

dc_341_11

**Akadémiai Doktori Értekezés
Tézisei**

**A CUCUMOVÍRUSOK
KÓRTANI VÁLTOZÉKONYSÁGA**

Salánki Katalin

Gödöllő, 2012

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A növényi vírusok gazdasági jelentősége felbecsülhetetlen, egyes szerzők szerint a mezőgazdaságban bekövetkezett termésveszteség és minőségromlás feléért is felelőssé tehető. Évről évre újabb vírusok kerülnek azonosításra, sőt a technikai lehetőségek fejlődésével ma már olyan vírusokat is azonosítanak, melyek látható tüneteket nem okoznak. A régóta ismert vírusok is folyamatosan megújulnak, akár a környezeti viszonyokhoz történő alkalmazkodás során újabb, korábban nem fertőzött területeken jelenhetnek meg, illetve kiválogatódhatnak például a magasabb hőmérséklet optimummal rendelkező variánsok. A globalizációs folyamatok és a nem mindig megfelelő karantén viszonyok is hozzájárulhatnak a korábban egy adott régióra nem jellemző vírusok megjelenéséhez, amik a már jelenlévő vírusokkal versenyezhetnek, de akár szinergizmus révén a korábinál súlyosabb járványokat is kialakíthatnak. A vírusok elleni védekezési stratégiák kialakításában fontos szerepet játszik rezisztencia gének beépítése a termesztésbe vont fajtákba. Azonban ezek a rezisztencia gének általában csak időleges megoldást jelentenek a vírusfertőzéssel szemben, és előbb-utóbb megjelennek a rezisztenciát áttörő vírustörzsek, majd ezek idővel dominánssá is válhatnak a víruspopulációban. Ezeknek a mutánsoknak az eredete mindig kétséges, kialakulhatnak a korábban jelenlévő víruspopulációból mutációval, illetve rekombinációval, esetleg a termőföldeket körülvevő természetes ökoszisztémában korábban is jelenlévő, de addig nem domináns izolátum is előtérbe kerülhet.

Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) minden szempontból az egyik legsikeresebb vírus. Gyakorlatilag nincs olyan terület a világon ahol mezőgazdasági termelés folyik és a CMV ne fordulna elő, megtalálható trópusi területektől egészen az északi vidékekig. A vírus gazdanövény spektruma hihetetlenül széles, mind egyszikű mind kétszikű növényekről leírták, éppúgy megtalálták lágyszárú, mint fás növényeken. Különböző izolátumai ugyanazon a gazdanövényen is a legváltozatosabb tüneteket alakíthatják ki, az egész súlyos, a növény pusztulását okozó nekrozistól az alig látható halvány mozaikig széles skálán mozognak a megfigyelt betegségi tünetek. Természetes ökoszisztémákból is a legváltozatosabb növényeken azonosították a CMV-t. Ugyanakkor a vele legszorosabb rokonságban

levő, felépítésében és működésében hozzá nagyon hasonló paradicsom magtalanság vírus (*Tomato aspermy virus*, TAV) és a földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) messze nem tekinthető ilyen sikeres vírusoknak, elterjedésük és gazdasági jelentőségük lényegesen szűkebb.

Az elmúlt két évtizedben a molekuláris biológia módszertanának fejlődése megteremtette a lehetőségét annak, hogy a korábban leírt változatos patológiai jellemzők kialakulásának okait megpróbáljuk kideríteni, és megtegyük az első lépéseket afelé, hogy megérthessük azt, hogy egy igen egyszerű, csupán öt fehérjét hordozó örökítőanyag fehérjeburokba csomagolva hogyan képes drasztikus betegségi tünetek kialakítására.

Munkám során az egyik legrégebben felfedezett és legváltozatosabb növényi vírushoz az uborka mozaik vírushoz és rokon vírusaihoz kapcsolódó munkáimat foglaltam össze. Különböző CMV izolátumokkal dolgoztam, melyek között szerepelt dr. Beczner László által az 1970-es évek végén gyűjtött izolátum (Trk7-CMV) éppúgy, mint az 1990-es években izolált, a világon leelterjedtebb izolátumokhoz hasonló tüneteket mutató izolátum (Rs-CMV), illetve egyedi patológiai jellemzőkkel rendelkező izolátum (Ns-CMV) is. Kísérleteinkbe bevontuk a két legközelebbi rokon vírust, a TAV-ot és a PSV-t is. Megpróbáltunk hozzájárulni annak megértéséhez, hogy a betegségi tünetek és a gazdanövénykör változatosságának meghatározását, illetve ehhez kapcsolódóan a vírusok változékonyságát milyen tényezők befolyásolhatják.

KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Növények

A kísérletekhez a növényeket üvegházi körülmények között neveltük, illetve fitotronban tartottuk, 14 óra megvilágítás (23 °C) és 10 óra sötétség (18 °C) környezeti paraméterek mellett. Munkánk során a következő tesztnövényeket használtuk: *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc, *Nicotiana clevelandii* Gray., *Nicotiana benthamiana* Domin., *Nicotiana debney* Gray., *Cucumis sativus* L. cv. Marketer vagy Delicates, *Chenopodium quinoa* Willd., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn, *Zinnia elegans* Jacq., *Arachis hypogea* L., *Lens culinaris* Medik. cv. Éva, *Medicago sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L. cv. Babilon, *Pisum sativum* L. cv. Rajnai törpe, *Robinia pseudoacacia* L., *Vigna sinensis* Savi et Hassk. cv. Black eye, *Solanum lycopersicum* L. cv. Kecskeméti jubileum.

Baktériumtörzsek

Kísérleteink során az *Escherichia coli* DH5- α , JM101, JM109 és TG90 törzseit használtuk.

Vírus izolátumok

Munkánk során az I. alcsoportba tartozó Rs-CMV törzset dr. Salamon Pál izolálta retekről (*Raphanus sativus* L.) és bocsátotta rendelkezésünkre. Az uborka mozaik vírus nekrotikus törzsét (CMV-N) Fulton izolálta 1953-ban. Vizsgálatainkhoz a nekrotikus törzs *Nicotiana glutinosa*-n ötszöri passzálása után nyert Ns-CMV változatát használtuk. A II. alcsoportba tartozó CMV izolátumok közül a fehérheréről (*Trifolium repens* L.) izolált CMV törzset (Trk7-CMV) és egy Franciaországból származó CMV izolátumot (R-CMV) használtunk. TAV esetében egy paprikáról származó izolátummal (P-TAV) dolgoztunk.

Az Rp-PSV törzset 2002-ben dr. Salamon Pál izolálta Gödöllőn fehér akácról és bocsátotta rendelkezésünkre. A munkánk során vizsgált további kilenc PSV izolátumot a Pannon ökorégió területén, enyhe mozaik és levél deformáció tüneteket mutató fehér akác növényekről gyűjtöttük 2007 és 2008 években. Az izolátumokat *C. quinoa* növényen történt háromszori egyléziós passzálást követően *N. benthamiana* tesztnövényeken szaporítottuk fel a további vizsgálatok elvégzéséhez.

Fertőzőképes vírusklónok

Felhasználtuk a II. alcsoportba tartozó Trk7-CMV és R-CMV törzs fertőzőképes klónjait (pTrk1, pTrk2, pTrk3, pR1, pR2, pR3), valamint az I. alcsoportba tartozó Rs-CMV és Ns-CMV fertőzőképes klónjait (pNs1, pNs2 és pNs3, pRs1, pRs2, pRs3). TAV esetében az RNS 3 fertőzőképes klónt használtuk (pT3).

Növények és protoplasztok inokulálása

Minden esetben 3–8 növényt inokuláltunk 2–8 leveles állapotban. A levelek felületét celittel sértettük meg, majd tisztított vírussal vagy a fertőzött növény homogenizált levelével 20 mM-os K-Na foszfát pufferben (pH: 8,0) inokuláltuk. *In vitro* transzkriptummal való fertőzéskor az inokuláláshoz használt keverék minden egyes vírus RNS-nek megfelelő *in vitro* RNS transzkriptumból 2-5 µg-ot tartalmazott növényenként 50 mM K-foszfát pufferben pH: 9,2. A protoplasztokat nevelőkamrában tartott *N. clevelandii* növények teljesen kifejlett leveleiből izoláltuk. Két mikrogramm tisztított vírus RNS-sel, vagy *in vitro* RNS transzkriptummal transzfektáltunk 100 µl protoplaszt szuszpenziót polietilén glikol (Ms ≈ 1500) felhasználásával. A protoplasztokat 24 óráig inkubáltuk növénynevelő kamrában. Az össznukleinsav kivonás előtt a sejteket lecentrifugáltuk (65 g/5 perc), a felülúszót leöntöttük.

Vírustisztítás és nukleinsav kivonás levélszövetből

A vírus izolátumokat különböző *Nicotiana* fajokon szaporítottuk fel. A vírusokat a jellegzetes tüneteket mutató növényekből 7-14 nappal a fertőzés után tisztítottuk. A növényekből, illetve a protoplasztokból az össznukleinsav kivonást 1 cm átmérőjű levélkorongból, illetve lefagyasztott protoplasztokból készítettünk fenol-kloroformos extrahálást követően, etanollal kicsapva és steril vízben szuszpendálva.

A vírus RNS-ek molekuláris klónozása, plazmidkonstrukciók elkészítése

A különböző rekombináns klónokat a fertőzőképes klónok felhasználásával, standard módszerekkel készítettük a klónokban eredetileg meglévő közös, illetve csendes mutációval beépített restrikciós hasítóhelyek felhasználásával. A CymRSV mozgási fehérje gén amlifikálásához a pCym19STOP klónt (Dr. Burgyán József szívességéből) használtuk.

A vírusfertőzés detektálása

RT/PCR DETEKTÁLÁS: A vírusfertőzés detektálását össznukleinsav kivonatból végeztük. A komplementer DNS szál szintézisét specifikus 3' vég primer jelenlétében M-MuLV reverz transzkriptázzal készítettük 1 órán át 42 °C-on. A PCR reakciót specifikus primerpár jelenlétében 30 cikluson keresztül futtattuk.

NORTHERN ANALÍZIS: Körülbelül 5 µg össznukleinsavat formaldehid és formamid tartalmú mintafelvívő pufferben denaturáltunk 65 °C-on. Az elektroforézis formaldehid tartalmú agaróz gélben történt. A nukleinsavakat Hybond-N nejlon membránra vittük át, UV fényel keresztkötöttük (70 mJ/cm²), majd a membránt Northern hibridizációnak vetettük alá. A ³²P-ral jelölt radioaktív próbát a CMV, TAV vagy PSV megfelelő klónjairól szintetizáltuk HexaLabel (Fermentas) kittel.

WESTERN BLOT ANALÍZIS: Western blot analízissel mutattuk ki a vírus köpenyfehérje jelenlétét fertőzött növényekben. A fertőzött és a kontroll növények leveleiből fehérjekivonatot készítettünk, denaturáltuk, 0,1 %-os SDS-t tartalmazó 12,5 %-os poliakrilamid gélen elválasztottuk, majd elektroblottolással átvittük Hybond-C-extra membránra. A köpenyfehérje detektálására alkalikus foszfátáz enzimmel konjugált köpenyfehérje ellenanyagot használtunk.

PRESS BLOTT HIBRIDIZÁCIÓ: *N. clevelandii* növények két átellenes, teljesen kifejlődött fertőzött levelét az inokulálást követő 1, 3 és 5 nappal, a szisztemikusan fertőzött leveleket 3, 5 és 7 nappal az inokulálás után gyűjtöttük be. A levelek fonákját pengével óvatosan megsértettük, majd - a sértett felülettel érintkezve - Hybond-N nejlon membránra helyeztük és a levélnedvet szűrőpapír között hengerrel préseltük a nejlon membránra. Szárítás után a nukleinsavakat UV fényel (120 mJ/cm²) kötöttük a membránhoz. A vírus RNS-ek kimutatásának további lépései megegyeztek a Northern analízisnél leírtakkal.

Nukleinsav szekvenciák meghatározása

A vizsgált nukleinsav szekvenciákat a Biomi Kft ABI 3100 Genetic Analyzer készülékén (Applied Biosystem) standard szekvenáló módban határozták meg.

Bioinformatikai vizsgálatok

FILOGENETIKAI ELEMZÉSEK: A szekvenciák feldolgozásához a Wisconsin Package version 10.0 GCG, a Phylip és T-coffee programcsomagokat, (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>, http://igs-server.cnrs-rs.fr/~cnotred/Projects_home_page/t_coffee_home_page.html) a TreeView programcsomagokat (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>) a törzsfák

megjelenítéséhez használtuk, valamint az Emboss-Align és a Clustal X (Thomson és mtsai., 1997) programcsomagok segítségével EMBL/NCBI nemzetközi adatbankban elérhető szekvenciákkal hasonlítottuk össze. A Clustal X programmal Neighbor-Joining eljárással a TreeView 1.6.6. felületén az adatokból filogenetikai törzsfát készítettünk. A filogenetikai vizsgálatok során a statisztikai megbízhatóságot a Clustal X program 1000 ismétlést alkalmazó bootstrap analízise biztosította.

REKOMBINÁCIÓS VIZSGÁLATOK: A nemzetközi adatbankokban fellelhető PSV szekvenciákra épülő rekombinációs vizsgálatokhoz az általánosan használt és elfogadott TOPALI v2 programcsomag PDM (Probabilistic Divergence Measures) analízisét alkalmaztuk (ablak méret: 200 nt, ablak elmozdulásának mérete: 10 nt) 95 %-os szignifikancia szinten.

HOMOLÓGIA MODELLEZÉS, ELEKTROSZTATIKUS POTENCIÁL SZÁMÍTÁS: A fehérje modellek a MODELLER 6.1 program segítségével készültek, templátként az Fny-CMV B alegységének szerkezetét használva. A szekvencia összerendezések a Wisconsin Package Version 10.0 programcsomaggal készültek. A homológia modellek finomítása a Kollman-All-Atom elnevezésű, fehérjékre kifejlesztett erőteret alkalmaztuk, a SYBYL 6.5 (1988) programcsomag felhasználásával. A modellek elektrosztatikai mintázatának számítása a linearizált Poisson-Boltzmann implicit módszerrel történt. A kontinuum fázis ionerősségét 0,1 mol/l-re, dielektromos állandóját $\epsilon=80$ -ra, míg a fehérje belsejére vonatkozó értéket $\epsilon=4$ -re voltak beállítva. A fehérjemodellben az összes lizin és arginin oldallánc egyszeres pozitív töltést, míg az összes glutamát és aszpartát oldallánc egyszeres negatív töltést viselt. Az atomok töltését a GRASP program segítségével számoltuk. A molekuláris grafikai munkák és az elektrosztatikus potenciál ábrázolások a Swiss PDB Viewer 3.7 programmal készültek.

EREDMÉNYEK

CMV által indukált törpülés *Nicotiana glutinosa* növényen

Különböző CMV izolátumok okozta tünetek jelentősen eltérhetnek egymástól egyes gazdanövényeken. A Trk7-CMV és az R-CMV hasonló tüneteket indukál a legtöbb gazdanövényen, azonban *Nicotiana glutinosa* tesztnövényen feltűnő különbséget figyeltünk meg az általuk okozott tünetekben. Míg a Trk7-CMV zöld mozaik tüneteket indukált, addig az R-CMV-vel fertőzött növényeken súlyos törpülést és levéldeformációt figyeltünk meg. Mind a Trk7-CMV izolátum, mind az R-CMV izolátum fertőzőképes klónjaival rendelkezünk, így első lépésben reasszortáns vírusok fertőzési tulajdonságainak vizsgálatával lokalizáltuk a törpüléssel járó tünetek kialakításáért felelős genomi RNS-t. Megállapítottuk, hogy minden olyan genomi RNS kombináció mely az R-CMV hármass RNS-ét tartalmazza (R1R2R3, R1Trk2R3, Trk1R2R3, Trk1Trk2R3) törpülést indukál, míg ha az R-CMV hármass RNS-e nem volt jelen (Trk1Trk2Trk3, Trk2R2Trk3, R1Trk2Trk3, R1R2Trk3) mozaik tüneteket figyeltünk meg. Így egyértelművé vált, hogy a törpülést determináló különbség az RNS3-on lokalizálódik.

A genetikai determináns pontos lokalizációjához a két vírus RNS3 fertőzőképes klónjait felhasználva rekombináns RNS3 molekulákat készítettünk. Első lépésben az RNS3-on lokalizálódó két gént (MP és CP) cseréltük ki, így meghatároztuk, hogy a törpülés genetikai determinánsa a köpenyfehérjén lokalizálódik. Az R-CMV és a Trk7-CMV köpenyfehérjéi között hat aminosav eltérés van, amiket további rekombináns, majd pontmutáns vírusok segítségével vizsgáltunk. A fertőzési kísérletek során megállapítottuk, hogy a törpülés kialakításáért egyértelműen a 193-as aminosav a felelős. Amennyiben ebben a pozícióban aszparagin található, a törpülés a többi genomi különbségtől függetlenül kialakul, míg ha ebben a pozícióban lizin található, mozaik tünetek jelennek meg.

A mutáns és rekombináns vírusok növényen belüli terjedésének kinetikáját, valamint a növényen belüli vírus akkumulációját vizsgálva megállapítottuk, hogy a két izolátum terjedésének sebessége megegyezik, mind a fertőzött levelek nyelében, mind a nem fertőzött levelekben azonos időpontban jelennek meg. A két izolátum akkumulációjában mind az inokulált, mind a szisztémikus levelekben találtunk különbséget, a súlyosabb tüneteket okozó izolátum, illetve a 193-as pozícióban aszparagint hordozó rekombinánsok nagyobb mennyiségben voltak jelen. Ugyanakkor ezt a vírusakkumulációban mutatkozó különbséget más gazdanövényeken (pl. *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc) is megfigyeltük, így az

indukált tünetekben megjelenő különbséget nem okozhatja magában a vírus felhalmozódásban megfigyelt különbség.

Az ismert Fny-CMV köpenyfehérje szerkezetet templátként hasznáva elkészítettük az R-CMV és a Trk7-CMV köpenyfehérjék homológia modelljét. A modellek segítségével meghatároztuk a 193-as aminosav pozícióját, ami H és az I β -redő közötti β H- β I hurok régióban, a víruspartikulum felületén helyezkedik el. A funkcionálisan fontos helyeket vizsgálva a PROSITE programmal megállapítottuk, hogy a 193-as pozíciót közvetlen megelőzve a 189-192. aminosavig terjedő szekvencia részen (SKDD) egy kazein kináz II (CK II) foszforilációs hely található. A 193-as aminosav töltése befolyásolja a kináz kötődését a köpenyfehérje felületén így a köpenyfehérje foszforiláltsági állapotát, ami alapvető hatással lehet az indukált biokémiai utak és így a vírustünetek jellegének meghatározásában.

A cucumovírusok hosszú távú mozgásában kulcsfontosságú köpenyfehérje régió azonosítása uborka növényeken

Nem csak az uborka mozaik vírus különböző izolátumai között figyelhetünk meg fontos tünettani különbségeket, hanem a különböző *Cucumovirus* nemzetségbe tartozó fajok között is. Míg a CMV izolátumok szisztemikusan fertőzik az uborkát, addig a különböző TAV izolátumok egyáltalán nem, vagy csak lokálisan fertőzik. Korábbi munkánk során reasszortáns és rekombináns vírusok segítségével igazoltuk, hogy a TAV köpenyfehérjeje nem teszi lehetővé a rekombináns vírus hosszú távú mozgását uborka növényen. A továbbiakban az R-CMV és a P-TAV izolátumokat felhasználva vizsgáltuk, hogy a cucumovírusok köpenyfehérjéjén hol lokalizálódik a hosszú távú mozgásban kulcsszerepet játszó régiók. Mivel a cucumovírusok hosszú távú mozgása víruspartikulum formájában történik a fertőzött növény szállítószövet rendszerén keresztül, így a köpenyfehérje víruspartikulum felszínén található hurokrégióra koncentráltuk vizsgálatainkat. Mind a CMV CP-nek, mind a TAV CP-nek ismert a röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott térszerkezete, és ezek nagyon hasonlítanak egymásra. A két köpenyfehérjét összehasonlítva meghatároztuk azt az 5-5 hurokrégiót, amely a víruspartikulum felületén lokalizálódik. Az R-CMV öt hurokrégióját egyesével a TAV megfelelő hurok részeivel helyettesítettük, így öt rekombináns klónt készítettünk. A két vírus közös gazdanövényét (*N. clevelandii*) a Trk7-CMV RNS1 és 2 jelenlétében mindegyik rekombináns vírus fertőzte, amint azt a vizuális megfigyelés, Northern analízis és RT/PCR vizsgálatok igazolták. Uborka növények fertőzése során megállapítottuk, hogy a β B- β C loop mutáns kivételével a rekombinánsok szisztemikusan fertőzik az uborkát, és a legtöbb mutáns által

indukált tünet az eredeti CMV fertőzéshez hasonló volt. A β E- α EF mutáns mutatott egyedül eltérést a vad típusú R-CMV-hez képest, ennél a rekombinánsnál a tünetek két nappal később jelentek meg, és gyengébbek is voltak. A β B- β C hurok régióban öt aminosav eltérés található a P-TAV és a Trk7-CMV izolátum között, amiket a továbbiakban egyesével illetve különböző kombinációkban vizsgáltunk, mutáns vírusok felhasználásával (pR3K76R, pR3P78T, pR3E79R, pR3E79A, pR3G83D, pR3EI79-80RT, pR3PEI78-80TRT). Megállapítottuk, hogy a két vírus közös gazdanövényeit mindegyik mutáns szisztemikusan fertőzi és a kialakult tünetek a legtöbb esetben nagyon hasonlítottak az R-CMV által okozott tünetekre. Egyedül az R3E79R mutáns indukált az eredeti R-CMV-nél lényegesen erősebb tüneteket, ahol a mozaik tüneteken kívül erős törpülést és levéldeformációt figyeltünk meg. Az RT/PCR nukleinsav sorrend meghatározás mindegyik esetben bizonyította a mutációk stabilitását. Uborka növények fertőzése után négy nappal mindegyik esetben megfigyeltünk lokális léziókat az inokulált leveleken, tehát a mutánsok sejtről-sejtre a vad típushoz hasonlóan terjedtek. Szisztemikus tüneteket a R3K76R, R3P78T, R3E79A, R3G83D, R3EI79-80RT vírusok esetén figyeltünk meg, míg a R3PEI78-80TRT és R3E79R vírus esetén nem jelentek meg tünetek. Az uborka növények nem inokulált leveleinek Northern analízise megerősítette a vizuális megfigyeléseinket, a β B- β C loop rekombináns mellett a R3PEI78-80TRT és R3E79R mutánsok sem képesek az uborka növényeket szisztemikusan fertőzni. Kísérleteink bizonyították, hogy ha az R-CMV CP β B- β C loop részén található PEI aminosavakat a P-TAV CP azonos elhelyezkedésű TRT aminosavakra cseréljük, vagy az R-CMV CP 79-es pozíciójában lévő glutaminsavat a P-TAV CP-ben található argininra cseréljük, uborka növényben a mutáns vírus hosszú távú mozgása, szisztemizálódása gátolt. Tehát a CP 78-80. aminosavai kulcsfontosságúak a CMV uborka növényen belüli hosszú távú mozgásában.

Felvetődött az a kérdés, hogy ha a P-TAV CP β B- β C loop régióját a CMV megfelelő szakaszával helyettesítjük, lehetővé válik-e a mutáns vírus hosszú távú mozgása uborka növényen. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához elkészítettük a pT3TRT78-80PEI és a pRT3TRT78-80PEI konstrukciókat. Mindkét konstrukció fertőzőképességét először *N. clevelandii* növényen vizsgáltuk Trk7-CMV RNS1 és 2 transzkriptum jelenlétében. Ezen a tesztnövényen mindkét konstrukció szisztemikus tüneteket okozott, és az RT/PCR reakció utáni nukleinsav sorrend meghatározás bizonyította a konstrukciók stabilitását. Uborka növények fertőzése során a T3TRT78-80PEI és a RT3TRT78-80PEI virionok csak lokális fertőzést indukáltak,

szisztémikus tüneteket egyetlen esetben sem sikerült detektálnunk, amit a Northern analízis eredménye is igazolt.

Összességében megállapítottuk, hogy a cucumovírusoknál a β B- β C loop 3 aminosavból álló régiója kulcsfontosságú uborka növényen a szisztémikus terjedéshez, azonban nem ez az egyetlen funkcionálisan fontos régió, ami a hosszú távú terjedésben a különbséget okozza a CMV és a TAV között.

A cucumovírusok sejtről-sejtre történő terjedésének feltétele a mozgási fehérje és a köpenyfehérje kompatibilitása

Régóta ismert, hogy a különböző cucumovírusok között reasszortáns vírusok állíthatók elő, tehát az egyik vírus RNS1 és 2 egy másik cucumovírus RNS3-ával fertőzőképes vírust alakíthat ki. Ugyanakkor az RNS1 és 2 csak az azonos fajhoz tartozó vírusok között, például a különbözőn CMV izolátumok között cserélhető ki szabadon. Korábbi munkánk során bizonyítottuk, hogy az RNS3-on kódoló két gén sem minden esetben cserélhető ki szabadon a különböző cucumovírusok között. Míg a CMV MP mind a CMV mind a TAV CP-vel fertőzőképes vírust alkot, addig a TAV MP csak a saját CP-jével képes fertőzőképes, tehát sejtről-sejtre és hosszú távú mozgásra is képes vírust kialakítani. A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy mi az oka a két rekombináns vírus különböző viselkedésének. További rekombináns vírusokat készítettünk. Először a MP-ek karboxi-terminális régióit cseréltük ki a két vírus között. A TAV esetén ez 30 aminosav, míg a CMV esetén 29 aminosav cseréjét jelentette. Fertőzési kísérletek során megállapítottuk, hogy a TAV MP karboxi-terminális részének CMV eredetűre cserélése elegendő ahhoz, hogy a rekombináns fehérje mind a CMV mind a TAV CP-vel fertőzőképes vírust alakíthasson ki.

A továbbiakban a CP rekombináns vírusok segítségével térképeztük, hogy a TAV MP-vel való fertőzéshez a CP melyik része szükséges. A köpenyfehérjék esetén a rekombinációs pontot a két vírus köpenyfehérjéinek aminosav sorrend homológia viszonyai alapján határoztuk meg. A két vírus CP-jének amino-terminális régiói kisebb homológiát mutattak (40,58 % az első 70 aminosav esetén) mint a C-terminális régió (63,33 % az utolsó 149 aminosavnál), így ezeket a részeket cseréltük ki. Az a rekombináns CP mely a TAV amino-terminális 70 aminosava mellett a CMV karboxi-terminális 149 aminosavát hordozta a CMV MP-el fertőzőképes vírust alkotott, míg a TAV MP jelenlétében protoplaszt rendszerben replikálódott, de növények inokulálása során sem lokális, sem szisztémikus tüneteket nem alakított ki. A másik köpenyfehérje rekombináns (CMV amino-terminális 70 aminosava mellett a TAV karboxi-terminális 149 aminosavát tartalmazta) egyik MP-el sem alkotott

fertőzőképes vírust. Protoplaszt rendszerben még mindegyik konstrukció hatékonyan replikálódott, azonban tesztnövényeken lokális tünetek sem alakultak ki. Ennek a rekombinánsnak a részletes bioinformatikai vizsgálata során azonosítottunk a fehérje felszínén egy, az első N-terminális α -hélix régiót követő részt, melynek töltéseloszlása fontos lehet a vírus fertőzőképességéhez. Míg a sejtről-sejtre hatékonyan terjedő konstrukciók esetén (P-TAV, R-CMV, R3NST) a 62. aminosav körüli fehérjerész elsősorban pozitív töltésű, addig a mozgásában gátolt konstrukció (R3SPT) esetében ez a régió inkább negatív töltésű. A töltésviszonyok alapján feltételeztük, hogy a pR3SPT konstrukció elektrosztatikus viszonyai miatt nem tudott megfelelő kölcsönhatást kialakítani más vírus vagy növényi eredetű fehérjékkel. A töltésviszonyok megváltoztatására a nem fertőző CP konstrukcióban egy kétszeresen mutáns köpenyfehérjét terveztünk, mely a 62. aminosav pozícióban lizint, a 65. aminosav pozícióban pedig arginint tartalmazott. Az így módosított CP fertőzőképessége helyreállt, a továbbiakban mind a TAV, mind a CMV MP jelenlétében a tesztnövényeket szisztemikus vírushatás alakult ki.

A kísérletek eredményeit összegezve megállapítottuk, hogy a MP C-terminális 29/30 aminosavának és a CP karboxi-terminális 2/3-ának kompatibilitása szükséges a cucumovírusok sejtről-sejtre terjedéséhez, valamint hogy a CP 62. aminosav körüli régió töltéseloszlása kulcsfontosságú a vírus sejtről-sejtre terjedéséhez.

Heterológ mozgási fehérje jelentősen módosíthatja a CMV-re jellemző tüneteket

Az előző munkákban bemutattuk, hogy a vírustünetek változatosságáért egyetlen vírusfehérje egyetlen aminosava is felelős lehet, illetve, hogy a vírus növényen belüli terjedéséhez, az egész növény megbetegítéséhez a különböző vírusfehérjék összehangolt működése szükséges. Ugyanakkor felmerült a kérdés, hogy különböző víruscsaládokhoz tartozó vírusok hasonló funkciójú fehérjéi képesek-e egymást helyettesíteni, valamint, hogy ez milyen hatással lehet a tünetek kialakítására. Ennek a célnak megfelelően a *Cymbidium* gyűrűsfoltosság vírus (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) mozgási fehérjéjével (ORF4) helyettesítettük a Trk7-CMV mozgási fehérjéjét, majd a vírus terjedését, illetve a vírustünetek változását vizsgáltuk. A tesztnövényeket három csoportba soroltuk aszerint, hogy mindkét szülői vírus lokális fertőzést okoz (1. csoport), mindkét szülői vírus szisztemikus tüneteket indukál (2. csoport) vagy csak az egyik vírus alakít ki szisztemikus tüneteket (3. csoport).

Az első csoportba különböző *Chenopodium* fajok tartoztak. Ezeket a növényeket, a szülői vírusokhoz hasonló módon, lokálisan fertőzte a hibrid vírus. A megjelenő

léziók mérete és jellege inkább a CymRSV-re hasonlított. Míg például *Chenopodium quinoa* tesztnövényen a CMV nekrotikus, folyton növekvő léziót indukál, addig a CymRSV és a rekombináns CMVcymMP klorotikus, apró léziókat alakít ki. *Chenopodium foetidum* növényeken a CMV nagyobb, diffúzabb léziókat, míg a CymRSV és a CMVcymMP apró klorotikus léziókat indukál. A vizsgált növények második csoportjába tartozó növényeknél (*N. benthamiana*, *N. clevelandii* és *N. megalosiphon*) a hibrid vírus a szülői vírusokhoz hasonlóan szisztemikus fertőzést okoz. A CMVcymMP vírus tünetei mindkét szülői vírus tüneteire emlékeztettek, levéldeformációt és mozaik tüneteket figyeltünk meg. A szülői vírusoknál a tünetek erőssége eltérő. A hibrid vírus a CymRSV-nél gyengébb, a CMV-nél pedig erősebb tüneteket indukált. A vizsgált tesztnövények harmadik csoportjába tartozó *N. debney*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanthi növényeken a szülői vírusok közül a CymRSV nem okoz szisztemikus tüneteket, a vírus a nem inokulált, csúcsi levelekből nem mutatható ki, míg a CMV mindhárom gazdanövényen szisztemikus tüneteket indukál. A rekombináns CMVcymMP vírus szisztemikusan fertőzi a *N. debney* és *N. tabacum* cv. Xanthi növényeket, azonban a *N. glutinosa* növényen csak lokális fertőzést indukál. Az *N. tabacum* cv. Xanthi és *N. debney* növényeken a CymRSV esetében jól megfigyelhetők voltak a fertőzött leveleken kialakuló lokális léziók, amik sem a CMV, sem a hibrid vírus hatására nem alakulnak ki. A hibrid vírusnál megjelenő szisztemikus tünetek ebben az esetben a CMV által indukált tünetekre emlékeztettek. A *Nicotiana glutinosa* tesztnövényen a rekombináns CMVcymMP vírus a CymRSV-hez hasonlóan lokális léziókat alakított ki a fertőzött leveleken, bár a léziók diffúzabbak és halványabbak voltak a szülői vírushoz képest.

Tehát bizonyítottuk, hogy a CMV mozgási fehérje helyettesíthető egy másik víruscsaládba tartozó vírus (CymRSV) mozgási fehérjéjével. A rekombináns vírus életképes, de az általa indukált tünetekre és a szisztemikus mozgására alapvető, a gazdanövénytől függő hatással van az idegen mozgási fehérje megjelenése.

A Pannon ökorégióban előforduló PSV izolátumok jellemzése

Mint az előző munkák során bemutattam, a cucumovírusok hármas RNS-én kódoló géneknek fontos szerepe van mind a jellemző tünetek kialakításában, mind a gazdanövénykör meghatározásában. Szintén a *Cucumovirus* nemzetségbe tartozó, de elsősorban pillangósokon előforduló földimogyoró satnyulás vírusról sokkal kevesebb információ érhető el e tekintetben, különösen az akác növényekről származó izolátumok esetén. Éppen ezért tűztük ki célul akácról származó PSV izolátumok gyűjtését, tünettani és molekuláris biológiai jellemzését. Így egy gödöllői

akácról származó izolátummal, az Rp-PSV-vel kezdtünk el foglalkozni. Az Rp-PSV mindhárom genomi RNS-ét klónoztuk, és meghatároztuk a teljes nukleinsav sorrendjüket, majd az adatokat elhelyeztük a GenBank nemzetközi adatbázisban az AM905353, AM905354, AM905355 azonosító számok alatt. Az RNS1 3325 nt, az RNS2 2942 nt, az RNS3 2208 nt hosszúságúnak bizonyult, mely adatok megközelítőleg megegyeztek az adatbankban található más PSV izolátumok nukleinsav sorrendjének hosszával, és a cucumovírusokra jellemző öt nyílt leolvasási keret is azonosítható volt. Az Rp-PSV nukleinsav sorrendjét összehasonlítottuk az adatbankban elérhető PSV izolátumok nukleinsav sorrendjével. Megállapítottuk, hogy az Rp-PSV nukleinsav szinten az RNS1 és 2 esetében a W-PSV-vel (84,6 %), a teljes RNS3 esetén pedig a J-PSV-el (83,9 %) mutatja a legnagyobb hasonlóságot. A géneket kódoló szakaszainak homológia viszonyait külön-külön vizsgálva, az 1a, 2a fehérjét, illetve a 3a fehérjét kódoló szakaszok a W-PSV-vel mutatták a legnagyobb hasonlóságot, azonban a CP-t kódoló gén esetén a Mi-PSV-vel kaptuk a legnagyobb hasonlóságot. Mivel az RNS3-on kódoló két gén a homológia vizsgálat során eltérő rokonsági viszonyokat mutatott, az RNS3-al rekombinációs analízist végeztünk. A rekombinációs vizsgálatokban a GenBank-ban elérhető teljes PSV RNS3 nukleinsav sorrendeket vontuk be. Az elemzés során 2 feltételezett rekombinációs forró pontot azonosítottunk 95 %-os szignifikancia szinten az 1199 nt (intergénikus régió) és az 1873 nt (CP karboxi-terminális vége) körüli régióban. A cucumovírusok esetén egy alcsoportba sorolhatók azok az izolátumok, melyek 90 %-nál nagyobb homológiát mutatnak egymással. Az ennél kisebb értékek esetén új alcsoportról beszélhetünk. Így az Rp-PSV a PSV izolátumok egy új, IV. alcsoportjába sorolható, és ennek a csoportnak a típusizolátuma. A IV. alcsoport kialakulásában a rekombináció fontos szerepet játszott.

Továbbiakban kérdéses volt, hogy ez az izolátum mennyire tekinthető egyedinek, vagy esetleg jellemző akác növények esetén. Éppen ezért további 9 PSV izolátumot gyűjtöttünk a Pannon ökorégió területén, és elvégeztük ezen az izolátumok RNS3-nak részleges klónozását, nukleinsav sorrend meghatározását és filogenetikai vizsgálatát. Megállapítottuk, hogy ezek az izolátumok nagymértékű azonosságot mutatnak egymással (nukleotid sorrendjük 96,3-98,0 %, míg aminosav sorrendjük 98,1-100 %), és a rekombinációs pontok is minden esetben azonosíthatók.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a Pannon ökorégió területén az akácról származó PSV izolátumok egy jól elkülönülő, új alcsoportot, a IV. alcsoportot alkotják. Ennek az alcsoportnak a kialakulásában RNS rekombináció szerepet játszott, majd nem a teljes köpenyfehérje kicserélődött a II. és III. alcsoport között. A rekombináció

szerepet játszhatott az akáchoz, mint gazdanövényhez történő alkalmazkodás folyamatában.

Egy különleges patotípusú CMV, az Ns-CMV vizsgálata

Az eddig ismertetett munkák során elsősorban a cucumovírusok RNS3-ának a patológiai jellemzők kialakításában, a gazdanövénykör változatosságában betöltött szerepét vizsgáltuk. Azonban az utóbbi években mind fontosabbá vált az RNS1 és 2 szerepének tisztázása a tünetek kialakításában. Az Ns-CMV izolátum jellemzése is ezekhez a munkákhoz járult hozzá. Az Ns izolátum különleges patológiai tulajdonsága abban nyilvánult meg, hogy a legtöbb CMV törzzsel szemben szisztemikusan fogékony növényfajokon, így például a *Solanaceae* család fajain is csak lokális léziókat okoz. *N. clevelandii* növények fertőzött levelein lokális léziót, majd szisztemikus fertőzést indukál, míg *N. tabacum* cv. Xanthi-nc és *N. glutinosa* tesztnövényeken csak az inokulált leveleken figyelhetünk meg lokális fertőzést, de szisztemikus tünetek nem alakulnak ki, és ezekben az esetekben a vírus Northern analízissel sem mutatható ki a nem fertőzött levelekből. Egy tipikusnak mondható CMV izolátum, az Rs-CMV felhasználásával reasszortáns majd rekombináns és pontmutáns vírusok felhasználásával sikerült az Ns-CMV különleges patológiai jellegéért felelős aminosavat az 1a fehérje 461-es aminosavára lokalizáltuk. A genetikai háttértől függetlenül, ha ebben a pozícióban cisztein található, kialakul a hiperszenzitív válaszreakció, ha azonban arginint építünk be (az Rs-CMV-ben ez található a 461-es pozícióban), akkor mozaik tünetek alakulnak ki. Az 1a fehérjének a 461-es pozíciója egy amfipatikus α -hélix részen, a töltéseloszlás változás határán található. A továbbiakban vizsgáltuk különböző jellegű aminosavak beépítésének hatását a vírus által indukált tünetekre, illetve a vírus életképességére.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy nemcsak az Ns-CMV 1a fehérjében jelenlévő cisztein aminosav indukálja a különleges patológiai jellemzőket, hanem a szerin és az alanin aminosavak beépítése ugyanebbe a pozícióba szintén a vírus lokalizációjához vezet. Ugyanakkor az 1a fehérje 461-es pozíciójába prolint, aszparagint vagy glutaminsavat építve a vírus replikációja megszűnik. A mutáns vírusok további vizsgálata azt is bizonyította, hogy a növény válaszreakciójában a vírusfertőzés során a fertőző inokulum koncentrációjának fontos szerepe van, valamint, hogy egyes esetekben a nekrotikus válaszreakció és a vírus lokalizációja szétválasztható.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Bizonyítottuk, hogy az uborka mozaik vírus R izolátuma által okozott törpülésszerű tünetek kialakításáért *N. glutinosa* növényen a köpenyfehérje 193-as aminosava a felelős. Ha ebben a pozícióban aszparagin vagy szerin található, a törpülésszerű tünetek kialakulnak, míg lizin jelenléte esetén mozaik tünetek alakulnak ki. A tünetek kialakulásában a molekula modellezés alapján a köpenyfehérje foszforilációs állapotának változása játszik szerepet.
2. Megállapítottuk, hogy a CMV szisztemikus terjedésében a β B- β C hurok régió 78., 79. és 80. aminosava játszik kulcsszerepet uborka növények esetén. Az uborkát szisztemikusan nem fertőző TAV hosszú távú mozgásának kialakításához ennek a régióknak a módosítása nem elég, így a hosszú távú mozgásban egyéb köpenyfehérje régióknak is meghatározó szerepe van.
3. Igazoltuk, hogy a cucumovírusok sejtről-sejtre terjedésének feltétele a mozgási fehérje és a köpenyfehérje kompatibilitása. Ehhez a kompatibilitáshoz egyrészt a mozgási fehérje karboxi-terminális 30 (TAV) illetve 29 (CMV) aminosava, illetve a köpenyfehérje karboxi-terminális 150 aminosava szükséges. Megállapítottuk, hogy a kompatibilitás kialakulása során a CMV MP kevésbé specifikus, mint a TAV MP, és ez a rugalmasság hozzájárulhat a CMV szélesebb gazdanövényköréhez illetve elterjedéséhez.
4. Azonosítottunk a köpenyfehérje felszínén egy zsebet, melynek töltéseloszlása a vírus sejtről-sejtre terjedéséhez kulcsfontosságú.
5. Bizonyítottuk, hogy a CMV mozgási fehérjéje heterológ (CymRSV eredetű) mozgási fehérjével helyettesíthető, és az így keletkező vírus fertőzőképes. Megállapítottuk, hogy a heterológ mozgási fehérje jelentősen módosíthatja a CMV-re jellemző tüneteket. Csak lokálisan fertőződő gazdanövények esetén meghatározza a lokális léziók méretét, jellegét, míg mindkét szülő által szisztemikusan fertőződő gazdanövények esetén módosítja a vírusfertőzés tüneteit. Csak a CMV által szisztemikusan fertőzött gazdanövényeknél nem minden esetben marad meg a vírus szisztemikus terjedése, így a MP-nek a vírus hosszú távú mozgásában is fontos szerepe van.

6. Elsőként állapítottuk meg, hogy a PSV evolúciójában a rekombináció fontos szerepet játszott.
7. Leírtuk a PSV negyedik alcsoportját, mely alcsoport típusörzse a hazánkban akácon előforduló Rp-PSV.
8. Bizonyítottuk, hogy a Pannon ökorégió területén, akác növényen a IV. alcsoport PSV izolátumai vannak jelen.
9. Igazoltuk, hogy az Ns-CMV különleges patológiai tulajdonságaiért az 1a fehérje 461-es aminosava a felelős. Megállapítottuk, hogy ez az aminosav egy amfipatikus α -hélix részét képezi, és az aminosav jellege alapvető fontosságú a vírusreplikációban és a tünetek típusának meghatározásában is.
10. Leírtuk, hogy a fertőző vírus koncentrációja kulcsfontosságú a növényi válaszreakció típusának meghatározásában.
11. Bizonyítottuk, hogy hiperszenzitív reakció esetén a vírus lokalizációja és a nekrotikus fenotípus szétválasztható.

A PhD FOKOZAT MEGSZERZÉSE ÓTA MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK:

Az értekezés témaköréből megjelent közlemények jegyzéke:

Folyóiratban megjelent közlemények:

Salamon P., Salánki K., Szilassy D. és Balázs E. (1998): Az uborka mozaik vírus nekrotikus izolátumának (CMV-N) patológiai jellemzése. *Növényvédelem*, 34:583-591.

Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (1999): Stunting symptom of cucumber mosaic virus infected *Nicotiana glutinosa* plants is determined by a single amino acid residue in the coat protein. *Mol. Plant Microbe Int.*, 12:1105-1113.

Huppert E., Szilassy D., Salánki K., Divéki Z. and Balázs E. (2002): Heterologous movement protein highly determinates the infection phenotype of cucumber mosaic virus. *Journal of Virology*, 76:3554-3557.

Salánki K., Gellért A., Huppert E., Náray-Szabó G. and Balázs E. (2004): Compatibility of the movement protein and the coat protein of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. *J. Gen. Virol.*, 85(4):1039-1048.

Divéki Z., Salánki K. and Balázs E. (2004): The necrotic pathotype of the Cucumber mosaic virus (CMV) Ns strain is solely determined by the amino acid 461 of the 1a protein. *Mol. Plant Microbe Int.* 17(8):837-45.

Salánki K., Gellért Á. és Balázs E. (2006): Az uborka mozaik vírus változékonysága a köpenyfehérje-szerkezet tükrében. *Növényvédelem*, 42(1):15-22.

Gellért Á., Salánki K., Náray-Szabó G. and Balázs E. (2006): Homology modelling and protein structure based functional analysis of five cucumovirus coat proteins. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 24(5):319-27.

Salánki K., Gellért A., Náray-Szabó G. and Balázs E. (2007): Modelling-based characterization of the elicitor function of amino acid 461 of cucumber mosaic virus 1a protein in the hypersensitive response. *Virology*, 358:109-117.

Kiss L., Balázs E. és Salánki K. (2008): Magyarországi fehér akácról (*Robinia pseudoacacia* L.) származó földimogyoró satnyulás vírus (Peanut stunt virus, PSV) izolátumok jellemzése. *Növényvédelem*, 44(11): 573-578.

Kiss L., Sebestyén E., László E., Salamon P., Balázs E. and 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(7):1373-7.

Kiss L., Balázs E. and Salánki K. (2009): Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus (PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of the fourth taxonomic PSV subgroup. *European Journal of Plant Pathology*, 125(4):671-677.

Salánki K, Kiss L, Gellért A, Balázs E. (2011): Identification a coat protein region of Cucumber mosaic virus (CMV) essential for long-distance movement in cucumber. *Arch. Virol.*, 156(12):2279-83.

Tudományos előadások, poszterek:

Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (1999): Determinants of a host specific stunting symptom induced by cucumber mosaic cucumovirus infection. XIth international congress of virology. Sydney, Australia 1999. August 9-13.

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K. és Balázs E. (2000): Egy különleges patológiai tulajdonságú uborka mozaik vírus törzs (CMV-N) elsődleges szerkezetének jellemzése. 46. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2000. február 22-23.

Salánki K., Huppert E. és Balázs E. (2000): Cucumovírusok lokális terjedésének feltétele a 3a protein és a köpenyfehérje kölcsönhatása. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2000. augusztus 24.-26.

Salánki K., Huppert E. és Balázs E. (2001): Cucumovírusok lokális terjedésének feltétele a mozgási fehérje és a köpenyfehérje kompatibilitása. 47. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2001. február 27-28.

Huppert E., Szilassy D., Salánki K., Divéki Z. és Balázs E. (2001): A mozgási fehérje kicserélése nem okozza az uborka mozaik vírus fertőzőképességének elvesztését. 47. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2001. február 27-28.

Divéki Z., Salánki K. és Balázs E. (2001): Uborka mozaik vírus nekrotikus törzsének (CMV-N) különleges patológiai tulajdonságaiért felelős genetikai determináns azonosítása. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. október 10-12.

Huppert E., Szilassy D., Salánki K., Divéki Z. és Balázs E. (2001): Hibrid uborka mozaik vírus előállítás nem homológ mozgási fehérje felhasználásával. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. október 10-12.

Divéki Z., Salánki K. és Balázs E. (2002): Az uborka mozaik vírus Ns törzsének nekrotizáló okozó képessége a vírusgenom 1. RNS-éhez köthető. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2002. Március 6-7.

Huppert E., Szilassy D., Salánki K., Divéki Z. and Balázs E. (2002): Hybrid cucumber mosaic virus moves efficiently with the movement protein of Cymbidium ringspot virus. XIIth International Congress of Virology, Paris, July 27- August 1 2002.

Salánki K., Huppert E., Gellért Á. and Balázs E. (2002): The compability of the 3A protein and the coat protein of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. XIIth International Congress of Virology, Paris, July 27- August 1 2002.

Divéki Z., Salánki K. and Balázs E. (2002): The genetic determinant responsible for the unique pathological properties of the Cucumber mosaic cucumovirus necrotic strain (CMV-N). XIIth International Congress of Virology, Paris, July 27- August 1 2002.

Gellért Ákos, Salánki Katalin, Huppert Emese, Náray-Szabó Gábor és Balázs Ervin (2004): A homológia modellezés legetősége a cucumovírusok sejtről sejtre való terjedésének vizsgálatában.. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete, Sopron, 2004. május 10-13.

Gellért Ákos, Salánki Katalin, Huppert Emese, Náray-Szabó Gábor and Balázs Ervin (2004): Applied homology modelling in the study of cell-to-cell movement of cucumoviruses. 22nd European Crystallographic Meeting, Budapest, August 26-31 2004.

Salánki Katalin, Gellért Ákos and Balázs Ervin. (2005): Characterization of the 461 amino acid position of cucumber mosaic virus 1a protein responsible for necrosis induction. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, July 22-28 2005.

Gellért Ákos, Salánki Katalin, Náray-Szabó Gábor and Balázs Ervin (2005): Homology modelling and structure based functional analysis of five cucumovirus coat proteins. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, July 22-28 2005.

Gellért Ákos, Salánki Katalin and Balázs Ervin (2005): Characterization of the 461 amino acid position of cucumber mosaic virus 1A protein responsible for necrosis induction. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica V52 P47 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary, October 26-28 2005.

Salánki Katalin, Gellért Ákos és Balázs Ervin (2006): Az uborka mozaik vírus (*cucumber mosaic virus, CMV*) 1A fehérje 461. aminosavának szerepe a hiperszenzitív reakció kialakításában. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2006. február 23-24.

Salánki Katalin, Kiss László, Gellért Ákos és Balázs Ervin (2006): Az uborka mozaik vírus szisztemikus terjedéséért felelős köpenyfehérje régió azonosítása uborka növényen. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2006. október 18-20.

Salánki Katalin, Kiss László, Gellért Ákos és Balázs Ervin (2007): Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus, CMV*) szisztemikus terjedéséért a köpenyfehérje 78-80. aminosavai felelősek uborka növényen. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2007 február 20-21.

Kiss László, Sebestyén Endre, László Emese, Salamon Pál, Balázs Ervin and Salánki Katalin (2007): Nucleotide sequence analysis of Peanut stunt virus RP isolate, prove the role of recombination in cucumovirus evolution. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 2007 July 18-20.

Kiss László, Sebestyén Endre, László Emese, Salamon Pál, Balázs Ervin és Salánki Katalin (2008): *In vivo* rekombináns földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*) izolátum molekuláris jellemzése. 54. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2008 február 27-28.

Salánki Katalin, Kiss László, Gellért Ákos and Balázs Ervin (2008): Identification of a region of *Tomato aspermy virus* (TAV) coat protein responsible for long-distance movement deficiency in cucumber XIVth International Congress of Virology, Istanbul, 2008 augusztus 10-15.

Kiss L., Sebestyén E., László E., Salamon P., Baláz, E. and Salánki K. (2008): Molecular characterization of a black locust strain of Peanut stunt virus, The 3rd Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (August 20-23, Ljubljana, Slovenia) 61.

Kiss L., Balázs E. és Salánki, K. (2009): Pannon ökorégióból származó földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, *PSV*) izolátumok jellemzése. 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2009 február 23-24.

A dolgozathoz nem, vagy nem közvetlenül kapcsolódó közlemények jegyzéke:

Folyóiratban megjelent közlemények:

Szász A., Szilassy D., Salánki K., Fári M. and Balázs, E. (1998): A simple and efficient method for the transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Agron.*, 46:201-207.

Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (1999): Molecular evidence for the existence of two distinct subgroups in Cucumber mosaic virus. *Virus Genes*, 18:221-227.

Teycheney P.Y., Aaziz R., Tourneur C., Salánki K., Dinant S., Balázs E., Jacquemond M. and Tepfer M. (2000): Synthesis of (-)-strand RNA from the 3' untranslated region of plant viral genomes expressed in transgenic plants upon infection with related viruses. *J. Gen. Virol.*, 81:1121-1126.

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K. és Balázs E. (2000): A GFP riportergén alkalmazása a Cucumovírusok mozgásának tanulmányozásában. *Növényvédelem*, 36(7):343-8

Salamon P. és Salánki K. (2001): Termesztett és vadon élő burgonyafélék vírusbetegségei és vírusai magyarországon. 4. Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) spontán előfordulása farkasbogyón (*Scopolia carniolica* Jacq.). *Növényvédelem*, 37(3):123-128.

Salamon P. és Salánki K. (2002): A napraforgó (*Helianthus Annus* L.) gyűrűs mozaik betegsége: Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) által okozott új betegség előfordulása Magyarországon. *Növényvédelem*, 38(1):9-21.

Divéki Z., Salánki K. és Balázs E. (2002) Limited utility of blue fluorescent protein (BFP) in monitoring plant virus movement. *Biochimie*, 84(10): 997-1002.

Tóbiás I., Szabó B., Salánki K. és Palkovics L. (2007): A cukkini sárga mozaik vírus és az uborka mozaik vírus terjedése a héj nélküli tök (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) magjával. *Növényvédelem*, 43(7):291-300.

Tóbiás István, Kiss Balázs, Pájtli Éva, Tholt Gergely és Salánki Katalin (2008): A búza törpülés vírus (Wheat dwarf virus) árpatorzsének jellemzése és átviteli kísérletek. *Növényvédelem*, 44(11):545-552.

Kiss L, Salánki K, Csilléry G, Szarka J és Palkovics L (2008): Az L3 rezisztencia sem elég már. *Kertészet és Szőlészet*, 57(22):12-13.

Balázs E., Bukovinszki Á, Csányi M, Csilléry G, Divéki Z., Nagy I, Mitykó J, Salánki K and Mihálka V. (2008): Evaluation of a wide range of pepper genotypes for regeneration and transformation with an *Agrobacterium tumefaciens* shooter strain. *South African Journal of Botany*, 74:720-725.

Tóbiás István, Almási Asztéria, Salánki Katalin és Palkovics László (2009): A kabakosokon 2008-ban végzett virológiai vizsgálat eredményei. *Növényvédelem*, 45(5):241-244.

Tóbiás I., Kiss B., Salánki K. and Palkovics L. (2010): The nucleotide sequence of barley strain of Wheat warf virus isolated in Hungary. *Cereal Research Communications*, 38(1):67-74.

Salamon Pál, Várallyay Éva, Nemes Katalin és Salánki Katalin (2010): Termesztett és vadon élő burgonyafélék vírusos betegségei és vírusai Magyarországon. 7. Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus) fehér törzsének előfordulása dohányon (*Nicotiana tabacum* L.) és a CMV-NTW izolátum tulajdonságai. *Növényvédelem*, 46(5):218-225.

Tóbiás István, Shevchenko Oleksiy, Kiss Balázs, Bysov Andriy, Snihur Halina, Polischuk Valery, Salánki Katalin and Palkovics, László (2011): Comparison of the Nucleotide Sequences of Wheat Dwarf Virus (WDV) isolates from Hungary and Ukraine. *Polish Journal of Microbiology*, 60(2):125-131.

Salamon P., Nemes K., Salánki K. and Palkovics L. (2012): First report of natural infection of pea (*Pisum sativum* L.) by Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Hungary. *Plant Disease*, 96(2):295.

Kádár Katalin, Salánki Katalin, Gellért Ákos, Divéki Zoltán, Balázs Ervin (2011): Olajtökről izolált uborka mozaik vírus molekuláris jellemzése. *Növényvédelem*, 47(9):357-362.

Tóbiás István, Kiss Balázs, Salánki Katalin és Palkovics László (2011): A búza törpülés vírus (*Wheat dwarf virus*) etiológiai vizsgálata és molekuláris jellemzése. *Növényvédelem*, 47(9):371-376.

Könyvfejezet:

Jacquemond M., Salánki K., Carrère I., Balázs E. and Tepfer M. (1997): Behaviour of cucumovirus pseudorecombinant and recombinant strains in solanaceous hosts. In: *Virus-resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact*. Ed. Tepfer M., Balázs E. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, INRA Paris, pp. 52-65.

Balázs E., Huppert E., Divéki Z. és Salánki K. (2006): A paprika fontosabb hazai víruskórokozói. In: *Étkezési és fűszerpaprika termesztése*. Ed.: Zatykó L. és Márkus F. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp164-173.

Tudományos előadások, posztterek:

Szilassy D., Józsa R., Palkovics L., Salánki K., Wittner A., Szász A. and Balázs, E. (1997): Coat protein mediated cross protection in different plant virus interactions. 8th European Congress on Biotechnology, Budapest, Hungary, 17-21 August.

Huppert E., Salánki K., Szilassy D. és Balázs E. (1998): Paradicsom magtalanság vírus (TAV-P) egyes és kettős RNS-ének molekuláris jellemzése. 44. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 1998

Aaziz R., Salánki K., Balázs, E., Jacquemond M. and Tepfer M. (1998): Strategies for detection of recombination in virus infected plants expressing a viral transgene. 5th International Symposium The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Braunschweig, Germany 1998

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (1999): Monitoring the movement of RNA viruses in plant tissue: the role of Tomato aspermy cucumovirus (TAV, Bromoviridae) coat protein in cell-to-cell movement. 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, August 29-September 1, 1999.

Salamon P., Salánki K. és Szilassy D. (2000): Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus) spontán előfordulása ricinuson (*Ricinus communis* L.) és farkasbogyón (*Scopolia carniolica* Jacq.). 46. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2000. február 22-23.

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (2000): Different expression level of green fluorescein protein (GFP) variants in several *Nicotiana* species. EMBO workshop „ Plant virus invasion and host defence” Kolymbari, Crete, Greece, May 28- June 1, 2000.

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K., Balázs E.(2000): Studying the use of green fluorescent protein (GFP) variants in plant systems. 6th International Congress of Plant Molecular Biology, Quebec, Canada, June 18-24.

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K. és Balázs E. (2000): A zöld fluoreszcens fehérje (GFP) - kék fluoreszcens fehérje (BFP) kettős jelölési rendszer optimalizálása növényekben. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2000. augusztus 24.-26.

Salamon P. és Salánki K. (2000): Az uborka mozaik vírus (CMV, Cucumber mosaic virus) és a tarlórépa mozaik vírus (TuMV, Turnip mosaic virus) előfordulása retken (*Raphanus sativus* L.). „Lippay János - Vas Károly” Tudományos Ülésszak, Budapest, 2000. november 6-7.

Salamon Pál, Gajdos Lajos, Varró P, Kiss László és Salánki Katalin. (2005): Uborka mozaik vírus (CMV, *cucumber mosaic virus*) rezisztencia paprika (*Capsicum annum* L.) genotípusokban: a rezisztencia jellege és beépítése új paprika vonalakba. 10. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum, Debrecen, 2005. október 18-20.

Salamon Pál, Gajdos Lajos, Balogh P, Solymoss E, Varró P, Milotay P, Kiss László és Salánki Katalin (2005): Virulens uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) törzs izolálása bogyoelhalás tünetet mutató paradicsomból (*Lycopersicon esculentum* MILL.) Lippay János Tudományos Ülésszak, Budapest, 2005. október 20-21.

Kiss László, Salánki Katalin, Csilléry Gábor és Palkovics László (2007): A Paprika enyhe tarkulás vírus (Pepper mild mottle virus, PMMoV L3 rezisztenciát áttörő patotípusának megjelenése Magyarországon, a kórokozó molekuláris jellemzése. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2007 február 20-21.

Tóbiás István, Szabó Béla, Salánki Katalin, Sári László, Hubert Kulhmann és Palkovics László (2008): A héj nélküli tök (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) magjával terjedő vírusok azonosítása. 54. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2008 február 27-28

Nemes Katalin, Kiss László, Csilléry Gábor és Salánki Katalin (2008): Paprikát fertőző vírusok kimutatása multiplex-PCR technikával. 54. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2008 február 27-28.

Tóbiás I., Kiss B., Pájtó É., Tholt G. és Salánki K. (2009): A búza törpülés vírus (*Wheat dwarf virus*) árpáról izolált törzseinek jellemzése és átviteli kísérletek. 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2009 február 23-24.

Salamon P., Nemes K. és Salánki K. (2009): Paradicsom foltos hervadás vírus (Tomato spotted wilt virus, TSWV) a borsó (*Pisum sativum* L.) új kórokozója Magyarországon. „Lippay János - Ormos Imre - Vas Károly” Tudományos Ülésszak, Budapest, 2009. október 28-30.

Salamon P., Nemes K. és Salánki K. (2010): Paradicsom foltos hervadás vírus (Tomato spotted wilt virus, TSWV) rezisztencia törő törzsének első izolálása paprikáról (*Capsicum annum* L.) Magyarországon. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2010. február 23-24.

Tóbiás István, Oleksij Shevchenko, Kiss Balázs, Andrij Bysov, Salánki Katalin, Nonka Bakardjieva, Tholt Gergely és Palkovics László (2011): A búza törpülés vírus (Wheat dwarf virus) variabilitása Európában. 57. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február 21-22. p26.

Nemes Katalin és Salánki Katalin (2011): Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) replikáz fehérje karboxi-terminális vége nem szükséges a vírusfertőzéshez. 57. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február 21-22. p74.

Kádár Katalin, Divéki Zoltán, Gellért Ákos, Salánki Katalin és Balázs Ervin (2011): Olajtökről izolált uborka mozaik vírus (CMV) jellemzése. 57. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február 21-22. p29.

Nemes Katalin, Gellért Ákos, Balázs Ervin és Salánki Katalin (2011): Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) 2b fehérjéjének funkcionális analízise. 57. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február 21-22. p30.

Katalin Nemes, Ákos Gellért, Ervin Balázs and Katalin Salánki (2011): Functional analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. APS-IPPC Joint Meeting, Honolulu, Hawaii, U.S.A. August 6 - 10.