-egy genom régióhoz vagy aminosav változáshoz kötni a vírusok által kialakított tüneteket, illetve gazdanövény specifikitást. Jelen munkánkkal, a CMV és a PSV gazdanövénykörében történő eltérések molekuláris hátterének vizsgálatát végezzük, rekombináns, reasszortáns vírusok segítségével.

IV. Anyag és módszer

4.1. Dolgozatban felhasznált anyagok

4.1.1. Növény anyag

A fertőzéshez és a növényi sejten belüli lokalizáció vizsgálatához *Nicotiana benthamiana* Domin, *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc, *Nicotiana glutinosa* L., *Chenopodium murale* L., *Cucumis sativus* L. cv. Szenzáció, *Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker és *Capsicum annuum* L. cv. Brody teszt növényeket használtunk. Teszt növényeket szabályozott körülmények mellett, fitotronban neveltük. *Nicotiana* fajokat és *C. murale*-t hosszúnappalos megvilágítás mellett 16 órás megvilágítás és 8 órás sötét periódus 24 °C-on tartottunk a megvilágítási periódusban és 16 °C-on a sötét periódus alatt. Az uborka, paprika és paradicsom növényeket is hosszúnappalos körülmények között, de 26 °C hőmérsékleten neveltük a megvilágítási periódusban és 23 °C hőmérsékleten sötét periódusban.

4.1.2. Vírus izolátumok, fertőzőképes klónok

A dolgozatban felhasznált vírus izolátumok: Rp-PSV izolátumot Dr. Salamon Pál izolálta, Gödöllőn, fehér akácról (*Robinia pseudoacacia* L.), fertőzőképes klónjait pRP1-PSV, pRP2-PSV, pRP3-PSV Kiss és mtsai. közzétették (KISS és mtsai., 2008) (1. táblázat). Az Rs-CMV izolátumot Dr. Salamon Pál izolálta, Gödöllőn, retekéről (*Raphanus sativus* L.), fertőzőképes klónjait pRS1-CMV, pRS2-CMV, pRS3-CMV Divéki és mtsai. közzétették (DIVÉKI és mtsai., 2004) (1. táblázat). Az MP rekombináns fertőzőképes klónokat overlap PCR segítségével állítottuk elő pCP3 pPC3 p Δ C3 (1. táblázat).

1. táblázat. a dolgozatban használt fertőzőképes klónok forrása és a linearizáláshoz használt restriktációs enzimek

Klón megnevezése	RNS	Forrás	Linearizálás
pRS1-CMV	Rs-CMV RNS1	Divéki és mtsai., 2004	<i>Bam</i> HI
pRS2-CMV	Rs-CMV RNS2	Divéki és mtsai., 2004	<i>Bam</i> HI
pRS3-CMV	Rs-CMV RNS3	Divéki és mtsai., 2004	<i>Bam</i> HI
pRP1-PSV	Rp-PSV RNS1	Kiss és mtsai., 2008	<i>Bam</i> HI
pRP2-PSV	Rp-PSV RNS2	Kiss és mtsai., 2008	<i>Bam</i> HI
pRP3-PSV	Rp-PSV RNS3	Kiss és mtsai., 2008	<i>Bam</i> HI, <i>Pst</i> I
pCP3	CMV3PSVCP	overlap PCR	<i>Pst</i> I
pPC3	PSV3CMVCP	overlap PCR	<i>Bam</i> HI
pPΔC3	PSV3ΔCMV CP	overlap PCR	<i>Bam</i> HI

4.1.3. Baktérium törzsek és plazmidok

A fertőzőképes klónok elkészítéséhez pGEM T-Easy (Promega) klónozó vektort és *Escherichia coli* baktérium DH5α, illetve TG90 törzsét használtuk. Az agroinfiltrálás kísérletekhez *Agrobacterium tumefaciens* C58C3 törzset és pBin61 expressziós vektort használtunk (SILHAVY, 2002).

4.2. Dolgozatban alkalmazott módszerek

4.2.1. MP rekombináns fertőzőképes klónok elkészítése

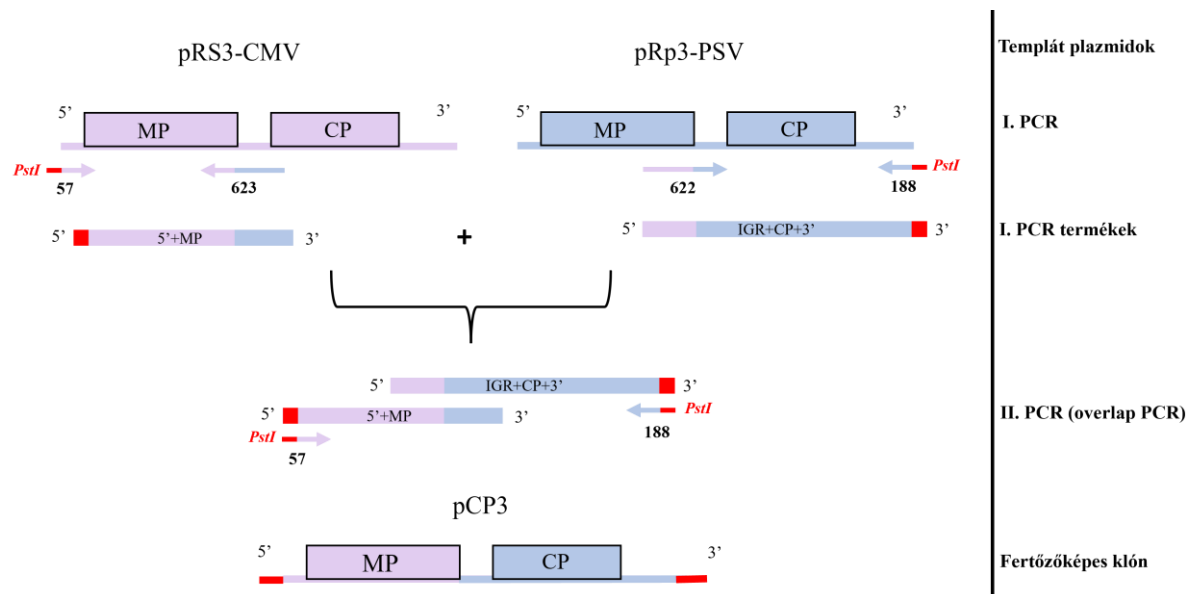
A tesztnövények fertőzéséhez első lépésben fertőzőképes klónokat állítottunk elő. Rp-PSV RNS1, RNS2 és RNS3 fertőzőképes klónját Kiss és munkatársai készítették el (KISS és mtsai.,

2008), Rs-CMV RNS1, RNS2, RNS3 fertőzőképes klónjait Divéki és munkatársai (DIVÉKI és mtsai., 2004). A munkánk során használt további MP rekombináns 3-as RNS-eket overlap PCR segítségével készítettük a pRS3-CMV és az pRp3-PSV cDNS klónok felhasználásával (1. táblázat). Az 5' oligonukleotid primer szekvenciák, a T7 bakteriofág RNS polimeráz promóterét tartalmazták, hogy később a cDNS klónok alkalmasak legyenek *in vitro* transzkriptum készítésére. A klónok 5' és 3' végén is restrikciós enzim szekvenciát építettünk be a primerpárok segítségével, amelyek a transzkripcióhoz való linearizáláshoz (1. táblázat) szükségesek.

A rekombináns fertőzőképes klónokhoz, első lépésben overlap PCR és specifikus primerek (2. táblázat) segítségével rekombináns PCR termékeket állítottunk elő.

pCP3 fertőzőképes klón pRS-CMV és pRp-PSV felhasználásával készítettük el (6. ábra). A CMV MP és az 5' nem kódoló régiót a PSV 3-as RNS-e ezen szakaszának megfelelő régióval kicseréltük. Az első PCR-ben pRS3-CMV klónból kiemeltük az 5' nem kódoló régiót és az MP-t 57-es és 623-as primerrel. Az 57-es primerrel *Pst*I hasítóhelyet és T7 promótert is beépítettük a szekvenciába (6. ábra, 2. táblázat). a 623-as primer egy PSV szekvencia specifikus átfedő régiót is tartalmazott. A 622-es és 188-as primerekkel pedig a PSV MP és CP közti nem kódoló régiót, CP-t és 3' nem kódoló régiót emeltük ki. A 622-es primer a CMV MP 3' vég szekvenciával átfedő régiót tartalmazott, a 188-as pedig egy *Pst*I hasítóhelyet (2. táblázat). Az 1. PCR az alábbi szerint zajlott, 95 °C-5 perc kezdeti denaturáció, Ciklus 30-szor ismételve: (95 °C-on 1 perc denaturáció, 58 °C-on 30 mp. primer kötés, 72 °C-on 1 perc 5 mp lánchosszabbítás), 72 °C-on 5perc terminálás.

A második PCR-ben az első PCR során keletkezett két termék átfedő régiójának köszönhetően, a két külső primerrel (57, 188) ki tudtuk emelni a teljes hosszúságú pCP3 rekombináns RNS3-t. A második PCR eredményeként kapott PCR termék a CMV 5' nem kódoló régiót és az MP-t tartalmazta, illetve a PSV MP és CP közti nem kódoló régiót, a CP-t és 3' nem kódoló régiót. A rekombináns PCR termék 5' végén T7 promótert és *Pst*I hasítóhelyet tartalmazott, illetve 3' végén is egy *Pst*I hasítóhelyet (6. ábra). Második PCR paraméterei az alábbiak: 95 °C-5 perc kezdeti denaturáció, Ciklus 30-szor ismételve: (95 °C-on 1 perc denaturáció, 62 °C-on 30 mp primer kötés, 72 °C-on 2 perc 5 mp lánchosszabbítás), 72 °C-on 5 perc terminálás.

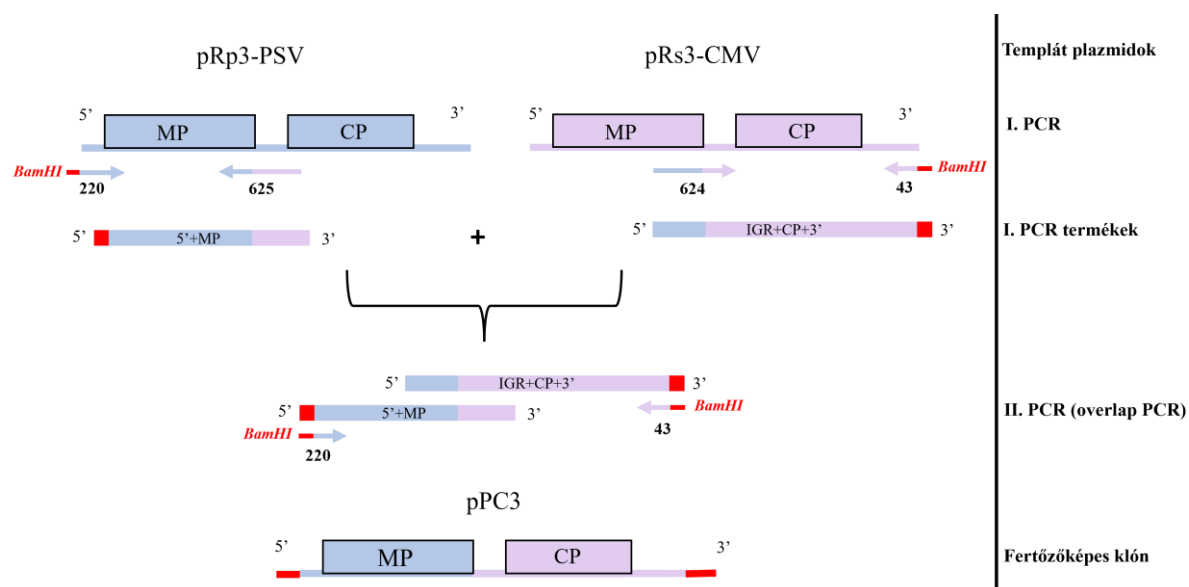


6. ábra. A fertőzéses vizsgálatokhoz használt pCP3 fertőzőképes klón elkészítése során alkalmazott overlap PCR sematikus ábrázolása. A nyilak és az alattuk látható számok a primereket jelölik, piros színnel a restrikciós endonukleázokat jelöltük, lilával CMV-ből származó DNS szakaszokat, kékkel pedig PSV-ből származó DNS szakaszokat.

pPC3 fertőzőképes klón pRS-CMV és pRp-PSV felhasználásával készítettük el (7. ábra). A PSV MP és az 5' nem kódoló régiót a CMV 3-as RNS-e ezen szakaszának megfelelő régióval kicseréltük. Az első PCR-ben pRp3-PSV klónból kiemeltük az 5' nem kódoló régiót és az MP-t 220-as és 625-ös primerrel. A 220-as primerrel *Bam*HI hasítóhelyet és T7 promótert is bevittünk a szekvenciába (7. ábra, 2. táblázat). A 625-ös primer egy CMV szekvencia specifikus átfedő régiót is tartalmazott. A 624-es és 43-as primerekkel pedig a CMV MP és CP közti nem kódoló régiót, CP-t és 3' nem kódoló régiót emeltük ki. A 624-es primer PSV MP 3' vég szekvenciával átfedő régiót tartalmazott, a 43-as pedig egy *Bam*HI hasítóhelyet (2. táblázat). Az 1. PCR az alábbi szerint zajlott, 95 °C-5 perc kezdeti denaturáció, Ciklus 30-szor ismételve: (95 °C-on 1 perc denaturáció, 58 °C-on 30 mp. primer kötés, 72 °C-on 1 perc 5 mp lánchosszabítás), 72 °C-on 5perc terminálás.

A második PCR-ben a két külső primerrel (57, 188) emeltük ki a teljes hosszúságú pPC3 rekombináns RNS3-t. A második PCR után a PCR termék a PSV 5' nem kódoló régiót és MP-t tartalmazta, illetve CMV MP és CP közti nem kódoló régiót, CP-t és 3' nem kódoló régiót (7. ábra). A rekombináns PCR termék 5' végén T7 promótert és *Bam*HI hasítóhelyet tartalmazott, illetve 3' végén is egy *Bam*HI hasító hely található (7. ábra). A második PCR paraméterei az

alábbiak: 95 °C-5 perc kezdeti denaturáció, Ciklus 30-szor ismételve: (95 °C-on 1 perc denaturáció, 62 °C-on 30 mp primer kötés, 72 °C-on 2 perc 5 mp lánchosszabítás), 72 °C-on 5 perc terminálás.

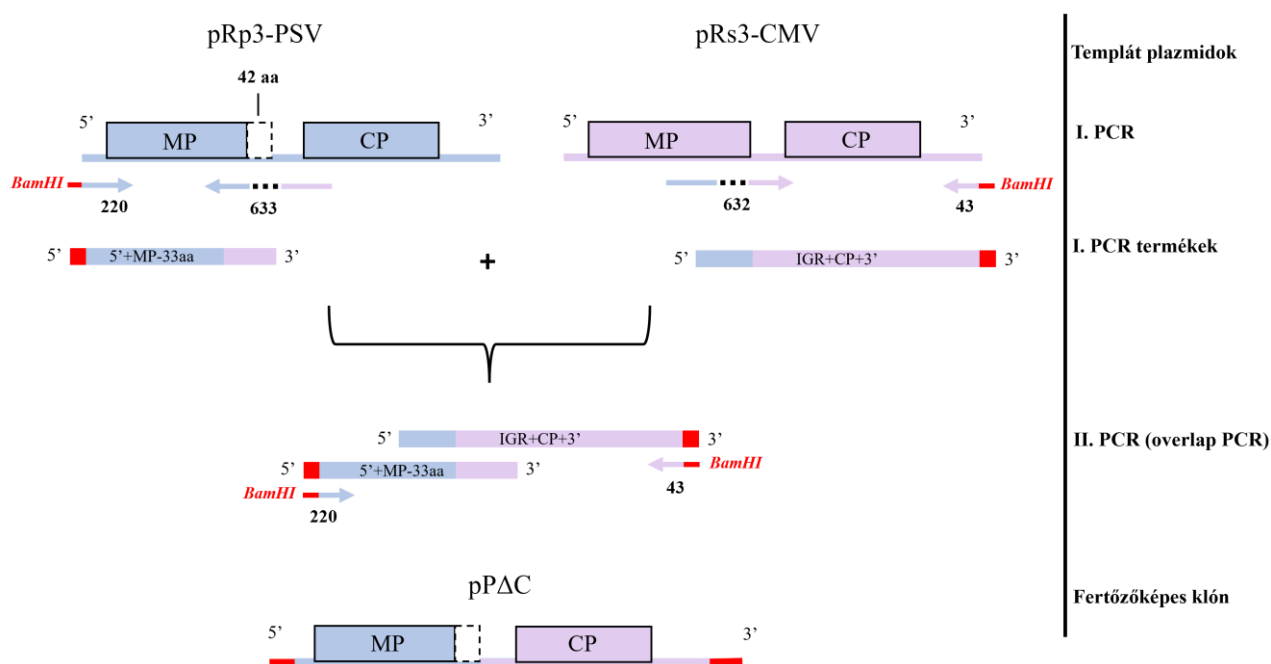


7. ábra. A fertőzéses vizsgálatokhoz használt pPC3 fertőzőképes klón elkészítése során alkalmazott overlap PCR sematikus ábrázolása. A nyilak és az alattuk látható számok a primereket jelölik, piros színnel a restrikciós endonukleázokat jelöltük, lilával CMV-ből származó DNS szakaszokat, kézzel pedig PSV-ből származó DNS szakaszokat.

A pPC3 fertőzőképes klón pRS-CMV és pRp-PSV felhasználásával készítettük el (8. ábra). A PSV MP és az 5' nem kódoló régiót a CMV 3-as RNS ezen szakaszának megfelelő szekvenciával kicseréltük és a PSV MP C-terminális 42 aminosavának megfelelő nukleotidot töröltük. Az első PCR-ben pRp3-PSV klónból kiemeltük az 5' nem kódoló régiót és az MP-t az utolsó 42 aminosavat kódoló nukleotid szekvencia nélkül, amihez 220-as és 633-as primert használtuk. A 220-as primerrel *BamHI* hasítóhelyet és T7 promótert is bevittünk a szekvenciába (8. ábra, 2. táblázat). A 633-as primer egy CMV szekvencia specifikus átfedő régiót is tartalmazott, illetve az MP 3' irányból 42 aminosavat kódoló szekvencia hiányzott a primer szekvenciából. A 632-es és 43-as primerekkel pedig a CMV MP és CP közti nem kódoló régiót, CP-t és 3' nem kódoló régiót emeltük ki. A 632-es primer PSV MP 3' végével átfedő régiót tartalmazott, az utolsó 42 aminosavnak megfelelő nukleotidok hiányával, a 43-as pedig egy *BamHI* hasítóhelyet. Az 1. PCR az alábbi szerint zajlott, 95 °C-5 perc kezdeti denaturáció, Ciklus 30-szor ismételve: (95 °C-

on 1 perc denaturáció, 58 °C-on 30 mp. primer kötés, 72 °C-on 1 perc 5 mp lánchosszabítás), 72 °C-on 5perc terminálás.

A második PCR-ben a két külső primerrel (57, 188) emeltük ki a teljes hosszúságú pPC3 rekombináns RNS3-t. A második PCR után a PCR termék a PSV 5' nem kódoló régiót és a 3' 42 aminosav deléciós MP-t tartalmazta, illetve CMV MP és CP közti nem kódoló régiót, CP-t és 3' nem kódoló régiót. A rekombináns PCR termék 5' végén T7 promótert és *Bam*HI hasítóhelyet tartalmazott, illetve 3' végén is egy *Bam*HI hasító helyet (8. ábra). A második PCR paraméterei az alábbiak: 95 °C-5 perc kezdeti denaturáció, Ciklus 30-szor ismételve: (95 °C-on 1 perc denaturáció, 62 °C-on 30 mp primer kötés, 72 °C-on 2 perc 5 mp lánchosszabítás), 72 °C-on 5 perc terminálás.



8. ábra. A fertőzéses vizsgálatokhoz használt pΔC3 fertőzőképes klón elkészítése során alkalmazott overlap PCR sematikus ábrázolása. A nyilak és az alattuk látható számok a primereket jelölik, piros színnel a restrikciós endonukleázokat jelöltük, lilával CMV-ből származó DNS szakaszokat, kézzel pedig PSV-ből származó DNS szakaszokat. A szaggatott vonal a 33 aminosavnak megfelelő hiányzó nukleotidokat jelöli.

Az overlap PCR-rel készült MP rekombináns PCR (pCP3, pPC3, pΔC3) termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük majd High-Pure Roche Purification Kit-tel (Roche) tisztítottuk a pGEM

T-Easy vektorba ligáláshoz. A plazmid vektorba ligált termékeinket *E. coli* DH5 α törzsébe transzformáltuk Inoue és mtsai. (1990) módszere szerint (INOUE és mtsai., 1990). A rekombináns klónok nukleotid sorrendjének meghatározását a Biomi Kft-nél, (Gödöllő) végeztük.

2. táblázat. Fertőzőképes klónok előállításához használt oligonukleotid primerek és megnevezésük. A primerek szekvenciájában piros színnel jelöltük a hasítóhelyeket, kékkel a T7 szekvenciát és aláhúztuk az overlap PCR-hez szükséges átfedő régiókat.

Primer elnevezése	Primer szekvencia	Használat	Ref.szám
CMV3PSVCP_FOR	5'-accgcaggtgggtaacggtctttagatataatgaatattatggta-3'	pCP3 fertőzőképes klón elkészítése	622
CMV3PSVCP_REV	5'-ataatattcatatatctaagaccgtaaccacctgc-3'	pCP3 fertőzőképes klón elkészítése	623
PSV3CMVCP_FOR	5'-tggtctgggattttgtgtaacacttggcgctattagatat-3'	pPC3 fertőzőképes klón elkészítése	624
PSV3CMVCP_REV	5'-atacgcaccaaagtgttacaacaaatcccagaaca-3'	pPC3 fertőzőképes klón elkészítése	625
PSV3 Δ CMVCP_FOR	5'-caaaaagcgattggttagtaacacttggcgctattagata-3'	p Δ C fertőzőképes klón elkészítése	632
PSV3 Δ CMVCP_REV	5'-atacgcaccaaagtgttaactaccaatcgcttttgaatg-3'	p Δ C fertőzőképes klón elkészítése	633
CMV_RNA3_FOR-T7PstI	5'-ggctgcagtaatacgactcactatagtaattaccac-3'	pCP fertőzőképes klón elkészítése	57
CMV_RNA3_REV-BamHI	5'-gcggatcctggtctccttttggaggccc-3'	pPC, p Δ C fertőzőképes klónok elkészítése	43
PSV_RNA3_FOR-T7BamHI	5'-ggggatcctaatacgactcactatagtttaaaccaacaaaacctgag-3'	pPC, p Δ C fertőzőképes klónok elkészítése	220
PSV_RNA3_REV-PstI	5'-ggctgcagtggtctcctatggagccctcatag-3'	pCP fertőzőképes klón elkészítése	188

4.2.2. *In vitro* transzkripció, inokulálás, virion tisztítás

A tesztnövények inokulálásához fertőzőképes *in vitro* transzkriptumokat készítettünk. A korábban említett fertőzőképes klónokat használtuk templátnak. CMV-hez: pRs1-CMV, pRs2-CMV, pRS3-CMV, PSV-hez pRp1-PSV pRp2-PSV, pRp3-PSV, az RNS3 reasszortáns vírusokhoz: pRs1-CMV, pRs2-CMV, pRp1-PSV, pRp2-PSV, pRS3-CMV, pRp3-PSV, az MP rekombináns vírusokhoz pedig pRs1-CMV, pRs2-CMV, pCP3, pPC3 és p Δ C3 klónokat használtuk (3. táblázat). A klónokat hordozó plazmidokat linearizáltuk *Bam*HI-es és *Pst*I-es restrikciós endonukleáz enzimmel (1. táblázat). A transzkriptumok szintézisét T7 polimeráz enzimmel végeztük (SZILASSY és mtsai., 1999). A transzkripciót az alábbiak szerint végeztük:

1 μ g linearizált plazmid templát

rNTP mix: 50 mM ATP-t, UTP-t és CTP-t, 6,25 mM GTP (Thermo Scientific)

5-szörös reakció puffer (Thermo Scientific): 2 μ l

CAP (7-metil-guanozin sapka) (Biomi): 50mM

T7 RNS polimeráz (Thermo Scientific): 50 U

RNáz Inhibitor (Thermo Scientific): 0,5 μ l

Steril víz: 1,5 μ l

A fenti 50 μ l végtérfogatú reakció elegyet 15 percig inkubáltuk 37 °C-on majd hozzáadtunk 25 mM GTP-t és további egy órát inkubáltuk 37 °C-on. Az elkészült *in vitro* transzkriptumok minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A cDNS klónokról készült *in vitro* RNS transzkriptumokat egyenlő mennyiségben különböző kombinációkban kevertük hozzá 40 μ l inokuláló pufferhez úgy, hogy az inokulum azonos mennyiségben tartalmazzon 1-es, 2-es és 3-as RNS-nek megfelelő transzkriptumot (3. táblázat). Minden tesztnövény 2–2 fiatal levelére 20–20 μ l karborundumot tartalmazó inokuláló pufferbe ((25 mM glicin, 15 mM K₂HPO₄, 0,5% celit) kevert transzkriptumot (1:10 hígításban) pipettáztunk, majd steril üveg spatulával elkentük ügyelve, hogy minél kevesebb sérülést okozzunk a leveleken. A transzkriptumokat az alábbi kombinációban fertőztük: C1+C2+C3, P1+P2+P3, C1+C2+P3, P1+P2+C3, C1+C2+CP3, C1+C2+PC3, C1+C2+ Δ C3 (3. táblázat). Negatív kontrollként használt növényeket inokuláló pufferrel és karborundummal inokuláltuk, amely nem tartalmazott *in vitro* transzkriptumot.

3. táblázat. A dolgozatban használt vírusok megnevezése, felhasznált *in vitro* transzkriptumok és fertőzőképes klónok

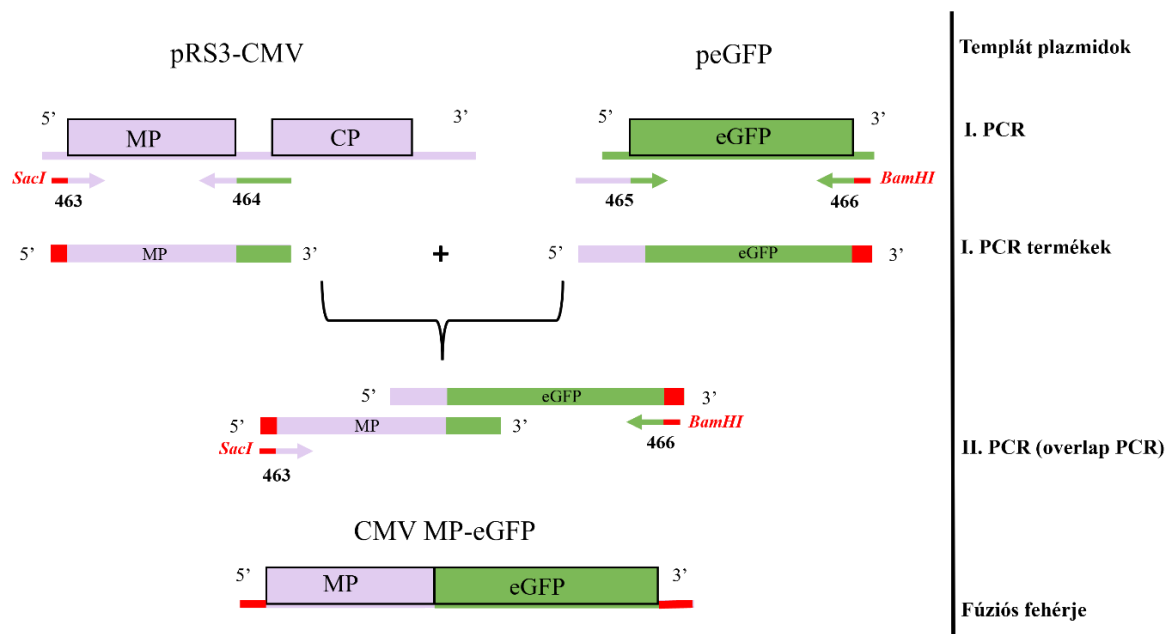
Vírus elnevezése	Felhasznált fertőzőképes klónok	<i>In vitro</i> transzkriptum
CMV	pRs1-CMV, pRs2-CMV, pRS3-CMV	C1+C2+C3
PSV	pRp1-PSV pRp2-PSV, pRp3-PSV	P1+P2+P3
C12P3	pRs1-CMV, pRs2-CMV, pRp3-PSV	C1+C2+P3
P12C3	pRp1-PSV, pRp2-PSV, pRS3-CMV	P1+P2+C3
C12CP3	pRs1-CMV, pRs2-CMV, pCP3	C1+C2+CP3
C12PC3	pRs1-CMV, pRs2-CMV, pPC3	C1+C2+PC3
C12PΔC3	pRs1-CMV, pRs2-CMV, pPΔC3	C1+C2+ΔC3

Az *in vitro* transzkriptummal fertőzött *N. benthamiana* növényekből, három héttel az inokulálás után a fertőzött növények tüneteket mutató fiatal, felső leveleiből virionokat tisztítottunk (LOT és KAPER, 1976). 100 g növényi mintát homogenizáltunk Na₃-citrát pufferben (0,5 M Na₃-citrát (pH: 6,5), 0,5 M EDTA (pH: 8)) és kloroformban, amelyeket 1:1 arányba kevertünk. Homogenizálás előtt 0,1% tioglikolsavat adtunk a pufferhez. A pufferben homogenizált növényi mintát centrifugáltuk (4 °C, 10 perc, 6000g), majd a vizes fázishoz 10%-os PEG 6000 adtunk, jégen kevertettük 15 percig, majd 30 percet állni hagytuk. Újabb centrifugálást követően (4 °C, 20 perc, 10000 g), visszaoldottuk a pelletet, 0,5 mM borát puffer (pH: 9) amelyben 2% Triton X-100-at oldottunk fel. Centrifugálást követően (4 °C, 10 perc, 10000 g) a borát puffer és Triton X-100 felülúszót 150 percig ultracentrifugáltuk 18000 g-n, 4 °C-on. Az ultracentrifuga után, a keletkezett pelletet 0,5 mM borát pufferben oldottuk vissza.

A fertőzéses kísérletekben a tisztított virionnal egyenlő koncentrációban fertőztünk teszt növényeket. Minden növényre 10 µg/ml koncentrációban inokuláló pufferbe (25 mM glicin, 15 mM K₂HPO₄, 0,5% bentonit, 0,5% celit) kevert viriont kentünk üveg spatulával. Az inokuláló pufferbe karborundumot kevertünk a növényi sejtek felsértéséhez. Negatív kontrollként használt növényeket inokuláló pufferrel és karborundummal inokuláltuk.

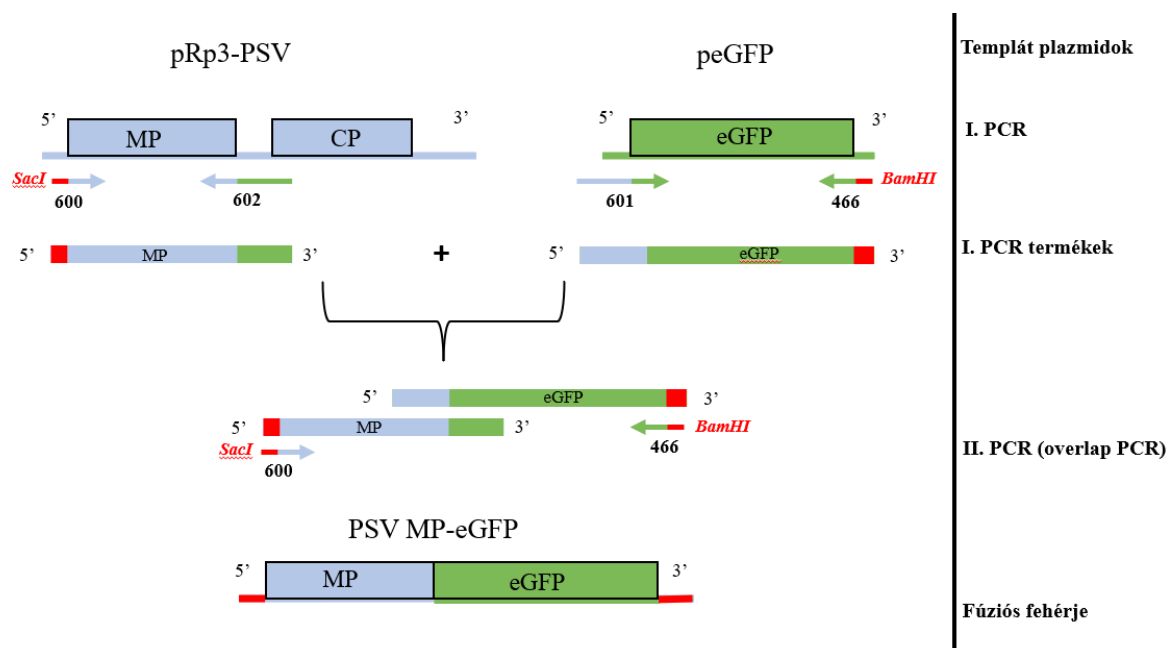
4.2.3. MP-eGFP fúziós fehérjék készítése sejten belüli lokalizáció vizsgálatához

A sejten belüli lokalizációs vizsgálatokhoz, MP-eGFP fúziós fehérjéket készítettünk. A CMV MP-t és PSV MP-t kódoló génszakasz C-terminális végéhez eGFP-t kódoló szakaszt fuzionáltattunk, miután az MP-k stop kodonját eltávolítottuk, hogy az MP transzlációja a GFP fehérjével együtt történjen. A két fúziós fehérjét overlap PCR segítségével készítettük el (9., 10. ábra). CMV MP-eGFP készítéséhez első lépésben pRS3-CMV-ből amplifikáltuk az MP-t a 463 primerrel, mely tartalmazta a *SacI* hasítóhelyet illetve a 464-es primerrel, amely eGFP 5' végével átfedő szekvenciát tartalmazott. Az 1. PCR során amplifikáltuk peGFP-ből, eGFP fehérjét kódoló szakaszt a 465-ös primer segítségével, ami CMV MP 3' végével átfedő régiót is tartalmazott, és a 466-os primerrel ami *BamHI* hasítóhelyet tartalmazott (9. ábra, 4. táblázat). Az első PCR kondíciói az alábbiak, 95 °C-on 1 perc denaturáció, 60 °C-on 30 mp. primer kötés, 72 °C-on 1 perc 5 mp lánchosszabítás), 72 °C-on 5 perc terminálás. A második PCR során az első PCR-ben szintetizált termékeket két szélső primerrel (463, 466) tovább amplifikáltuk, így megkaptuk CMV MP-eGFP fúziós fehérje PCR terméket, az 5' végén *SacI*, a 3' végén *BamHI* hasítóhelyekkel. A második PCR kondíciói, 95 °C-on 1 perc denaturáció, 58 °C-on 30 mp. primer kötés, 72 °C-on 2 perc 5 mp lánchosszabítás, 72 °C-on 5 perc terminálás.



9. ábra. A sejten belüli lokalizációs vizsgálatokhoz előállított CMV MP-eGFP overlap PCR sematikus ábrázolása. A nyilak és az alattuk látható számok a primereket jelölik, piros színnel a restrikciós endonukleázokat jelöltük, lilával CMV-ből származó DNS szakaszokat, zölddel pedig eGFP-ből származó DNS szakaszokat.

A PSV MP-eGFP elkészítéséhez első lépésben pRp3-PSV-ből amplifikáltuk az MP-t a 600-as primerrel, mely tartalmazta a *SacI* hasítóhelyet illetve a 602-es primerrel, amely eGFP 5' végével átfedő szekvenciát tartalmazott. Az 1. PCR során amplifikáltuk peGFP-ből, eGFP kódoló szakaszt a 601-es primer segítségével ami PSV MP 3' végével átfedő régiót is tartalmazott, és a 466-os primerrel ami *BamHI* hasítóhelyet tartalmazott (10. ábra, 4. táblázat). Az első PCR kondíciói az alábbiak, 95 °C-on 1 perc denaturáció, 60 °C-on 30 mp. primer kötés, 72 °C-on 1 perc 5 mp lánchosszabítás, 72 °C-on 5 perc terminálás. A második PCR során az első PCR-ben szintetizált termékeket két szélső primerrel (600, 466) tovább amplifikáltuk, így megkaptuk PSV MP-eGFP fúziós fehérje PCR terméket, az 5' végén *SacI*, a 3' végén *BamHI* hasítóhelyekkel. A második PCR kondíciói, 95 °C-on 1 perc denaturáció, 58 °C-on 30 mp. primer kötés, 72 °C-on 2 perc 5 mp lánchosszabítás, 72 °C-on 5 perc terminálás.



10. ábra. A sejten belüli lokalizációs vizsgálatokhoz előállított PSV MP-eGFP overlap PCR sematikus ábrázolása. A nyilak és az alattuk látható számok a primereket jelölik, piros színnel a restrikciós endonukleázokat jelöltük, kézzel PSV-ből származó DNS szakaszokat, zölddel pedig eGFP-ből származó DNS szakaszokat.

Az overlap PCR-rel készült MP-eGFP fúziós fehérje PCR (CMV MP-eGFP, PSV MP-eGFP) termékeket High-Pure Roche Purification Kit-tel (Roche) tisztítottuk a pGEM T-Easy vektorba ligáláshoz. A plazmid vektorba ligált termékeinket a felszaporításhoz *E. coli* DH5α törzsébe

transzformáltuk INOUE és mtsai. (1990) módszere szerint. A rekombináns klónok nukleotid sorrendjének meghatározását a Biomi Kft-nél, (Gödöllő) végeztük.

4. táblázat. Az MP-eGFP fúziós fehérjék előállításához használt oligonukleotid primerek. A primerek szekvenciájában piros színnel jelöltük a hasítóhelyeket, aláhúztuk az overlap PCR-hez szükséges átfedő régiókat

Primer elnevezése	Nukleotid szekvencia	Használat	Ref.szám
CMV MP_eGFP_for	5'-gtggttaacggtctt <u>atgg</u> tgagcaagggcgagg-3'	CMV MP-eGFP fúziós fehérje elkészítése	465
CMV MP_eGFP_rev	5'- <u>cgcccttgctcaccata</u> aagaccgtaaccacctgc-3'	CMV MP-eGFP fúziós fehérje elkészítése	464
CMV MP_SacI_for	5'-gggagctcatggcttccaaggtaccagt-3'	CMV MP-eGFP fúziós fehérje elkészítése	463
eGFP_BamHI_rev	5'-ccggatcctcactgtacagttcgccatg-3'	PSV MP-eGFP, CMV MP-eGFP fúziós fehérje elkészítése	466
PSV_MP_eGFP_for	5'-tctgggattttgttgatggtgagcaagggcgag-3'	PSV MP-eGFP fúziós fehérje elkészítése	601
PSV_MP_eGFP_rev	5'- <u>cgcccttgctcaccat</u> caacaaaatcccagaacac-3'	PSV MP-eGFP fúziós fehérje elkészítése	602
PSV_MP_SacI_for	5'-gggagctcatggcttctctgggtctagtcgg-3'	PSV MP-eGFP fúziós fehérje elkészítése	600

4.2.4. *Agrobacterium* transzformálás és *Agrobacterium*-közvetített tranziens génexpresszió

Az overlap PCR-rel készült *E. coli*-ban felszaporított MP-eGFP klónokat *Agrobacterium tumefaciens* C53C1 törzsébe transzformáltuk, miután a szekvenciába integrált hasítóhelyek (SacI, BamHI) segítségével pBin expressziós plazmid vektorba ligáltuk. Az *A. tumefaciens* transzformálás az alábbiak szerint zajlott: jégen összemérve 100 µl *A. tumefaciens* kompetens sejthez 5 µl pBin plazmidba ligált DNS-t adtunk, amit egy percre folyékony nitrogénbe helyeztünk. Teljes felolvadásig 28 °C-on inkubáltuk. A felolvadt kompetens sejtekhez 500 µl folyékony LB tápoldatot adtunk, majd egy éjszakán át rázatva inkubáltuk 28 °C-on. A felnőtt

baktérium kultúrából 100 µl-t szélesztettünk szelektív antibiotikus (rifampicin (10 mg/l) és kanamicin (50 mg/l)) lemezen.

Az *Agrobacterium*-közvetített tranziens génexpresszióhoz az MP-eGFP plazmidokat hordozó *A. tumefaciens* kultúrákat 4-5 *Agrobacterium* leoltó folyadékba (folyékony LB táptalaj, rifampicin 10mg/l, kanamycin 50mg/l, acetosyringone, MES 10mM, acetosziringon 20mM) oltottuk, majd egy éjszakán át 28 °C-on rázattuk 18 rpm-en. A felszaporodott baktérium kultúrákat 10 percig centrifugáltuk, 3500 rpm-en szobahőmérsékleten, majd a pelletet felszuszpendáltuk 3 ml visszaoldó pufferben (10 mM MgCl₂-ot, 10 mM MES 100mM acetosziringon). A visszaoldott baktérium kultúrákat 3 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Inkubálást követően megmértük spektrofotométerrel az agrobaktériumok koncentrációját 600 nm-en. Az agroinfiltrálást megelőzően a baktériumszuszpenziók koncentrációját beállítottuk. Az MP-eGFP konstrukciót hordozó baktérium kultúrák koncentrációját OD₆₀₀ 0,4-re állítottuk be. A szuszpenziókhoz minden konstrukció esetén P19 szupresszor fehérjét hordozó *Agrobacterium* törzset is hozzáadtunk (JAY és mtsai., 2023), melynek koncentrációját pedig OD₆₀₀ 0,2-re állítottuk be. Az agrobaktérium szuszpenziót, fecskendő segítségével injektáltuk 4-5 leveles dohány illetve paprika növények levél fonákjába (NEMES és mtsai., 2014).

4.2.5. Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia

Az eGFP-vel jelölt MP-k növényi sejten belüli lokalizációját konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal figyeltük meg, az agroinfiltrálást követő 24 órában. Leica TCS SP8 konfokális lézer-pásztázó mikroszkópot használtunk a kísérletekhez (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), HC PL APO CS2 40×/1.10 immerziós objektívvel. Az anilinkék festés detektálása 405 nm, az eGFP gerjesztéséhez pedig 488 nm hullámhosszú lézerfényt alkalmaztunk.

A plazmodezmák jelöléséhez anilin kék festést használtunk. Mikroszkópos vizsgálat előtt, az agroinfiltrált növényi szövetekbe 2:3 arányban 0,1%-os anilin kék és 1 M glicin pH: 9.5-t injektáltunk, amellyel a plazmodezmáknál található kallózt festettük meg (KUMAR és mtsai., 2016).

A plazmolizált sejtes vizsgálatokhoz, mikroszkópos vizsgálat előtt, anilin kék festés után az infiltrált növényekből levélkorongnyi mintákat 10%-os NaCl oldatban áztattuk 15 percig, aminek hatására a plazmamembrán elvált a sejtfaltól.

4.2.6. Statisztikai analízis, képfeldolgozás

Az MP-k plazmodezma kolokalizációjának számszerűsítéséhez Pearson korrelációs koefficiens (PKK) használtunk, öt különböző mikroszkópos képen 50 plazmodezmát mértünk le Fiji ImageJ (1.52) szoftver co-localization plugin segítségével (LEASTRO és mtsai., 2021). PKK értékek 0,2-0,4-ig gyenge korrelációt jelentenek, 0,5 feletti érték pedig erős korrelációt. Negatív értékek fordított korrelációt jelentenek (DUNN és mtsai., 2011; LEASTRO és mtsai., 2018).

A plazmodezma kolokalizációban mért szignifikáns különbségeket meghatározására *N. benthamiana* sejtekben PSV MP-eGFP, CMV MP-eGFP, PSV MP-eGFP plazmolizált sejtben, illetve CMV MP-eGFP plazmolizált sejtben esetén, egytényezős ANOVA modellt alkalmaztunk, miután az adatokat normalitás vizsgálatnak vetettük alá Kolmogorov-Smirnov próbával, és ellenőriztük a szóráshomogenitást Levene tesztel. A szignifikánsan eltérő csoportok páronkénti összehasonlítására Tukey HSD Post Hoc tesztet vagy Games-Howell Post Hoc tesztet használtunk (amikor a szórás homogenitás feltétel nem teljesült az ANOVA teszt során) ($P < 0,05$).

C. annuum sejtekben CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP páronkénti összehasonlításhoz kétmintás T-próbát használtunk, amit $P < 0,05$ értékkel végeztük el, miután megvizsgáltuk a szóráshomogenitást. Minden statisztikai elemzéshez az IBM SPSS Statistics 25-öt használtuk.

4.2.7. Vírusok detektálása, RNS kivonás, cDNS, RT-PCR

A fertőzőses kísérletekben, a fertőzés sikerességének igazolásához, az inokulált *N. benthamiana* és *C. annuum* növényekből CMV-t, PSV-t, RNS 3 reasszortáns és MP rekombináns vírusokat RT-PCR segítségével detektáltuk. *C. annuum* növényekből hat héttel, *N. benthamiana* növényekből kettő, négy és hét nappal fertőzés után (C12PC3, C12PΔC3 vírus fertőzések összehasonlítása esetén 21 nappal), a felső, fiatal nem inokulált levelekből vettünk egy levélkorong mintát az RNS kivonáshoz. Az RNS kivonást a gyártó utasításai szerint végeztük SV Total RNA Isolation Kit-el (Promega).

A kivont RNS-ből, komplementer DNS-t (cDNS) készítettünk, amihez reverz transzkripciót végeztünk: 65 °C-on denaturáltuk 5 percig a kivont RNS-t a reverz, szekvencia specifikus oligonukleotid primerekkel, ezután hozzámértünk 5x reverz transzkriptáz puffert (Thermo Scientific), 1 µl 5 mM-os dNTP mixet (Thermo Scientific), 1 µl M-MuLV reverz transzkriptáz

enzimet (200 U/μl, Thermo Scientific,), 0,5 μl RiboLock RNáz inhibitor (40 U/μL, Thermo Scientific) amit 42 °C-on inkubáltunk 1 óra hosszat.

A cDNS-ek felhasználásával végeztük a PCR vizsgálatot. A vírusok kimutatásához a CP-re specifikus oligonukleotid primereket használtunk (5. táblázat). A CMV, P12C3, C12PΔC3 esetén CMV CP specifikus (CMV_RNA3_CP_ for, CMV_RNA3_REV-BamHI), míg PSV, C12P3 és C12CP3 esetén PSV CP specifikus (PSV_RNA3_CP_ for, PSV_RNA3_REV-PstI) primereket használtunk (5. táblázat). A cDNS és RT-PCR ellenőrzéséhez aktin kontrollt használtunk és Cap_actin for, Cap_actin rev primereket (5. táblázat). PCR reakció paraméterei az alábbiak voltak:

- 1) 95 °C-5 perc (kezdeti denaturáció)

Ciklus:

- 2) 95 °C-1 perc (denaturáció)
- 3) 58 °C-30 sec. (primer kötés)
- 4) 72 °C-1 perc (láncosszabítás)

30-szor ismételve

- 5) 72 °C-5perc (terminálás)

A PCR termékeket horizontális agaróz gélelektroforézissel választottuk el egymástól molekula marker (1 kb, 0,5 μg/μl Thermo Scientific) mellett, 1%-os agaróz gélen. Az agaróz gélen lévő DNS-mintázatot UV-transzilluminátor és az AlphaImager gél dokumentációs szoftver (Alpha Innotech) segítségével vizualizáltuk.

5. táblázat. A cDNS és RT-PCR készítéséhez felhasznált szekvencia specifikus oligonukleotid

Primer elnevezése	Primer szekvencia	Használat
CMV_RNA3_REV-BamHI	5'-gcggatcctggctctcttttggaggccc-3'	CMV, P12C3, C12PC3 detektálás
PSV_RNA3_REV-PstI	5'-ggctgcagtgggtctctatggagccctcatag-3'	PSV, C12P3, C12CP3 detektálás
CMV_RNA3_CP_for	5'-ggctgcagtccgcgagattgcgtt-3'	PSV, C12P3, C12CP3 detektálás
PSV_RNA3_CP_for	5'-cgcatatggcatcttcaggatc-3'	PSV, C12P3, C12CP3 detektálás
Cap_actin for	5'-agggatgggtcaaaaggatggc-3'	aktin detektálás
Cap_actin rev	5'-gagacaacaccgcctgaatgc-3'	aktin detektálás

4.2.8. eGFP detektálása, fehérjekivonás, Western blot analízis

Az MP-eGFP fúziós fehérjékkel agroinfiltrált növényekből (*N. benthamiana*, *C. annuum*) három-három levélkorong mintát vettünk 24 órával az infiltrálást követően. A növényi szövetmintákat, jégre helyezett dörzsmozsárban, 1x-es fehérje kivonó pufferben homogenizáltuk (4x puffer: 40% glicerín, 240 mM Tris HCl, pH 6.8, 8% SDS, 0.04% brómfenol-kék és 5% 2-merkaptoetanol). A fehérjéket denaturáltuk 95 °C-on 5 percig, majd 5 percig centrifugáltuk (10000 g), majd minden mintából 5-10 µl-t elválasztottunk 12%-os denaturáló (SDS tartalmú) poliakrilamid gélben 80 V-on, 120 percig. A gélben elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (GE Healthcare Bio-Sciences) vittük át, 200 mA-rel, 90 percig blottoltuk. A fehérjék egyenlő mennyiségét a membrán Ponceau festéssel (Cell Signaling Technology) igazoltuk.

A membrán blokkolásához Western Blocker Solution oldatot (Sigma) alkalmaztuk. Az MP-khez kapcsolt eGFP-t nyúl poliklonális anti-GFP (Agrisera) elsődleges ellenanyaggal mutattuk ki, amit 1:3 000 hígításban használtunk. Másodlagos ellenanyagként HRP-konjugált anti-nyúl ellenanyagot (Agrisera) alkalmaztunk, 1:5000 hígításban. Az előhíváshoz Pierce ECL HRP detection reagent Kitet (Thermo Fisher Scientific) használtunk. A kemilumineszcencia detektáláshoz pedig iBright FL1500 képalkotót használtunk (Thermo Fisher Scientific).

V. Eredmények

5.1. CMV és PSV gazdanövénykörének és tüneteinek változatossága kertészeti termesztésben előforduló gazdanövényeken és virológiai kutatásokban használt tesztnövényeken

Szakirodalmi adatok alapján a CMV és a PSV hasonló genomszerveződése és hasonló fehérjefunkcióinak ellenére a két vírus gazdanövényköre jelentősen eltér (EDWARDSON és CHRISTIE, 2018; MINK és mtsai., 1969). Növényvirológiában általánosan használt tesztnövényeket (*N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanthi-nc, *N. benthamiana*, *Chenopodium murale*) és a termesztésben meghatározó gazdaságilag jelentős növényeket fertőztünk (*Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum lycopersicum*) Rp-PSV-vel és Rs-CMV-vel, hogy a két vírus gazdanövénykörét, illetve a gazdanövényeken okozott tüneteit összehasonlítsuk (11. ábra). A tüneteket fertőzés után 10 nappal detektáltuk. *Cucumis sativus* esetén szikleveles állapotban fertőztük a növényeket, *N. glutinosa*, *N. tabacum* Xanthi, *N. benthamiana*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum lycopersicum*, *Chenopodium murale* esetén pedig 2-3 lombszeleves állapotban.

N. glutinosa és *N. benthamiana* tesztnövények közös gazdanövényei a CMV-nek és PSV-nek, mindkét vírus szisztemikus tüneteket okoz, azonban PSV esetén a tünetek enyhébbek. Inokulálást követően CMV esetén erős levéldeformációt, levélszavartást, erős mozaikot és törpülést figyeltünk meg, míg PSV mindkét tesztnövény esetében enyhébb mozaikos tüneteket és enyhe levéldeformációt okozott a megfigyelt periódusban (11. ábra).

N. tabacum cv. Xanthi-nc növényt CMV szisztemikusan fertőzte, erős levéldeformáció, erős mozaikos tüneteket figyeltünk meg. PSV fertőzés esetén viszont nem alakultak ki szisztemikus tünetek és a vírus nem is volt kimutatható a nem inokulált levelekben (11. ábra).

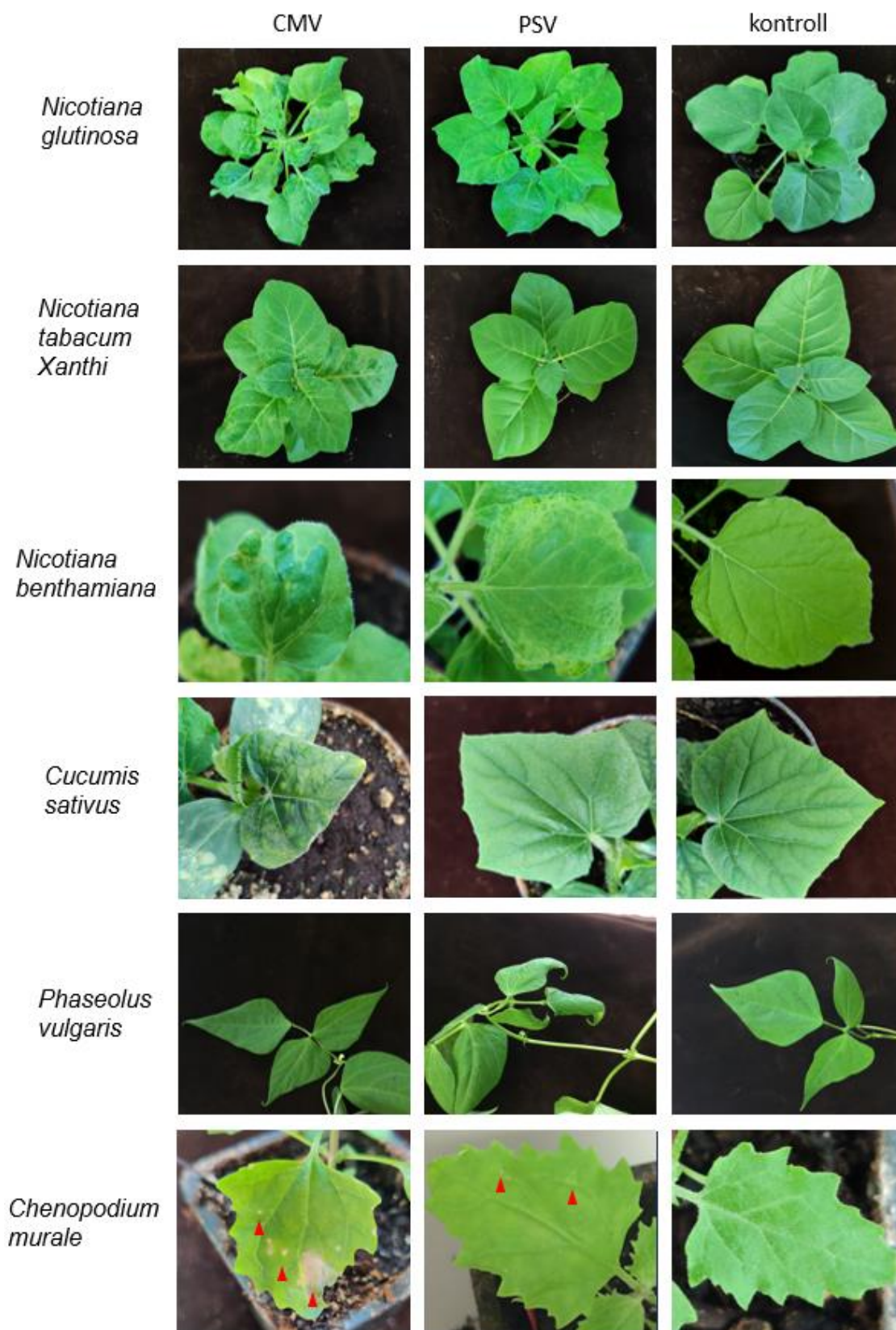
Chenopodium murale mindkét általunk vizsgált vírusnak lokális léziós gazdanövénye, azonban a PSV kisebb és enyhébb mértékben nekrotizálódó léziókat okozott az inokulált leveleken, mint a CMV. Egyik vírus sem tudott szisztemikus tüneteket kialakítani (11. ábra).

Kertészeti termesztésben jelentős növényt, az uborkát (*Cucumis sativus*), a CMV szisztemikusan fertőzte, a fertőzött leveleken klorotikus léziókat, a nem fertőzött felső leveleken

levéldeformációt és erős mozaikot okozva, míg PSV nem okozott sem lokális sem szisztemikus tüneteket.

A paradicsom (*Solanum lycopersicum*), amely hazánkban szintén nagy gazdasági jelentőséggel bíró növény, a CMV-nek szisztemikus gazdanövényének bizonyult, a vírus erős mozaikos tüneteket, törpülést és a levél lemezek keskenyedését okozta. PSV-vel fertőzött növényeken nem figyeltünk meg vírus tüneteket.

Mivel a PSV gazdanövénykörét főleg pillangós virágú növények alkotják, bab (*Phaseolus vulgaris*) növényeken is vizsgáltuk a két vírus által okozott tüneteket. Az CMV nem okozott szisztemikus tüneteket a fertőzött növényen. PSV esetén erős törpülést, kacs és levél deformációt, csavarodást figyeltünk meg, illetve enyhe mozaikos rajzolatot a lombsleveleken.

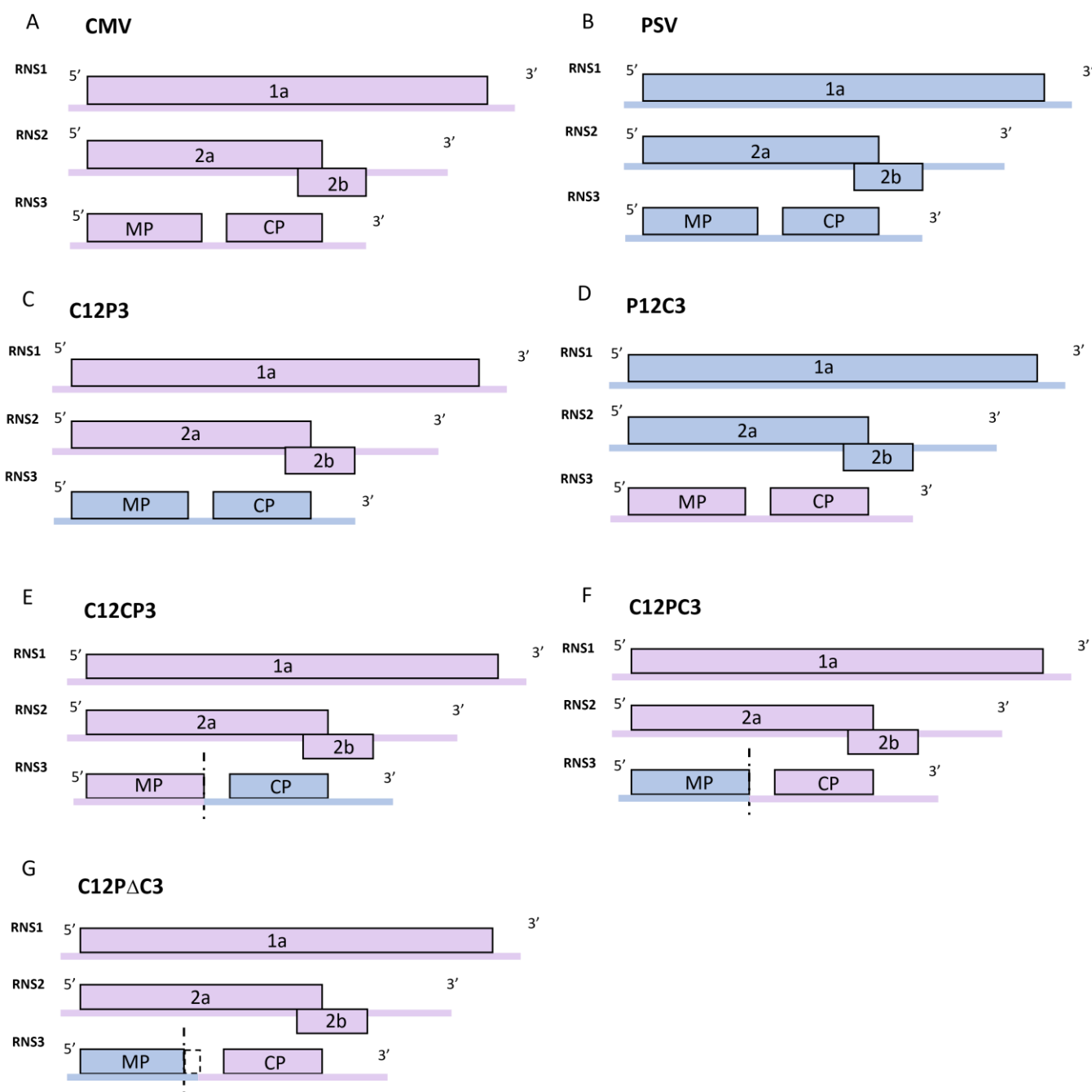


11. ábra. Rs-CMV és Rp-PSV fertőzés tünetei 10 nappal a fertőzés után tesztnövényeken (*N. glutinosa*, *N. tabacum Xanthi*, *N. benthamiana*, *Chenopodium murale*) és gazdaságilag fontos gazdanövényeken (*Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris*). Piros nyilak a lokális léziókat mutatják.

5.2 Fertőzőképes RNS3 reasszortáns és MP rekombináns vírusok készítése és *Nicotiana benthamiana* tesztnövény inokulálása

A két cucumovirus gazdanövénykörében megfigyelt lényeges eltérések, illetve a közös gazdanövényeken kialakított tünetek közti különbségek vizsgálatára különböző RNS3 rekombináns és reasszortáns vírusokat készítettünk. A fertőzésekhez a korábban leírt Rs-CMV RNS1, 2 és 3 fertőzőképes klónokat (pRs1-CMV pRs2-CMV, pRS3-CMV) (DIVÉKI és mtsai., 2004) és az Rp-PSV RNS 1, 2 és 3 fertőzőképes klónjait (pRp1-PSV pRp2-PSV, pRp3-PSV) használtuk (KISS és mtsai., 2008). Rekombináns RNS3 klónok készítéséhez a pRS3-CMV és az pRp3-PSV klónokat használtuk, overlap PCR segítségével specifikus primer párokkal (1. táblázat) az MP és az 5' nem kódoló régiót a két vírus 3-as RNS-e között kicseréltük, majd plazmidba klónoztuk, melynek eredménye a pCP3 (CMV 5' nem kódoló régiót és MP-t tartalmazza, illetve PSV MP, CP közti nem kódoló régiót, CP-t és 3' nem kódoló régiót), pPC3 (PSV 5' nem kódoló régiót és MP-t tartalmazza, illetve CMV MP, CP közti nem kódoló régiót, CP-t és 3' nem kódoló régiót) klónok. A plazmidok a klónok teljes hosszúságú DNS másolatait tartalmazzák T7 RNS promóterhez kapcsolva.

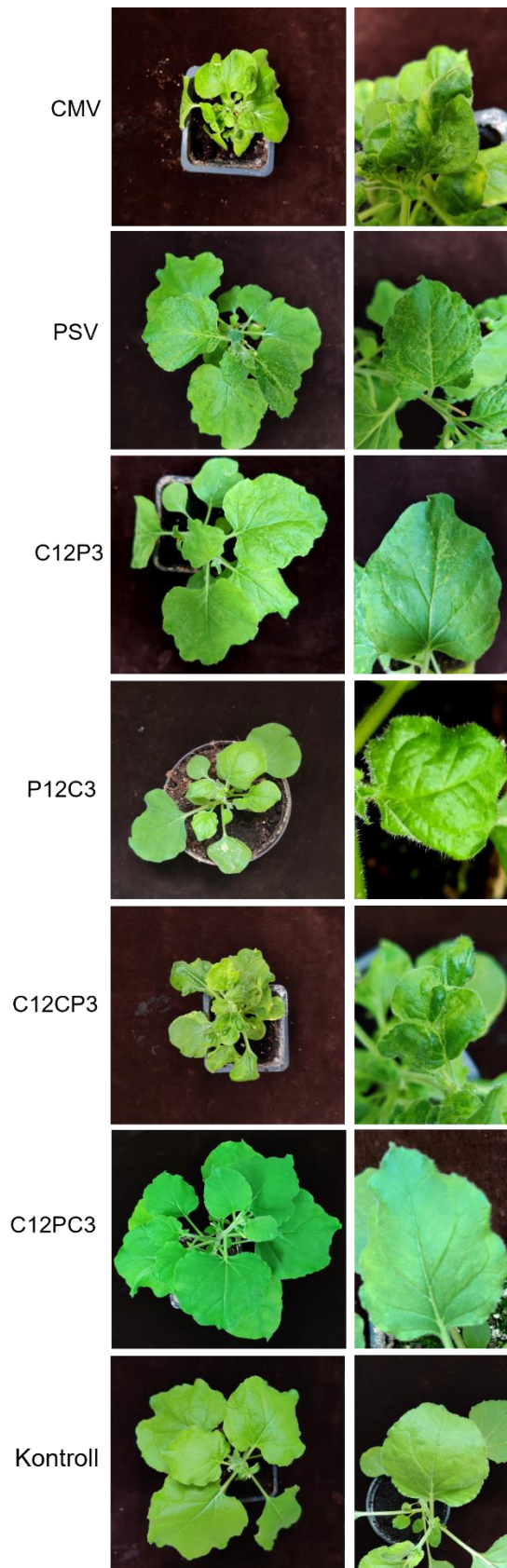
Fertőzéshez *in vitro* transzkriptumot készítettünk, amelyhez templátnak a fent említett fertőzőképes klónokat hordozó plazmidokat linearizáltuk *Bam*HI restrikciós endonukleázzal (pPSV3 esetében *Bam*HI és *Pst*I). A transzkriptumokat az alábbi kombinációban mechanikai inokulálással juttattuk tesztnövények levelére: C1+C2+C3 (12. ábra, A), P1+P2+P3 (12. ábra, B), C1+C2+P3 (12. ábra, C), P1+P2+C3 (12. ábra, D), C1+C2+CP3 (12. ábra, E), C1+C2+PC3 (12. ábra, F), C1+C2+ΔC3 (12. ábra, G), a növényi epidermisz felsértésére karborundumot használtunk. Fertőzőképesség igazolását követően a vírusokat *N. benthamiana*-ból tisztítottuk, további fertőzőkísérletekhez már a tisztított virionokat használtuk.



12. ábra. Fertőzőes kísérletekhez használt rekombináns és reasszortáns vírusok sematikus ábrázolása.

A reasszortáns és rekombináns vírusok fertőzőképességét először a két vírus közös gazdanövényén, *N. benthamiana* növényen vizsgáltuk. A CMV és a PSV szisztémikusan fertőzi a tesztnövényt, azonban CMV erősebb tüneteket, erős levéldeformációt, klorózist, törpülést okoz, míg PSV enyhe mozaikot és enyhe levéldeformációt. Háromleveles *N. benthamiana* növényeket fertőztünk CMV-vel, PSV-vel, C12P3 és P12C3 jelű RNS3 reasszortáns illetve C12CP3 és C12PC3 jelű MP rekombináns vírusokkal (13. ábra). A tünetek kialakulását az elkövetkező három

héten követtük nyomon. *N. benthamiana* növényt C12PC3 rekombináns vírus kivételével mindegyik konstrukció szisztemikusan fertőzte, azonban a tünetek intenzitása jelentősen eltért. CMV és C12CP3 esetén csúcsi, fiatal, nem inokulált levelek erős deformációját erős klorotikus mozaikot és az egész növény satnyulását, törpülését figyeltük meg. Tünetek négy nappal az inokulálást követően jelentek meg, enyhe mozaik formájában, majd egyre erősödtek. P12C3 esetén a tünetek megjelenését szintén négy nap után észleltük, azonban a tünetek enyhébbek voltak a CMV és C12CP3 vírusokhoz képest. PSV és C12P3 vírusok által okozott tünetek a CMV MP-t tartalmazó vírusokhoz képest később jelentkeztek, a hetedik napon váltak láthatóvá és jóval enyhébb tüneteket okoztak, főként enyhe mozaikot figyeltünk meg enyhe levél deformitással társulva (13. ábra).



13. ábra. CMV-vel, PSV-vel, RNS3 reasszortáns és rekombináns vírusokkal fertőzött *N. benthamiana* növények 14 nappal fertőzést követően.

Korábbi irodalmi adatok alapján CMV MP képes egy másik cucumovírus, a TAV CP-vel együtt funkcionálni, azonban TAV MP nem képes a sejtről-sejtre való terjedést elősegíteni CMV CP-vel kombinálva. Ha a C-terminális 33 aminosav deléció TAV MP mutánsal végezték el ugyanezt a kísérletet, ez a konstrukció már képes volt a vírus sejtről-sejtre való terjedését támogatni. Tehát az MP C-terminális 33 aminosava felelős a két cucumovírus fehérje közötti kompatibilitásért (SALÁNKI és mtsai., 2004). Egy másik *Bromoviridae* családba tartozó vírus, a BMV esetén is igazolták a CMV MP C-terminális 33 aminosav deléciójának szükségességét a CP-vel való kompatibilitáshoz (NAGANO és mtsai., 2001).

Mivel C12PC3 rekombináns, nem volt képes szisztemikus tüneteket kialakítani dohány növényen, a fent említett eredmények alapján aminosav szekvencia illesztés segítségével meghatároztuk a PSV MP-nek a CMV MP C-terminális 33 aminosavával homológ szakaszt, ami a PSV MP estén 42 aminosav volt (14. ábra).

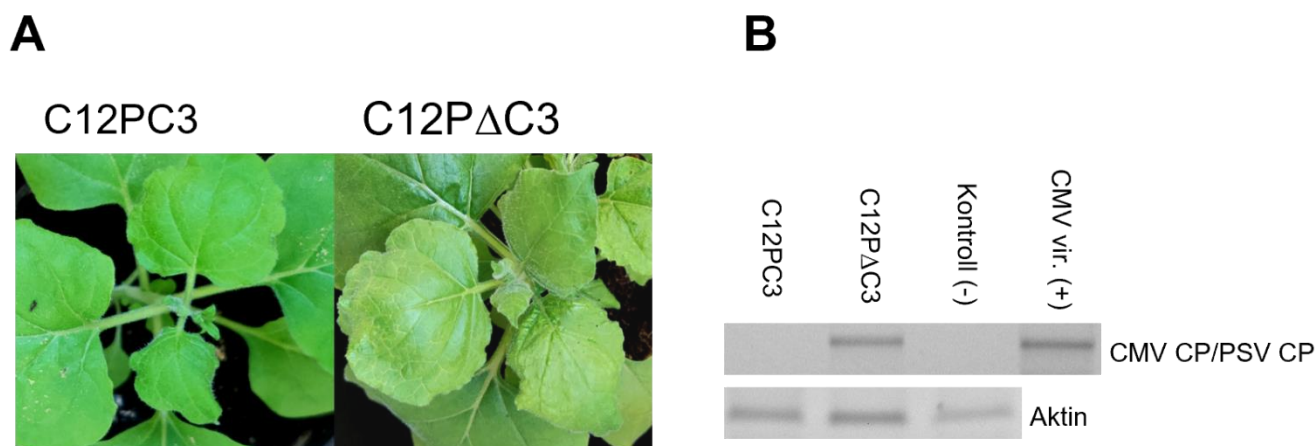
Rp-PSV	L	G	R	H	H	W	M	R	A	D	N	A	V	C	V	R	P	L	V	P	E	S	T	S	N	K	V	T	R	W	F	K	S	G	Y	E	A	G	D	L
Rs-CMV	L	G	R	H	H	W	M	R	A	D	N	A	I	S	V	R	P	L	V	P	E	V	T	H	G	R	I	A	S	F	F	K	S	G	Y	D	V	G	E	L
Rp-PSV	P	S	K	G	Y	M	S	V	P	Q	V	L	C	A	I	T	R	T	V	M	A	N	A	E	G	S	I	R	I	Y	L	A	D	L	G	D	D	E	L	A
Rs-CMV	C	S	K	G	Y	M	S	V	P	Q	V	L	C	A	V	T	R	T	V	S	T	D	A	E	G	S	L	R	I	Y	L	A	D	L	G	D	K	E	L	S
Rp-PSV	P	I	D	D	Q	V	V	T	L	H	N	R	D	L	P	A	L	V	S	F	Q	P	T	Y	D	C	P	M	E	I	V	K	G	K	S	R	C	F	V	V
Rs-CMV	P	I	D	G	Q	C	V	S	L	H	N	H	D	L	P	A	L	V	S	F	Q	P	T	Y	D	C	P	M	E	T	V	G	N	R	K	R	C	F	A	V
Rp-PSV	V	T	E	R	Y	G	Y	I	G	H	S	G	S	T	A	S	V	C	S	S	W	Q	P	K	F	S	S	K	N	N	N	Y	R	P	A	A	A	G	K	T
Rs-CMV	V	I	E	R	H	G	Y	I	G	Y	T	G	T	T	A	S	V	C	S	N	W	Q	A	R	F	S	S	K	N	N	N	Y	T	H	I	A	A	G	K	T
Rp-PSV	L	V	L	P	Y	N	R	L	S	E	L	S	G	P	S	A	V	A	R	L	L	K	S	Q	L	N	M	Q	S	S	P	F	F	Q	L	P	G	S	P	V
Rs-CMV	L	V	L	P	F	N	R	L	A	E	Q	T	K	P	S	A	V	A	R	L	L	K	S	Q	L	N	N	I	E	S	S	Q	Y	L	L	T	N	A	K	I
Rp-PSV	I	Q	K	A	I	G	S	E	H	E	E	G	L	N	C	N	R	K	L	P	L	E	E	V	S	T	T	P	Q	D	M	V	S	S	K	P	S	V	V	N
Rs-CMV	N	Q	N	A	R	-	S	E	S	E	D	-	L	N	V	E	-	S	P	P	A	A	I	G	S	S	S	A	S	R	S	E	A	F	R	P	Q	V	V	N
Rp-PSV	G	V	E	C	S	G	I	L	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rs-CMV	G	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

14. ábra. CMV MP és PSV MP aminosav szekvencia illesztés, CMV C-terminális 33 aminosav (aa) és PSV C-terminális 42 aa piros kerettel jelölve

Overlap PCR és specifikus primerek segítségével pPC3 klón, PSV MP C-terminális 42 aminosav deléció mutánsát készítettük el, melyet p Δ C3 neveztünk el. pRs1-CMV pRs2-CMV

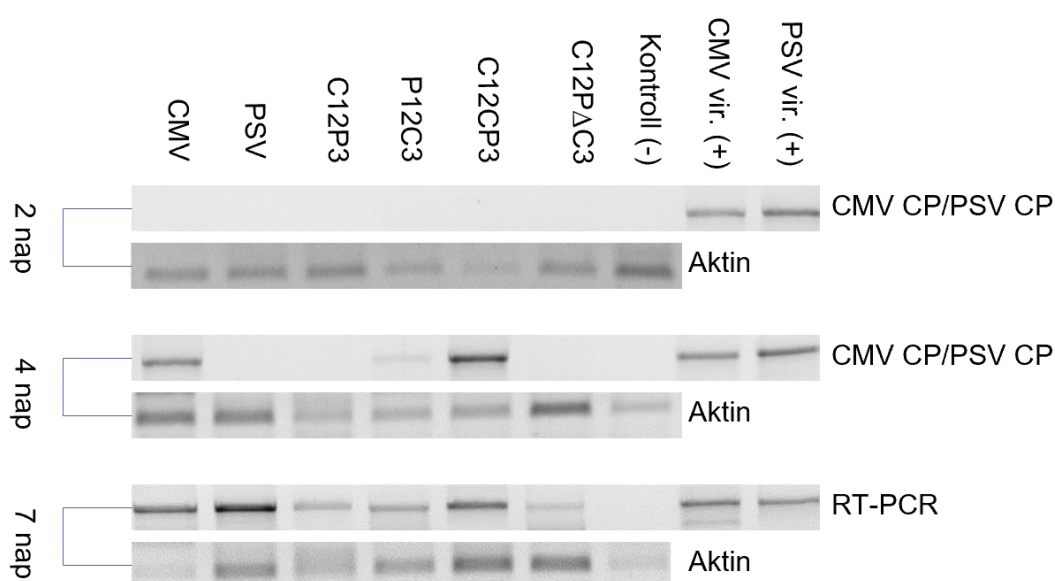
és p Δ C3-ról transzkriptumot készítettünk, majd *N. benthamiana* tesztnövényt fertőztünk. Hét nappal a fertőzést követően szisztemikus tüneteket figyeltünk meg a C12P Δ C3 vírussal fertőzött növényen. A C12PC3 vírusklónnal ellentétben amely egyáltalán nem okozott tüneteket, C12P Δ C3 fertőzőképes volt. A többi PSV MP-t tartalmazó konstrukcióhoz hasonlóan (PSV, C12P3), C12P Δ C3 is enyhébb tüneteket okozott a tesztnövényen, és lassabban jelentkeztek a tünetek, a hetedik napon váltak vizuálisan detektálhatóvá. Főként enyhe mozaikos és enyhe levéldeformációt figyeltünk meg (15. ábra, A). A fertőzött növényekből viriont tisztítottunk, amit további fertőzési kísérletekhez használtunk.

A vírus RNS akkumulációját RT-PCR segítségével CP specifikus primerekkel ellenőriztük *N. benthamiana* növények felső, nem inokulált leveleiből, a fertőzés után 21 nappal szedtünk mintát. RT-PCR-rel C12PC3 CP vírus nem volt detektálható 21 nappal fertőzés után, azonban C12P Δ C3 vírus kimutatható volt (15. ábra, B). Negatív kontrollként vírust nem tartalmazó pufferrel inokuláltuk *N. benthamiana* növény levelét, ebből készítettünk TNS (totál nukleinsav, TNS, össznukleinsav) kivonást, cDNS-t, RT-PCR-t. pozitív kontrollként pedig CMV virionból kivont RNS-t használtunk a cDNS és RT-PCR-hez. A cDNS, RT-PCR kimutatás sikerességét aktin kontrollal ellenőriztük.



15. ábra. (A) C12PC3, C12P Δ C3 transzkriptumokkal inokulált *Nicotiana benthamiana* növények 21 nappal inokulálást követően (B) RT-PCR köpenyfehérje specifikus primerek segítségével a vírus RNS akkumuláció kimutatására. PCR negatív kontrollként vírust nem tartalmazó inokuláló pufferrel kezelt *Nicotiana benthamiana* növényt használtunk, pozitív kontrollként pedig CMV viriont. A cDNS, RT-PCR kimutatás sikerességét aktin kontrollal ellenőriztük.

N. benthamiana növények fertőzésének dinamikáját a vizuális megfigyelések mellett RT-PCR-rel vizsgáltuk (16. ábra). CMV, P12C3, C12PΔC3 esetén CMV CP specifikus (CMV_RNA3_CP_for, CMV_RNA3_REV-BamHI), míg PSV, C12P3 és C12CP3 esetén PSV CP specifikus (PSV_RNA3_CP_for, PSV_RNA3_REV-PstI) primereket használtunk (1.táblázat). A vírus RNS akkumuláció kimutatására *N. benthamiana* növények felső, nem inokulált leveleiből 2, 4 és 7 nappal inokulálást követően szedtünk mintát. Két nappal az inokulálást követően a vírus RNS nem volt kimutatható egyik konstrukció esetén sem. Négy nappal az inokulálást követően a CMV MP-t hordozó konstrukciók, melyeknél már a tünetek is láthatóak voltak, kimutathatóak voltak (CMV, P12C3 és C12CP3). Hét nappal az inokulálást követően az összes vizsgált vírus kimutatható volt (CMV, PSV, C12P3, P12C3, C12CP3 és C12PΔC3), azok is, amelyeknél a tünetek később, 7 nappal az inokulálást követően jelentkeztek. Pozitív kontrollként CMV és PSV virionokból kivont RNS-t használtunk, negatív kontrollként vírust nem tartalmazó pufferrel inokulált *N. benthamiana*-ból kivont TNS-t. A cDNS, RT-PCR kimutatás sikerességét aktin kontrollal ellenőriztük.

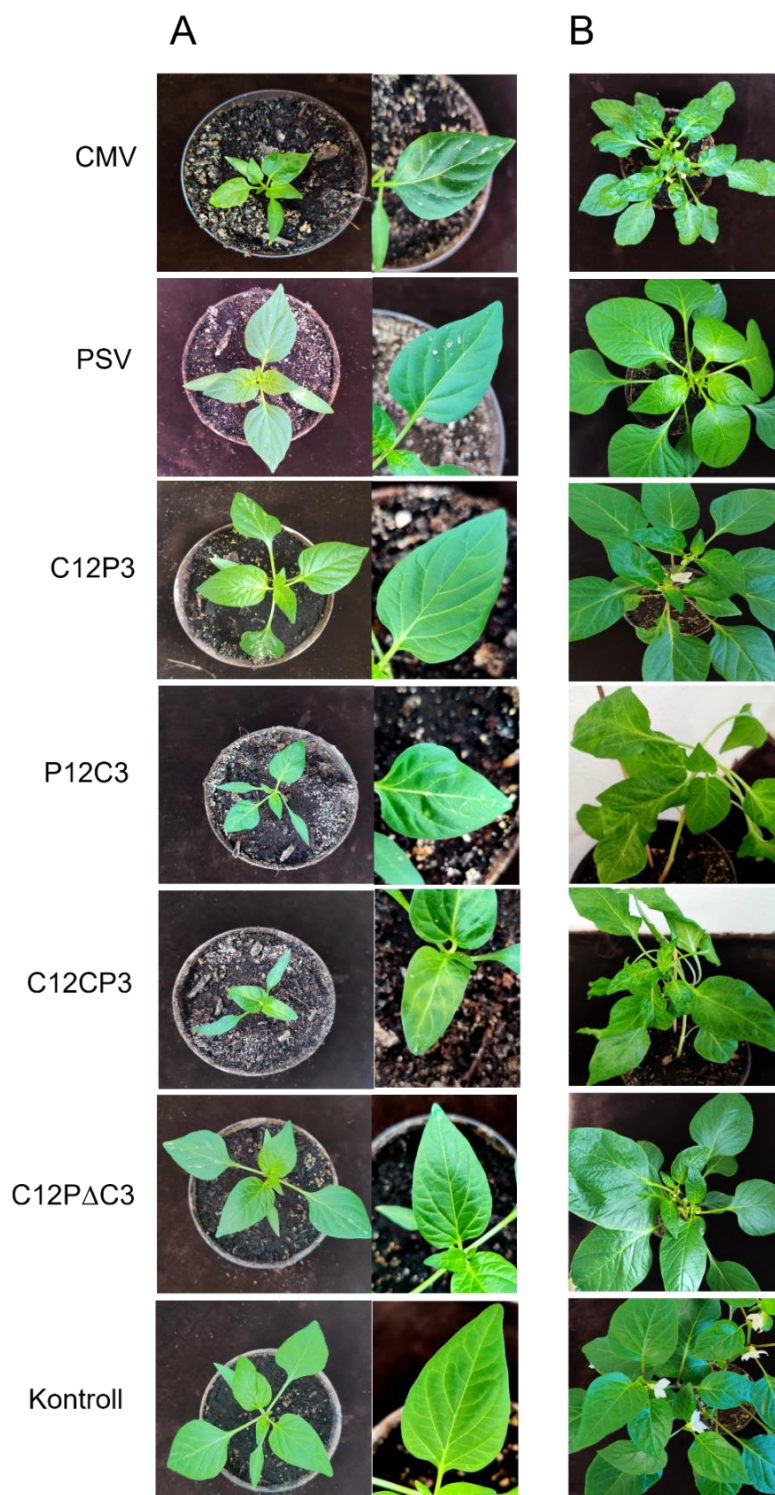


16. ábra. RT-PCR vizsgálat CP specifikus primerek használatával, CMV, PSV, C12P3, P12C3, C12CP3 és C12PΔC3-val fertőzött *N. benthamiana* növényekből. PCR negatív kontrollként vírust nem tartalmazó inokuláló pufferrel kezelt *N. benthamiana* növényt használtunk, pozitív kontrollként pedig CMV, PSV viriont.

N. benthamiana fertőzések kísérletek alapján megállapítottuk, hogy C12PC3 vírus konstrukció a PSV MP és CMV CP közötti inkompatibilitás miatt nem volt fertőzőképes, azonban deléciós mutánsa (C12PΔC3) igen, ennek eredményeképp a továbbiakban a deléciós mutánst használtuk a kísérletekhez. A CMV MP-t tartalmazó vírusok (P12C3, C12CP3) a CMV-hez hasonlóan erősebb tüneteket okoztak, törpülést, erős klorotikus mozaikot és erős levél deformitást. PSV MP-t tartalmazó konstrukciók (C12P3, C12PΔC3) PSV-hez hasonlóan enyhébb levél deformálódást és gyengébb mozaikos tüneteket okoztak.

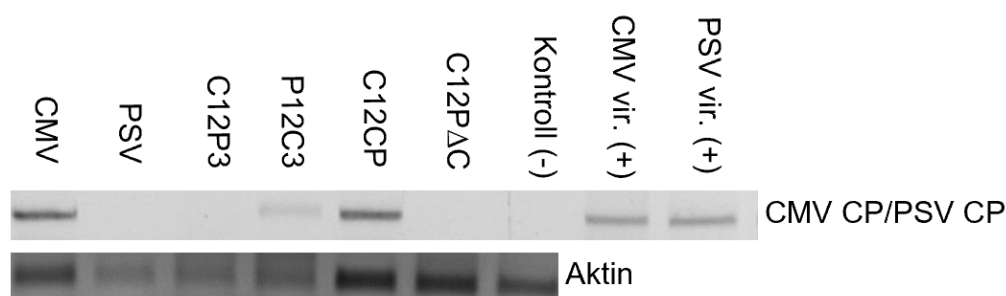
5.3 *Capsicum annuum* fertőzése RNS3 reasszortáns és MP rekombináns vírusokkal

Egy szelektív gazdanövényen, *C. annuum* cv. Brodyn folytattuk a vizsgálatokat, melyet a CMV szisztemikusan fertőz, viszont a PSV-nek nem gazdanövénye. Paprika növényeket két leveles állapotban inokuláltuk, a tünetek fejlődését hat hétig követtük nyomon. A paprika növényt a CMV szisztemikusan fertőzte, felső nem inokulált leveleken erős deformációt figyeltünk meg, valamint a CMV-re jellemző erős mozaikos tüneteket és a növény törpülését. A tünetek két héttel a fertőzést követően jelentek meg és egyre intenzívebbé váltak az idő előrehaladtával. A PSV nem okozott tünetet a növényen, sem a fiatal hajtásokon, sem pedig az alsóbb inokulált leveleken. A P12C3, és C12CP3 tehát a CMV MP-t tartalmazó vírusok, a CMV-hez hasonlóan erős levél torzulást, mozaikot és törpülést okoztak. A PSV MP-t hordozó vírusok, a C12P3 és C12PΔC3 a PSV-hez hasonlóan tünetmentesek voltak a monitorozott periódus alatt (17. ábra).



17. ábra. Tünetek kialakulása CMV-vel, PSV-vel RNS3 reasszortáns (C12P3, P12C3) és MP rekombináns (C12CP3, C12PΔC3) vírusokkal fertőzött *C. annuum* cv. Brody növényen, A: kettő héttel és B: hat héttel az inokulálást követően

A vírusok akkumulációja a szisztémikusan fertőzött levelekben a PSV és a CMV CP régióra specifikus RT-PCR-rel értékeltük, hat héttel az inokulálás után. CMV, P12C3, C12PΔC3 vírusok esetén CMV CP specifikus (CMV_RNA3_CP_for, CMV_RNA3_REV-BamHI), míg PSV, C12P3 és C12CP3 esetén PSV CP specifikus (PSV_RNA3_CP_for, PSV_RNA3_REV-PstI) primereket használtunk (1. táblázat). Pozitív kontrollként CMV és PSV virionokból kivont RNS-t használtunk. A cDNS, RT-PCR detektálás sikerességét aktin kontrollal ellenőriztük. A CMV MP-t tartalmazó vírusok (CMV, P12C3, C12CP3), amelyek szisztémikus tüneteket okoztak *C. annuum*-on, RT-PCR által detektálhatónak bizonyultak hat héttel inokulálást követően, míg a tüneteket nem okozó, PSV MP-t tartalmazó vírusokat (PSV, C12P3, C12PΔC3) nem tudtuk kimutatni a fertőzött növényekből.



18. ábra. A vírusok akkumulációja a szisztémikusan fertőzött *C. annuum* cv. Brody levelekben. A kísérletet CMV CP vagy PSV CP régióra specifikus RT-PCR-rel értékeltük hat héttel az inokulálás után.

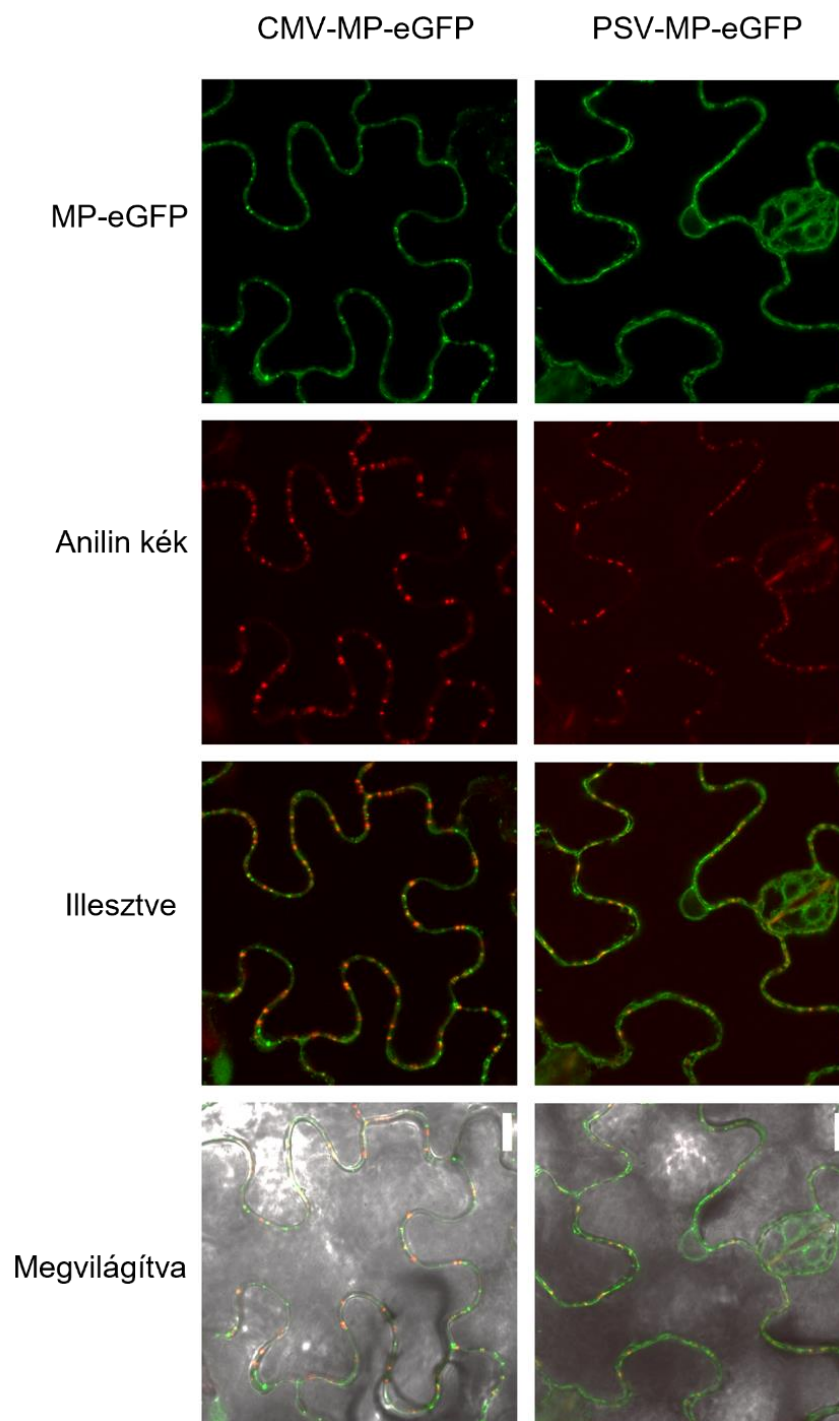
C. annuum-on szisztémikus tünetek kialakításában a CMV és a PSV esetén is az MP-nek kulcsszerepe van. Ha a CMV MP-t tartalmazta egy vírus akkor képest volt a növényt szisztémikusan fertőzni azonban, ha a vírus a PSV MP-t tartalmazta, az nem fertőzte a paprika növényt.

5.4 CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék sejtben belüli lokalizációja *Nicotiana benthamiana* sejtekben

A teszt növények fertőzése során az MP-t azonosítottuk, mint tünet jellegét vagy gazdanövényt meghatározó faktor. Az MP fő feladata a vírus sejtről-sejtre történő terjedésének támogatása, amihez az MP plazmodezma lokalizációja szükséges feltétel (NAVARRO és mtsai., 2019).

Fertőzéses kísérletek alapján felvetődött a kérdés, hogy esetleg a CMV MP és a PSV MP különböző mértékben tudja a vírus sejtről-sejtre történő mozgását támogatni, így a MP szerepét tovább vizsgáltuk. A sejtről-sejtre való terjedés, a növényi plazmodezmákon keresztül történik, ezért a CMV MP és a PSV MP növényi sejtben belüli lokalizációját, illetve plazmodezma kolokalizációját hasonlítottuk össze *N. benthamiana* növények epidermisz sejtjeiben (19. ábra). A két MP-t kódoló génszakasz C-terminális végéhez eGFP-t kódoló szakaszt fuzionáltattunk, miután az MP-k stop kodonját eltávolítottuk, hogy az MP translációja a GFP fehérjével együtt történjen. *N. benthamiana* sejtekben agroinfiltrálás segítségével tranziensen expresszáltattuk az MP-eGFP fúziós fehérjéket, majd konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével vizualizáltuk az epidermisz sejtekben az eGFP által kibocsátott zöld fluoreszcens jelet. Hat leveles dohány növényeket agroinfiltráltunk CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP-t hordozó Agrobaktérium kultúrával, majd 24 óra elteltével vizsgáltuk a növényi szövetből vett mintákat.

A növényi plazmodezmákat anilin kék festékkel tettük láthatóvá, azonban piros színnel jelöltük az ábrákon, a jobb láthatóság érdekében (19. ábra). A CMV és PSV eGFP-vel jelölt MP zöld fluoreszkáló jelként detektálható, az ábrákon zöld színnel jelöltük. Mind a PSV MP-eGFP, mind a CMV MP-eGFP mikroszkóppal a sejt perifériáján volt megfigyelhető, pontszerű formációkba rendeződve. Azonban a fluoreszcens jel eloszlása különbözött. A CMV MP-eGFP egyértelműen a sejt fal mentén lokalizálódott, kék színnel jelölt plazmodezmákkal megegyező pozícióban, míg a PSV MP-eGFP amellet, hogy a sejt periférián is detektálható volt pontszerű formációkban, homogénebben oszlott el az epidermisz sejtek citoplazmájában is. Az egymásra illesztett piros (plazmodezmák) illetve zöld (MP-k) fluoreszcens jelek esetén egyértelmű különbséget figyeltünk meg a CMV MP-eGFP és a PSV MP-eGFP plazmodezma kolokalizációjában (19. ábra).



19. ábra. CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációja *Nicotiana benthamiana* növény epidermisz sejtekben, agroinfiltrálást követően 24 órával. A fehér vonal 10 μm -t jelöl. A plazmodezma körüli kallózt anilin késsel festettük, és az ábrán piros színnel jelöltük, míg a GFP fluoreszcenciát zöld színnel jelöltük.

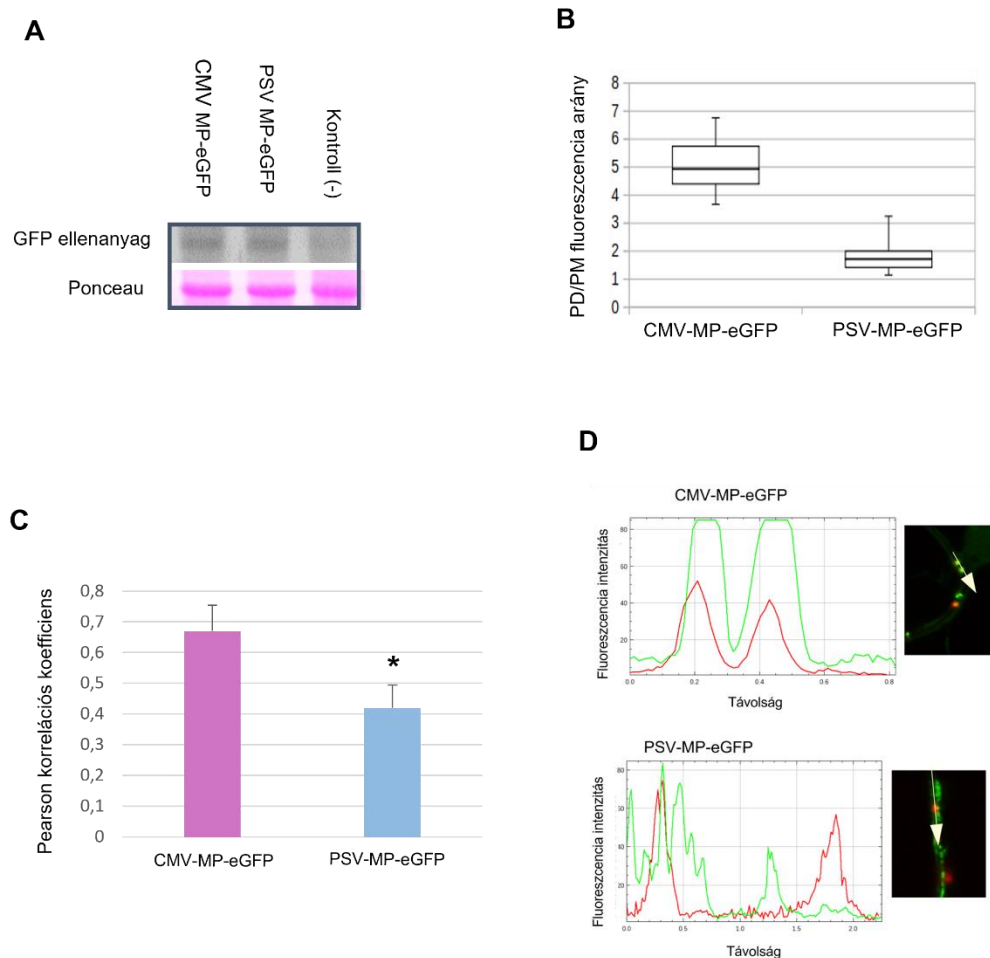
Western blot segítségével igazoltuk, hogy az agroinfiltrált növényi sejtekben, a két MP-eGFP fúziós fehérje ugyanolyan mennyiségben expresszáldott, így a sejten belüli lokalizációban való eltérések nem magyarázhatóak fehérje expressziós különbségekkel. (20. ábra, A). Az MP-eGFP fúziós fehérjék detektálásához GFP ellenanyagot használtunk, a felhasznált fehérjék azonos mennyiségének igazolásához Ponceau festést alkalmaztunk (20. ábra, A). Mivel vizuális mikroszkópos megfigyeléssel egyértelmű eltérést észleltünk a CMV MP-eGFP és a PSV MP-eGFP sejten belüli lokalizációja között, az MP-eGFP szignál plazmodezma/plazmamembrán eloszlásának arányát számszerűsítettük Fiji ImageJ szoftver alkalmazásával és box plot diagramon ábrázoltuk a mediánnal és a maximum, minimum értékekkel (20. ábra, B) (PERRAKI és mtsai., 2018). A CMV MP-eGFP plazmodezma/plazmamembrán aránya jóval magasabb mint a PSV MP-eGFP-nek, ami azt mutatja, hogy a CMV MP a plazmodezmáknál lokalizálódik főleg, míg a PSV MP a plazmamembrán és a plazmodezmák között egyenletesebben oszlik meg (20. ábra, B).

Az MP-k plazmodezma kolokalizációjának számszerűsítéséhez Pearson korrelációs koefficiens (PKK) használtunk, öt különböző mikroszkópos képen 50 plazmodezmát mértünk le Fiji ImageJ szoftver co-localization plugin segítségével (LEASTRO és mtsai., 2021). PKK értékek 0,2-0,4-ig gyenge korrelációt jelentenek, 0,5 feletti érték pedig erős korrelációt (DUNN és mtsai., 2011; LEASTRO és mtsai., 2018). A mért értékekből átlagot és szórást számítottunk és oszlop diagramon ábrázoltuk (20. ábra, C). Statisztikai analízis segítségével határoztuk meg a szignifikáns eltérést, amit csillaggal jelöltünk az ábrán. A páronkénti összehasonlítást ANOVA modell után, Tukey post-hoc teszttel végeztük el. A CMV MP-eGFP esetén erős plazmodezma kolokalizációt igazoltunk ([PKK]=0,67), míg a PSV MP-eGFP kevésbé hatékonyan kolokalizált a plazmodezmákkal ([PKK]=0,42). A két fehérje plazmodezma kolokalizációja között statisztikailag szignifikáns különbséget mutattunk ki (20. ábra, C).

Az MP plazmodezma kolokalizációt a továbbiakban fluoreszcencia intenzitás diagramokkal hasonlítottuk össze a két vírus MP esetén (20. ábra, D). Random módon választott plazmodezmák közötti vonalakat jelöltünk ki a vizsgálathoz és plot profilokat generáltunk a zöld pixelek (eGFP-vel jelölt MP-eket jelöli), és a piros pixelek (anilin kézzel festett plazmodezmákat jelöli) vonatkozásában ImageJ program segítségével. Az ábrákon a piros függvény a plazmodezmákat jelöli, míg a zöld függvény az eGFP-vel jelölt MP-eket. Az ábrán szereplő mikroszkópos képeken a fehér nyíllal jelölt régiókból készítettük a diagramokat. A CMV MP-eGFP esetén jól láthatóan a

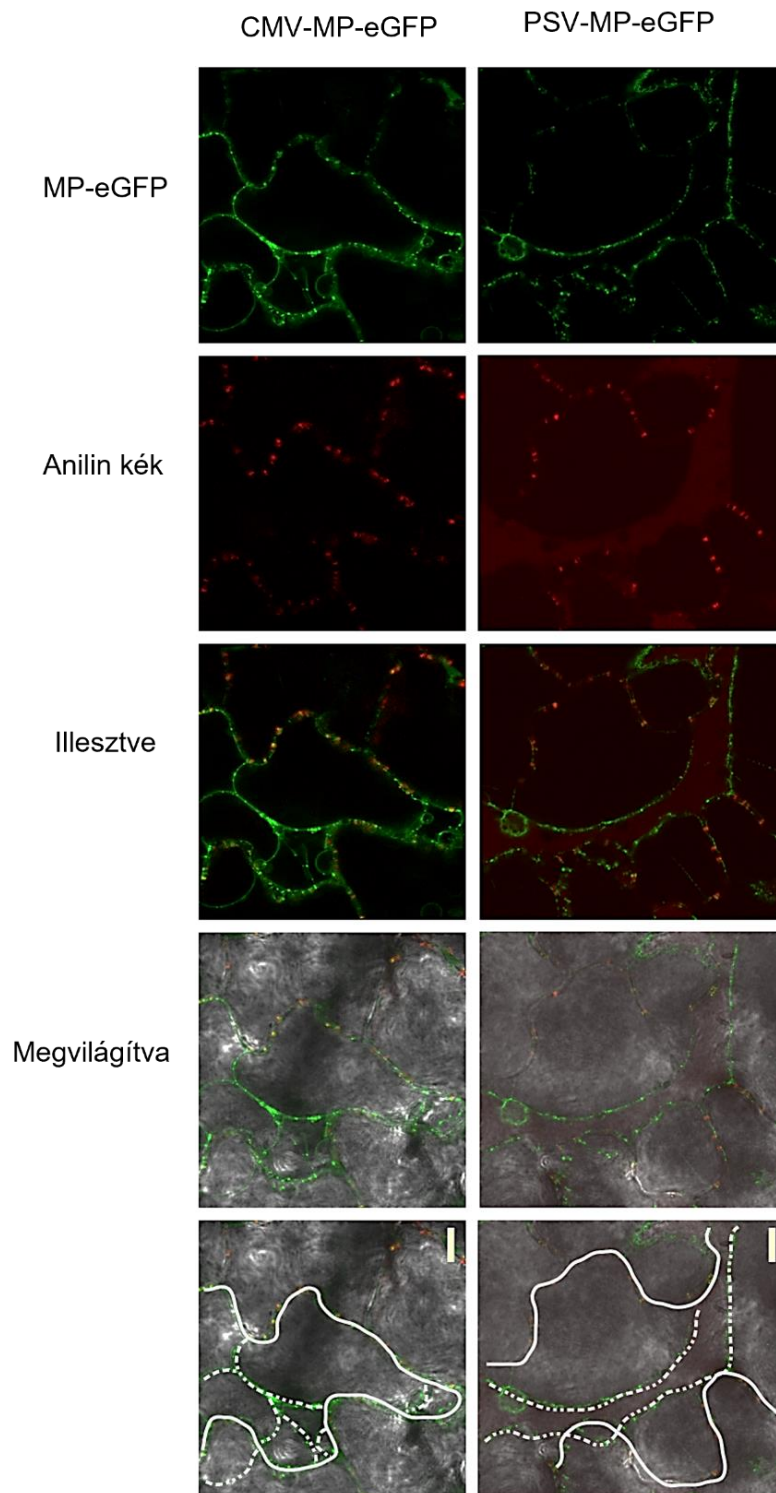
diagramon piros színnel jelölt plazmodezma és zölddel jelölt MP függvények csúcsai egybe esnek. A PSV MP-eGFP esetén a két függvény csak részlegesen esik egybe (20. ábra, D).

A plazmodezma/plazmamembrán eloszlás, a mért PKK értékek és a fluoreszcencia intenzitás diagrammok igazolták a vizuálisan megfigyeltet, miszerint a PSV MP-eGFP kevésbé képes *N. benthamiana* növény plazmodezmáival kolokalizálni mint a CMV MP-eGFP.



20. ábra. A) Western blot MP-eGFP fúziós fehérjék expressziójának összehasonlítására. B) Boxplot diagram CMV-MP-eGFP és PSV-MP-eGFP plazmodezma-plazmamembrán (PD-PM) fluoreszcencia intenzitás arányáról. C) MP-eGFP fúziós fehérjék PD kolokalizációját ábrázoló oszlop diagram, szórásokkal, statisztikailag szignifikáns különbséget, csillaggal jelöltük. D) CMV MP-eGFP, PSV MP-eGFP PD kolokalizációja fluoreszcencia intenzitás diagramokkal ábrázolva. A diagramm a fehér nyíllal jelölt régióból készült. Piros függvény a plazmodezmákat jelöli, míg a zöld függvény az eGFP-vel jelölt mozgási fehérjét.

A CMV-MP-eGFP és a PSV-MP-eGFP plazmodezma kolokalizációjának vizsgálata után, a plazmodezmákhoz való kötődést vizsgáltuk plazmolizált *N. benthamiana* epidermisz sejtekben. Az agroinfiltrálás után 24 órával szedett növényi mintákat, mikroszkópos vizsgálat előtt közvetlenül 10%-os NaCl oldatban áztattuk, aminek hatására a plazmamembrán elválk a sejtfaltól (21. ábra). A kísérlet során csak a plazmodezmákhoz kapcsolódó MP-eGFP fehérjék maradnak a sejtfalnál, az ott lokalizálódó de nem kapcsolódó fehérjék pedig eltávolodnak a sejtfaltól. A konfokális mikroszkóppal készült ábrán, melyen a zöld és piros fluoreszcens jelet egymásra illesztettük, jól megfigyelhető, hogy CMV MP-eGFP esetén a zölden fluoreszkáló pontok nagy része a sejtfal mentén elhelyezkedő plazmodezmákhoz kapcsolódva kolokalizál (21. ábra). PSV MP-eGFP esetén a zöld pontok jelentős része a plazmolízis hatására a zsugorodó citoplazmával együttesen elvált a sejtfaltól, igazolva PSV MP gyengébb plazmodezma kötődését. Az ábrán fehér szaggatott vonallal jelöltük a sejtfaltól leváló plazmamembránt, illetve fehér folytonos vonallal a sejtfalat (21. ábra).

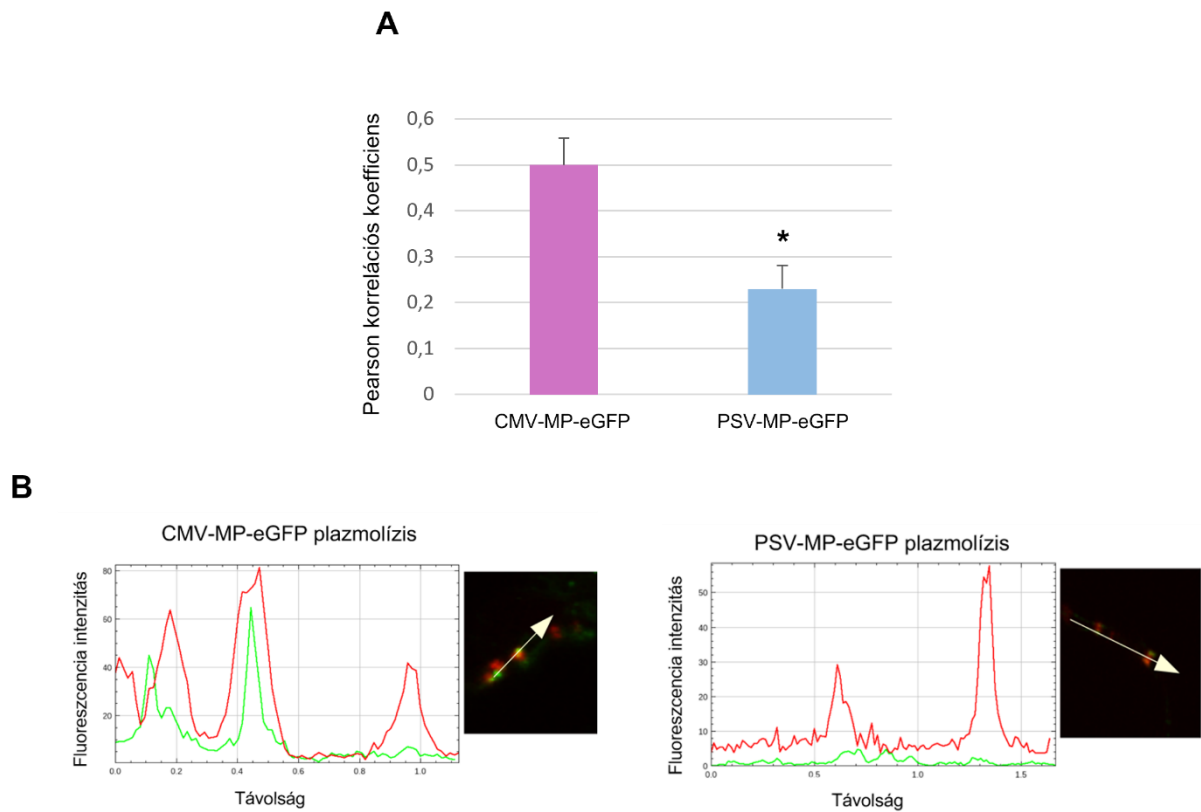


21. ábra. A mozgási fehérjék plazmodezmákhoz való kötődésének igazolása plazmolizált növényi sejtekben, agroinfiltrálást követően 24 órával. A fehér szaggatott vonal a plazmamembránt jelöli míg a folytonos vonal a sejtfalat. A plazmodezmák körüli kallózt anilin kékkel festettük, és az ábrán piros színnel jelöltük, míg a GFP fluoreszcenciát zöld színnel jelöltük. A fehér függőleges vonal 10 μm -t jelöl.

A korábbi sejten belüli lokalizációs vizsgálatoknál elvégzett méréseket plazmolizált *N. benthamiana* sejtek esetén is elkészítettük. Az MP-k plazmodezma kolokalizációjának meghatározásához PKK értékeket használtunk, öt különböző mikroszkópos képen 50 plazmodezmát mértünk, ahogy azt a korábbiakban is. A PKK értékekből, átlagot és szórást számítottunk, amit oszlop diagramon ábrázoltuk (22. ábra, A), majd statisztikai analízis segítségével meghatároztuk két MP plazmodezma lokalizációjában mért szignifikáns eltéréseket. A CMV MP-eGFP plazmolízis után is kolokalizált a plazmodezmákkal ugyan, minimálisan csökkent a PKK érték ([PKK]=0,5), de továbbra is erős korrelációt jelent. PSV MP-eGFP esetén plazmolízist követően szintén csökkent a PKK érték ([PKK]=0,24) az ép sejtekben mérthez képest, amely gyenge korrelációt eredményez a plazmodezmák és a PSV MP-eGFP lokalizációja között (22. ábra, A).

Az MP plazmodezma kolokalizációt, fluoreszcencia intenzitás diagramokkal is összehasonlítottuk (22. ábra, B), *N. benthamiana* ép sejteken végzett vizsgálathoz hasonló módon. A CMV MP-eGFP esetén a piros színnel jelölt plazmodezma függvény, illetve a zöld színnel jelölt MP-eGFP függvény csúcsai egybe esnek, ezzel alátámasztva a kolokalizációt, a PSV MP-eGFP esetén a két függvény csak részlegesen esik egybe, a fehérje részben kolokalizál csak a plazmodezmákkal (22. ábra, B).

Megállapítottuk, hogy ugyan a PSV MP plazmodezma lokalizációja kimutatható, de nem képes azok szerkezetébe olyan mértékben integrálódni, mint a CMV MP.

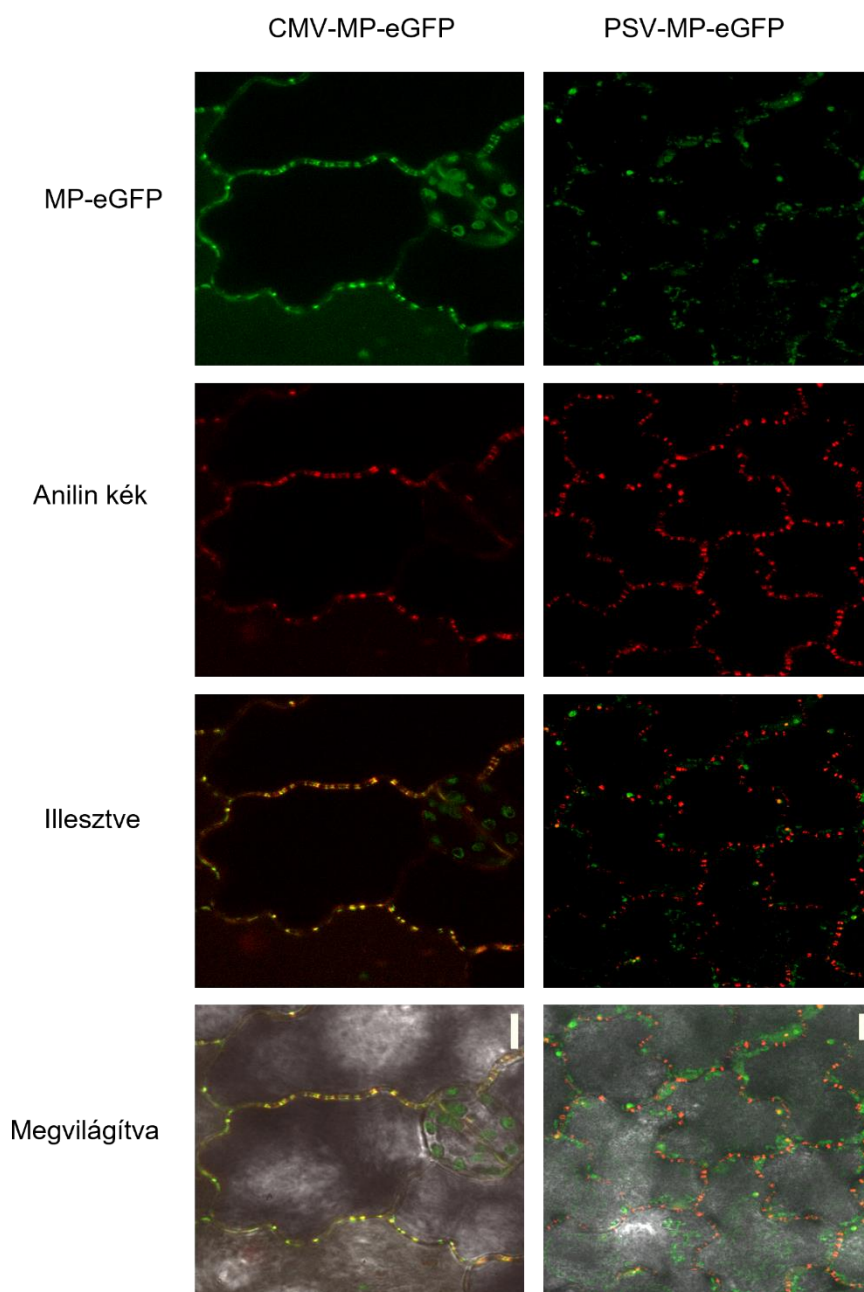


22. ábra. (A) Plazmolizált *N. benthamiana* sejtekben MP-eGFP fúziós fehérjék plazmodezma kolokalizációját ábrázoló oszlop diagram, szórásokkal, statisztikailag szignifikáns különbséget csillaggal jelöltük. D) Plazmolizált *N. benthamiana* sejtekben mozgási fehérjék plazmodezma kolokalizációja fluoreszcencia intenzitás diagramokkal ábrázolva. A diagram a fehér nyíllal jelölt régióból készült. Piros függvény a plazmodezmákat jelöli, míg a zöld függvény az eGFP-vel jelölt MP-eket.

5.5 CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék sejtben belüli lokalizációja *Capsicum annuum* sejtekben

Mivel *C. annuum* cv. Brody növényt a PSV nem volt képes szisztémikusan fertőzni, a CMV-nek viszont gazdanövénye, és a fertőzéses kísérletekben az MP-t határoztuk meg, mint a fertőzést limitáló faktort, ezen a növényen is további vizsgálatokat folytattunk a két MP sejtben belüli lokalizációjával kapcsolatban. Korábban használt CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós

fehérjék sejten belüli lokalizációját és plazmodezma kolokalizációját vizsgáltuk (23. ábra). A sejtperiférián kialakuló pontszerű formációkat észleltünk mindkét MP-eGFP esetén, de a fluoreszcens jel eloszlásában lényeges különbséget figyeltünk meg. CMV MP-eGFP tökéletesen pontszerű formációkba rendeződött az anilin kékkel jelölt plazmodezmák környékén. A PSV MP-eGFP jel, sejten belüli eloszlása teljesen más mintázatot mutatott, főleg a citoplazmában volt megfigyelhető és alig volt látható átfedést az anilin kék plazmodezma szignálokkal (23. ábra).



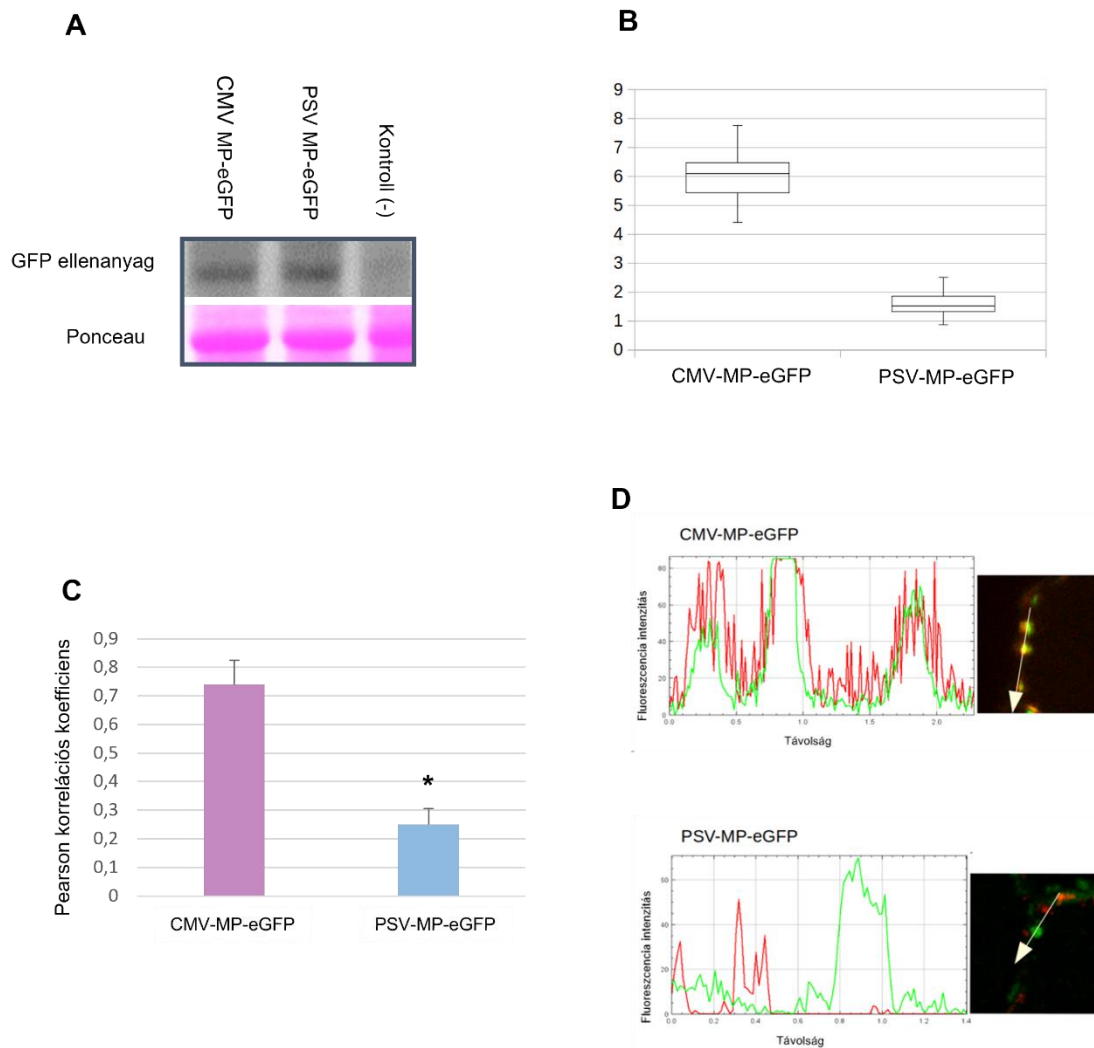
23. ábra. CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációja *Capsicum annuum* cv. Brody növény epidermisz sejtekben, agroinfiltrálást követően 24 órával. A fehér függőleges vonal 10 µm-t jelöl. A plazmodezma körüli kallózt anilin kékkel festettük, és az ábrán piros színnel jelöltük, míg a GFP fluoreszcenciát zöld színnel jelöltük.

Az agroinfiltrált *C. annuum* sejtekben Western blot segítségével igazoltuk, hogy CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék ugyanolyan mennyiségben expresszálódtak (24. ábra, A). Az MP-eGFP fúziós fehérjék detektálásához GFP ellenanyagot használtunk, a felhasznált fehérjék azonos mennyiségének igazolásához Ponceau festést alkalmaztunk.

A vizuális megfigyelések igazolásához, ahogy *N. benthamiana* növényi sejtek esetén is, az MP-eGFP szignál plazmodezma/plazmamembrán eloszlásának arányát mértük meg, majd boxplot diagramon ábrázoltuk mediánnal, maximum és minimum értékkel (24. ábra, B). CMV MP-eGFP plazmodezma/plazmamembrán aránya sokkal magasabb volt, mint PSV MP-eGFP plazmodezma/plazmamembrán arány, aminek jelenléte leginkább a citoplazmában volt kimutatható.

Az MP-k plazmodezma kolokalizációjának méréséhez, az előzőekben *N. benthamiana* növényeken végzett kísérletekhez hasonlóan PKK használtunk, amihez öt különböző mikroszkópos képen 50 plazmodezmát mértünk le. A mért értékekből átlagot és szórást számítottunk és oszlop diagramon ábrázoltuk (24. ábra, C). Statisztikailag szignifikáns eltéréseket kétmintás T-próbával igazoltuk, majd az ábrán csillaggal jelöltük. CMV MP-eGFP plazmodezma kolokalizációja erős korrelációt mutatott ([PKK]=0,74), amely magasabb szám, mint az *N. benthamiana* esetén mért. PSV MP-eGFP nagyon kis mértékben kolokalizált plazmodezmákkal ([PKK]=0,25), amely jóval alacsonyabb korreláció, mint *N. benthamiana* esetén ([PKK]=0,42) (24. ábra, C).

Fluoreszcencia intenzitás diagramokkal is összehasonlítottuk PSV MP-eGFP és CMV MP-eGFP plazmodezma lokalizációját (24. ábra, D). Az ábrákon a piros függvény a plazmodezmákat jelöli, míg a zöld függvény az eGFP-vel jelölt MP-eket. Az ábrán szereplő mikroszkópos képeken a fehér nyíllal jelölt régiókból készítettük a diagramokat. CMV MP-eGFP esetén a pirossal jelölt plazmodezma függvény három csúcsa tökéletesen egybe esik a zöld fluoreszcens jel (MP-eGFP) függvény három csúcsával. PSV MP-eGFP esetén viszont a piros és zöld függvény csekély mértékben sem fedi egymást (24. ábra, D).



24. ábra. A) Western blot MP-eGFP fúziós fehérjék expressziójának összehasonlítására. B) Boxplot diagram CMV-MP-eGFP és PSV-MP-eGFP plazmodezma/plazmamembrán (PD/PM) fluoreszcencia intenzitás arányáról. C) MP-eGFP fúziós fehérjék plazmodezma kolokalizációját ábrázoló oszlop diagram, szórásokkal, statisztikailag szignifikáns különbséget, csillaggal jelöltük. D) Mozgási fehérjék plazmodezma kolokalizációja fluoreszcencia intenzitás diagramokkal ábrázolva. A diagram a fehér nyíllal jelölt régióból készült. Piros függvény a plazmodezmákat jelöli, míg a zöld függvény az eGFP-vel jelölt MP-eket.

Megállapítottuk, hogy ugyan a PSV MP plazmodezma kolokalizációja kimutatható, de nem kötődik a plazmodezmákhoz olyan hatékonyan, mint a CMV MP, ez okozza *C. annuum* esetében a két vírus közti gazdanövény különbséget, illetve *N. benthamiana* esetén a tünetekben való eltérést.

VI. Következtetések

A CMV-nek több mint 1200 gazdanövényét írták le több mint 100 növény családból, azonban a PSV gazdanövényköre és gazdasági jelentősége leginkább a hüvelyes növényekre korlátozódik, annak ellenére, hogy taxonómiai és genom-szerveződésben, illetve a fehérjék funkciójában CMV-hez nagyon hasonló. A gazdanövénykör és a tünetek kialakulása komplex jelenség, melyeket bonyolult vírus-növény kölcsönhatások határoznak meg. A cucumovírusok esetén mind az öt vírus által kódolt fehérje szerepét igazolták ezen kölcsönhatások kialakulásában, azonban ezen kölcsönhatások részletes jellemzéséről nem áll rendelkezésre elegendő információ (SALÁNKI és mtsai., 2018).

A CMV és a PSV gazdanövénykörének és tüneteinek változatosságát a növényvirológiában általánosan használt teszt növényeken és a zöldségtermesztésben előforduló növényeken figyeltük meg. A korábbi irodalmi adatokhoz hasonlóan, a PSV nem fertőzte szisztemikusan *N. tabacum* cv. Xanthi növényt, a CMV viszont képes volt ezen a növényen szisztemikus tüneteket kialakítani. *N. benthamiana* teszt növényeken mindkét vírus szisztemikus tüneteket okozott, azonban a tünetek intenzitásában és fenotípusában eltérés mutatkozott (KISS és mtsai., 2008). Uborkán és paradicsomon a CMV szisztemikus tüneteket okozott, míg a PSV nem, azonban a pillangós virágúakhoz tartozó babot, a PSV szisztemikusan fertőzte, amire a CMV nem fertőzte.

A CMV és a PSV gazdanövénykörében való eltérések és a közös gazdanövényeken kialakított tünetek fenotípusa közti különbségek vizsgálatára először különböző RNS3 reassortáns (C12P3, P12C3) vírusokat, ahol a két vírus közt az RNS3 kicserélésre került, és MP rekombináns (C12CP3, C12PC3) vírusokat készítettünk, ahol az MP-t cseréltük ki a két vírus között. Korábban az MP szerepét a gazdanövénykör meghatározásában CMV RNS3 és földimogyoró rozettásodás vírus (*Groundnut rosette virus*, GRV) MP segítségével igazolták (RYABOV és mtsai., 1999). A CMV MP szerepét a tünetek meghatározásában igazolták egy másik vírusszaládba tartozó vírus, a *Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus* (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) MP segítségével, amely esetben CMV MP-t CymRSV MP-vel helyettesítve dohány növényen a tünetek változását igazolták (HUPPERT és mtsai., 2002). Munkánk során a rekombináns és reassortáns vírusokkal egy közös gazdanövényt *N. benthamiana*-t fertőztünk. A C12PC3 rekombináns vírus kivételével mindegyik konstrukció szisztemikusan fertőzte a teszt növényt. Korábbi irodalmi adatok alapján több példa van rá, hogy a *Bromoviridae* családon belül két vírus MP-je csak a C-terminális 33 aminosav delécióna esetén képes a másik vírus CP-vel együtt funkcionálni. A BMV esetén

igazolták a CMV MP C-terminális 33 aminosav deléciójának szükségességét a CP-vel való kompatibilitáshoz (NAGANO és mtsai., 2001). A CMV MP képes egy másik Cucumovírus, a TAV CP-vel együtt funkcionálni, azonban a TAV MP nem képes a sejtről-sejtre való terjedést elősegíteni a CMV CP-vel kombinálva. A TAV MP C-terminális 33 aminosava felelős a két cucumovírus fehérje közötti kompatibilitásért (SALÁNKI és mtsai., 2004). Mivel kísérleteink során C12PC3 rekombináns, nem volt képes szisztemikus tüneteket kialakítani dohány növényen, elkészítettünk egy MP C-terminális deléciós mutánst, ahol a CMV MP C-terminális 33 aminosavval homológ szakaszt eltávolítottuk PSV MP szekvenciából. Az így kapott deléciós mutáns pPAC3, képest volt szisztemikus tünetek kialakítására *N. benthamiana* növényen. Az eredmények azt mutatják, hogy a PSV-nek a TAV-hoz hasonlóan kevésbé rugalmas a MP-je, a CMV-hez viszonyítva, ami összefüggésbe hozható a CMV sokkal tágabb gazdanövénykörével. A további kísérletekhez ezt a szisztemizálódni képes deléciós mutánst használtuk. A fertőzéses kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a CMV MP-t tartalmazó vírusok (P12C3, C12CP3) a CMV-hez hasonlóan erősebb tüneteket okoztak, törpülést, erős klorotikus mozaikot és erős levél deformitást és hamarabb, már négy nappal inokulálást követően kimutathatóak a nem fertőzött frissebb hajtásokból, mint a PSV MP-t tartalmazó vírusok. A PSV MP-t tartalmazó konstrukciók (C12P3, C12PAC3) a PSV-hez hasonlóan enyhébb levél deformálódást és gyengébb mozaikos tüneteket okoztak, hét nappal az inokulálást követően voltak kimutathatóak a szisztemikus levelekből.

A kísérleteket egy szelektív gazdanövényen, *C. annuum* cv. Brodyn folytattuk, melyet a CMV szisztemikusan képes fertőzni, azonban a PSV-nek nem gazdanövénye. A P12C3, és C12CP3 reasszortáns és rekombináns vírusok tehát a CMV MP-t tartalmazó vírusok, a CMV-hez hasonlóan erős levél torzulást, erős mozaikos tüneteket és törpülést okoztak a paprika növényen, míg a PSV MP-t hordozó vírusok, a C12P3 és C12PAC3 a PSV-hez hasonlóan nem tudták szisztemikusan fertőzni a paprika növényt, és nem voltak kimutathatóak a nem inokulált levelekben a hat hetes monitorozott periódus alatt. Fertőzési kísérleteink igazolták, hogy *N. benthamiana* növényen és paprika növényen, a CMV és a PSV közötti gazdanövény illetve tüneti eltéréseket a két vírus MP-hez köthetjük.

A cucumovírus MP elsődleges feladata a vírus sejtről-sejtre történő terjedésének támogatása, ami a növényi plazmodezmákon keresztül történik és az MP plazmodezma lokalizációja szükséges feltétel hozzá (NAVARRO és mtsai., 2019). *N. benthamiana* növények epidermisz sejtjeiben eGFP-vel jelölt CMV MP és PSV MP sejten belüli lokalizációját és plazmodezma kolokalizációját

hasonlítottuk össze. Mind a PSV MP-eGFP, mind a CMV MP-eGFP fúziós fehérje a sejt periferiáján volt megfigyelhető, pontszerű formációkba rendeződve. Azonban a CMV MP-eGFP egyértelműen a plazmodezmákkal megegyező pozícióban lokalizálódott magasabb plazmodezma/plazmamembrán aránnyal míg a PSV MP-eGFP a plazmodezma lokalizáció mellett homogénebben oszlott el az epidermisz sejtek citoplazmájában is, plazmodezma/plazmamembrán aránya alacsonyabb volt a CMV MP-eGFP esetében mérténél. A Pearson korrelációs koefficiens segítségével történő plazmodezma kolokalizáció számszerűsítésénél a CMV MP-eGFP esetén erős plazmodezma kolokalizációt igazoltunk ([PKK]=0,67), míg a PSV MP-eGFP kevésbé hatékonyan kolokalizált a plazmodezmákkal ([PKK]=0,42), tehát statisztikailag szignifikáns különbséget mutattunk ki. A koloklaizációban megállapított különbségek alapján, a két vírus MP plazmodezmákhoz való kötődését vizsgáltuk plazmolizált *N. benthamiana* epidermisz sejtekben. A PSV MP-eGFP jelentős része a plazmolízis hatására a zsugorodó citoplazmával együttesen elvált a sejtfaltól, míg a CMV MP-eGFP jelentős része a plazmodezmákhoz kötötten a sejtfalnál maradt, igazolva a PSV MP gyengébb plazmodezma kötődését. Megállapítottuk *N. benthamiana* növény esetén, hogy ugyan a PSV MP plazmodezma lokalizációja kimutatható, de nem képes azok szerkezetébe olyan mértékben integrálódni, mint a CMV MP. Mivel *C. annuum* cv. Brody növényt a PSV nem volt képes szisztemikusan fertőzni, a CMV-nek viszont gazdanövénye, ezen a növényen is további vizsgálatokat folytattunk a két MP sejten belüli lokalizációjával kapcsolatban. A CMV MP-eGFP plazmodezma kolokalizációja erős korrelációt mutatott ([PKK]=0,74), amely magasabb, mint a *N. benthamiana* növény esetén mért. Paprika növény epidermisz sejtjeiben a PSV MP-eGFP nagyon kis mértékben kolokalizált plazmodezmákkal ([PKK]=0,25), amely jóval gyengébb korreláció, mint *N. benthamiana* esetén ([PKK]=0,42).

Még ha a növényi vírusok gazdanövénykörének meghatározása összetett jelenség is, a sejtről-sejtre való mozgás korlátozása gátolhatja a fertőzés kialakulását, vagy a tünetek megjelenésének sebességét. A PSV MP szerkezete hasonló a 30K szupercsalád többi MP-jéhez, a fő domének erős homológiát mutatnak a CMV MP-vel, mint például a hidrofób domén (86-118. aminosav) vagy az RNS-kötő domén (aa 174-233). A C-terminális régiónál figyelhető meg a legkisebb hasonlóság, ami érdekes módon hosszabb is (7 aa), mint a CMV vagy a TAV C-terminális régiója. Korábban kimutatták, hogy a CMV MP plazmodezma integrációját elősegíti a 28-as Serin aminosav, mely foszforilálható (SÁRAY és mtsai., 2021), ez az aminosav a PSV MP-ben is jelen van. A 30k szupercsaládban a plazmodezma lokalizációs szignált a közelmúltban az N-terminális 50. aminosavnál határozták meg TMV esetén (YUAN és mtsai., 2016). A plazmodezma lokalizációs

szignál egyik kölcsönható partnerét, a növényi szinaptotagmint (SYTA) is meghatározták (YUAN és mtsai., 2018).

A cucumovírusok esetében hasonló adatok nem állnak rendelkezésre, ezért további vizsgálatok szükségesek a sejtről-sejtre való mozgáshoz szükséges faktorok azonosításához, valamint ezen kölcsönhatások elemzése különböző gazdanövény-vírus kapcsolatok esetén. Ezen kölcsönhatások további jellemzése magyarázatot adhat a CMV és a PSV MP eltérő sejten belüli lokalizációjára *N. benthamiana* és *C. annuum* növények epidermisz sejtjeiben.

VII. Új tudományos eredmények

1. Igazoltuk a PSV MP C-terminális 42 aminosav deléciójának szükségességét a CMV CP-vel való kompatibilitáshoz.
2. Megállapítottuk, hogy *N. benthamiana* növényen a CMV MP-t tartalmazó vírusok (C12CP3, P12C3) a CMV-hez hasonlóan erősebb tüneteket okoztak, törpülést, erős klorotikus mozaikot és erős levél deformitást figyeltünk meg, míg a PSV MP-t tartalmazó vírusok (C12PΔC3, C12P3) a PSV-hez hasonlóan enyhébb levél deformálódást és gyengébb mozaikos tüneteket okoztak.
3. *C. annuum* cv. Brody növényen a CMV MP-t tartalmazó vírusok (C12CP3, P12C3), a CMV-hez hasonlóan erős levél torzulást, erős mozaikos tüneteket és törpülést okoztak, míg a PSV MP-t tartalmazó vírusok (C12PΔC3, C12P3), nem okoztak tüneteket, nem tudták szisztemikusan fertőzni a paprika növényt.
4. *N. benthamiana* sejtekben CMV MP-eGFP fúziós fehérje esetén erős plazmodezma kolokalizációt igazoltunk, míg a PSV MP-eGFP fúziós fehérje kevésbé hatékonyan kolokalizált a plazmodezmákkal, illetve plazmolizált sejtekben igazoltuk PSV MP-eGFP gyengébb plazmodezma kötődését.
5. Bizonyítottuk, hogy *C. annuum* cv. Brody növényen a CMV MP-eGFP fúziós fehérje plazmodezma kolokalizációja erősebb, mint *N. benthamiana* esetén, PSV MP-eGFP fúziós fehérje viszont nagyon kis mértékben kolokalizál a plazmodezmákkal. Tehát a PSV nem képes hatékony sejtről-sejtre terjedésre a paprika növényben és ez lehet a legfontosabb oka annak, hogy a PSV nem képes a paprika növény megfertőzésére.

VIII. Összefoglalás magyar és angol nyelven

8.1 Összefoglalás

Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) és a földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) egyaránt a *Cucumovirus* nemzetség tagja, mely a *Bromoviridae* családon belül mezőgazdasági szempontból a legjelentősebb nemzetség. Osztott genomjuk összességében hozzávetőleg nyolc kilobázis (kb) méretű, mindössze öt fehérjét kódol, melyek több funkciót látnak el. A CMV és a PSV hasonló genomszerveződése és hasonló fehérjefunkcióinak ellenére a két vírus gazdanövényköre jelentősen eltér. Cucumovírusok közül a CMV összes fehérjéjéről igazolták a patogenitásban betöltött szerepét különböző gazdanövényeken, azonban a nemzetség további tagjai, TAV (*Tomato aspermy virus*) és PSV esetén kevesebb információ áll rendelkezésünkre.

A CMV és a PSV gazdanövénykörében való eltérések és a közös gazdanövényeken kialakított tünetek fenotípusa közti különbségek vizsgálatára különböző RNS3 reasszortáns (C12P3, P12C3) vírusokat, és MP rekombináns (movement protein, mozgási fehérje) (C12CP3, C12PC3) vírusokat készítettünk melyekkel először egy közös gazdanövényt, *N. benthamiana*-t fertőztünk. C12PC3 rekombináns vírus, nem volt képes szisztemikus tüneteket kialakítani a tesztnövényen, a PSV MP C-terminális 42 aminosav deléciójára volt szükség a CMV CP-vel való kompatibilitáshoz C12PΔC3). A CMV MP-t tartalmazó vírusok (C12CP3, P12C3) a CMV-hez hasonlóan erősebb tüneteket okoztak, törpülést, erős klorotikus mozaikot és erős levél deformitást figyeltünk meg, míg a PSV MP-t tartalmazó vírusok (C12PΔC3, C12P3) a PSV-hez hasonlóan enyhébb levél deformálódást és gyengébb mozaikos tüneteket okoztak. A kísérleteket egy szelektív gazdanövényen, *C. annuum* cv. Brodyn folytattuk, melyet a CMV szisztemikusan képes fertőzni, azonban a PSV-nek nem gazdanövénye. CMV MP-t tartalmazó vírusok (C12CP3, P12C3), a CMV-hez hasonlóan erős levél torzulást, erős mozaikos tüneteket és törpülést okoztak, míg a PSV MP-t tartalmazó vírusok (C12PΔC3, C12P3), nem okoztak tüneteket, nem tudták szisztemikusan fertőzni a paprika növényt.

N. benthamiana epidermisz sejtjeiben eGFP-vel jelölt CMV MP és PSV MP sejten belüli lokalizációját és plazmodezma kolokalizációját hasonlítottuk össze. Mind a PSV MP-eGFP, mind a CMV MP-eGFP fúziós fehérje a sejt periferiáján volt megfigyelhető, pontszerű formációkba rendeződve. Azonban a CMV MP-eGFP egyértelműen a plazmodezmákkal megegyező pozícióban lokalizálódott míg a PSV MP-eGFP a plazmodezma lokalizáció mellett homogénebben

oszlott el az epidermisz sejtek citoplazmájában is. Plazmolizált sejtekben igazoltuk PSV MP-eGFP gyengébb plazmodezma kötődését. *C. annuum* cv. Brody epidermisz sejteket infiltrálva, bizonyítottuk, hogy CMV MP-eGFP fúziós fehérje plazmodezma kolokalizációja erősebb, mint *N. benthamiana* esetén, PSV MP-eGFP fúziós fehérje viszont nagyon kis mértékben kolokalizál a plazmodezmákkal.

Eredményeinkkel *N. benthamiana* növényen CMV és PSV által kialakított tünetekben való eltérésért, illetve paprika növény esetén a gazdanövényt meghatározó faktorként az MP-t azonosítottuk. A két vírus MP plazmodezma kolokalizációjában szignifikáns különbséget mutattunk ki *N. benthamiana* és *C. annuum* cv. Brody növényekben.

8.2. Summary

Cucumber mosaic virus (CMV) and *Peanut stunt virus* (PSV) are both members of the *Cucumovirus* genus, which is the most economically important genus of the *Bromoviridae* family. Their multipartite genome has a total size of approximately 8 kilobases (kb) and encodes only five proteins that perform several functions. Despite their similar genome and protein functions, the host ranges of the two viruses differ significantly. All five viral proteins of CMV were proven to have roles in pathogenicity on various host plants, however there is less information available for other members of the genus (*Tomato aspermy virus*, TAV and PSV).

In order to investigate the differences in the host range of CMV and PSV and the differences between the phenotypes of the symptoms developed on common host plants, different RNS3 reassortant (C12P3, P12C3) viruses and MP (movement protein) recombinant (C12CP3, C12PC3) viruses were generated with which we first infected a common host plant *N. benthamiana*. Recombinant C12PC3 was unable to develop systemic symptoms on the test plant, deletion of the C-terminal 42 amino acids of PSV MP was required for compatibility with CMV CP (C12PΔC3). Viruses containing CMV MP (C12CP3, P12C3) caused stronger symptoms, similar to CMV, stunting, strong chlorotic mosaic and severe leaf deformity were observed, while viruses containing PSV MP (C12PΔC3, C12P3) induced milder leaf deformation and weaker mosaic symptoms like PSV. The experiments were carried out on a selective host plant, *C. annuum* cv. Brody. Viruses containing CMV MP (C12CP3, P12C3) caused strong leaf distortion, strong mosaic symptoms and stunting, like CMV, while viruses coding PSV MP (C12PΔC3, C12P3) caused no symptoms and could not infect systemically the pepper plant.

The intracellular localization and plasmodesma colocalization of eGFP-labelled CMV MP and PSV MP were compared in epidermal cells of *N. benthamiana*. Both PSV MP-eGFP and CMV MP-eGFP fusion proteins were detectable as punctate-like structures along the cell wall, however, CMV MP-eGFP was clearly localized in the same position as plasmodesmata, while PSV MP-eGFP was more homogeneously distributed in the cytoplasm. In plasmolyzed cells the great majority of CMV-MP-eGFP remained detectable at plasmodesmata. In the case of PSV-MP-eGFP, the majority of MP-eGFPs were retracted with the shrinking protoplast from the cell wall, indicating that they were weakly associated with plasmodesmata. Infiltrating *C. annuum* cv. Brody epidermal cells clear differences were observed in the subcellular localization of CMV-MP-eGFP and PSV-MP-eGFP. CMV-MP-eGFP was enriched in *C. annuum* PD more than in *N. benthamiana* and colocalized more accurately with PDs in *C. annuum* epidermal cells than in *N. benthamiana* epidermal cells.

In this study, MP as the protein determining symptom phenotypes on *N. benthamiana* and responsible for the host range difference on *C. annuum* cv. Brody was identified. Significant differences in the MP plasmodesma colocalization of the two viruses in *N. benthamiana* and *C. annuum* cv. Brody in plants were observed.

IX. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek; Dr. Salánki Katalinnak, hogy minden felmerülő szakmai vagy egyéb problémában, segítségemre volt a dolgozat elkészítése során, megismertette velem a növényvirologia világát, és hogy türelemmel segített elsajátítani a dolgozat elkészítéséhez szükséges molekuláris módszereket, és Dr. Palkovics Lászlónak a szakmai irányítást és hogy segítségemre volt abban hogy az egyetemi éveim alatt az érdeklődési körömnek megfelelő kutató munkába kapcsolódhassak.

Köszönet illeti az MTA ATK NÖVI Virologiai Csoportjának összes tagját, akikhez bátran fordulhattam szakmai vagy mindennapos problémáimmal, kérdéseimmel, barátságos légkört teremtettek a munkához.

Köszönöm Dr. Fábián Attilának a mikroszkópos munkák során nyújtott szakmai segítségért.

Köszönettel tartozom továbbá az Agrártudományi Kutatóközpont és a Növényvédelmi Intézet korábbi és jelenlegi vezetésének, hogy a kutatásaimat az intézet keretein belül végezhettem.

Mellékletek

Irodalomjegyzék

1. ABBINK, T. E. M., DE VOGEL, J., BOL, J. F., LINTHORST, H. J. M. (2001): Induction of a Hypersensitive Response by Chimeric Helicase Sequences of Tobamoviruses U1 and Ob in *N* - Carrying Tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 14, 1086–1095. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.9.1086>
2. ALVES-JÚNIOR, M., ALFENAS-ZERBINI, P., ANDRADE, E. C., ESPOSITO, D. A., SILVA, F. N., DA CRUZ, A. C. F., VENTRELLA, M. C., OTONI, W. C., ZERBINI, F. M. (2009): Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. *Virology* 387, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.046>
3. AMSBURY, S., KIRK, P., BENITEZ-ALFONSO, Y. (2018): Emerging models on the regulation of intercellular transport by plasmodesmata-associated callose. *Journal of Experimental Botany* 69, 105–115. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx337>
4. ANDIKA, I. B., WEI, S., CAO, C., SALAIPETH, L., KONDO, H., SUN, L. (2017): Phytopathogenic fungus hosts a plant virus: A naturally occurring cross-kingdom viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 12267–12272. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714916114>
5. BECZNER, L., DEVERGNE, J. C., VASSÁNYI, R. (1978): Symptomatological and serological characterization of some Hungarian cucumovirus isolates. 3. *International Congress of Plant Pathology* 45.
6. BENDAHDANE, A., KÖHM, B. A., DEDI, C., BAULCOMBE, D. C. (1995): The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx 1-mediated virus resistance in potato. *The Plant Journal* 8, 933–941. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.8060933.x>
7. BLACKMAN, L. M., BOEVINK, P., CRUZ, S. S., PALUKAITIS, P., OPARKA, K. J. (1998): The Movement Protein of Cucumber Mosaic Virus Traffics into Sieve Elements in Minor Veins of *Nicotiana clevelandii*. *The Plant Cell* 10, 525–537. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.4.525>
8. BOCCARD, F., BAULCOMBE, D. (1993): Mutational Analysis of Cis-acting Sequences and Gene Function in RNA3 of Cucumber Mosaic Virus. *Virology* 193, 563–578. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1165>

9. BRIGNETI, G. (1998): Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO Journal* 17, 6739–6746. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6739>
10. BUJARSKI, J., GALLITELLI, D., GARCÍA-ARENAL, F., PALLÁS, V., PALUKAITIS, P., REDDY, M. K., WANG, A., ICTV REPORT CONSORTIUM (2019): ICTV Virus Taxonomy Profile: Bromoviridae. *Journal of General Virology* 100, 1206–1207. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001282>
11. CANTO, T., PALUKAITIS, P. (1999): Are Tubules Generated by the 3a Protein Necessary for Cucumber Mosaic Virus Movement? *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 12, 985–993. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.11.985>
12. CANTO, T., PRIOR, D. A. M., HELLWALD, K.-H., OPARKA, K. J., PALUKAITIS, P. (1997): Characterization of Cucumber Mosaic Virus. *Virology* 237, 237–248. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8804>
13. CHOI, S. K., PALUKAITIS, P., MIN, B. E., LEE, M. Y., CHOI, J. K., RYU, K. H. (2005): Cucumber mosaic virus 2a polymerase and 3a movement proteins independently affect both virus movement and the timing of symptom development in zucchini squash. *Journal of General Virology* 86, 1213–1222. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80744-0>
14. CHOI, Y., KANG, M.-Y., LEE, J.-H., KANG, W.-H., HWANG, J., KWON, J.-K., KANG, B.-C. (2016): Isolation and Characterization of Pepper Genes Interacting with the CMV-P1 Helicase Domain. *PLOS ONE* 11, e0146320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146320>
15. CLARK, A. J., PERRY, K. L. (2002): Transmissibility of Field Isolates of Soybean Viruses by *Aphis glycines*. *Plant Disease* 86, 1219–1222. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.11.1219>
16. CODOÑER, F. M., ELENA, S. F. (2008): The promiscuous evolutionary history of the family Bromoviridae. *Journal of General Virology* 89, 1739–1747. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000166-0>
17. DANIELS, J. (1992): Characterization of Cucumber Mosaic Virus Isolates from California. *Plant Disease* 76, 1245. <https://doi.org/10.1094/PD-76-1245>
18. DE WISPELAERE, M., GAUBERT, S., TROUILLOUD, S., BELIN, C., TEPFER, M. (2005): A map of the diversity of RNA3 recombinants appearing in plants infected with cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus. *Virology* 331, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.017>

19. DEOM, C. M., OLIVER, M. J., BEACHY, R. N. (1987): The 30-Kilodalton Gene Product of Tobacco Mosaic Virus Potentiates Virus Movement. *Science* 237, 389–394. <https://doi.org/10.1126/science.237.4813.389>
20. DEVERGNE, J. C., CARDIN, L. (1973): Contribution l'étude du virus de la mosaïque du concombre CMV. *Annales de Phytopathologie* 5, 409–430.
21. DEVERGNE, J. C., CARDIN, L., BURCKARD, J., VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1981): Comparison of direct and indirect ELISA for detecting antigenically related cucumoviruses. *Journal of Virological Methods* 3, 193–199. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(81\)90070-7](https://doi.org/10.1016/0166-0934(81)90070-7)
22. DING, S. W., LI, W. X., SYMONS, R. H. (1995): A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *The EMBO Journal* 14, 5762–5772. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00265.x>
23. DIVÉKI, Z., SALÁNKI, K., BALÁZS, E. (2004): The Necrotic Pathotype of the *Cucumber mosaic virus* (CMV) Ns Strain Is Solely Determined by Amino Acid 461 of the 1a Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 17, 837–845. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.8.837>
24. DOOLITTLE, S. P. (1916): A new infectious disease of cucumber. *Phytopathology* 6.2, 145–147.
25. DOROKHOV, Y. L., ERSHOVA, N. M., SHESHUKOVA, E. V., KOMAROVA, T. V. (2019): Plasmodesmata Conductivity Regulation: A Mechanistic Model. *Plants* 8, 595. <https://doi.org/10.3390/plants8120595>
26. DU, Z., CHEN, F., ZHAO, Z., LIAO, Q., PALUKAITIS, P., CHEN, J. (2008): The 2b protein and the C-terminus of the 2a protein of cucumber mosaic virus subgroup I strains both play a role in viral RNA accumulation and induction of symptoms. *Virology* 380, 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.036>
27. DUNN, K. W., KAMOCKA, M. M., McDONALD, J. H. (2011): A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300, C723–C742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>
28. EDWARDSON, J. R., CHRISTIE, R. G. (2018): CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes, 1. kiad. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351071192>
29. ELVIRA GONZÁLEZ, L., PEIRÓ, R., RUBIO, L., GALIPIENSO, L. (2021): Persistent Southern Tomato Virus (STV) Interacts with Cucumber Mosaic and/or Pepino Mosaic Virus in Mixed- Infections

- Modifying Plant Symptoms, Viral Titer and Small RNA Accumulation. *Microorganisms* 9, 689. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040689>
30. ESCRIU, F., FRAILE, A., GARCÍA-ARENAL, F. (2000): Evolution of Virulence in Natural Populations of the Satellite RNA of *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology*® 90, 480–485. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.5.480>
 31. FLASINSKI, S. (1995): Diseases of *Peperomia*, *Impatiens*, and *Hibbertia* Caused by Cucumber Mosaic Virus. *Plant Disease* 79, 843. <https://doi.org/10.1094/PD-79-0843>
 32. GAL-ON, A., KAPLAN, I. B., PALUKAITIS, P. (1996): Characterization of Cucumber Mosaic Virus. *Virology* 226, 354–361. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0663>
 33. GILARDI, P., GARCÍA-LUQUE, I., SERRA, M. T. (2004): The coat protein of tobamovirus acts as elicitor of both L 2 and L 4 gene-mediated resistance in Capsicum. *Journal of General Virology* 85, 2077–2085. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80017-0>
 34. GILDOW, F. E., SHAH, D. A., SACKETT, W. M., BUTZLER, T., NAULT, B. A., FLEISCHER, S. J. (2008): Transmission Efficiency of *Cucumber mosaic virus* by Aphids Associated with Virus Epidemics in Snap Bean. *Phytopathology*® 98, 1233–1241. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-11-1233>
 35. GOTO, K., KOBORI, T., KOSAKA, Y., NATSUAKI, T., MASUTA, C. (2007): Characterization of Silencing Suppressor 2b of Cucumber Mosaic Virus Based on Examination of its Small RNA-Binding Abilities. *Plant and Cell Physiology* 48, 1050–1060. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm074>
 36. GUIU-ARAGONÉS, C., MONFORTE, A. J., SALADIÉ, M., CORRÊA, R. X., GARCIA-MAS, J., MARTÍN-HERNÁNDEZ, A. M. (2014): The complex resistance to cucumber mosaic cucumovirus (CMV) in the melon accession PI161375 is governed by one gene and at least two quantitative trait loci. *Molecular Breeding* 34, 351–362. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0038-y>
 37. HAJIMORAD, M. R., HU, C.-C., GHABRIAL, S. A. (1999): Molecular characterization of an atypical Old World strain of Peanut stunt virus. *Archives of Virology* 144, 1587–1600. <https://doi.org/10.1007/s007050050612>
 38. HAMAMOTO, H., WATANABE, Y., KAMADA, H., OKADA, Y. (1997): A Single Amino Acid Substitution in the Virus-Encoded Replicase of Tomato Mosaic Tobamovirus Alters Host Specificity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 10, 1015–1018. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.8.1015>

39. HAYES, R. J., BUCK, K. W. (1990): Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63, 363–368. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90169-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90169-F)
40. HEBERT, T. T. (1967): Epidemiology of the Peanut stunt virus in North Carolina. *Phytopathology* 461.
41. HERRERA-VÁSQUEZ, J. A., ALFARO-FERNÁNDEZ, A., CÓRDOBA-SELLÉS, M. C., CEBRIÁN, M. C., FONT, M. I., JORDÁ, C. (2009): First Report of Tomato torrado virus Infecting Tomato in Single and Mixed Infections with *Cucumber mosaic virus* in Panama. *Plant Disease* 93, 198–198. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-2-0198A>
42. HU, C.-C., GHABRIAL, S. A. (1998): Molecular Evidence That Strain BV-15 of Peanut Stunt Cucumovirus Is a Reassortant Between Subgroup I and II Strains. *Phytopathology*® 88, 92–97. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.2.92>
43. HULL, R. (2002): Matthew's Plant virology. Academic Press Inc, San Diego, USA.
44. HUPPERT, E., SZILASSY, D., SALÁNKI, K., DIVÉKI, Z., BALÁZS, E. (2002): Heterologous Movement Protein Strongly Modifies the Infection Phenotype of Cucumber Mosaic Virus. *Journal of Virology* 76, 3554–3557. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.7.3554-3557.2002>
45. HWANG, M. S., KIM, K. N., LEE, J. H., PARK, Y. I. (2007): Identification of amino acid sequences determining interaction between the cucumber mosaic virus-encoded 2a polymerase and 3a movement proteins. *Journal of General Virology* 88, 3445–3451. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83207-0>
46. HWANG, M. S., KIM, S. H., LEE, J. H., BAE, J. M., PAEK, K. H., PARK, Y. I. (2005): Evidence for interaction between the 2a polymerase protein and the 3a movement protein of Cucumber mosaic virus. *Journal of General Virology* 86, 3171–3177. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81139-0>
47. INABA, J., KIM, B. M., SHIMURA, H., MASUTA, C. (2011): Virus-Induced Necrosis Is a Consequence of Direct Protein-Protein Interaction between a Viral RNA-Silencing Suppressor and a Host Catalase. *Plant Physiology* 156, 2026–2036. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180042>
48. INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)

49. JAY, F., BRIOUDES, F., VOINNET, O. (2023): A contemporary reassessment of the enhanced transient expression system based on the tombusviral silencing suppressor protein P19. *The Plant Journal* 113, 186–204. <https://doi.org/10.1111/tpj.16032>
50. JI, L.-H., DING, S.-W. (2001): The Suppressor of Transgene RNA Silencing Encoded by *Cucumber mosaic virus* Interferes with Salicylic Acid-Mediated Virus Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 14, 715–724. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.6.715>
51. JOSHI, R. L., JOSHI, S., CHAPEVILLE, F., HAENNI, A. L. (1983): tRNA-like structures of plant viral RNAs: conformational requirements for adenylation and aminoacylation. *The EMBO Journal* 2, 1123–1127. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01556.x>
52. KAPER, J. M., WATERWORTH, H. E. (1981): Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis. Elsevier, Amsterdam.
53. KAPLAN, I. B., GAL-ON, A., PALUKAITIS, P. (1997): Characterization of Cucumber Mosaic Virus. *Virology* 230, 343–349. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8468>
54. KAPLAN, I. B., ZHANG, L., PALUKAITIS, P. (1998): Characterization of Cucumber Mosaic Virus. *Virology* 246, 221–231. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9192>
55. KIM, C.-H., PALUKAITIS, P. (1997): The plant defense response to cucumber mosaic virus in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. *The EMBO Journal* 16, 4060–4068. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.4060>
56. KIM, M. J., HUH, S. U., HAM, B.-K., PAEK, K.-H. (2008): A Novel Methyltransferase Methylates *Cucumber Mosaic Virus* 1a Protein and Promotes Systemic Spread. *Journal of Virology* 82, 4823–4833. <https://doi.org/10.1128/JVI.02518-07>
57. KIM, S. H., KALININA, N. O., ANDREEV, I., RYABOV, E. V., FITZGERALD, A. G., TALIANSKY, M. E., PALUKAITIS, P. (2004): The C-terminal 33 amino acids of the cucumber mosaic virus 3a protein affect virus movement, RNA binding and inhibition of infection and translation. *Journal of General Virology* 85, 221–230. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19583-0>
58. KISS, L., SEBESTYÉN, E., LÁSZLÓ, E., SALAMON, P., BALÁZS, E., SALÁNKI, K. (2008): Nucleotide sequence analysis of peanut stunt virus Rp strain suggests the role of homologous recombination in cucumovirus evolution. *Archives of Virology* 153, 1373–1377. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0120-z>

59. KOBORI, T., MIYAGAWA, M., NISHIOKA, K., OHKI, S. T., OSAKI, T. (2002): Amino Acid 129 of Cucumber mosaic virus Coat Protein Determines Local Symptom Expression and Systemic Movement in *Tetragonia expansa*, *Momordica charantia* and *Physalis floridana*. *Journal of General Plant Pathology* 68, 81–88. <https://doi.org/10.1007/PL00013059>
60. KWON, C. S., CHUNG, W.-I. (2000): Differential roles of the 5' untranslated regions of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2, 3 and 4 in translational competition. *Virus Research* 66, 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00120-9)
61. LEASTRO, M. O., FREITAS-ASTÚA, J., KITAJIMA, E. W., PALLÁS, V., SÁNCHEZ-NAVARRO, J. A. (2021): Unravelling the involvement of cilevirus p32 protein in the viral transport. *Scientific Reports* 11, 2943. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82453-4>
62. LEASTRO, M. O., KITAJIMA, E. W., SILVA, M. S., RESENDE, R. O., FREITAS-ASTÚA, J. (2018): Dissecting the Subcellular Localization, Intracellular Trafficking, Interactions, Membrane Association, and Topology of Citrus Leprosis Virus C Proteins. *Frontiers in Plant Science* 9, 1299. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01299>
63. LES ERICKSON, F., HOLZBERG, S., CALDERON-URREA, A., HANDLEY, V., AXTELL, M., CORR, C., BAKER, B. (1999): The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *The Plant Journal* 18, 67–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00426.x>
64. LEWSEY, M. G., GONZÁLEZ, I., KALININA, N. O., PALUKAITIS, P., CANTO, T., CARR, J. P. (2010): Symptom induction and RNA silencing suppression by the cucumber mosaic virus 2b protein. *Plant Signaling & Behavior* 5, 705–708. <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11643>
65. LEWSEY, M., SURETTE, M., ROBERTSON, F. C., ZIEBELL, H., CHOI, S. H., RYU, K. H., CANTO, T., PALUKAITIS, P., PAYNE, T., WALSH, J. A., CARR, J. P. (2009): The Role of the Cucumber mosaic virus 2b Protein in Viral Movement and Symptom Induction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 22, 642–654. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-6-0642>
66. LI, Q., PALUKAITIS, P. (1996): Comparison of the Nucleic Acid- and NTP-Binding Properties of the Movement Protein of Cucumber Mosaic Cucumovirus and Tobacco Mosaic Tobamovirus. *Virology* 216, 71–79. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0035>
67. LI, Q., RYU, K. H., PALUKAITIS, P. (2001): Cucumber mosaic virus -Plant Interactions: Identification of 3a Protein Sequences Affecting Infectivity, Cell-to-Cell Movement, and Long-distance Movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 14, 378–385. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.3.378>

68. LIU, S., HE, X., PARK, G., JOSEFSSON, C., PERRY, K. L. (2002): A Conserved Capsid Protein Surface Domain of *Cucumber Mosaic Virus* Is Essential for Efficient Aphid Vector Transmission. *Journal of Virology* 76, 9756–9762. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.19.9756-9762.2002>
69. LOT, H., KAPER, J. M. (1976): Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus. *Virology* 74, 223–226. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(76\)90143-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(76)90143-4)
70. MAKKOUK, K. M., ATTAR, N. (2003): Seed transmission of Cucumber mosaic virus and Alfalfa mosaic virus in lentil seeds. *Arab Journal of Plant Protection*, 49–52.
71. MASCIA, T., CILLO, F., FANELLI, V., FINETTI-SIALER, M. M., DE STRADIS, A., PALUKAITIS, P., GALLITELLI, D. (2010): Characterization of the Interactions Between *Cucumber mosaic virus* and *Potato virus Y* in Mixed Infections in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 23, 1514–1524. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-10-0064>
72. MASCIA, T., VUČUROVIĆ, A., MINUTILLO, S. A., NIGRO, F., LABARILE, R., SAVOIA, M. A., PALUKAITIS, P., GALLITELLI, D. (2019): Infection of *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora infestans* by taxonomically different plant viruses. *European Journal of Plant Pathology* 153, 1001–1017. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01615-9>
73. MASIRI, J., VELASQUEZ, N. V., MURPHY, J. F. (2011): *Cucumber mosaic virus* 2b-Deficient Mutant Causes Limited, Asymptomatic Infection of Bell Pepper. *Plant Disease* 95, 331–336. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0392>
74. MASUTA, C., UEDA, S., SUZUKI, M., UYEDA, I. (1998): Evolution of a quadripartite hybrid virus by interspecific exchange and recombination between replicase components of two related tripartite RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 10487–10492. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10487>
75. MATSUSHITA, Y., YOSHIOKA, K., SHIGYO, T., TAKAHASHI, H., NYUNOYA, H. (2002): Phosphorylation of the Movement Protein of Cucumber Mosaic Virus in Transgenic Tobacco Plants. *Virus Genes* 24, 231–234. <https://doi.org/10.1023/A:1015324415110>
76. MEISTER, G., TUSCHL, T. (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature02873>
77. MELCHER, U. (2000): The ‘30K’ superfamily of viral movement proteins. *Microbiology* 81, 257–266. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-1-257>

78. MESHI, T., MOTOYOSHI, F., MAEDA, T., YOSHIWOKA, S., WATANABE, H., OKADA, Y. (1989): Mutations in the tobacco mosaic virus 30-kD protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. *The Plant Cell* 1, 515–522. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.5.515>
79. MINK, G. L., SILBERNAGEL, M. J., SAKSENA, K. N. (1969): Host range, purification, and properties of the western strain of Peanut stunt virus. *Phytopathology* Vol.59, pp.1625-1631.
80. MISE, K., ALLISON, R. F., JANDA, M., AHLQUIST, P. (1993): Bromovirus movement protein genes play a crucial role in host specificity. *Journal of Virology* 67, 2815–2823. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.5.2815-2823.1993>
81. MOCHIZUKI, T., OHKI, S. T. (2011): Single amino acid substitutions at residue 129 in the coat protein of cucumber mosaic virus affect symptom expression and thylakoid structure. *Archives of Virology* 156, 881–886. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0910-y>
82. MURPHY, J. F., BOWEN, K. L. (2006): Synergistic Disease in Pepper Caused by the Mixed Infection of *Cucumber mosaic virus* and *Pepper mottle virus*. *Phytopathology*® 96, 240–247. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0240>
83. MUSHEGIAN, A. R., KOONIN, E. V. (1993): Cell-to-cell movement of plant viruses: Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. *Archives of Virology* 133, 239–257. <https://doi.org/10.1007/BF01313766>
84. NAGANO, H., MISE, K., FURUSAWA, I., OKUNO, T. (2001): Conversion in the Requirement of Coat Protein in Cell-to-Cell Movement Mediated by the Cucumber Mosaic Virus Movement Protein. *Journal of Virology* 75, 8045–8053. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.17.8045-8053.2001>
85. NAIDU, R. A. (1991): Symptom-Modulating Properties of Peanut Stunt Virus Satellite RNA Sequence Variants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4, 268. <https://doi.org/10.1094/MPMI-4-268>
86. NAIDU, R. A., HU, C. C., PENNINGTON, R. E., GHABRIAL, S. A. (1995): Differentiation of eastern and western strains of peanut stunt cucumovirus based on satellite RNA support and nucleotide sequence homology. *Phytopathology* 85, 502–507.
87. NAVARRO, J. A., SANCHEZ-NAVARRO, J. A., PALLAS, V. (2019): Key checkpoints in the movement of plant viruses through the host, In: *Advances in Virus Research*. Elsevier, 1–64 p. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.05.001>

88. NEMES, K., GELLÉRT, Á., BALÁZS, E., SALÁNKI, K. (2014): Alanine Scanning of Cucumber Mosaic Virus (CMV) 2B Protein Identifies Different Positions for Cell-To-Cell Movement and Gene Silencing Suppressor Activity. *PLoS ONE* 9, e112095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112095>
89. NETSU, O., HIRATSUKA, K., KUWATA, S., HIBI, T., UGAKI, M., SUZUKI, M. (2008): *Peanut stunt virus* 2b cistron plays a role in viral local and systemic accumulation and virulence in *Nicotiana benthamiana*. *Archives of Virology* 153, 1731–1735. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0166-y>
90. NG, J. C. K., JOSEFSSON, C., CLARK, A. J., FRANZ, A. W. E., PERRY, K. L. (2005): Virion stability and aphid vector transmissibility of Cucumber mosaic virus mutants. *Virology* 332, 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.11.021>
91. NITTA, N., TAKANAMI, Y., KUWATA, S., KUBO, S. (1988): Inoculation with RNAs 1 and 2 of Cucumber Mosaic Virus Induces Viral RNA Replicase Activity in Tobacco Mesophyll Protoplasts. *Journal of General Virology* 69, 2695–2700. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-10-2695>
92. O'KEEFE, D. C., BERRYMAN, D. I., COUTTS, B. A., JONES, R. A. C. (2007): Lack of Seed Coat Contamination with *Cucumber mosaic virus* in Lupin Permits Reliable, Large-Scale Detection of Seed Transmission in Seed Samples. *Plant Disease* 91, 504–508. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-5-0504>
93. PALUKAITIS, P., GARCÍA-ARENAL, F. (2003): Cucumoviruses. *Advances in Virus Research* 62, 241–323.
94. PALUKAITIS, P., ROOSSINCK, M. J., DIETZGEN, R. G., FRANCKI, R. I. B. (1992): Cucumber Mosaic Virus, In: *Advances in Virus Research*. Elsevier, 281–348 p. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60039-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60039-1)
95. PERRAKI, A., GRONNIER, J., GOUGUET, P., BOUDSOCQ, M., DEROUBAIX, A.-F., SIMON, V., GERMAN-RETANA, S., LEGRAND, A., HABENSTEIN, B., ZIPFEL, C., BAYER, E., MONGRAND, S., GERMAIN, V. (2018): REM1.3's phospho-status defines its plasma membrane nanodomain organization and activity in restricting PVX cell-to-cell movement. *PLOS Pathogens* 14, e1007378. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007378>
96. PIERRUGUES, O., GUILBAUD, L., FERNANDEZ-DELMOND, I., FABRE, F., TEPFER, M., JACQUEMOND, M. (2007): Biological properties and relative fitness of inter-subgroup cucumber mosaic virus RNA 3 recombinants produced in vitro. *Journal of General Virology* 88, 2852–2861. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83077-0>

97. PRINGLE, C. R., MAYO, M. A. (1998): Virus taxonomy--1997. *Journal of General Virology* 79, 649–657. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-4-649>
98. PRUSS, G., GE, X., SHI, X. M., CARRINGTON, J. C., BOWMAN VANCE, V. (1997): Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The Plant Cell* 9, 859–868. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.6.859>
99. RENTERÍA-CANETT, I., XOCONOSTLE-CÁZARES, B., RUIZ-MEDRANO, R., RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. (2011): Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal* 8, 104. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-104>
100. RIETVELD, K., PLEIJ, C. W., BOSCH, L. (1983): Three-dimensional models of the tRNA-like 3' termini of some plant viral RNAs. *The EMBO Journal* 2, 1079–1085. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01549.x>
101. ROOSSINCK, M. J., ZHANG, L., HELLWALD, K.-H. (1999): Rearrangements in the 5' Nontranslated Region and Phylogenetic Analyses of Cucumber Mosaic Virus RNA 3 Indicate Radial Evolution of Three Subgroups. *Journal of Virology* 73, 6752–6758. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6752-6758.1999>
102. RYABOV, E. V., ROBERTS, I. M., PALUKAITIS, P., TALIAISKY, M. (1999): Host-Specific Cell-to-Cell and Long-Distance Movements of Cucumber Mosaic Virus Are Facilitated by the Movement Protein of Groundnut Rosette Virus. *Virology* 260, 98–108. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9806>
103. RYU, K. H., KIM, C.-H., PALUKAITIS, P. (1998): The Coat Protein of Cucumber Mosaic Virus Is a Host Range Determinant for Infection of Maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 11, 351–357. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.5.351>
104. SALÁNKI, K., GELLÉRT, Á., HUPPERT, E., NÁRAY-SZABÓ, G., BALÁZS, E. (2004): Compatibility of the movement protein and the coat protein of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. *Journal of General Virology* 85, 1039–1048. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19687-0>
105. SALÁNKI, K., GELLÉRT, Á., NÁRAY-SZABÓ, G., BALÁZS, E. (2007): Modeling-based characterization of the elicitor function of amino acid 461 of Cucumber mosaic virus 1a protein in the hypersensitive response. *Virology* 358, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.014>
106. SALÁNKI, K., GELLÉRT, Á., NEMES, K., DIVÉKI, Z., BALÁZS, E. (2018): Molecular Modeling for Better Understanding of Cucumovirus Pathology, In: *Advances in Virus Research*. Elsevier, 59–88 p. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.06.002>

107. SÁRAY, R., FÁBIÁN, A., PALKOVICS, L., SALÁNKI, K. (2021): The 28 Ser Amino Acid of Cucumber Mosaic Virus Movement Protein Has a Role in Symptom Formation and Plasmodesmata Localization. *Viruses* 13, 222. <https://doi.org/10.3390/v13020222>
108. SASAKI, N., PARK, J.-W., MAULE, A. J., NELSON, R. S. (2006): The cysteine–histidine-rich region of the movement protein of Cucumber mosaic virus contributes to plasmodesmal targeting, zinc binding and pathogenesis. *Virology* 349, 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.035>
109. SATO, H., HASE, S., SUGIYAMA, M., KARASAWA, A., SUZUKI, T., TAKAHASHI, H., EHARA, Y. (2000): A Novel Satellite RNA of Cucumber Mosaic Virus Induces Unique Line-pattern Mosaic Symptoms in Tobacco. *Journal of Phytopathology* 148, 47–51. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2000.tb04623.x>
110. SCHNEIDER, W. L., ROOSSINCK, M. J. (2000): Evolutionarily Related Sindbis-Like Plant Viruses Maintain Different Levels of Population Diversity in a Common Host. *Journal of Virology* 74, 3130–3134. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3130-3134.2000>
111. SCHOLTHOF, H. B., SCHOLTHOF, K.-B. G., KIKKERT, M., JACKSON, A. O. (1995): Tomato Bushy Stunt Virus Spread Is Regulated by Two Nested Genes That Function in Cell-to-Cell Movement and Host-Dependent Systemic Invasion. *Virology* 213, 425–438. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.0015>
112. SHI, B.-J., MILLER, J., SYMONS, R. H., PALUKAITIS, P. (2003): The 2b Protein of Cucumoviruses Has a Role in Promoting the Cell-to-cell Movement of Pseudorecombinant Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 16, 261–267. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.3.261>
113. SHI, B.-J., PALUKAITIS, P., SYMONS, R. H. (2002): Differential Virulence by Strains of *Cucumber mosaic virus* is Mediated by the 2b Gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 15, 947–955. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.9.947>
114. SHINTAKU, M. H., ZHANG, L., PALUKAITIS, P. (1992): A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *The Plant Cell* 4, 751–757. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.7.751>
115. SIDDIQUI, S. A., VALKONEN, J. P. T., RAJAMÄKI, M.-L., LEHTO, K. (2011): The 2b Silencing Suppressor of a Mild Strain of *Cucumber mosaic virus* Alone Is Sufficient for Synergistic Interaction with *Tobacco mosaic virus* and Induction of Severe Leaf Malformation in 2b-Transgenic Tobacco Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 24, 685–693. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-10-0290>

116. SILHAVY, D. (2002): A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *The EMBO Journal* 21, 3070–3080. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf312>
117. SINGHAL, P., NABI, S. U., YADAV, M. K., DUBEY, A. (2021): Mixed infection of plant viruses: diagnostics, interactions and impact on host. *Journal of Plant Diseases and Protection* 128, 353–368. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00384-0>
118. ŠKORIC, D., KRAJACIC, M., BARBAROSSA, L., CILLO, F., GRIECO, F., ŠARIC, A., GALLITELLI, D. (1996): Occurrence of Cucumber Mosaic Cucumovirus with Satellite RNA in Lethal Necrosis Affected Tomatoes in Croatia. *Journal of Phytopathology* 144, 543–549. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1996.tb00296.x>
119. SMITH, T. J., CHASE, E., SCHMIDT, T., PERRY, K. L. (2000): The Structure of Cucumber Mosaic Virus and Comparison to Cowpea Chlorotic Mottle Virus. *Journal of Virology* 74, 7578–7586. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.16.7578-7586.2000>
120. SOARDS, A. J., MURPHY, A. M., PALUKAITIS, P., CARR, J. P. (2002): Virulence and Differential Local and Systemic Spread of *Cucumber mosaic virus* in Tobacco are Affected by the CMV 2b Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 15, 647–653. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.7.647>
121. SU, S., LIU, Z., CHEN, C., ZHANG, Y., WANG, X., ZHU, L., MIAO, L., WANG, X.-C., YUAN, M. (2010): *Cucumber Mosaic Virus* Movement Protein Severs Actin Filaments to Increase the Plasmodesmal Size Exclusion Limit in Tobacco. *The Plant Cell* 22, 1373–1387. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064212>
122. SUGIYAMA, M., SATO, H., KARASAWA, A., HASE, S., TAKAHASHI, H., EHARA, Y. (2000): Characterization of symptom determinants in two mutants of cucumber mosaic virus Y strain, causing distinct mild green mosaic symptoms in tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56, 85–90. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0250>
123. SUZUKI, M., KUWATA, S., KATAOKA, J., MASUTA, C., NITTA, N., TAKANAMI, Y. (1991): Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA3 using an in vitro transcription system. *Virology* 183, 106–113. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90123-S](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90123-S)
124. SUZUKI, M., YOSHIDA, M., YOSHINUMA, T., HIBI, T. (2003): Interaction of replicase components between Cucumber mosaic virus and Peanut stunt virus. *Journal of General Virology* 84, 1931–1939. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19070-0>

125. SZILASSY, D., SALA'NKI, K., BALA'ZS, E. (1999): Molecular Evidence for the Existence of Two Distinct Subgroups in Cucumber Mosaic Cucumovirus. *Virus Genes* 18, 221–227. <https://doi.org/10.1023/A:1008016202128>
126. SZIRMAI, J. (1941): A fűszerpaprika leromlását megindító újhitűségnek nevezett vírusbetegségről. *Növényegészségügyi Évkönyv* 1, 109–133.
127. SZITTYA, G., BURGYÁN, J. (2001): Cymbidium Ringspot Tombusvirus Coat Protein Coding Sequence Acts as an Avirulent RNA. *Journal of Virology* 75, 2411–2420. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.5.2411-2420.2001>
128. TAKAHASHI, H., SUZUKI, M., NATSUAKI, K., SHIGYO, T., HINO, K., TERAOKA, T., HOSOKAWA, D., EHARA, Y. (2001): Mapping the Virus and Host Genes Involved in the Resistance Response in Cucumber Mosaic Virus-Infected *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 42, 340–347. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce039>
129. TAKESHITA, M., KOIZUMI, E., NOGUCHI, M., SUEDA, K., SHIMURA, H., ISHIKAWA, N., MATSUURA, H., OHSHIMA, K., NATSUAKI, T., KUWATA, S., FURUYA, N., TSUCHIYA, K., MASUTA, C. (2012): Infection Dynamics in Viral Spread and Interference Under the Synergism Between *Cucumber mosaic virus* and *Turnip mosaic virus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 25, 18–27. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0170>
130. TEOFANOVA, D., LOZANOVA, Y., LAMBOVSKA, K., PACHEDJIEVA, K., TOSHEVA, A., ODJAKOVA, M., ZAGORCHEV, L. (2022): *Cuscuta* spp. populations as potential reservoirs and vectors of four plant viruses. *Phytoparasitica* 50, 555–566. <https://doi.org/10.1007/s12600-022-00981-9>
131. TOMLINSON, J. A. (1987): Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals of Applied Biology* 110, 661–681. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1987.tb04187.x>
132. TROUTMAN, J. L. (1966): Stunt – a newly recognized virus disease of peanuts. *Phytopathology* 56, 587.
133. VANCE, V., VAUCHERET, H. (2001): RNA Silencing in Plants--Defense and Counterdefense. *Science* 292, 2277–2280. <https://doi.org/10.1126/science.1061334>
134. VAQUERO, C., LIAO, Y.-C., NÄHRING, J., FISCHER, R. (1997): Mapping of the RNA-binding domain of the cucumber mosaic virus movement protein. *Journal of General Virology* 78, 2095–2099. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-8-2095>

135. WAHYUNI, W. S., DIETZGEN, R. G., HANADA, K., FRANCKI, R. I. B. (1992): Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathology* 41, 282–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1992.tb02350.x>
136. WANG, J., TURINA, M., MEDINA, V., FALK, B. W. (2009): Synergistic interaction between the Potyvirus, Turnip mosaic virus and the Crinivirus, Lettuce infectious yellows virus in plants and protoplasts. *Virus Research* 144, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.04.017>
137. WANG, R., DU, Z., BAI, Z., LIANG, Z. (2017): The interaction between endogenous 30S ribosomal subunit protein S11 and Cucumber mosaic virus LS2b protein affects viral replication, infection and gene silencing suppressor activity. *PLOS ONE* 12, e0182459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182459>
138. WANG, Y., GABA, V., YANG, J., PALUKAITIS, P., GAL-ON, A. (2002): Characterization of Synergy Between *Cucumber mosaic virus* and Potyviruses in Cucurbit Hosts. *Phytopathology*® 92, 51–58. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.51>
139. WANG, Y., TZFIRA, T., GABA, V., CITOVSKY, V., PALUKAITIS, P., GAL-ON, A. (2004): Functional analysis of the Cucumber mosaic virus 2b protein: pathogenicity and nuclear localization. *Journal of General Virology* 85, 3135–3147. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80250-0>
140. WEBER, H., SCHULTZE, S., PFITZNER, A. J. (1993): Two amino acid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the Tm-2(2) resistance gene in the tomato. *Journal of Virology* 67, 6432–6438. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.11.6432-6438.1993>
141. WEBER, P. H., BUJARSKI, J. J. (2015): Multiple functions of capsid proteins in (+) stranded RNA viruses during plant–virus interactions. *Virus Research* 196, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.014>
142. WHITE, P. S., MORALES, F., ROOSSINCK, M. J. (1995): Interspecific Reassortment of Genomic Segments in the Evolution of Cucumoviruses. *Virology* 207, 334–337. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1088>
143. XU, Z., CHEN, K., CHEN, G., CAO, G. (1994): Black locust, primary source of Peanut stunt virus (PSV) for the PSV epidemics on peanut. *Acta Phytopathologica Sinica* 24, 305–309.
144. XU, Z., HIGGINS, C. M., CHEN, C. K., DIETZGEN, R. G., ZHANG, Z., YAN, L., FANG, X. (1998): Evidence for a third taxonomic subgroup of peanut stunt virus from China. *Plant Disease* 82, 992–998.

145. XU, Z. Y., BARNETT, O. W., GIBSON, P. B. (1986): Characterization of peanut stunt virus strains by host reactions, serology, and RNA patterns. *Phytopathology* 76, 390–395.
146. YAN, L. Y., XU, Z. Y., GOLDBACH, R., KUNRONG, C., PRINS, M. (2005): Nucleotide sequence analyses of genomic RNAs of Peanut stunt virus Mi, the type strain representative of a novel PSV subgroup from China. *Archives of Virology* 150, 1203–1211. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0492-2>
147. YANG, Y., KIM, K. S., ANDERSON, E. J. (1997): Seed Transmission of Cucumber Mosaic Virus in Spinach. *Phytopathology*® 87, 924–931. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.9.924>
148. YOU, J. S., BAIK, H. S., PAEK, K. H. (1999): Mutational analysis of cucumber mosaic virus movement protein gene. *BMB Reports* 32, 82–85.
149. YUAN, C., LAZAROWITZ, S. G., CITOVSKY, V. (2016): Identification of a Functional Plasmodesmal Localization Signal in a Plant Viral Cell-To-Cell-Movement Protein. *mBio* 7, e02052-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02052-15>
150. YUAN, C., LAZAROWITZ, S. G., CITOVSKY, V. (2018): The Plasmodesmal Localization Signal of TMV MP Is Recognized by Plant Synaptotagmin SYTA. *mBio* 9, e01314-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01314-18>
151. ZHANG, X., YUAN, Y.-R., PEI, Y., LIN, S.-S., TUSCHL, T., PATEL, D. J., CHUA, N.-H. (2006): Cucumber mosaic virus -encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development* 20, 3255–3268. <https://doi.org/10.1101/gad.1495506>