

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Pinczés Dóra

Budapest

2024



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

Az uborka mozaik 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 zöldségműveinket veszélyezteti leginkább, azon belül is a kabakosokat (*Cucurbitaceae*), a paprikát (*Capsicum Annuum* L.), és a paradicsomot (*Solanum lycopersicum* L.), míg a PSV gazdanövényköre leginkább pillangósvirágú növényekre korlátozódik (*Fabaceae*). A két vírus nagyon hasonló genomszerveződése, aminosav sorrendje és fehérjéi funkciója ellenére gazdanövénykörük jelentősen eltér. Napjainkig már a cucumovírusok mindegyik fehérjét kódoló génjét azonosították mint patogénitáért felelős gén. A mozgási fehérje (movement protein, 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. Ezen mechanizmusok ismerete, megértése a biotechnológia fejlődésével új lehetőségeket kínál a növényi vírusok elleni védekezésre, rezisztens, ellenálló növények létrehozására.

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 reassortáns 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.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Dolgozatban felhasznált anyagok

2.1.1. Növény anyag

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. *Nicotiana* fajokot 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.

2.1.2. 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. közzölték (KISS és mtsai., 2008). Az Rs-CMV izolátumot Dr. Salamon Pál izolálta, Gödöllőn, retekről (*Raphanus sativus* L.), fertőzőképes klónjait pRS1-CMV, pRS2-CMV, pRS3-CMV Divéki és mtsai. közzölték (DIVÉKI és mtsai., 2004). Az MP rekombináns fertőzőképes klónokat overlap PCR segítségével állítottuk elő pCP3 pPC3 p Δ C3.

2.2. Dolgozatban alkalmazott módszerek

2.2.1. MP rekombináns fertőzőképes klónok elkészítése

Az MP rekombináns 3-as RNS-eket overlap PCR segítségével készítettük CMV és PSV RNS3 (pRs3 és pRp3) cDNS klónok felhasználásával. pPC3 fertőzőképes klón a CMV MP és az 5' nem kódoló régiót a PSV 3-as RNS ezen szakaszának megfelelő régiójával kicseréltük. Az overlap PCR eredményeként kapott PCR termék szolgált később templátként az *in vitro* transzkripcióhoz, mely 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.

A pPC3 fertőzőképes klónt is a fent említett cDNS klónok felhasználásával készítettük el overlap PCR segítségével. A PSV MP és az 5' nem kódoló régiót a CMV 3-as RNS ezen szakaszának megfelelő régiójával cseréltük ki. Az overlap 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. A rekombináns PCR termék 5' végén T7 promótert és *Bam*HI hasítóhelyet tartalmazott, illetve 3' végén is egy *Bam*HI hasító hely található.

A p Δ C3 fertőzőképes klónt a pRs3 és pRp3 cDNS klónok felhasználásával készítettük el overlap PCR segítségével. A PSV MP és az 5' nem kódoló régiót a CMV 3-as RNS ezen szakaszának megfelelő szekvenciájával kicseréltük és a PSV MP C-terminális 42 aminosavának megfelelő nukleotidot töröltük a szekvenciából. Az overlap PCR után a PCR

termék a PSV 5' nem kódoló régiót és a 3' 42 aminosav deléció 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.

Az overlap PCR-el készült MP rekombináns PCR (pCP3, pPC3, p Δ C) termékeket *E. coli* DH5 α törzsébe transzformáltuk INOUE és mtsai. (1990) módszere szerint. A rekombináns klónok nukleotid sorrendjének meghatározását a Biomi Kft.-nél, (Gödöllő) végeztük.

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

Tesztnövények inokulálásához fertőzőképes *in vitro* transzkriptumokat készítettünk. A korábban említett fertőzőképes klónokat használtuk templánnak. 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. A klónokat hordozó plazmidokat linearizáltuk *Bam*HI-es és *Pst*I-es restrikciós endonukleáz enzimmal. A transzkriptumok szintézisét T7 polimeráz enzimmal végeztük (SZILASSY és mtsai., 1999) .

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.

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). A fertőzéses kísérletekben a tisztított virionnal egyenlő koncentrációban fertőztünk tesztnövényeket.

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

A sejten belüli lokalizációs vizsgálatokhoz, MP-eGFP fúziós fehérjét 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 pRs3, pRp3 és peGFP cDNS klónok felhasználásával. Az overlap PCR során kapott PCR termékek az 5' végükön *SacI*, a 3' végükön *BamHI* hasítóhelyeket tartalmaztak. A PCR termékeket *E. coli* DH5α törzsébe transzformáltuk Inoue és mtsai. (1990) módszere szerint. A rekombináns klónok nukleotid sorrendjének meghatározását a Biomi Kft.-nél, (Gödöllő) végeztük.

2.2.4. *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 *Agrobacterium*-közvetített tranziens génexpresszióhoz az MP-eGFP plazmidokat hordozó *A. tumefaciens* kultúrák koncentrációját beállítottuk az agroinfiltrálást megelőzően. 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 *Agrobacterium* szuszpenziót, fecskendő segítségével injektáltuk 4–5 leveles dohány illetve paprika növények levél fonákjába (NEMES és mtsai., 2014).

2.2.5. 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.

A plazmodezmák jelöléséhez anilin kék festést használtunk, amellyel a plazmodezmáknál található kallózt festettük meg (KUMARI és mtsai., 2021). A plazmolizált sejtés vizsgálatokhoz levélkorongnyi mintákat 10%-os NaCl oldatban áztattuk 15 percig.

2.2.6. 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 egytényezős ANOVA modellt alkalmaztunk ($P < 0,05$). *C. annuum* sejtekben CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP páronkénti összehasonlításhoz kétmintás T-próbát használtunk, amit $P < 0,05$ értékkel végeztük el.

2.2.7. Vírusok, eGFP detektálása

A fertőzéses kísérletekben, a fertőzés sikerességének igazolásához, az inokulált *N. benthamiana* és *C. annuum* növényekből CMV-t, PSV-t, RNS 3 reassortáns és MP rekombináns vírusokat RT-PCR segítségével detektáltuk. A kivont RNS-ből, komplementer DNS-t (cDNS) készítettünk, amihez reverz transzkripciót végeztünk. A cDNS-ek felhasználásával végeztük a PCR vizsgálatot. A vírusok kimutatásához a CP-re specifikus oligonukleotid primereket használtunk.

Az MP-eGFP fúziós fehérjével agroinfiltrált növényekből vett mintákat fehérje kivonást követően elválasztottunk 12%-os denaturáló (SDS tartalmú) poliakrilamid gélben, majd nitrocellulóz membránra vittük át. 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.

3. EREDMÉNYEK

3.1. CMV és PSV gazdanövénykörének és tüneteinek vizsgálata különböző gazdanövényeken

Szakirodalmi adatok alapján a CMV és a PSV hasonló genomszerveződése és tulajdonságai ellenére gazdanövénykörülnél jelentősen eltér (EDWARDSON és CHRISTIE, 2018; MINK és mtsai., 1969). Növényvirológiában általánosan használt tesztnövényeket és a természetben meghatározó gazdaságilag jelentős növényeket fertőztünk Rp-PSV-vel és Rs-CMV-vel, hogy a két vírus gazdanövénykörét, illetve a gazdanövényeken okozott tüneteit összehasonlítsuk

N. glutinosa és *N. benthamiana* tesztnövényeket mindkét vírus szisztemikusan fertőzi azonban PSV esetén a tünetek enyhébbek. *N. tabacum* cv. Xanthi-nél növényt CMV szisztemikusan fertőzte, PSV viszont nem alakított ki szisztemikus tüneteket a növényen. *Chenopodium murale* mindkét általunk vizsgált vírusnak lokális léziós gazdanövénye, azonban a léziók méretében különbséget figyeltünk meg, a PSV kisebb és enyhébb mértékben nekrotizálódó léziókat okozott az inokulált leveleken, mint a CMV. Uborka növényt (*Cucumis sativus*), a CMV szisztemikusan fertőzte, a szisztemikus leveleken levéldeformációt és erős mozaikot okozva, míg PSV nem fertőzte a növényt. A paradicsom (*Solanum lycopersicum*), 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 okozta 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 lombleveleken.

3.2 Fertőzőképes RNS3 reassortáns és MP rekombináns vírusok készítése és *Nicotiana benthamiana* tesztnövény inokulálása

A két cucumovírus gazdanövénykörében és az okozott tünetekben megfigyelt különbségek vizsgálatára különböző RNS3 reassortáns és MP rekombináns vírusokat készítettünk, melyek fertőzőképességét a két vírus közös gazdanövényén, *N. benthamiana* növényen vizsgáltuk. Háromleveles *N. benthamiana* növényeket fertőztünk CMV-vel, PSV-vel, C12P3 és P12C3 jelű RNS3 reassortáns, illetve C12CP3 és C12PC3 jelű MP rekombináns vírusokkal. A tünetek kialakulását az elkövetkező három héten követtük nyomon. *N. benthamiana* növényt C12PC rekombináns vírus kivételével mindegyik konstrukció szisztemikusan fertőzte, azonban a tünetek intenzitása jelentősen eltért.

A CMV MP-t tartalmazó vírusok a levelek erős deformációját erős klorotikus mozaikot és az egész növény satnyulását, törpülését okozták. A tünetek négy nappal az inokulálást követően jelentek meg. A PSV MP-t tartalmazó vírusok (PSV, C12P3) vírusok által okozott tünetek később jelentkeztek, a hetedik napon és a tünetek enyhébb formában jelentkeztek, főként enyhe mozaikot figyeltünk meg enyhe levél deformitással társulva.

Irodalmi adatok alapján több példa található, ahol a Bromoviridae családon belül két vírus MP-je csak a C-terminális 33 aminosav deléciója esetén képes

a másik vírus CP-vel együtt funkcionálni (NAGANO és mtsai., 2001; SALÁNKI és mtsai., 2004).

Mivel C12PC3 rekombináns, nem volt fertőzőképes, aminosav szekvencia illesztés segítségével meghatároztuk a PSV MP-nek a CMV MP C-terminális 33 aminosavával homológ szakaszt, ami a C-terminális 42 aminosav volt. Elkészítettük a pPC3 klón, PSV MP C-terminális 42 aminosav deléciós mutánsát (pPΔC3). *N. benthamiana* inokulálása után hét nappal szisztemikus tüneteket figyeltünk meg, melyek a többi PSV MP-t tartalmazó konstrukcióhoz (PSV, C12P3), hasonlóan enyhébbek voltak és lassabban jelentkeztek a növényen.

N. benthamiana növények fertőzésének dinamikáját a vizuális megfigyelések mellett RT-PCR-rel vizsgáltuk az össze vírus konstrukció fertőzése esetén CP specifikus primerekkel. 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, hét nappal az inokulálást követően jelentkeztek.

További kísérleteink során a deléciós mutánt használtuk a fertőzésekhez. A fertőzött növényekből viriont tisztítottunk az összes vírus konstrukció esetén, amit további fertőzési kísérletekhez használtunk.

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

C. annuum cv. Brodyn folytattuk a vizsgálatokat, melyet a CMV szisztemikusan fertőz, viszont a PSV-nek nem gazdanövénye. A fertőzött növényeken a CMV erős levél deformációt, valamint a CMV-re jellemző erős mozaikos tüneteket és a növény törpülését okozta. A tünetek két héttel a fertőzést követően jelentek meg és egyre intenzívebbé váltak az idő előrehaladtával. A PSV nem okozott tünetet a növényen. 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. A vizuálisan megfigyelt eredményeket molekuláris módszerrel is alátámasztottuk RT-PCR-rel is alátámasztottuk.

3.4 CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációja *Nicotiana benthamiana* sejtekben

A teszt növények fertőzése során az MP-t azonosítottuk, mint a tünet jellegét vagy a gazdanövényt meghatározó faktort. Az MP fő feladata a vírus sejtről-sejtre történő terjedésének támogatása, amihez az MP plazmodezma lokalizációja szükséges feltétel (NAVARRO és mtsai., 2019). CMV MP és a PSV MP növényi sejten belüli lokalizációját, illetve plazmodezma kolokalizációját hasonlítottuk össze *N. benthamiana* növények epidermisz sejtjeiben, CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék segítségével. Mind a PSV MP-eGFP, mind a CMV MP-eGFP konfokális mikroszkóppal a sejt perifériáján voltak megfigyelhetők, pontszerű formációkba rendeződve. Azonban CMV MP-eGFP egyértelműen a plazmodezmákkal megegyező

pozícióban lokalizálódott, míg a PSV MP-eGFP homogénebben oszlott el a sejtek citoplazmájában is. Az MP-eGFP szignál plazmodezma/plazmamembrán eloszlásának arányát számszerűsítettük, ami CMV MP-eGFP esetében jóval magasabb mint a PSV MP-eGFP esetén alátámasztva, hogy a CMV MP a plazmodezmáknál lokalizálódik főleg, míg a PSV MP a plazmamembrán és a plazmodezmák között egyenletesebben oszlik meg.

Az MP-k plazmodezma kolokalizációjának számszerűsítéséhez Pearson korrelációs koefficiens (PKK) használtunk, statisztikai analízis segítségével határoztuk meg a szignifikáns eltérést. 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.

A CMV-MP-eGFP és a PSV-MP-eGFP plazmodezmákhoz való kötődését is megvizsgáltuk plazmolizált *N. benthamiana* epidermisz sejtekben. A kísérlet során csak a plazmodezmákhoz kapcsolódó MP-eGFP fehérjék maradnak a sejtfallnál, az ott lokalizálódó de nem kapcsolódó fehérjék pedig eltávolodnak a sejtfalltól a plazmolízis hatására leváló plazmamembránnal együtt. A kísérlet során igazoltuk a PSV MP gyengébb plazmodezma kötődését.

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

3.5 CMV MP-eGFP és PSV MP-eGFP fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációja *Capsicum annuum* sejtekben

Mivel *C. annuum* cv. Brody fertőzések kísérletekben az MP-t határoztuk meg, mint a fertőzést limitáló faktort, ezen a növényen is további vizsgálatokat folytattunk a két MP sejten belüli lokalizációjával kapcsolatban. CMV MP-eGFP pontszerű struktúrákba rendeződött a plazmodezmák környékén. A PSV MP-eGFP jel főleg a citoplazmában volt megfigyelhető és alig volt látható átfedést a plazmodezma szignálokkal. 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 PKK-t használtunk. 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). 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.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

A CMV-nek több mint 1200 gazdanövényét írták le több mint 100 növény családból, míg a PSV gazdanövényköre és gazdasági jelentősége főként a hüvelyes növényekre korlátozódik, annak ellenére, hogy taxonómiaiilag és genomszerveződésben, 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 tesztnövényeken és a zöldségtermesztésben előforduló növényeken vizsgáltuk 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* tesztnövényeken 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 képes.

A CMV és a PSV gazdanövénykörében való eltérések és a különböző fenotípusú tünetek vizsgálatára RNS3 reasszortáns (C12P3, P12C3), és MP

rekombináns (C12CP3, C12PC3) vírusokat készítettünk. Korábban az MP szerepét a gazdanövénykör meghatározásában CMV RNS3 és földimogyoró rozettásodás vírus (*Groundnut rosette virus*, GRV) és Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) MP segítségével is igazolták (HUPPERT és mtsai., 2002; RYABOV és mtsai., 1999).

Munkánk során a rekombináns és reasszortáns vírusokkal egy közös gazdanövény *N. benthamiana* inokulálását követően a C12PC rekombináns vírus kivételével mindegyik konstrukció szisztemikus fertőzést okozott. Korábbi irodalmi adatok alapján több példa van rá a Bromoviridae családon belül, hogy két vírus MP-je csak a C-terminális 33 aminosav deléciója esetén képes a másik vírus CP-vel együtt funkcionálni (NAGANO és mtsai., 2001; SALÁNKI és mtsai., 2004). Ezen információk alapján, a C12PC rekombinánsnak elkészítettünk egy MP C-terminális deléciós mutánsát (C12PΔC), ahol a CMV MP C-terminális 33 aminosavval homológ szakaszt eltávolítottuk PSV MP szekvenciából. C12PΔC képes 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 összefüggésben lehet a CMV sokkal tágabb gazdanövénykörével. A fertőzéses kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a CMV MP-t tartalmazó vírusok (P12C3, C12CP) a CMV-hez hasonló tüneteket okoztak, törpülést, erős klorotikus mozaikot és erős levél deformitást és már négy nappal inokulálást követően kimutathatóak a nem fertőzött frissebb hajtásokból. A PSV MP-t tartalmazó konstrukciók (C12P3, C12PΔC3) a PSV-hez hasonlóan enyhébb levél deformálódást és gyengébb mozaikos tüneteket okoztak, legkorábban 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 C12PΔC3 a PSV-hez hasonlóan nem tudták szisztemikusan fertőzni. Fertőzési kísérleteink alapján *N. benthamiana* növényen és paprika növényen, a CMV és a PSV közötti gazdanövény, illetve tüneti eltéréseket a két vírus MP-hez köthető.

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. 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. Pearson korrelációs koefficiens alkalmazásával CMV MP-eGFP esetén erős plazmodezma kolokalizációt igazoltunk ([PKK]=0,67), míg a PSV MP-eGFP kevésbé hatékonyan kolokalizált a plazmodezmákkal ([PKK]=0,42). Plazmolizált *N. benthamiana* epidermisz sejtekben, megállapítottuk, 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 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).

A vírusok sejtről-sejtre való mozgásának korlátozása gátolhatja a fertőzés kialakulását, vagy a tünetek megjelenésének sebességét. A PSV MP szerkezete a 30K szupercsaládra jellemző, a fő domének erős homológiát mutatnak a CMV MP-vel. A C-terminális régiónál figyelhető meg a legnagyobb különbség, ami 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 szerin aminosav, mely foszforilálható (SÁRAY és mtsai., 2021), ez az aminosav a PSV MP-ben is megtalálható. A 30k szupercsaládban a plazmodezma lokalizációs szignál 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.

5. 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. PSV MP-t tartalmazó vírusokhoz képest a CMV MP-t hordozó konstrukciók a fertőzés után 3 nappal hamarabb detektálhatóak a felső, szisztémikus levelekben.

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 szisztémikusan 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.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. 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>
2. DUNN, K. W., KAMOČKA, 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>
3. EDWARDSON, J. R., CHRISTIE, R. G. (2018): CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes, 1. kiad. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351071192>
4. 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>
5. 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)
6. JAY, F., BRIOUDES, F., VOINET, 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>
7. 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>
8. KUMARI, R., KUMAR, S., LEIBMAN, D., ABEBIE, B., SHNAIDER, Y., DING, S., GAL-ON, A. (2021): Cucumber RDR1s and cucumber mosaic virus suppressor protein

2b association directs host defence in cucumber plants. *Molecular Plant Pathology* 22, 1317–1331. <https://doi.org/10.1111/mpp.13112>

9. 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>
10. 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>
11. 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)
12. 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.
13. 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>
14. 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>
15. 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>

16. RYABOV, E. V., ROBERTS, I. M., PALUKAITIS, P., TALIANSKY, 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>
17. 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>
18. 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>
19. 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>
20. SZILASSY, D., SALÁNKI, K., BALÁZS, 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>
21. 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>
22. 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>

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Impakt faktoros folyóiratcikkek

Pinczés D., Fábíán A., Palkovics L., Salánki K. (2022): Peanut stunt virus movement protein is the limiting factor in Capsicum annuum infection. VIRUS RESEARCH, 319, 198879. [Q2, IF 6,286]

Lektorált (MTA listás) megjelent közlemények

Pinczés D., Sáráy R., Fábíán A., Palkovics L., Salánki K. (2021): Az uborka mozaik vírus és a földimogyoró satnyulás vírus mozgási fehérje szerepe a vírustünetek és a gazdanövénykör meghatározásában. NÖVÉNYVÉDELEM 82(10), 445–452 .

Konferencia kiadványok

Pinczés D., Fábíán A., Palkovics L., Salánki K. (2023): Peanut stunt virus movement protein has a substantial contribution to host range and symptom determination. In: 12th International Congress of Plant Pathology ICPP 2023 20–25 August Lyon, France 811–811. p.

8. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ NEM SZOROSAN KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Almási A., **Pinczés D.**, Tímár Z., Sáráy R., Palotás G., Salánki K. (2023): Identification of a new type of resistance breaking strain of tomato spotted wilt virus on tomato bearing the Sw-5b resistance gene, EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY 166, 219–225. [Q1, IF 2,224]

Ágoston J., Almási A., **Pinczés D.**, Sáray R., Salánki K., Palkovics L. (2023): First report of meadow saffron breaking virus on wild *Colchicum autumnale* from a strictly protected Natura2000 site at a Hungarian National Park. PLANT DISEASE 107, 1955 p. [Q1, IF 4,5]

Ágoston J., Almási A., **Pinczés D.**, Sáray R., Salánki K., Palkovics L. (2023): *Thalia dealbata*, a new host of sugarcane mosaic virus. JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY 105, 587–588. [Q2, IF 2,772]

Ágoston J., Almási A., **Pinczés D.**, Sáray R., Salánki K., Palkovics L. (2024): First report of saffron latent virus in *Crocus sativus* from Hungary. PLANT DISEASE, 108(2), 540. [Q1, IF 4,4]

Ágoston J., Almási A., **Pinczés D.**, Sáray R., Salánki K., Palkovics L. (2024): Biology, phylogenetic and evolutionary relations of *Tradescantia mild mosaic virus* isolates from Hungary. JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY, 1–6. [Q2, IF 2,2]

Ágoston J., Almási A., **Pinczés D.**, Sáray R., Salánki K., Palkovics L. (2023): Vizigyömbér, a cukornád mozaik vírus új gazdanövénye és lehetséges rezervoárja. NÖVÉNYVÉDELEM 84(6): 241–247.

Almási A., **Pinczés D.**, Sáray R., Tímár Z., Palotás G., Salánki K. (2023): Paradicsom sw-5b rezisztenciagént áttörő paradicsom bronzfoltosság vírus (TSWV) megjelenése Magyarországon. NÖVÉNYVÉDELEM 84(8), 337-343.

Sáray R., Szathmáry E., **Pinczés D.**, Almási A., Deák T., Salánki K., Palkovics L. (2022): Szőlő Pinot gris vírus (Grapevine Pinot gris virus, GPGV) fertőzöttség egy dél-magyarországi szőlőültetvényben. NÖVÉNYVÉDELEM 83(10), 429–436.

Sáray R., **Pinczés D.**, Salánki K., Bulecza Cs., Csilléry G., Tóbiás I., Almási A. (2021): Szentesen üvegházban termesztett paprikaminták virológiai vizsgálata a 2019-2021 közötti időszakban. NÖVÉNYVÉDELEM 82(10), 453–459.