

## A GFP RIPORTERGÉN ALKALMAZÁSA A CUCUMOVÍRUSOK MOZGÁSÁNAK TANULMÁNYOZÁSÁBAN

Divéki Zoltán, Szilassy Dénes, Salánki Katalin és Balázs Ervin  
 Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, 2101 Gödöllő, Pf. 411  
 E-mail: divekiz@abc.hu

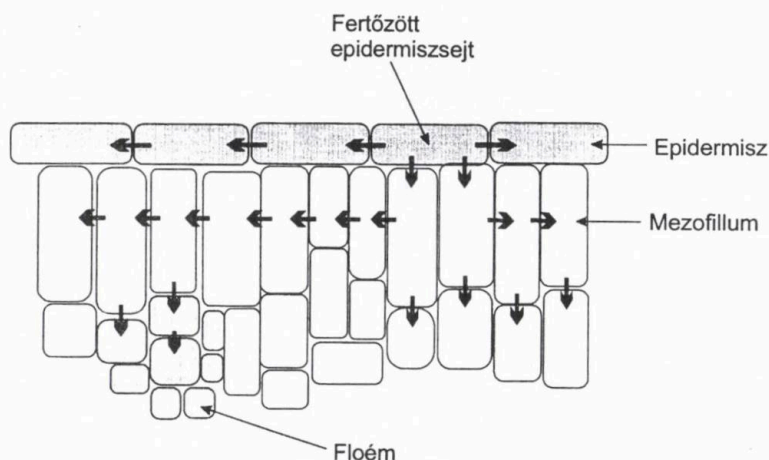
A növényi vírusok patogenezisének fontos lépése azok átjutása a szomszédos sejtekbe. Ez a sejteket összekötő plazmodezmákon keresztül valósul meg. A vírusok mozgását elsődlegesen az úgynevezett mozgási fehérjék („movement protein”, MP) teszik lehetővé, de más vírusfehérjék – például a köpenyfehérje – is szerepet játszanak a folyamatban. A paradicsom magtalanság vírus (tomato aspermy cucumovirus, TAV) osztott genomja három részből áll, a köpenyfehérje gén a 3-as RNS-en található. A TAV növénybeli mozgásának vizsgálatához olyan rekombináns vírusokat hoztunk létre, melyek a gfp riportergént tartalmazták. A gént hordozó vírusok mozgását a növényi szövetben fluoreszcens mikroszkópi technikák alkalmazásával követtük nyomon. Eredményeink szerint a TAV köpenyfehérjéje feltétlenül szükséges a vírus lokális mozgásához, és ezt a képességét fúziós fehérje formájában is részben megtartja. Ismereteink szerint ez az első olyan GFP-t termelő cucumovírus klón, mely részlegesen megőrizte a rövid távú mozgásképességét.

A vírusok mozgása a növények fertőzése során két jól elkülöníthető fázisra bontható (összefoglalókat l. Maule 1991; Lucas és Gilbertson 1994; Carrington és mtsai 1996; Mezzitt és Lucas 1996; Gilbertson és Lucas 1996; Santa-Cruz 1999). Az első fázisban a kórokozó az iniciálisan fertőzött epidermiszsejtől a plazmodezmákon keresztül a szomszédos epidermiszsejtekbe, illetve a mezofillumsejtekbe, innen pedig a vaszkuláris rendszerbe jut (1. ábra). Ezt a fázist, melynek utolsó lépése a vírus háncsrostsejtekbe jutása, **lokális mozgásnak** nevezik. A második fázis a vírus transzlokációja a floémbe, melyet **hosszú távú mozgásnak** neveznek. Újabb bizonyítékok azt támasztják alá, hogy a szállítószövet rendszer nyálábhüvely- és floéparenchima-sejtjeit összekötő plazmodezmák lényegesen különböznek a mezofillumban, illetve az epidermiszben találhatóktól, így a vírusok eltérő mechanizmussal juthatnak át rajtuk (Ding és mtsai 1992; Wintermantel és mtsai 1997).

A növények vírusokkal szembeni extrém ellenálló képessége sokszor nem a replikáció szintjén valósul meg, hanem annak köszönhető, hogy a vírus nem képes terjedni a növényben. A cucumovírusok körében is több esetben leírtak olyan immunitást, mely a vírus mozgásának blokkolásán keresztül valósul meg. Példaként említhető az uborkanövények paradicsom magtalanság vírussal (tomato aspermy cucumovirus – TAV) szembeni immunitása, ahol zavartalan vírusreplikáció mellett gátolt a TAV lokális mozgása (Salánki és mtsai 1997), valamint paprikavonalak uborka mozaik vírussal (cucumber mosaic cucumovirus – CMV) szembeni rezisztenciája, melynek háttérében a vírus hosszú távú mozgásának sérültsége áll (Dufuor és mtsai 1989).

A növényi vírusok terjedését a gazdanövényben speciális fehérjék segítik. E fehérjéket elsődleges funkciójukra utalva mozgási fehérjéknek (movement protein – MP\*) nevezik. Az MP-ken kívül ugyanakkor gyakran a vírus

\*A genetikában használt konvenció értelmében a géntermékek nevét nagybetűvel, a gének nevét dőlt kisbetűvel szedjük.



1. ábra. A vírusok mozgása a fertőzött levélben. A nyilak a plazmodezmákon áthaladó vírusokat jelölik

köpenyfehérjéje (coat protein – CP), és/vagy számos más vírusfehérje is szerepet játszik ebben a folyamatban.

A CMV MP-je a vírus 3. RNS-én lokalizált *3a* gén terméke; a vírus hosszú távú mozgásában játszott szerepét intenzíven vizsgálták. Az MP az epidermiszsejtek plazmodezmáinak átmérőjét növeli, ez azonban önmagában mégsem elegendő ahhoz, hogy a replikálódó vírus RNS-ei átjuthassanak rajtuk (Canto és mtsai 1997).

Bár a cucumovírusok lokális terjedéséhez a köpenyfehérje jelenléte is szükséges (Suzuki és mtsai 1991, Canto és mtsai 1997), a vírus nem virion formában jut át a szomszédos sejtekbe. Ezt támasztják alá Kaplan és mtsai (1998) vizsgálatai, ahol olyan CMV köpenyfehérje deléciós mutánsok is lokális terjedést mutattak, melyek nem tudtak virionná összeépülni. Blackman és mtsai (1998) virion specifikus antitestek felhasználásával ultravékony metszeteken CMV partikulumukat csak a sejtek citoplazmáiban tudtak kimutatni, a plazmodezmákban nem.

A növényi vírusok rövid távú mozgását egyszerűbb vizsgálni, mint a szállítószövetben végbemenő hosszú távú transzlokációt, így ez utóbbi folyamatról kevesebb adat áll rendelkezésünkre. A köpenyfehérje jelenléte ebben a fá-

zisban a legtöbb vírus esetében – így a CMV esetében is – elengedhetetlen. Blackman és mtsai (1998) ugyanakor az MP felhalmozódását írták le a rostasejtekben. Az általuk felállított modell szerint a CMV a vírus RNS, a köpenyfehérje és az MP által alkotott nukleoprotein komplex (vNP) formájában lép a kísérősejtekből a rostasejtekbe. E plazmodezmák belső oldalán a rostasejt retikulum membránjaihoz kötötten jönnek létre a vírus összeépülés helyei, ahol az

MP leválik a komplexről, és végbemegy az encapsidáció. Az összeépült virionok pedig a floémáramba kerülnek. Ez a modell lényegében egyezik a Gilbertson és Lucas (1996) által javasolttal, mely szerint a köpenyfehérje nem a rostasejtekben transzplódiódik, hanem vNP komplexként érkezik a rostasejtekbe. A vírus floém-beli transzportja minden bizonnyal passzív folyamat, ekkor vírusreplikáció sem történik (Hellwald és Palukaitis 1995).

A vírusok növényen belüli mozgásának vizsgálatában új tavlatokat nyitott a zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein – GFP) alkalmazása (Oparka és mtsai 1996). A GFP génjét eredetileg az *Aequorea victoria* medúzából izolálták, és mára a legkülönfélébb molekuláris biológiai rendszerekben sikerrel szerepel riportergénként (Prasher 1995). Ez a fehérje közeli UV gerjesztés hatására zöld fényt emittál. Más riportergénekkal szemben a GFP rendkívüli előnyei, hogy kisméretű (27 kD), stabil, fluoreszkáló képességét fúziós fehérjeként is megtartja, a növényi sejtekre nem toxikus, továbbá kimutatása nem teszi szükségessé a vizsgált szövet elroncsolását. Sejten belüli lokalizációja egyszerű UV megvilágítással *in vivo* is nyomon követhető.

Laboratóriumunkban célul tűztük ki a TAV rövid távú mozgásának tanulmányozását. Eh-

hez a GFP riporterfehérje nyom követésére alkalmas epifluoreszcens mikroszkópos kísérleti technikát építettük ki. Jelen dolgozatunkban e rendszer alkalmazásáról számolunk be azokban a kísérletekben, melyekben a TAV köpenyfehérjének a vírus sejtről sejtre történő mozgásában betöltött szerepét vizsgáltuk.

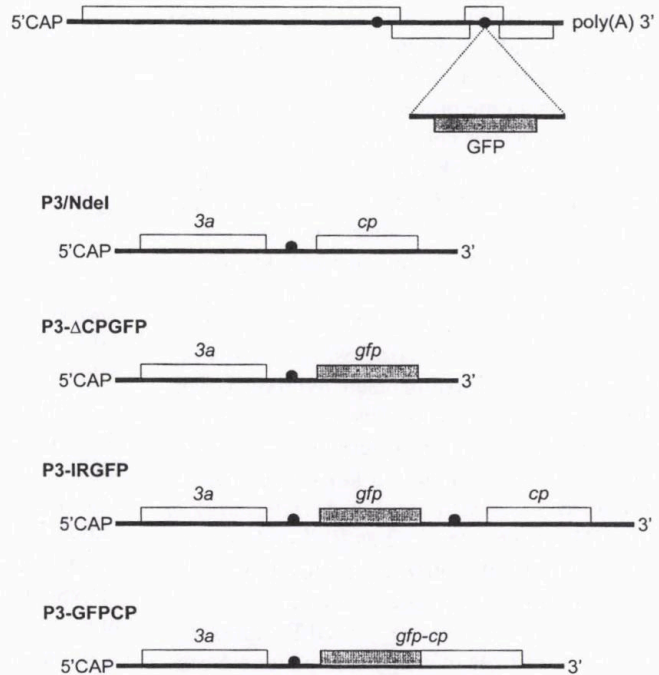
## Anyag és módszer

### Fertőzőképes transzkriptumok, a *gfp* gént tartalmazó vírus-konstrukciók

A rekombináns klónokat standard módszerekkel készítettük (Sambrook és mtsai 1989), szerkezetüket a 2. ábrán tüntettük fel. A **P3-IRGFP** elkészítéséhez a P-TAV korábban előállított P3/NdeI cDNS klónjának (Salánki és mtsai 1994) 930nt pozíciójába egy EcoRV hasítóhelyet építettünk MutaGene Phagemid *in vitro* Mutagenesis Kit (BioRad) segítségével. A keletkezett klón (M6) ScaI/NdeI szakaszát, mely közvetlenül a köpenyfehérje (*cp*) gén kezdetétől (1225nt) tartalmazza a P3 3' felét, a GFP TU#65-as klónjának AgeI helyére illesztettük tompa véggel. Az így keletkezett klónt EcoRV és EcoRI enzimekkel emésztettük, és az M6-os klón EcoRV helyére illesztettük, mely a P3-IRGFP-t eredményezte. A **P3-ΔCPGFP** készítésekor a P3 NdeI-SphI szakaszát a GFP TU#65 KpnI-EcoRI szakaszára cseréltük fel. A **P3-GFPCP** konstrukciót úgy készítettük, hogy a GFP TU#65 KpnI-BsmI szakaszát a P3-as klón XbaI helyére illesztettük. A rekombináns klónokról az *in vitro* transzkripció T7 RNS polimeráz (Promega) enzimmal végeztük, a gyártó előírásait követve.

A Trk7-CMV törzs 1-es és 2-es RNS-nek megfelelő cDNS klónokról szintetizált RNS transzkriptumokat (Szilassy és mtsai 1999)

### PVX-GFP (Baulcombe munkacsoport)



2. ábra. A *gfp* gént tartalmazó rekombináns TAV 3. RNS klónok szerkezete. A géneket keretekkel jelöltük

összekevertük a P-TAV 3-as RNS-nek megfelelő, a *gfp* gént is hordozó cDNS klónok transzkriptumaival. Kísérleteinkben a tesztnövényeket (*Chenopodium quinoa* Wild, *Nicotiana glauca* Gray) ezzel az RNS eleggyel fertőztük.

### A GFP fluoreszcencia detektálása

A *Ch. quinoa* fertőzött leveleit MRC 1000 konfokális lézer scanning mikroszkóppal (BioRad) vizsgáltuk, 488 nm gerjesztési és 522 nm emissziós hullámhosszon. A többi felvétel BH2-RFL UV lámpa feltéttel felszerelt IMT-2 típusú inverz mikroszkóppal (Olympus) készült IF490 illetve BG12 gerjesztési, valamint Y455, illetve O590 „barrier” szűrőket alkalmazva. PM-10ADS fotó feltétet és C35AD4 kamerát továbbá Fujichrome 200-as filmet használtunk a fényképek elkészítéséhez.

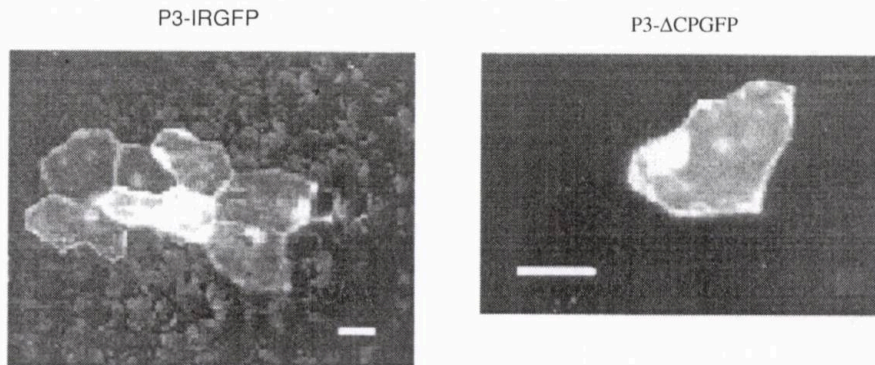
## Eredmények és megvitatásuk

A TAV növénybeli mozgásának vizsgálatához olyan rekombináns vírusokat hoztunk létre, melyek a *gfp* riportergént tartalmazták. A **P3-IRGFP** tricisztronikus klón. A *gfp* gén elé a szubgenomi promotert tartalmazó intercisztronikus régiót helyeztük, majd ezt a blokkot a *3a* és a *cp* gének közé illesztettük. A *cp* leolvasási keret a klón 3' végén maradt, mivel korábbi közleményekből ismert volt, hogy a 3' vég felőli gén erősebben fejeződik ki, mint a középső helyzetű gén (Boccard és Baulcombe 1993). A klónban tehát a TAV génei intaktak maradtak, míg a GFP termelésével a vírus helye és mozgása folyamatosan nyomon követhetővé vált a fertőzött növény szöveteiben. A **P3-ΔCPGFP** a *gfp* riportergént a *cp* gén helyén tartalmazta. A fenti két konstrukcióról készült RNS transzkriptumokat összekevertük a Trk7-CMV törzs 1-es és 2-es RNS-nek megfelelő cDNS klónok transzkriptumaival, és azokkal *Ch. quinoa* növényeket fertőztünk.

A 3. ábrán látható, hogy a GFP expresszió 5 nappal a fertőzés után egyik konstrukció esetében sem terjedt túl a levelek egy-kétsejtes régióján. A P3-IRGFP lokális léziókat okozott a gazdanövényen. A léziók szövetnedvével továbbfertőzve *N. cleavelandii* és *N. benthamiana* növényekre, azokon zöld mozaikfoltosodás tünetek alakultak ki (nincs bemutatva), GFP expresszió azonban nem volt kimutatható. Azt a következtetést vontuk le, hogy a P3-IRGFP a fertőzést követően igen gyorsan elvesztette a *gfp* gént vagy annak egy részét. A P3-IRGFP

klónnal szemben a P3-ΔCPGFP konstrukció nem okozott léziókat a *Ch. quinoa* gazdán. A léziók elmaradása a *cp* gént nem tartalmazó kimérával fertőzött tesztnövényeken pedig arra utal, hogy a vírus az elsődlegesen fertőzött epidermiszsejtekből nem volt képes kijutni. Ez a köpenyfehérje jelenlétének szükségességét valószínűsíti a TAV sejtről sejtre történő terjedéséhez, ami összhangban van a CMV-n végzett megfigyelésekkel (Canto és mtsai 1997).

Azért, hogy tovább vizsgáljuk a TAV köpenyfehérjének a vírus mozgásában betöltött szerepét, elkészítettük a köpenyfehérje és a GFP fúziós konstrukcióit. A továbbiakban a GFP fluoreszcenciáját epifluoreszcens mikroszkóppal követtük nyomon a növényi szövetben. A mikroszkópos detektálás optimalásához GFP-t expresszáló PVX-et (potato X potexvirus) használtunk pozitív kontrollként, melyet David Baulcombe (Sainsbury Laboratory Norwich, UK) bocsátott rendelkezésünkre. A vírus cDNS-ről készült *in vitro* RNS transzkriptummal *N. cleavelandii* növényeket fertőztünk. A 4. ábrán mutatjuk be a GFP-specifikus fluoreszcencia detektálását két eltérő szűrőpár alkalmazásával. Megfigyelhető, hogy az 590 nm-nél nagyobb hullámhossztartományban átteresztő O590-es „barrier” szűrő alkalmazása esetén a GFP fluoreszcenciája már nem látható, az apoptotikus sejtek autofluoreszcenciája azonban világosan kivehető. Ezzel a szűrőkombinációval tehát biztosan el tudtuk különíteni a GFP fluoreszcenciáját a sérült, nekrotizálódó sejtek autofluoreszcenciájától.



3. ábra. GFP kifejeződés a P3-IRGFP és a P3-ΔCPGFP vírusokkal (vö. 2. ábra) fertőzött *Ch. quinoa* tesztnövényen. A fehér vonal 10  $\mu$ m-nek felel meg

A P3- $\Delta$ CPGFP konstrukció a *N. clevelandii* növényeken sem volt képes a sejtről sejtre történő mozgásra (5A. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy ezen a gazdanövényen is szükség van a köpenyfehérjére a vírus rövid távú mozgásához.

A GFP-t a köpenyfehérje N-terminális fúziós partnereként hordozó, P3-GFPCP elnevezésű konstrukció (2. ábra) korlátozott mértékű mozgását figyeltük meg a *N. clevelandii* epidermiszsejtjei között. A fertőzés után 5 nappal a levélben 3–4 sejt, erős GFP-fluoreszcenciát mutató sejtcsoportokat regisztráltunk (5B. ábra). A P3-GFPCP rekombináns vírus tehát csak részlegesen őrizte meg a rövid távú mozgásképességét. Azonos idő alatt a vad típusú vírus szinte teljesen elterjed a fertőzött levélben.

Eredményeink teljesen összevethetők Canto és mtsai (1997) által a CMV-n megfigyeltekkel. A CMV 3-as RNS-ének *cp* génjének helyén *gfp* gént hordozó konstrukcióval fertőzött *N. clevelandii* növényekben a GFP expresszió szintén csak egyedülálló sejtekre korlátozódott, a vírus az inokulált levélben nem volt kimutatható. A köpenyfehérje szükségességét a CMV sejtről sejtre történő mozgásához deléciós mutások segítségével igazolták (Suzuki és mtsai 1991; Canto és mtsai 1997). Elgondolkodtató azonban, hogy Ding és mtsai (1995) mikroinjektációs vizsgálatai szerint az MP önmagában is képes a fluoreszcensen jelölt CMV RNS-ek szomszédos sejtekbe juttatására. Ezt a látszólagos ellentmondást Ryabov és mtsai (1999) kétféleképpen látják feloldhatónak: (i) A replikálódó CMV a növényi sejtben esetleg valamilyen védekező reakciót indukál, amely meggátolja a vírus mozgását. A köpenyfehérje ezt a mechanizmust gátolja. Mikroinjektációs kísérletekben az említett védekező mechanizmus feltehetően nem indukálódik. (ii) A CMV köpenyfehérje az MP dajkafehérjeként („chaperon”) is funkcionál, ezáltal nélkülözhetetlen a vírusmozgásban. A mikroinjektációs vizsgálatokban az MP molekuláknak spontán is kialakulhat az aktív konformációval rendelkező alpopulációjuk. Az elmélet alapján hasonlóképpen értelmezhető az a megfigyelés is, hogy a CMV és a TAV 3. RNS-ének *3a* és *cp* génei közötti szimmetrikus kimerák eltérő módon vi-

selkedtek dohánynövényben (Salánki és mtsai 1997). A dohányt mindkét vírus hatékonyan fertőzi. Amikor azonban rekombinánsokkal fertőzték a növényeket, azt tapasztalták, hogy a CMV *3a* és a TAV *cp* gént hordozó konstrukció elterjedt az egész növényben, a TAV *3a* és a CMV *cp* gént tartalmazó vírus viszont elvesztette a sejtről sejtre történő terjedés képességét. A megfigyelt jelenség a két genomi régió (minden bizonnyal a fehérjetermékek) közötti kölcsönhatást valószínűsíti.

A P3-IRGFP konstrukciókkal analóg rekombináns CMV szintén rendkívül gyorsan elvesztette a *gfp* gént (Canto és mtsai 1997). A P3-IRGFP konstrukcióban minden bizonnyal homológ rekombináció ment végbe, feltételezhetően a megduplázott intercisztronikus régió hibridizációján keresztül.

A CMV-ben a GFP-t natív fehérjeként, illetve az MP fúziós partnereként kifejezve csupán egysejtes fluoreszcenciát lehetett megfigyelni (Canto és mtsai 1997). Ismereteink szerint a P3-GFPCP az első olyan GFP-t termelő cucumovírus klón, mely részlegesen megőrizte a rövid távú mozgásképességét.

## IRODALOM

- Blackman, L.M., Boevink, P., Santa Cruz, S., Palukaitis P. and Oparka, K.J.** (1998): The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana clevelandii*. *Plant Cell*, 10: 525–537.
- Boccard, F. and Baulcombe, D.** (1993): Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology*, 193: 563–578.
- Canto, T., Prior, D.A.M., Hellwald, K.-H., Oparka, K.J. and Palukaitis P.** (1997): Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology*, 237: 237–248.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. and Schaad M.C.** (1996): Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell*, 8: 1669–1681.
- Ding, B., Haudenschild, J.S., Hull, R.J., Wolf, S., Beachy, R.N. and Lucas, W.J.** (1992): Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, 4: 915–928.

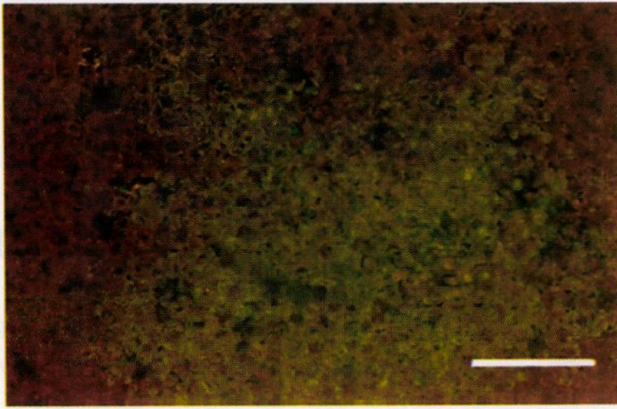
- Ding, B., Li, Q., Nguyen, L., Palukaitis, P. and Lucas, W.J. (1995): Cucumber mosaic virus 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology*, 207: 345–353.
- Dufour, O. et al. (1989): The distribution of cucumber mosaic virus in resistant and susceptible plants of pepper. *Can. J. Bot.*, 67: 655–660.
- Gilbertson, R.L. and Lucas, W.J. (1996): How do viruses traffic on the 'vascular highway'? *Trends Plant Sci.* 1: 260–268.
- Hellwald, K.H. and Palukaitis, P. (1995): Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against cucumber mosaic virus. *Cell*, 83: 937–946.
- Kaplan, I.B., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1998): Characterization of cucumber mosaic virus. V. Cell-to-cell movement requires capsid protein but not virions. *Virology*, 246: 221–231.
- Lucas, W.L. and Gilbertson, R.L. (1994): Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32: 387–411.
- Maule, A.J. (1991): Virus movement in infected plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9:457–473
- Mezitt, L.A. and Lucas, W.J. (1996): Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. *Plant Mol Biol.* 32: 251–273.
- Oparka, K.J., Boevink, P. and Santa-Cruz, S. (1996): Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends Plant Sci* 1:412–418.
- Prasher, D.C. (1995): Using GFP to see the light. *TIG*, 11: 320–329.
- Ryabov, E.V., Roberts, I.M., Palukaitis, P. and 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989): In: *Molecular Cloning*. Ford N., Nolan C., Ferguson M. (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Salánki, K., Balázs, E. és Burgván, J. (1994): Nucleotide sequence and infectious in vitro transcripts of RNA 3 of tomato aspermy virus pepper isolate. *Virus Res.* 33: 281–289.
- Salánki, K., Carrère, I., Jacquemond, M., Balázs, E. and Tepfer, M. (1997): Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus. *J Virol*, 71: 3597–3602.
- Santa-Cruz, S. (1999): Perspective: phloem transport of viruses and macromolecules – what goes in must come out. *Trends Microbiol.* 7: 237–241.
- Szilassy, D., Salánki, K. and Balázs, E. (1999): Stunting induced by cucumber mosaic cucumovirus-infected *Nicotiana glutinosa* is determined by a single amino acid residue in the coat protein. *Mol Plant Microbe Interact.* 12: 1105–1113.
- Suzuki, M., Kuwata, S., Kataoka, J., Masuta, C., Nitta, N. and Takanami, Y. (1991): Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA3 using an in vitro transcription system. *Virology*, 183: 106–113.
- Wintermantel, W.M., Banerjee, N., Oliver, J.C., Paolillo, D.J. and Zaitlin, M. (1997): Cucumber mosaic virus is restricted from entering minor veins in transgenic tobacco exhibiting replicase-mediated resistance. *Virology*, 231: 248–257.

## THE USE OF THE GFP REPORTER GENE IN STUDYING CUCUMOVIRUS MOVEMENT

Z. Divéki, D. Szilassy, Katalin Salánki and E. Balázs  
Agricultural Biotechnology Center, H-2101 Gödöllő, POB. 411, HUNGARY  
e-mail: divekiz@abc.hu

Both cell-to-cell and long distance movement are crucial functions in the pathogenesis of plant viruses. In cell-to-cell movement, viruses use plasmodesmata connecting neighboring cells. This movement is primarily facilitated by virus-encoded movement proteins, although other gene products (e.g. coat proteins) and host factors are involved in this process. Tomato aspermy cucumovirus (TAV, *Bromoviridae*) has a tripartite RNA genome; the gene coding for the coat protein (CP) is located on RNA3 segment. We constructed several recombinant clones using the *gfp* reporter gene, including a fusion protein with the TAV CP. Plants were coinoculated with *in vitro* transcripts of cucumber mosaic cucumovirus (CMV, *Bromoviridae*) RNA1 and RNA2 cDNA clones and the TAV RNA3 constructs. Virus movement was monitored by confocal and epifluorescence microscopy *in vivo*. Our results revealed that the CP is essential for the cell-to-cell movement of TAV, and the GFP-fused CP partly retained its ability to promote virus movement in the examined host-virus system.

Érkezett: 2000. február 12.

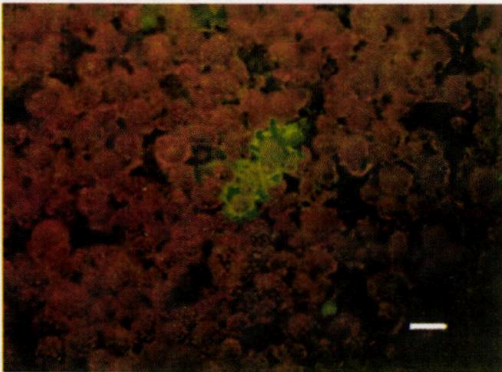
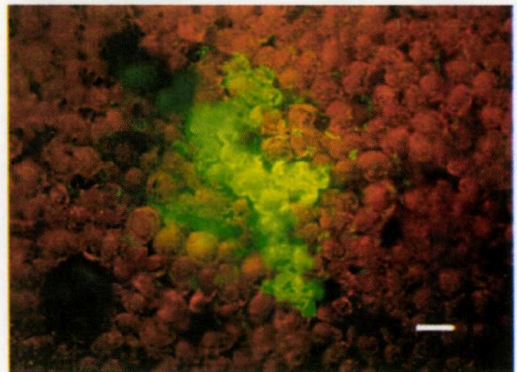
**A**

4. ábra. A GFP kifejeződés és a nekrotizáló sejtek autofluoreszcenciájának elkülönítése az inokulált levélben. *N. clevelandii* növényeket fertőztünk PVX-GFP vírussal (l. 2. ábra).

A) A vírus elterjedése 5 nappal a fertőzés után (zöld fluoreszcencia). A fehér vonal 100  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.

B) GFP-t kifejező és nekrotizáló sejteket tartalmazó régió Y455, illetve O590 „barrier” szűrő alkalmazásával.

A fehér vonal 10  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.

**B****Y455****O590****A****B**

5. ábra. GFP-t kifejező TAV konstrukciókkal fertőzött *N. clevelandii* növények levelei. A fehér vonal 10  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.

(A) Fertőzés P3- $\Delta$ CPGFP kimerával. (B) Fertőzés P3-GFPCP kimerával.