

JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

SZIMULTÁN FERTŐZÖTT PROTOPLASZT RENDSZER ALKALMAZÁSA VIRUS-
INHIBITOROK TANULMÁNYOZÁSÁRA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

KÉSZITETTE:
BARTA ANNA

SZEGED
1980

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1 Mennyivel nyújtott többet a növényi proto- plaszt rendszer a virus-gazda kapcsolat vizs- gálatakor mint az intakt levél rendszer?....	9
2.2 A protoplaszt izolálási folyamat és az ere- deti módszer módosításai	14
2.3 Az izolált protoplasztok virussal történő fertőzése	16
2.4 A protoplaszt fertőzés hatásfokát befolyá- soló tényezők	18
2.5 A vírusok bejutása a protoplasztokba	20
2.6 A protoplasztokban lejátszódó vírusrepliká- ció	21
2.7 A 2-tiouracil, mint virus szaporodásgátló ve- gyület hatásának vizsgálata levél rendszer - ben	25
3. Anyagok és módszerek	
3.1 Nicotiana tabacum cv. Xanthi	30
3.2 Protoplaszt izolálás	30
3.3 Az izolált protoplasztok fertőzése dohány- mozaik virussal	32
3.4 A protoplasztok inkubálása	33
3.5 ^{32}P jelölés	33
3.6 A protoplasztok által felvett ^{32}P mennyisé- gének meghatározása	33
3.7 A nukleinsavakba beépült ^{32}P mennyiségének meghatározása	34
3.8 Fenol-krezolos nukleinsav kivonás	35
3.9 Poliakrilamid gélelektroforézis	35



3.10 A gélek szeletelése és a szeletek radio- aktivitásának mérése	36
3.11 Viruskivonás protoplasztokból	37
3.12 A kivont vírusminta vizsgálata cukorgradiens centrifugálással	37
3.13 A kivont vírusminta biológiai tesztje	38
3.14 A protoplasztok fertőzőttégi százalékanak megállapítása fluoreszcens festéssel	39
3.15 Virus koncentráció mérés szerológiai módszer- rel	41
3.16 Az enzimhez kapcsolt antitest szerológiai módszerrel összefüggő eljárások	44
4. Eredmények és következtetések	
4.1 A 2-tiouracil hatása a dohánymozaik virus /DMV/ szaporodására	48
4.1.1 A 2-tiouracil hatása a DMV-RNS szinté- zisre	48
4.1.2 A 2-tiouracil hatása a virusképződésre ..	54
4.1.3 A 2-tiouracil hatása a vírusok infekti- vitására	61
4.2 A 2-tiouracil hatása a vírusok terjedésére ...	62
5. Összefoglalás	78
6. Irodalom	80

1. BEVEZETÉS

A 2-tiouracilról, mint nukleinsav bázisanalógról régóta ismert, hogy erőteljesen gátolja a vírusok szaporodását, viszont a hatásmódja még nem ismert. A hatásmechanizmusát eddig főleg vírusfertőzött levél rendszeren vizsgálták, amely rendszerben a vírusok szaporodnak, de ezzel egyidőben terjednek is, ezért a kapott eredményekből nem lehet választ kapni arra, hogy a 2-tiouracil a vírusok szaporodását vagy terjedésüket, esetleg mindkettőt gátolja-e.

Ha meg akarjuk ismerni ennek a virusinhibitornak a hatásmódját, akkor olyan rendszert kell választanunk, amelyben ezt a két folyamatot, a virusszaporodást és terjedést, szét lehet választani.

Ebből kiindulva jutottunk arra a következtetésre, hogy céljainknak a virussal szimultán fertőzött protoplaszt rendszer felel meg legjobban. Ezen rendszer felhasználásával tanulmányozni lehet a vírusok egy-lépéses szaporodási folyamatát, s ezzel bármilyen virusinhibitor - esetünkben 2-tiouracil - virusszaporodásra gyakorolt hatását is.

Az így kapott eredményekből következtetést lehet levonni a vírusfertőzött levélben lejátszódó folyamatokra: nevezetesen - hogyan hat a 2-tiouracil a vírusok szaporodására az elsődlegesen fertőzött sejtekben.

Kísérleteim során először ezt a kísérleti módszert sajátítottam el és valósítottam meg - hazánkban elsőként.

A jól használható módszer segítségével a továbbiakban vizsgáltam a 2-tiouracil hatását:

- a dohánymozaik virus-RNS szintézisre,
- a vírusok képződésére,
- a képződött vírusok infektivitására,
- levél rendszerrel kombinálva - a vírusok terjedésére és
- összehasonlítottam a 2-tiouracilt tartalmazó és a normál dohánymozaik virus stabilitását.

A munkám során felhasznált módszerek - a protoplaszt izolálás, a kapott protoplasztok virussal történő in vitro fertőzése, az izotópos jelölés, a nukleinsav kivonás, a gélelektroforézis, a jelölt nukleinsavakat tartalmazó gélek szeletelése és a szeletek radioaktivitásának mérése, a protoplasztokból történő viruskivonás és tisztítás, a kivont virus infektivitásának tesztje, a fluoreszcens festés, a virusfertőzött protoplasztok virus koncentrációjának mérése szerológiai módszerrel, a cukorgradiens centrifugálás - segítségével kapott adatok azt mutatják, hogy a közismert virusinhibitor, a 2-tiouracil

a vírusok szaporodását az elsődlegesen fertőzött sejtekben - ellentétben az irodalmi adatokkal - nem gátolja.

A 2-tiouracil vírus-terjedést gátló hatása valószínűleg több folyamat együttes hatásaként jön létre.



2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A magasabbrendű növényekben lejátszódó vírus-szaporodás mechanizmusának megértéséhez alapvetően szükséges, hogy minél több ismeretünk legyen a növényt alkotó sejtek fertőzéséről. A növényi vírusfertőzés sejtszintű tanulmányozására azonban hosszú évekig nem állt a kutató rendelkezésére megfelelő kísérleti rendszer. A vírusfertőzött intakt növény, szerv vagy szövet rendszer vizsgálata nem vezet el a kívánt eredményhez, mivel ezekben a rendszerekben:

- az inokulum által kezdetben megfertőzött sejtek száma kevés,
- a vírusok szaporodása az egyes sejtekben nem szimultán folyamat és
- a vírusok nemcsak szaporodnak, hanem terjednek is ezekben a rendszerekben.

A modern bakteriális és állati virológiában már évtizedekkel ezelőtt létrehoztak olyan rendszert, amely segítségével a vírusok egy-lépéses szaporodási ciklusa nyomon követhető /17/.

A növényi virológia területén viszont csak a közelmúltban, az 1960-as évek végén dolgozták ki a növényi

vírusok egy-lépéses szaporodási folyamatának tanulmányozására alkalmas kísérleti rendszert /96/.

Nagyrészt ez indokolja, hogy a vírusfüggő RNS-ek és fehérjék szintézisével, a növényi vírusok szaporodásával, az ellenük hatásosnak vélt virusinhibitorok hatásmechanizmusával kapcsolatban meglehetősen kevés eredmény áll rendelkezésre.

Ahhoz, hogy ezen alapvető módszertani problémát növényi vírusok esetében is meg lehessen oldani, a kísérleti rendszernek két alapvető követelményt kell kielégítenie:

- a növényi sejtek nagy százalékban szimultán fertőzhetők legyenek és
- a rendszer elkülönült sejtekből álljon, hogy szekunder fertőződés lehetősége a minimumra csökkenjen.

Növényi kallusz-kulturák sem képesek ezeket az igényeket kielégíteni /38/.

Növényi sejt-kulturák esetében ezek a követelmények megvalósulnak ugyan, de a merev fal jelenléte miatt a sejtek fertőzése igen nehézkes és rendkívül kis hatásfoku /38, 50, 56/.

Mivel a növényi vírusok képtelenek áthatolni a merev sejtfalon, ezért a sejtek nagy hatásfoku vírus fertőzé-

séhez el kell távolítani a sejtfalakat, s az így kapott protoplaszt rendszer alkalmazása már teljes egészében kiküszöböli a fent leírt hátrányokat.

A növényi protoplasztok izolálására kétféle módszert lehet alkalmazni: az ősből, a sejtfalak mechanikai eltávolítása: a plazmolizált sejtekből mechanikai úton szabadítják ki a protoplasztokat. Ezzel a módszerrel csak nagyon kevés protoplaszt nyerhető, illetve a mezofil szövetből nem is kapunk protoplasztokat /12/. A megoldást az a felismerés jelentette, hogy a növényi sejtfalak könnyedén eltávolíthatók sejtfalbontó enzimek segítségével. A növényi protoplasztok gyors, enzimátikus izolálását elsőként Cocking /9/ valósította meg 1960-ban. Ezzel a módszerrel lényegesen nagyobb számban kaphatók protoplasztok a növény minden szövetéből és az izolált protoplasztok kevésbé sérültek. Szintén Cocking próbálkozott elsőként az izolált protoplasztok virussal történő szimultán fertőzésével /10/, majd a módszer fokozatosan tökéletesedett Aoki és Takebe /1/, Cocking és Pojnar /11/, Takebe és Otsuki /96/ és Mühlbach és mts.-i /57/ által, - csak a leglényegesebbeket felsorolva.

Az azóta eltelt időszakban egyre halmozódnak az információk a vírusfertőzés ultrastrukturájára /66/, a sejtekben lejátszódó vírusfüggő RNS-ek és fehérjék /88, 89, 90/ szintézisére vonatkozóan.

A dohány mezofil protoplasztok dohánymozaik vírus /DMV/-RNS-sel való szimultán fertőzésére Aoki és Takebe /1/ dolgozott ki módszert, amit Sarkar és mts.-i módosítottak /91/, amellyel sokkal nagyobb hatásfoku fertőzés érhető el. A közelmúltban, 1978-ban megvalósították a protoplasztok kis molekulású fertőző RNS-sel, viroiddal való sikeres fertőzését /57/, s ezzel megtörtént az első lépés a viroidok replikációjának megismerése felé is.

A növényi protoplaszt rendszer standard laboratóriumi eszközzé vált a növényi vírus kutatásban, mivel számos olyan előnyös tulajdonsággal rendelkezik, amelyek egyetlen egy korábbi rendszernél sem álltak a kutatók rendelkezésére. Melyek ezek? /99/

- a protoplasztok virussal szimultán fertőzhetők és ez szimultán vírus replikációt eredményez,
- a merev fal hiánya miatt a fertőzés hatásfoka nagy,
- a szekunder fertőződés kizárt: néhány széteső protoplasztból szabadulhat ki vírus a közegbe, de ezek képtelenek más protoplasztot megfertőzni a poli-L-ornitin hiánya miatt, ami elengedhetetlenül szükséges az eredményes vírusfertőzés létrehozásához,

- a kísérleti körülmények pontosan ellenőrizhetők.

A felsorolt előnyök miatt alkalmazható eredményesen a protoplaszt rendszer a vírus-gazda kapcsolat és a különböző virusinhibitorok hatásmechanizmusának megismerésére.

2.1. Mennyivel nyújtott többet a növényi protoplaszt rendszer a virus-gazda kapcsolat vizsgálatakor mint az intakt levél rendszer?

Közel 10 év telt el a magasabbrendű növényekből történő protoplaszt izolálási módszer kidolgozása óta. Az eltelt időszakban nagyon sokat változott, fejlődött ez a technika, emellett kidolgozták az izolált növényi protoplasztok virussal történő szimultán fertőzését. Ezen módszerek bevezetésével nagyszerű lehetőség nyílt a kutatók előtt a virusszaporodás, a virus-gazda kapcsolat, illetve a különböző virusinhibitorok hatásmechanizmusának a tanulmányozására. Az így adódott lehetőségek ellenére az elmúlt évtizedben nem sok új eredményt hozott a protoplaszt rendszer használata. Jórészt csak azokat a kísérleteket ismételték meg, amelyeket már levél rendszer felhasználásával elvégeztek. Elenyésző az olyan eredmények száma, amelyeket nem ismerhettek volna meg a kutatók ezen rendszer használata nélkül.

Melyek voltak ezek?

Nicotiana tabacum cv. Xanthi nc. protoplasztokban a dohánymozaik virus fertőzésre bekövetkező nekrotikus válasz hiánya /67/. Ennek a dohány fajtának a levelei hordoznak egy ugynevezett N-gént, amely hatására a levele-

ken nekrotikus léziók képződnek a vírus fertőzésre, a fertőzött sejtek elhalása következtében. Ugyanennek a dohány fajtának a leveleiből izolált protoplasztokban a vírus kitűnően szaporodik, maguk a protoplasztok is ugyanolyan mértékben életképesek mint a kontrol protoplasztok, amelyekből hiányzik az N-gén. Az a váratlan eredmény, hogy protoplaszt állapotban az N-gén nem működik, azt sugallja, hogy az N-gén működésének manifesztálódásához bizonyos típusu sejt-sejt kölcsönhatás szükséges. Ezt a magyarázatot alátámasztják azok az eredmények, amelyek azt mutatják, hogy a nekrotikus léziók képzése leveleken sem történik meg, ha a levelekben a sejt-sejt kapcsolatokat - tulajdonképpen a plazmodezmákat - szétroncsolják a szövet plazmolizálásával /32/. Az N-gén kifejeződésével kapcsolatos sejt-sejt kölcsönhatásra vonatkozóan az ismeretek még nagyon hiányosak.

A virussal teljesen telített dohánylevél sejtekben - protoplaszt izolálás után - újra elindul a vírus szintézis /20/. Ha *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi levelet dohánymozaik virussal fertőzünk, egy idő után az összes sejt telitődik utódvirussal és a virusszintézis leáll. Az ilyen dohány levelekben vannak ugynevezett "zöld szigetek", ahol kevés vírus van jelen. A virussal telített levél-szövetből izolált protoplasztokban viszont a vírus szaporodás újra elindul, és élénk vírus szintézis figyelhető

meg a "zöld szigetek" részről izolált protoplasztokban is. A kapott eredmények azt mutatják, hogy valamilyen szabályozó mechanizmus, ami működik szövetszinten és korlátozza a vírus-szaporodást, nem működik sejtszinten.

Bizonyos paradicsom növények dohánymozaik virussal szembeni rezisztencia génje protoplaszt állapotban nem működik. Az ezt a gént hordozó protoplasztok ugyanolyan mértékben fertőzhetők dohánymozaik virussal, mint az érzékeny paradicsom fajtákból származóak /55/. A protoplaszt rendszer felhasználásával lehetőség nyílt a vírusok gazdaspecifikusságának tanulmányozására is.

A dohánymozaik vírus termoszenzitiv mutánsa jól szaporodik protoplasztokban még azon a hőmérsékleten is, amelyen levélben már alig szaporodik /61/.

Az immunofluoreszcens technikával végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy ha a vírusfertőzött leveleket a nem megengedett hőmérsékleten tartják, a virusszaporodás az elsődlegesen fertőződött sejtekre korlátozódik, s ez azt mutatja, hogy a mutáció abban a vírusgénben van, amely a vírusok terjedését kontrolálja a levélszövetben.

Mivel a protoplaszt rendszer teljesen elkülönült, egymástól szeparált sejtekből áll, ez olyan rendszert ad, amely valóban a folyamatok sejt-szintjét reprezentálja. Ez teszi lehetővé, hogy tanulmányozzuk például két növényi vírus interakcióját.



A növények több mint egy virussal való fertőzöttsége nem ritka a természetben, de az esetek többségében nem világos, hogy a két különböző vírus ugyanazt a sejtet, vagy ugyanabban az időben két különböző sejtet fertőz-e. A protoplasztok immunofluoreszcens módszerrel való vizsgálata egyértelműen mutatja, hogy két rokon vírus fertőzheti ugyanazt a sejtet, és két távoli rokonságban álló vírus szaporodhat ugyanabban a sejtben /71/. Dohány protoplasztokat sikerült nagy hatásfokkal fertőzni két, közeli rokonságban álló dohánymozaik vírus törzsszel is /73/.

Ezek a kísérletek ellentmondanak annak a korábbi elképzelésnek, ami szerint egy sejtet csak egy vírus részecske fertőzhet. Ugyanannak a sejtnek kétféle virussal való szimultán fertőzése esetében az utódvirusok burokproteinje kevert fehérjékből áll /73/.

Az olyan protoplasztok fertőzése dohánymozaik virussal, amelyek korábban már egy rokon törzsszel fertőzöttek voltak, nem volt sikeres /70, 72/.

Ilyen és hasonló kísérletekkel közelebb lehet jutni a rokon vírusok okozta interferencia jelenség megértéséhez.

A közismert virusinhibitor, a 2-tiouracil nem gátolja a vírusok szaporodását az elsődlegesen virusfertőzött sejtekben /4/. Számos kutatócsoport levél rendszeren végzett kísérletek eredményeként azt kapta, hogy a 2-tioura-

cil erőteljesen gátolja a vírus-RNS szintézist és a virusképződést /13, 25, 27, 49/.

A protoplaszt rendszer felhasználásával kapott eredményeink azt mutatják, hogy a 2-tiouracil a vírusok RNS szintézisét és a virusképződést nem gátolja az elsődlegesen vírusfertőzött sejtekben.

A protoplasztoknak a növényi virológiában történő használhatóságával kapcsolatban felvetődik az a kérdés, hogy: lehet-e következtetéseket levonni a protoplaszt rendszeren végzett kísérletek eredményeiből a növényi sejtekben lejátszódó folyamatokra.

A protoplasztok a növényi sejtek szokatlan formái, amelyek természetes körülmények közt nem fordulnak elő. A növényi virológiában a protoplaszt rendszer alapvetően használatos a vírusfertőzés sejtszintű folyamatainak tanulmányozására azzal a megszorítással, hogy a virusszaporodás protoplasztokban is ugyanugy játszódik le, mint az intakt levél sejtjeiben. Ez a feltevés többé-kevésbé helyes, de vannak bizonyítékok arra vonatkozóan, hogy a protoplasztok anyagcseréje bizonyos szempontból különbözik a levél sejtjeiétől.

Egyrészt: az izolált dohány mezofil protoplasztokban jelentősen emelkedik az RN-áz szintézis /44/ és a protoplaszt izolálás során megváltozik a poliriboszómák mennyisége és

profilja /87/. Ezeknek a változásoknak egyrészét a protoplasztokat körülvevő hiperozmótikus közeg hatásának tekintik /44/.

Másrészt: az izolált növényi protoplasztok teljesen normálisnak tűnnek ultrastruktúra /97/ és anyagcsere szempontjából /88/.

Egyes megfigyelések szerint a protoplasztok anyagcseréjét befolyásolhatja a sejtfal hiánya is /43/.

Még további vizsgálatok szükségesek azonban, hogy pontosan jellemezni lehessen az izolált növényi protoplasztok anyagcseréjét.

2.2 A protoplaszt izolálási folyamat és az eredeti módszer módosításai

A magasabbrendű növények esetében a protoplaszt izolálás folyamatának két klasszikus módszerét dolgozták ki: a két-lépéses /95/ és az egy-lépéses /75/ izolálási folyamatot. A jelenleg legszélesebb körben alkalmazott protoplaszt készítési módszerek Takebe és mts.-i /95/ által kidolgozott enzimátikus eljárásokon alapulnak. Maga a protoplaszt izolálási folyamat két lépésre bontható:

- A felhasznált növényi szövet különálló sejtekre való szétbontása, általában a Rhizopus speciesek által

termelt pektináz /macerozim/ felhasználásával.

- Az izolált sejtek sejtfalának leemésztése a *Trichoderma viridae* által termelt cellulázzal.

Az eredeti két-lépéses izolálási folyamat módosításával létrehozták az egy-lépéses eljárást, amelyben a növényi szövetből a két enzim /pektináz és celluláz/ keverékével kezelve közvetlenül nyerhetők a protoplasztok /39,65,75,76/. Az egy-lépéses izolálási módszer sokkal egyszerűbb az előzőnél, de az így kapott protoplasztok heterogének, a szivacsos és a palisad parenchima sejtjeit is tartalmazzák. Mühlbach és mts.-i, az általuk kidolgozott módszerben /57/ a fokozatos plazmolizist alkalmazták protoplasztok nyerésére, s ezzel az eljárással nagyobb számú, stabilabb protoplasztok izolálhatók, mint a korábbiakkal.

Legelterjedtebben a dohány levelek mezofil szövetéből izolálnak protoplasztokat a vírusfertőzés és a virusszaporodás mechanizmusának tanulmányozásához. Ebből a szövetből könnyű nagy számú, ép protoplasztot nyerni, a kapott protoplasztok több vírussal eredményesen fertőzhetők és bennük a virusszaporodás is megfelelő mértékű.

Megfelelő számú, ép protoplasztok nyerését nagyon sok tényező befolyásolja: a felhasznált növények fiziológiai állapota, kora; a levelek pozíciója; az öntözés; a fény viszonyok; a protoplaszt izolálás hőmérséklete; a ráztatás sebessége; az ozmotikum minősége és koncentrációja; az al-

kalmazott enzimpreparátum szennyezettsége /95, 104/.

A protoplaszt izolálás mintegy 10 éves történetében a dohány mellett számos más növény esetében is kidolgozták a protoplasztok nyerésének optimális körülményeit.

Az izolált protoplasztokat a legtöbb esetben Aoki és Takebe /1/ által összeállított tápoldatban, vagy annak kicsit módosított változatában inkubálják. Ez a tápközeg számos nemorganikus só, auxint, citokinint és antibiotikumot tartalmaz. A protoplasztok ebben a közegben több napig életben maradnak és kezdenek osztódni. A protoplasztokat az inkubálás során optimális hőmérsékleten és fény viszonyok közt tartják.

2.3 Az izolált protoplasztok virussal történő fertőzése

Az izolált növényi protoplasztok virussal való szimultán fertőzését 1969-ben két kutatócsoport dolgozta ki: Cocking és mts.-i /11/ paradicsom, Takebe és mts.-i /96/ dohány protoplasztokat fertőztek sikeresen dohánymozaik virussal /DMV/. Az eredetileg DMV-sal történő fertőzésre kidolgozott módszer más vírusnál is használhatónak bizonyult, így ma már több mint tíz növényfaj protoplasztjai fertőzhetők mintegy 17 különböző növényi virussal /100/.

A Takebe és Otsuki által kidolgozott protoplaszt fertőzési módszer /96/ kulcsszerepű lépése egy nagy molekulásulyu polikation hozzáadása a vírus inokulum oldathoz. Ez a polikation a poli-L-ornitin /PLO/, amely bázikus aminosavakból álló lineáris polimer. A fertőzési folyamat fontos lépése a PLO és a vírus részecskék tíz perces előinkubálása a fertőző oldatban. Ezen inkubálás idején a PLO kapcsolódik a negatív töltésű részecskékhez és vírus-PLO komplex képződik /98/. Más kísérletekből ismert, hogy a PLO a virussal való előinkubálás idején aggregátumot képez, s ez az aggregátum PLO-t, virust és puffer molekulákat is tartalmaz /47/. Az így képződött aggregátumok a protoplasztokkal való inkubálás során hozzátapadnak a membránhoz és bejuttatják a virust a protoplasztokba /47/. A fertőzés utolsó lépéseként a nem adszorbeálódott vírus részecskéket el kell távolítani a közegből és végül az inkubációs oldatba tett protoplasztokban lejátszódik a virusszaporodás.

A Takebe és Otsuki /96/ által kidolgozott protoplaszt fertőzési módszert Motoyoshi és mts.-i oly módon módosították /54/, hogy a lecentrifugált protoplasztokat közvetlenül a vírus-PLO komplexet tartalmazó oldatban szuszpendálták, ahelyett, hogy először mannit oldatban vették volna fel, majd 1:1 arányban fertőző oldatot adtak volna hozzá.

Okuno és Furusawa rozsnokmozaik virussal való fertőzésre dolgozott ki módszert, amely szerint a fertőzés hatásfokát igen megnövelhetjük, ha a fertőző oldat ozmotikus nyomását közvetlenül a fertőzés előtt és alatt megemeljük /63/.

2.4 A protoplaszt fertőzés hatásfokát befolyásoló tényezők

A protoplaszt fertőzés hatásfoka logaritmikus összefüggést mutat az alkalmazott virusinokulum virus koncentrációjával /52, 96/. A fertőzötté vált protoplasztok aránya a mintában függ az alkalmazott virus preparátum specifikus infektivitásától is.

A PLO jelenléte elengedhetetlenül szükséges a protoplasztok DMV-sal /96/, uborkamozaik virussal /68/, burgonya X-virussal /69/ és tehénborsó klorotikus foltosság virussal /51/ való nagy hatásfoku fertőzéséhez. Az előbb felsorolt virusok mindegyikének savas izoelektromos pontja van, így az inokulálás pH-ján többé-kevésbé negatív töltésűek. A PLO egyik szerepe feltehetően az, hogy semlegesíti vagy pozitívvá változtatja a virusok negatív töltését, így elősegíti a virusok adszorpcióját az ugyancsak



negatív töltésű protoplaszt membránhoz /31/. Valószínű, hogy a PLO nemcsak a vírus adszorpcióban, hanem a vírusok protoplasztokba való bejuttatásában is szerepet játszik/98/. Vannak olyan vírusok, a borsó enációs mozaik vírus /52/ és a rozsnokmozaik vírus /28, 53, 63/, amelyekkel PLO adagolás nélkül is megfelelő hatásfokkal lehet fertőzni a protoplasztokat. Ezek a vírusok magasabb izoelektromos ponttal rendelkeznek, így a fertőzés pH-ján pozitív töltésűek. Megfelelő hatásfoku vírusfertőzést kapunk abban az esetben is, ha a protoplasztok membránja relatíven kis negatív töltéssel rendelkezik /58/.

Más polikation, például a poli-L-lizin és poli-L-hisztidin is fokozza a vírusfertőzés hatásfokát, csak kevésbé kifejezetten, mint a PLO /54/. A PLO molekulaszúlya szintén befolyásolja a vírusfertőzés eredményességét: a 90 000 molekulaszúlyú PLO kevésbé hatásos, mint az általánosan használt 130 000 molekulaszúlyú /98/.

A Takebe és mts.-i által használt citrát puffer /96/ helyett Kubo és mts.-i foszfát puffert /42/ alkalmaztak dohány mezofil protoplasztok dohány rattle virussal való szimultán fertőzéséhez, mivel így magasabb fertőzési százalékokat kaptak, de foszfát puffer felhasználása esetén a vírus fertőzőttesség hatásfokát befolyásolja a fertőző pufferben lévő protoplasztok koncentrációja is /48, 92/. Hasonló jelenséget talált Takebe és Otsuki is DMV-sal kapcsolatban /99/.

A protoplaszt fertőzés sikerességét befolyásolhatja még a növény kora és a felhasznált levelek pozíciója is /54/.

Az 1969-ben kidolgozott protoplaszt fertőzési módszer a módosítások hatására egyre tökéletesedett és ennek eredményeként a protoplasztok 80-90%-a szimultán fertőzhető virussal. A protoplasztok fertőzöttségi százalékának megállapítására a leggyorsabb és legpontosabb módszer a vírus-antitesthez kötött fluoreszcein izotiocianáttal /FITC/ történő protoplaszt festés. A fertőzés után 24 órával már elvégezhető, kiértékelhető a festés.

2.5 A vírusok bejutása a protoplasztokba

A vírusfertőzött protoplasztokból készült metszetek elektronmikroszkópos vizsgálatai alapján a kutatók egyrésze úgy véli, hogy a növényi vírusok endocitozissal jutnak be a protoplasztokba /11, 100/. Más laboratóriumban a kísérleti eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a vírusok a poli-L-ornitin okozta sérüléseken át hatolnak be a protoplasztokba /7, 40/. Ez az utóbbi elképzelés viszont nem ad magyarázatot arra, hogy vannak vírusok, amelyek poli-L-ornitin /PLO/ adagolás

nélkül is képesek fertőzni a protoplasztokat. Okuno és Furusawa endocitozist jelző strukturát figyelt meg árpa protoplasztok rozsnokmozaik virussal való fertőzésekor, a mint ismeretes ez a vírus PLO hozzáadása nélkül is fertőz /63/. A fertőzés határfokát igen megnövelte ebben a rendszerben a rendszer ozmotikus nyomásának megemelése közvetlenül a fertőzés előtt /62/. Ezek az eredmények nem mondanak ellent az endocitózisos vírus bejutás lehetőségének, mivel az ozmotikus sokk csökkenti a turgort és ez elősegíti a sejtmembrán befűződését.

Az izolált protoplasztokban lejátszódó endocitozisos vírus bejutás folyamatát világosan alátámasztják azok az elektronmikroszkópos kísérletek, amelyek polisztrén szemcsék felvételét mutatják /94/.

Jelenleg azonban a közvetlen bizonyítékok még hiányoznak annak alátámasztására, hogy a növényi vírusok ténylegesen endocitozis útján jutnak be a növényi sejtbe.

2.6 A protoplasztokban lejátszódó vírus replikáció

Tíz évvel ezelőtt, 1969-ben dolgozták ki a protoplasztok virussal történő fertőzésének módszerét /96/, amely segítségével a protoplasztok több mint 90%-a szimultán fertőzhető virussal a rövid ideig tartó vírus-

kezelés alatt. Mivel a vírusok megtapadása és bejutása a protoplasztokba néhány perc alatt lejátszódik, így igen kicsi a szekunder fertőződés lehetősége, tehát a virusszaporodás szimultán folyamat protoplaszt rendszerben. A protoplaszt rendszer ezen tulajdonsága teszi lehetővé az egyedi sejtekben lejátszódó vírus sokszorozódás folyamatának nyomonkövetését.

Elsőként a dohánymozaik vírus /DMV/ szaporodását vizsgálták protoplasztok alkalmazásával.

A DMV egy pozitív szálú RNS molekulát és fehérjeburkot tartalmaz, amely számos fehérje molekulából áll. A vírus-RNS egyrészt templátként szolgál a fehérjeszintézishez, másrészt pedig irányítja a saját replikációját.

A protoplasztok virussal való fertőzésekor a vírus részecskék megtapadnak a protoplasztok membránján, majd bejutnak azokba és a fertőzést követően rövid időn belül elvesztik fehérjeburkukat. A vírus bejutásának és a fehérjeburok levetésének pontos mechanizmusa és helye azonban még tisztázatlan. A kísérleti eredmények szerint a vírusfertőzött protoplasztokban néhány órával a vírus fertőzés után virusspecifikus RNS-ek és fehérjék szintézise kezdődik meg /2, 74, 88, 89, 90/. Hasonló eredményeket kaptak vírusfertőzött levél rendszeren végzett kísérletek eredményeként is /36, 80, 81, 82, 83, 84, 85/.

A virusfertőzést követően lejátszódó RNS és protein szintézis helye különbözik, azaz: a virusfüggő RNS-ek szintézisének helye a sejtmagban, a virusfüggő fehérjéké pedig a citoplazmában lokalizálható /2, 6, 83, 88, 89/. A sejtekben a virus-RNS szintézise a fertőzés utáni negyedik órában már kimutatható és a fertőzés kezdeti szakaszában szabad RNS-ként, vagy fehérjével részben borítottan halmozódnak fel a sejtekben /2, 82, 88/, majd a későbbiekben szintézisük mértéke exponenciálissá válik. Képződésük időgörbéje szerint háromféle virusfüggő RNS mutatható ki a virusfertőzött protoplasztokban és virusfertőzött levélsejtekben: a replikatív forma, a replikatív intermedier és a tulajdonképpeni virus-RNS. Az első két forma a virus-RNS képződés intermedierje. A virus-RNS megsokszorozódása egy RNS-függő RNS-polimeráz segítségével valósul meg, amely a gazda növény enzime /86/. Ezt az enzimet egészséges dohány levelekben is kimutatták, viszont szintézisének mértéke a virusfertőzött szövetekben sokszorosa a kontrolban találhatóénak. Feltételezhetően a DMV-RNS nem kódolja a replikációjához szükséges teljes enzimet, de nem kizárt, hogy valamelyik alegységét kódolja, vagy egy olyan faktort, amely hatására megsokszorozódik a gazda RNS-függő RNS-polimeráz szintézisének a mértéke.

A fertőzés későbbi szakaszában indul be a virusfüggő protein szintézise, amely során a burokfehérjén kívül két,



nagy molekulasulyu fehérje is képződik. Ezek a fehérjék elkülönülten olvasódnak le a DMV-RNS-ről, és a szintézisük mértéke is különböző /6, 19, 74, 82, 88, 89, 90/.

A nagy molekulasulyu viruskódolt fehérjék szintézise korábban kezdődik, mint a burokfehérjéé, de ezen utóbbi szintézisének sebessége jóval nagyobb az előzőkéénél. A két nagy molekulasulyu fehérjének a vírus replikációban betöltött szerepét azonban még nem sikerült tisztázni.

A virusszaporodás későbbi szakaszában, amikor a burokfehérje képződése intenzívvé válik, megkezdődik a vírus-RNS és fehérje spontán összekapcsolódása, amely mechanizmusa már elég jól ismert /21, 22/ és létrejönnek az utód-vírusok.

A protoplasztonként képződött vírus mennyisége

$0,5 - 9,3 \times 10^6$ vírus/protoplaszt értéknek adódott /2, 37/.

A levél szövet vizsgálatakor kapott érték:

$0,5 - 2,5 \times 10^6$ vírus/sejt /79, 105/.

A levél rendszeren végzett kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a lokálléziós dohánylevél szövetében kevesebb vírus képződik, mint a szisztémikus gazdáéban a fertőzött sejtek elhalása miatt, ami megakadályozza a folyamatos virusszintézist /105/. Lokálléziós gazdanövényből izolált protoplasztokkal végzett kísérletek eredményei viszont azt mutatják, hogy bennük ugyanolyan sebes-

séggel és ugyanannyi vírus képződik /67/, mint a szisztemikus gazdából izolált protoplasztokban, tehát az aktiv virusszintézis nem okozza a sejt elhalását. A hiperszenzitív dohány növényekben a sejtek elpusztulásáért más folyamatok felelősek /41/.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a nekrotikus válasz létrejöttéhez sejt-sejt kapcsolat szükséges /67/.

2.7 A 2-tiouracil, mint vírus szaporodásgátló vegyület hatásának vizsgálata levél rendszerben

A 2-tiouracil /2-TU/ évtizedek óta erőteljes virusinhibitorként ismert. Már 1951-ben ismertté vált Commoner és Mercer által /13/, hogy ez az uracil analóg gátolja a dohánymozaik vírus szaporodását. Az azóta eltelt időszakban számos kutatócsoport /5, 14, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 34, 35, 59, 60/ foglalkozott a 2-TU vizsgálatával, így sok részeredmény ismertté is vált, viszont a hatásmechanizmusát máig sem tisztázták.

Kísérleti eredmények alapján ismeretes, hogy a 2-TU beépül a dohánymozaik vírus RNS-be /DMV-RNS/ /24, 26, 46, 78/ és a ds DMV-RNS-be /77/. Emellett gátolja a ^{32}P beépülését a DMV-RNS-be /25, 49/ és a ds DMV-RNS-be /77/.

Több kutatócsoport munkája nyomán ismertté vált, hogy a 2-TU-lal kezelt levelekből kivont vírus-RNS-eknek és maguknak a vírusoknak is jelentős része - az összvírus mennyiség 50-80%-a - nem fertőzőképes /24, 26, 27/. A 2-TU-t tartalmazó DMV-RNS is kevésbé infektív, mint a kontrol DMV-RNS, viszont az infektivitás különbség nem olyan nagy mint amit a vírus részecskék vizsgálatakor találtak /24/. Másrészt megfigyelték, hogy az infektivitás különbség jóval kisebb a 2-TU-DMV és a DMV közt, ha tisztított vírus preparátumokat vizsgálnak tisztítatlan helyett /24/, illetve az infektivitási teszttel mért virushozam csökkenés jóval nagyobb, mint amit elektronmikroszkópos számolással vagy szerológiai módszerrel kaptak /24/.

A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján ezekre a jelenségekre a magyarázat nem ismert.

A defektív vírus részecskék képzése mellett a 2-TU-lal kezelt dohány levelekben szintetizálódott összvírus mennyiség is kevesebb, mint a kontrolé /14, 25, 27/.

Commoner és mts.-i 1952-ben /14/, Francki és mts.-i 1959-ben /23/ megállapították, hogy a 2-TU-t tartalmazó és a normál DMV között nincs különbség elektroforetikus mobilitásban és elektronmikroszkópos méretben. Commoner és mts.-i /13/ által vált ismertté, hogy a 2-TU igen alacsony koncentrációban is hatásos /10 μ g/ml/ s ez a gátló hatás kétszeres uracil mennyiséggel visszafordítható.

Ugyanez a kutatócsoport végzett kísérleteket arra vonatkozóan, hogy a 2-TU fizikailag inaktiválja-e a virust.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy nem.

Ralph és mts.-i /78/, Dawson és Schlegel /15, 16/ eredményei szerint a virusszaporodás korai lépése 2-TU érzékeny. Dawson és Schlegel ugynevezett szinkron növények felhasználásával ezt az időszakot a fertőzés utáni 12 órában, Meyer és mts.-i /49/ pedig 24 órában jelölték meg. Francki /25/ eredményei szerint a virusszaporodás akkor nagyon érzékeny a 2-TU-os kezelésre, amikor a levelek vírus koncentrációja nagyon alacsony. A legnagyobb gátlást a fertőzéssel egyidőben kapta. Meyer és mts.-i /49/ kísérletei alapján a DMV-RNS szintézis akkor a legérzékenyebb a 2-TU-os kezelésre, amikor a vírus-RNS szintézis a legintenzívebb.

Francki és Matthews /27/ által közölt eredmények alapján, ha a vírus mennyisége a felére csökken a 2-TU-lal kezelt mintában a kontrolhoz képest, a vírus-RNS összuracil tartalmának 10%-a 2-TU. Matthews eredményei szerint ez az érték 3,5% /46/. Szerológiai módszert 1965-ben Jeener /35/ alkalmazott a 2-TU-t tartalmazó és a kontrol vírusok vizsgálatára. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a 2-TU-t tartalmazó DMV-nak szerológiailag módosult proteinje van: a 2-TU jelenlétében képződött vírusok 30-50%-a nem képes az antitesttel kapcsolódni, ami a DMV burokfehérjében bekövetkezett aminosav változás következménye.

Bawden és Kassanis megfigyelése /5/: a 2-TU virusszaporodást gátló hatásának a mértéke szórást mutat a levelek fiziológiai állapotának megfelelően, és ha a 2-TU-t kihagyják a tápoldatból, a virusszaporodás normális módon zajlik le.

A 2-TU virusszaporodást gátló hatását eddig főleg intakt növényi rendszeren vizsgálták, infektivitási teszt /13, 14, 16, 24, 27/ segítségével és az összvirus mennyiség meghatározásával /14, 25, 46/.

Az intakt növényi rendszer felhasználásának azonban vannak korlátai ezen jelenség vizsgálatakor. Ebben a rendszerben a vírusok nemcsak szaporodnak hanem terjednek is. A rendelkezésre álló eredményekből tehát nem kaphatunk választ arra vonatkozóan, hogy a 2-TU magát a virusszaporodást, a virusterjedést vagy mindkettőt gátolja-e.

A fennálló korlátok kiküszöbölésére szolgál a virussal szimultán fertőzött protoplaszt rendszer felhasználása a 2-TU hatásának tisztázása során. Protoplaszt rendszer alkalmazása esetén különválasztva vizsgálható a 2-TU hatása a vírus-RNS szintézisre, a virusképződésre és a vírusok terjedésére.

DMV-sal szimultán fertőzött protoplaszt rendszer segítségével vizsgáltuk a 2-TU hatását a virusképződéssel, majd levél rendszerrel kombinálva a virusterjedéssel kapcsolatban /4/. Az így kapott eredmények azt mutatják, hogy

a 2-TU sem a virus-RNS szintézist, sem a virusképződést
nem gátolja az elsődlegesen fertőzött sejtekben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Nicotiana tabacum cv. Xanthi

Nicotiana tabacum cv. Xanthi növények üvegházban nevelt hat-nyolc hetes példányainak szépen kifejlődött középső leveleit használtam protoplaszt izolálásra. Fiatalabb levelek alkalmazása esetén a protoplaszt izolálás könnyebb, de az így kapott protoplasztok törékenyek, nehezen élik túl a vírusfertőzés és az inkubálás folyamatát. Az idősebb levelekből izolált protoplasztok szintén instabilak.

3.2 Protoplaszt izolálás /57/

A kísérletekhez szükséges protoplasztokat Nicotiana tabacum cv. Xanthi növények leveleinek mezofil szövetéből izoláltam.

A gondosan kiválasztott dohány leveleket steriliztem 70%-os alkoholban, 4%-os hypoban és steril desztillált vízben történő mosással. A sterilizett leveleket 1-2 mm. széles csikokra szeleteltem üveglapon, 0,4M mannit oldatban.

A továbbiakban a fokozatos plazmolízis elvét követve, a szeleteket 0,5M mannitban gyűjtöttem össze és a mintákat infiltráltam. A nyomáskülönbség lassu kiegyenlítése után a kis levélszeletek lesüllyednek az oldat aljára. Az infiltrálás befejezése után 30 percig plazmolizáltam a szeleteket 0,5M mannit oldatban, 30°C-os vízfürdőn enyhén rázatva /25-50 ford./perc/; majd a mannit oldatot macerozim enzimoldatra cseréltem, amely 0,7M mannitot, 0,5% macerozimet és 0,5% kálium-dextran-szulfátot tartalmazott és pH 5,8 volt. A 40 percig tartó inkubálás idején az enzim elbontja a sejteket összetartó pektint. Az enzimes kezelést 30°C-os vízfürdőn enyhén rázatva végeztem el. A macerozim enzimoldat leöntése után a mintákat celluláz enzimmel kezeltem, amely 0,7M mannitot és 1% cellulázt tartalmazott és a pH-ja szintén 5,8. Az enzim a 2-2,5 órás inkubálás idején /32°C-os vízfürdőn enyhén rázatva/ leemésztette a sejtfalakat és a protoplasztok szabaddá váltak, amelyeket 0,7M mannit oldattal mostam ki az enzimoldatból. Alacsony fordulatszámú centrifugálással /50-100g, 2perc/ a protoplasztok elkülönültek a sejtfal maradványoktól, a szét-esett protoplasztoktól és a törmeléktől.

3.3 Az izolált protoplasztok fertőzése DMV-sal /62, 96/

Az izolált dohány protoplasztok virussal való szimultán fertőzéséhez a dohánymozaik vírus /DMV/ OM törzsét használtam fel.

A DMV-sal történő fertőzéshez az optimális protoplaszt koncentráció 100 000-150 000 protoplaszt/ml.

A lekerekedett, ép protoplasztokat kicentrifugáltam a 0,7M mannit oldatból és fertőző oldatba tettem vissza, amely 0,01M pH 6,7 KH_2PO_4 puffert, 0,78M mannitot, 1 $\mu\text{g/ml}$ PLO-t és 1 $\mu\text{g/ml}$ DMV-t tartalmazott.

A fertőzőoldatot a fertőzés megkezdése előtt 10 perccel össze kell mérni, mivel a sikeres fertőzés létrejöttéhez a PLO és a DMV 10 perces előinkubálása elengedhetetlenül szükséges. Az így előkészített közegben a vírusfertőzés 10 perc alatt lejátszódik. Az inokulálás után a nem adszorbeálódott vírus részecskéket és a PLO-t CaCl_2 -os mosóval távolítottam el a mintákból, amely összetétele:

0,7M mannit és $5 \times 10^{-7}\text{M}$ CaCl_2

Ez az oldat stabilizálja a protoplasztok membránját. A vírusfertőzött protoplasztokat inkubációs közegbe helyeztem.

3.4 A protoplasztok inkubálása /1/

Az inkubáláshoz az optimális protoplaszt koncentráció 100 000-200 000 protoplaszt/ml. Az inkubációs közeg pH-ja 5,8, és számos nemorganikus sót, auxint és antibiotikumot tartalmaz. Ebben a közegben a protoplasztok több napig életképesek. Az inkubálás idején a hőmérséklet 25°C, a fény erőssége pedig 1500 lux volt.

3.5 ^{32}P jelölés

Az inkubációs médiumban lévő egészséges és DMV fertőzött protoplasztokat hordozómentes ^{32}P -ral /50 $\mu\text{Ci/ml}$ /, 6 óra/ jelöltem. A jelölés után a fel nem vett izotópot kimostam a mintákból CaCl_2 -os mosóval, majd kivontam az egyes mintákból a nukleinsavakat.

3.6 A protoplasztok által felvett ^{32}P mennyiségének meghatározása

Az izotóppal jelölt protoplasztokat lecentrifugáltam,

többször mostam 0,7M mannit oldattal, ismét lecentrifugáltam és 10 percig protoplaszt lizáló pufferrel kezeltem, amely 0,02M glicint, 0,001 M NaHPO_4 -t, 0,06M NaCl -t, 1% Na-dodecilszulfátot, 2% 2-merkaptoetanol és 2% Nonidet P 40-t tartalmazott. A mintákból szűrőpapír korongokra cseppentettem, beszárítottam, küvettába helyeztem és toluolos szcintillációs elegyben mértem a minták radioaktivitását.

3.7 A nukleinsavakba beépült ^{32}P mennyiségének meghatározása

Az izotóppal jelölt protoplasztokat lecentrifugáltam, többször mostam 0,7M mannit oldattal a fel nem vett ^{32}P eltávolítása céljából, majd ismét lecentrifugáltam és protoplaszt lizáló puffert adtam hozzá amivel 10 percig kezeltem. A mintákból szűrőpapír korongokra cseppentettem, beszárítottam, majd korongonként 5 ml 5%-os triklórecet-savval $+/+0,2\%$ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ / 6x10 percig mostam. Ezután kétszer 96%-os alkohollal, majd 1:1 arányu alkohol:éter eleggyel, végül éterrel mostam és beszárítottam. A beszárítás után mérőküvettákba raktam és szcintillációs elegyben mértem a minták radioaktivitását Nuclear Chicago folyadék-szcintillációs spektrométerrel.

3.8 Fenol-krezolos nukleinsav kivonás /33/

A kivonás minden lépését hűtés $/4^{\circ}\text{C}/$ mellett kell végezni a növényi ribonukleázok aktivitásának lecsökkentése miatt. A lecentrifugált protoplasztokat kivonó pufferben homogenizáltam, amely 0,5M TRIS-HCl puffert, 10% tris-izo-propilnaftalinszulfonsav Na-sóját, 0,5M NaCl-t, p-aminoszalicilsav Na-sóját és vizet tartalmazott. A homogenizátumhoz ekvivalens mennyiségben fenol-krezol elegyet adtam, amely 80% fenolt, 10% m-krezolt, 0,1% OH-quinolint és 10% vizet tartalmazott. A fenolozás után a vizes fázisból 96%-os alkohollal kicsaptam a nukleinsavakat, majd 70%-os alkohollal többször átmostam a fenol nyomok eltávolítása céljából. A tiszta nukleinsavakat elektroforetikus pufferben felvettem és poliakrilamid gélen megfuttattam.

3.9 Poliakrilamid gélelektroforézis /15/

A kísérletekhez 2,4%-os poliakrilamid gélét készítettem, amely akrilamidot, bis-akrilamidot, elektroforetikus puffert, vizet, tetrametiletildiamint és $/\text{NH}_4/2\text{S}_2\text{O}_8$ -t tartalmazott. Az elektroforetikus pufferben TRIS-HCl, puffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ és EDTA volt. A futtatáshoz az elektrofore-

tikus puffert ötszörösére hígítottam. A kész géleket az anyag felrétegezése előtt előfuttattam /5mA/cső, 30-40perc/, majd a nukleinsav mintákat rárétegeztem a gélek tetejére. Az optimális térfogat 30 μ l, 1-1,5 OD₂₆₀/optikai denzitás/egység. A minták felvitelét ribonukleáz mentes cukor hozzáadása segítette elő. A géleken a mintákat négy órán át futtattam /5mA/cső/, majd a megfuttatott géleket kivettem a csövekből és desztillált vízben áztattam a szennyeződések eltávolítása céljából. Joyce-Loebl Chromoscan mikrodenzitóméter segítségével felrajzoltam a megfuttatott nukleinsavak optikai denzitás profilját.

3.10 A gélek szeletelése és a szeletek radioaktivitásának mérése

A megfuttatott géleket, amelyek tartalmazták a radioaktív izotóppal jelölt nukleinsavakat, az eredeti hosszukra fagyasztottam szárazjéggel és 1 mm-es darabokra szeleteltem. Az egyes szeleteket szűrőpapír korongokra helyeztem, be-
száritottam, a száradás után mérőküvetékbe raktam, majd mértem a gélseletek radioaktivitását toluolos szcintillációs elegyben Nuclear Chicago folyadék-szcintillációs spektrométeren. A kapott eredményeket grafikonon ábrázoltam és összehasonlítottam a minták optikai denzitás profiljával.



3.11 Viruskivonás protoplasztokból /22, 30/

A lecentrifugált, dohánymozaik virussal fertőzött protoplasztokat homogenizáltam 0,1M pH 7,25 Na-pirofoszfát pufferben. A centrifugálás után /10 000 rpm, 10 perc/ kapott felüluszó butanolos kezelése után a virust polietilénlikolos módszerrel kicsaptam a mintákból. A többszöri polietilénlikolos tisztítás után kapott viruspreparátumokat 0,1M Na-pirofoszfát /pH 7,25/ pufferben oldottam vissza. Az egyes minták virus mennyiségét a 260 nm-nél mért optikai denzitás értékből számoltam a következő képlet segítségével:

$$C_{DMV} \text{ mg/ml} = \frac{A_{260} \times \text{higitás}}{3,24}$$

A_{260} : a 260 nm-nél mért fényabszorpció

3.12 A kivont virusminta vizsgálata cukorgradiens centrifugálással

A kísérletekhez 10-35%-os linearis cukorgradienst készítettem. SW 27 rotorral /24 000 rpm, 2,5 óra/ Beckman ultra-

centrifugán centrifugáltam a mintákat. Minden cső tetejére 5 optikai denzitás egységnyi vírus preparátumot rétegeztem.

3.13 A kivont vírusminta biológiai tesztje /69/

A biológiai teszt kivitelezéséhez *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. növényeket használtam, amelyek a vírusfertőzésre lokállézió képzéssel válaszolnak. Az infektivitási teszt segítségével mérhetjük egyrészt: ismeretlen vírus koncentrációju minta vírus mennyiségét, másrészt: ismert koncentrációju mintában a vírusok fertőzőképességét.

Egy adott víruspreparátum vírus koncentrációjának meghatározása: Az ismeretlen vírus koncentrációju mintából meghatározott térfogatot kifertőztem *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. növények leveleinek egyik felére, a másik félre adott koncentrációju vírusminta meghatározott térfogata került. Két-három nap múlva, a kontrol félen képződött lokálléziók számából a higitás figyelembe vételével, kiszámítható a vizsgált vírusminta vírus koncentrációja.

Ismert koncentrációju vírus mintában a vírusok infektivitásának meghatározása: Az azonos koncentrációra beállított vizsgált vírusminta és kontrol vírus preparátum meghatározott térfogatát *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc.

dohány növények fél-fél leveleire kifertőzttem, majd két-három nap múlva a fél-leveleken képződött lokálléziók leszámolásával megkaptam, hogy a vizsgált virusmintában lévő virus részecskék hány százaléka fertőzőképes. Kísérleteimben a 2-TU-t tartalmazó és a normál DMV infektivitását hasonlítottam össze.

3.14 A protoplasztok fertőzőettségi százalékanak megállapítása fluoreszcens festéssel /64/

A módszer nagy előnye, hogy 24 órával a protoplasztok virussal történő fertőzése után már megtudhatjuk, hogy a fertőzés sikeres volt-e vagy sem. Az eljárás gyorsan elvégezhető, nagy specifikussága miatt pontos eredmények kaphatók, de csak annyi információt nyerhetünk, hogy a vizsgált protoplaszt mintában mennyi protoplaszt vált fertőzötté.

A módszer mennyiségi kiértékelésre nem alkalmas.

A módszer leírása:

Vékony tárgylemezt bekentem Mayer albuminnal, amely 1:1 arányban tojásfehérje és glicerín keveréke; ezután rá-cseppentettem a 24 óráig inkubált DMV fertőzött protoplasztokból pár cseppet, majd a protoplasztoknak a lemezhez való tapadása után hajszáritóval gyorsan beszáritottam a

a mintákat. Kontrolként egészséges protoplasztokat vizsgáltam. Ezután a lemezeket 5-10 percig mostam etanollal a klorofillek extrahálása miatt. A következő lépés a mintákban lévő mannit és alkohol eltávolítása. Ehhez a művelethez foszfát puffert használtam, amely 0,01M foszfát puffert és 0,85% NaCl-t tartalmazott és pH 7,0 volt. Ezután a mintákhoz nyulban termeltetett antitestet /anti-DMV-IgG/ adtam és egy órán át 37°C-on inkubáltam, amely idő alatt az antitest kapcsolódott a protoplasztokban lévő antigénekhez. Az egy óra elteltével a nem kötődött IgG-t foszfát pufferrel mostam ki a mintákból /20 perc keverés mellett/, majd a mintákhoz fluoreszcein-izotiocianáthoz kötött anti-nyul-IgG-t /anti-nyul-IgG-FITC/ adtam és újabb egy órán át 37°C-os termosztátban inkubáltam a mintákat, amely idő alatt az anti-nyul-IgG-FITC és a nyulban termeltetett anti-DMV-IgG kapcsolódott egymással. A nem kötődött anti-nyul-IgG-FITC komplexet foszfát pufferes mosással távolítottam el a mintákból.

Az így elkészített preparátumokat 1 rész glicerinnel és 9 rész foszfát puffer keverékével befedtem, majd a fedőlemez ráhelyezése után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam.

A vírusfertőzött protoplasztok zölden fluoreszkáltak, míg az egészségesek pirosas színűek voltak.

A vírusfertőzött és az összes protoplaszt leszámolásával megkaptam, hogy a vizsgált vírusfertőzött protoplasztok hány százaléka volt valóban vírusfertőzött.

3.15 Virus koncentráció mérés szerológiai módszerrel /103/

Míg a fluoreszcens festéssel kapott eredmények csak minőségi kiértékelést tesznek lehetővé, addig az enzimhez kapcsolt antitest szerológiai módszer /Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA/ segítségével kapott adatok mennyiségi kiértékelésre is módot adnak: a módszerrel nagy pontossággal meghatározhatjuk a vizsgált minta vírus koncentrációját.

Ezen szerológiai módszer előnyei:/8/

- alkalmas nagyon alacsony vírus koncentráció kimutatására /10-100 ng/ml/,
- látens, múlt tüneteket okozó vírusoknál is eredményes,
- nagy a specifikussága,
- lehetséges nagyszámu minta vizsgálatot egyidejűen elvégezni,
- minőségi és mennyiségi meghatározásokra is alkalmas,
- a közeli rokonságban álló vírusok is jól elkülöníthetők a segítségével és
- a módszer érzékenysége független az antigén-antitest aránytól.

Az enzimhez kapcsolt antitest szerológiai módszert először emberi és állati vírusok specifikus kimutatására dolgozta

ki két kutatócsoport /18, 102/, majd átdolgozták növényi vírusok detektálására /93, 103/, amely esetben a "dupla antitest szendvics" változat bizonyult a legmegfelelőbbnek.

A módszer lényege:

- a virusspecifikus IgG /antitest/ hozzákötése a mikrotitráló laphoz /érzékenyítés/,
- a virust tartalmazó minta hozzáadása,
- a virusspecifikus IgG-enzim konjugátum hozzáadása,
- az enzimszubsztrát hozzáadása és
- az enzimreakció leállítása.

A hidrolizált szubsztrát színintenzitásának fotometriás mérésével a vírus koncentráció meghatározható. Mivel a színintenzitás arányos a vizsgált minta vírus koncentrációjával, ezért kalibrációs görbe segítségével a vírus koncentráció pontosan megkapható.

A vizsgálatokhoz széles körben használt enzim az alkali-kus foszfatáz, melynek a szubsztrátja a p-nitrofenilfoszfát /szintelen/. A termék a p-nitrofenol /sárga/ 405 nm-nél mérhető stabil vegyület.

A módszer leírása: /93/

A reakció kivitelezéséhez a 96 lukas Dinotech-féle polisztirolból készült mikrotitráló lapokat használtam.

- érzékenyítés: a virusspecifikus IgG megfelelő hígításaiból $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ pH 9,6 pufferben 200 μl -t

mértem be lukanként, s egy éjszakán át hűtőszekrényben /4°C-on/ állni hagytam. Ez idő alatt az IgG kötődött a polisztirol lemez falához.

- mosás, háromszor egymás után pH 7,4 foszfát pufferrel, melynek összetétele:

NaCl	8,0g
KH ₂ PO ₄	0,2g
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	2,9g
KCl	0,2g
Tween 20	0,5ml
NaN ₃	0,2g

desztillált vízzel 1000 ml-re

- a pH 7,4 foszfát pufferben /+1% polivinil-pirrolidin/ lévő vizsgált virus preparátum megfelelő higitásának bemérése. A mikrotitráló lemezt ezután két órára nedveskamrában 30°C-os termosztátba helyeztem, amely idő alatt a mintában lévő virus részecskék kapcsolódtak a lemez falához már korábban kötődött anti-DMV-IgG-hez
- mosás
- az antitest-enzim konjugátum hozzáadása: az 1% polivinil-pirrolidint tartalmazó pH 7,4 foszfát pufferben lévő konjugátum megfelelő higitását bemértem a mikrotitráló lap lukaiba és a lemezeket nedveskamrában 30°C-os termosztátba tettem két órára, amely idő alatt az anti-DMV-IgG-enzim komplex kapcsolódott a lemez falához már korábban kötődött DMV részecskékhez.

- mosás
- az enzimszubsztrát hozzáadása: a 10%-os dietanolamin pufferben oldott p-nitrofenil-foszfátból /1 mg/ml/ megfelelő mennyiséget bemértem a mikrotitráló lemez lukaiba és a lemezeket nedveskamrában 30°C-os termosztátba tettem másfél órára, hogy az enzim-reakció végbemenjen.

A dietanolamin puffer összetétele: pH 9,8

$C_4H_{11}NO_2$ 97 ml
desztillált vízzel 1000 ml-re
pH beállítás 1 n HCl-lel

- az enzimreakció leállítása: az enzimreakciót lukanként 50 µl 3M-os NaOH-dal állítottam le.

A színintenzitás a vírus koncentráció függvénye, ezért kalibrációs görbe segítségével pontosan megkapható a vizsgált minták vírus koncentrációja. A színintenzitást 405 nm-nél mértük spektrofotométerrel.

3.16 Az enzimhez kapcsolt antitest szerológiai módszerrel összefüggő eljárások

- az antiszérum előállítása: az antigént /DMV/ ekvi-



valens mennyiségben Freud adjuvánssal homogenizáltam és nyulban intramuszkulárisan oltottam. Az oltást követő második héten vettem le a vért.

- az antiszérum titerének meghatározása mikroprecipitin teszttel: /101/ a tiszta DMV preparatum egy megadott higitását különböző antiszérum higitásokkal mértem /1:2, 1:4 ... 1:2038/

Petri csészéken viztasztó réteget képeztem, majd a virus preparatum és a kontrolok /a virus higitáshoz használt puffer, a szérum higitáshoz használt puffer, növényi fehérje 1/10 higitásban és normál szérum/ kicseppentése következett. Ezután mind a mintához /DMV/, mind a kontrolokhoz különböző higitásu antiszérumot cseppentettem. A cseppeket paraffin olajjal lefedtem a párolgás megakadályozása miatt. Termosztátba helyeztem /37°C, 2 óra/, majd binokuláris sztereomikroszkóppal 20-szoros nagyításnál értékeltem a szerológiai reakciókat.

- az antitest /IgG/ tisztítása: 2 ml antiszérumhoz hozzáadtam 18 ml desztillált vizet és 200 ml telített ammonium szulfátot, majd 1 órát szobahőmérsékleten inkubáltam és a csapadékot lecentrifugáltam /8000 ford/perc, 10 perc/ és feloldottam 0,1M pH 7,5 foszfát pufferben. A kapott fehérje oldatot 0,1M pH 7,5 foszfát pufferrel szemben egy éjszakán át dializáltam.

Sephadex G 200 oszlopon a mintában lévő albumint és az immunoglobulinokat elválasztottam és spektrofotométerrel 280 nm-nél mértem a kapott immunoglobulin koncentrációját, amelyet a mikrotitráló lemezek érzékenyítésére és enzimmel való kapcsolásra használtam a továbbiakban.

- DEAE Sephadex G 200 oszlopon a fehérjék elválasztása:

1 g Sephadex G 200-t annyi desztillált vízben szuszpendáltam amennyit felvett, majd szűrőtölcsérben ülepitettem és a vizes fázist leöntöttem. Ezután 0,5M NaOH-dal mostam lugos pH-ig, desztillált vízzel pH 7,0-ig, 0,1N foszforsavval savas pH-ig, desztillált vízzel pH 7,0-ig, 0,01M foszfát pufferrel pH 6,5-ig és a vizes fázist leszivattam.

Az így ekvilibrált oszlopra felvittem a részben tisztított szérumot, s egy órát állni hagytam 4°C-on, majd a szérum átszivatása után megkaptam a tisztított immunoglobulinokat.

- a tisztított IgG kapcsolása az enzimmel: enzimként

a Sigma által forgalomba hozott alkalikus foszfatáz VII. típusát használtam. Az enzim glutáraldehid jelenlétében irreverzibilisen kapcsolódik az IgG-hez.

A lecentrifugált enzim preparatumhoz hozzáadtam az előkészített IgG-t és foszfát pufferrel /0,1M, pH 7,5/ szemben dializáltam egy éjszakán át. A dialízis után

0,2% végkoncentrációban glutáraldehidet adtam hozzá és szobahőmérsékleten két órát állni hagytam /sárgult és csapadék képződött/, majd 0,05M pH 8 TRIS pufferrel szemben egy éjszakán át dializáltam.

Az enzim-IgG komplex mennyiségét megmértem és fénytől védve + 4°C-on tároltam.

- az IgG és a konjugátum optimális dózisának megállapítása: az antiszérum tisztított IgG frakciójának különböző higitásait felvittem a polisztirolból készült Dinotech-féle mikrotitráló lemezre. Megállapítottam azt a higitási pontot, amelynél még elegendő IgG kötődött le a lemez felületéhez ahhoz, hogy az alacsony koncentrációban jelenlévő vírus még biztosan kimutatható legyen. Az enzim-virusspecifikus IgG konjugátumot is több higitásban vizsgáltam.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1 A 2-tiouracil hatása a DMV szaporodására

4.1.1 A 2-tiouracil hatása a DMV-RNS szintézisre

A 10 µg/ml 2-tiouracillal kezelt és kezeletlen DMV-sal fertőzött protoplasztokat 24 órán át 25°C-on és 1500 lux fényintenzitáson inkubáltam. A fertőzés után 18-24 óra között 50 µCi/ml ^{32}P -ral jelöltem a vizsgált mintákat. Az izotópos jelölés után a protoplasztokból kivontam a nukleinsavakat, poliakrilamid gélen megfuttattam és a nukleinsavak optikai elnyelés profilját felrajzoltam. Ezután a géleket felszeleteltem, az egyes szeletek radioaktivitását lemértem és az eredményeket grafikonon ábrázolva összehasonlítottam az optikai elnyelés profilokkal /1.2.3. ábra/. Az optikai denzitás profil esetében a vízszintes tengelyen a nukleinsavak vándorlási távolságát, a függőlegesen pedig a relatív abszorpciót ábrázoltam. A ^{32}P beépülési görbe esetében a vízszintes tengelyen a szeletek számát, a függőlegesen pedig a beütés/perc-et rajzoltam fel. Tisztított hideg DMV-RNS-t futtattam egy paralel gélen, hogy pontosan azonosítani tudjam a DMV-RNS helyét a géleken. Ez a lépés szükséges volt, mivel az egészséges és a 24 óráig inkubált DMV fertőzött protoplasztokból

kivont nukleinsavak optikai elnyelés profilja hasonló. Ennek az az oka, hogy 24 óra alatt a DMV-RNS még nem szaporodik fel oly mértékben a mintákban, hogy optikai denzitás alapon is biztonsággal kimutatható legyen, de az eredmények ^{32}P beépülési görbe alapján kiértékelhetők. A gélelektroforézis megkezdése előtt a DNS-t kiemésztettem a mintákból, hogy ne zavarja a kísérletek kiértékelését, mivel ebben a futtató rendszerben a DNS és a DMV-RNS viszonylag közel fut egymáshoz.

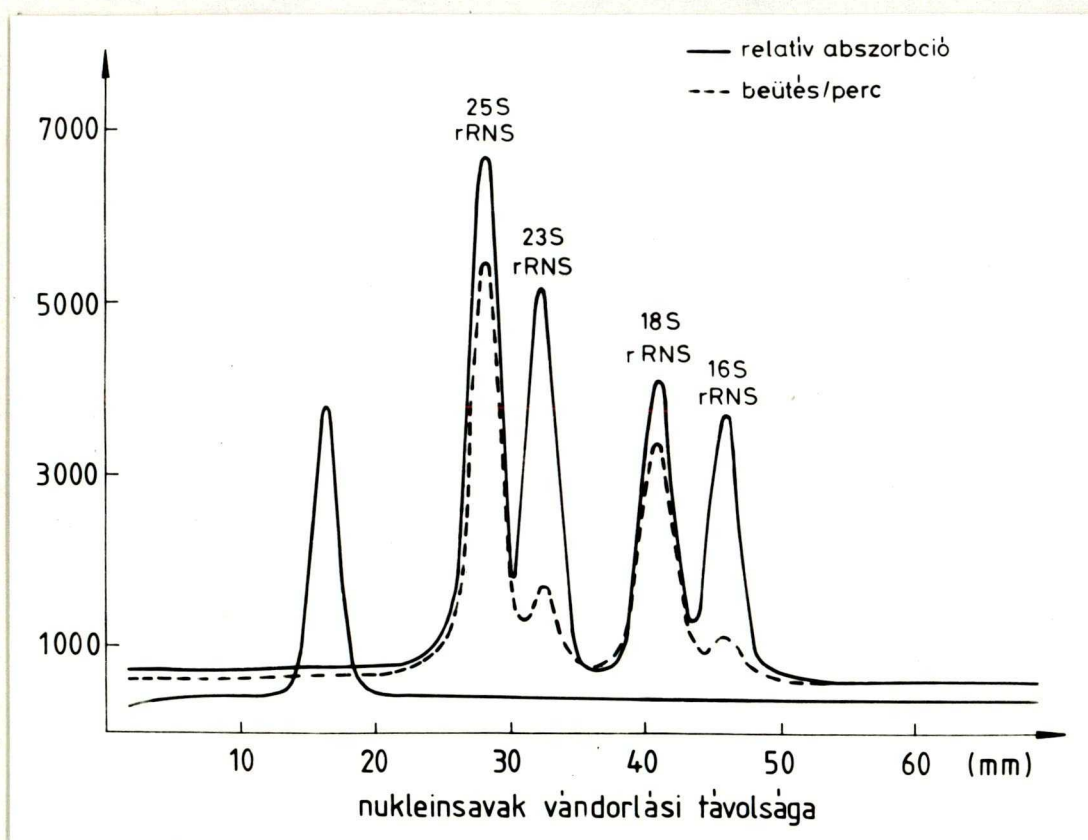
A 2-tiouracillal kezelt és kezeletlen egészséges protoplasztokból kivont nukleinsavak optikai denzitás és ^{32}P beépülési görbéje teljesen megegyezik.

Ha a 2-TU-lal kezelt és a kezeletlen DMV-fertőzött protoplasztokból kivont nukleinsavak ^{32}P beépülési görbéit összehasonlítjuk, azt figyelhetjük meg, hogy lényeges különbség nincs a DMV-RNS szintézis sebességében a két minta közt /2.3.ábra/.

A kapott kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a 2-TU a DMV-RNS szintézist az elsődlegesen virusfertőzött sejtekben - ellentétben az irodalmi adatokkal - nem gátolja szimultán fertőzött protoplaszt rendszer felhasználása esetén, a fertőzés után közvetlenül alkalmazva sem.

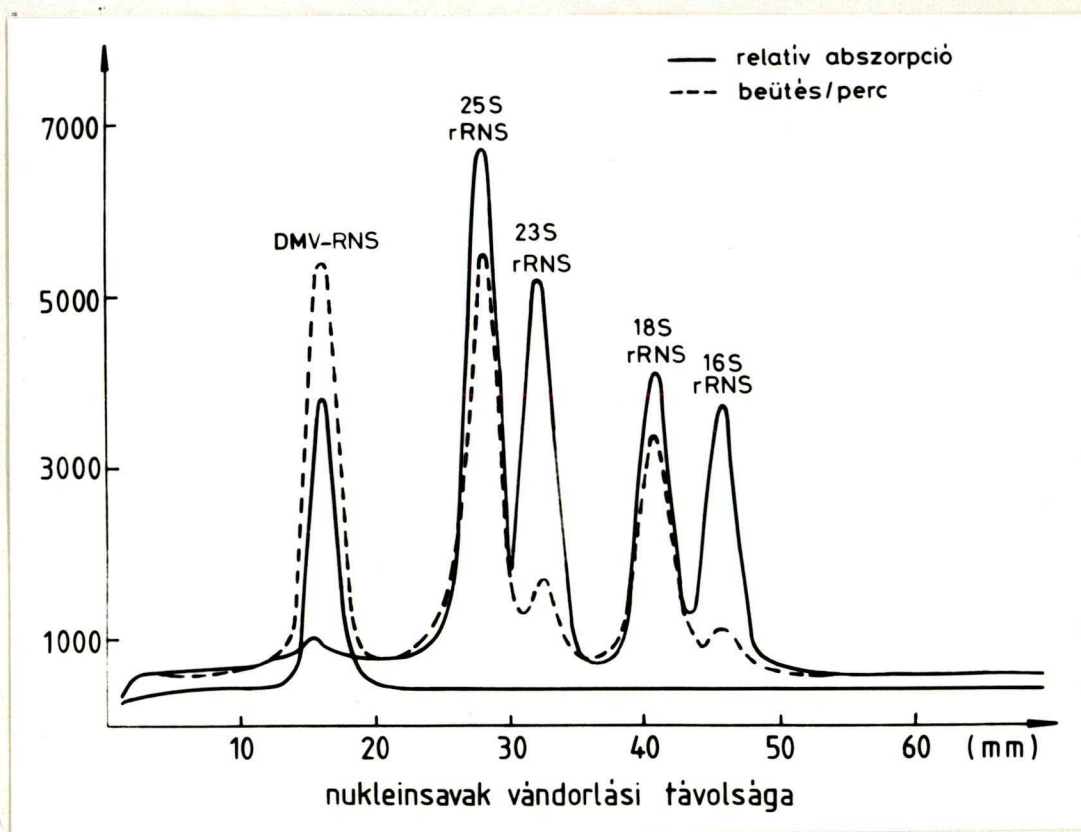
Egyértelműbbé válik a 2-TU gátló hatásának a hiánya, ha összehasonlítjuk a 2-TU-lal kezelt és kezeletlen protoplasztokból kivont nukleinsavak ^{32}P beépülési görbéje

segítségével a DMV-RNS és a gazda 25S rRNS görbe alatti területét a kezelt és a kontrol minták esetében /1.tábl./.



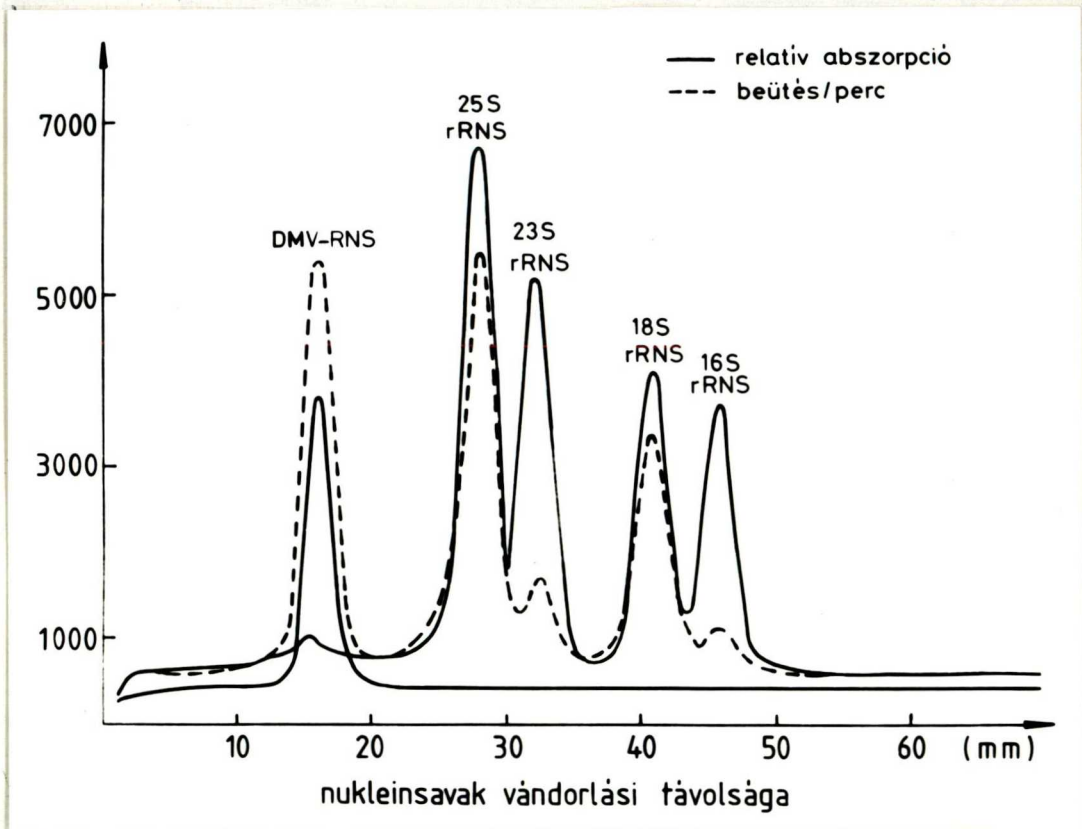
1. ábra

Az egészséges protoplasztokból kivont nukleinsavak optikai denzitás és ^{32}P beépülési profilja



2. ábra

A DMV-sal fertőzött protoplasztokból kivont nukleinsavak optikai denzitás és ^{32}P beépülés profilja



3. ábra

A 2-tiouracillal kezelt DMV-sal fertőzött protoplasztokból
kivont nukleinsavak optikai denzitás és ^{32}P be-
épülés profilja

kísérlet	DMV-RNS görbe alatti terület ^x		hatás /%/
	- 2-TU	+ 2-TU	
No.1	117	107	- 8,6
No.2	101	104	+ 2,9
No.3	115	112	- 2,2
átlag:	111,0	107,6	- 3,1

^xAz adatok mg-ban vannak megadva. A ³²P
25S rRNS-be való beépülésének értéke
egységnyi minden mintában.

1. táblázat

A három kísérlet eredményét átlagolva közel 3% különbség volt kimérhető a DMV-RNS szintézis sebességében a kezelt és a kontrol minta összehasonlításakor.

4.1.2 A 2-TU hatása a virusképződésre

Kísérleteim további részében meghatároztam a 2-TU-lal kezelt és a kezeletlen protoplasztokban képződött vírusok koncentrációját szerológiai módszerrel /ELISA/, majd a kezelt és a kontrol mintákból kivont vírus mennyiségét mértem optikai denzitás alapon és számoltam elektronmikroszkóp segítségével.

A szerológiai módszerrel kapott eredményeket átlagolva a 2. táblázat tartalmazza.

minták	A ₄₀₅		DMV /µg/ml/
	inkubálás ideje /h/		
	0	24	
növényi fehérje	0,101	0,055	-
- 2-TU	0,293	1,440	50
+ 2-TU	0,259	0,850	10

2. táblázat

A 2. táblázat eredményei azt mutatják, hogy a 2-TU-lal kezelt virusfertőzött protoplasztokban 80%-kal kevesebb ép virus képződik, mint a kontrolban.

Ismeretes azonban Jeener 1965-ben kapott eredménye /35/, amely szerint a 2-TU-t tartalmazó DMV-RNS-nek szerológiai-lag módosult proteinje van, s ez az anti-DMV-IgG-vel nem képes kötődni, mivel a DMV-RNS transzlációja során hibás aminosav épül be a virus burokfehérjébe, s ez megváltoztatja a virus részecske antitestkötő helyeit.

Mivel egyértelműen nem lehetett eldönteni, hogy a kapott eredmények esetében melyik ténnyel állunk szemben, elvégeztem a következő kísérletet: azonos koncentrációra beállított 2-TU-t tartalmazó és normál DMV preparátumot vizsgáltam szerológiai módszerrel. A kapott eredményeket átlagolva a 3. táblázat tartalmazza.

minta	OD ₂₆₀ /ml	A ₄₀₅	DMV /µg/ml/
- 2-TU	0,45	1,53	55
+ 2-TU	0,45	0,53	6

3. táblázat

A 3. táblázat eredményeinek ismeretében egyértelműen megállapíthatjuk: az azonos koncentrációju 2-TU-t tartalmazó és normál DMV-t a szerológiai módszer nem mérte azonosnak.

Mivel a szerológiai módszerrel kapott adatok nem mutatják egyértelműen, hogy a 2-TU-lal kezelt és a kezeletlen mintában azonos mennyiségű vírus képződik-e vagy sem, így a rendelkezésre álló eredményekből nem lehet következtetést levonni a 2-TU virusképződésre gyakorolt hatásával kapcsolatban.



A továbbiakban a kezelt és a kontrol mintákból virust vontam ki, optikai denzitás alapon mértem a kivont preparátum virus koncentrációját és elektronmikroszkóppal számoltam a virus részecskék számát. A 2-TU-lal kezelt és a kontrol virusfertőzött protoplasztokból történő virus kivonás eredményét a 4. táblázat tartalmazza.

kísérlet	kivont virus /OD ₂₆₀ /ml/
No. 1 - 2-TU	0,45
+ 2-TU	0,45
No. 2 - 2-TU	0,40
+ 2-TU	0,34
No. 3 - 2-TU	0,42
+ 2-TU	0,43
átlag: - 2-TU	0,42
+ 2-TU	0,40

4. táblázat

A virus kivonások eredményeinek megfelelően a kivonható virus mennyisége a 2-TU-lal kezelt mintában megegyezik a kontroléval. A kapott eredmények alátámasztására a kivont

virus preparátumokban elektronmikroszkóp segítségével számoltuk a vírus részecskék számát. A vírus részecskék számát a két mintában latex szemcsék hozzáadásával vonatkoztattuk azonos térfogatra /3/.

A kapott eredmények szerint a 2-TU a DMV-RNS szintézisét és magát a virusképződést sem gátolja jelentős mértékben szimultán fertőzött protoplaszt rendszer felhasználása esetén, amely rendszer az elsődlegesen vírusfertőzött sejtekben lejátszódó folyamatokat reprezentálja.

A 2-TU virusinhibitor vizsgálatával kapcsolatban felmerültek a következő kérdések:

- meg lehet-e fertőzni a 2-TU-lal telített levelekből származó protoplasztokat?
- hogyan alakul a virusszintézis a 2-TU-lal telített protoplasztokban, amikor főleg 2-TU áll rendelkezésre a virusszaporodáshoz uracil helyett?

Ezen kérdések felvetődésének oka az, hogy nem szimultán fertőzött levél rendszer felhasználása esetén megállapították, hogy a virusszaporodás korai lépése 2-TU érzékeny /16, 49/. Ez az időszak Meyer és mts.-i /49/ adatai alapján a fertőzés utáni 24 óráig tart, tehát a 2-TU akkor fejti ki a legnagyobb gátló hatást a virusszaporodásra, ha a fertőzést követő 24 órán belül adagolják. Dawson és Schlegel /16/ "szinkron" fertőzött levél rendszer felhasználásával.

nálásával kapott eredmények alapján a fertőzés utáni 12 órát jelölte meg a vírus replikáció 2-TU érzékeny periódusának. Az általunk használt szimultán fertőzött protoplaszt rendszer alkalmazásakor kapott eredmények pedig azt mutatják, hogy a 2-TU nincs gátló hatással a vírus szaporodásra az elsődlegesen virusfertőzött sejtekben. A felsoroltak alapján a következő tendencia figyelhető meg: minél szimultánabb virusszaporodást lehetővé tevő kísérleti rendszert alkalmazunk, annál jobban rövidül a virusszaporodás 2-TU érzékeny periódusa.

Elképzelhető, hogy teljesen szimultán fertőzött protoplaszt rendszer felhasználásakor is gátolja a 2-TU a vírus replikációt, csak ez a 2-TU érzékeny időszak olyan rövid, hogy hiába adagoltam a virusinhibitort a virusfertőzés után 0 órában, hatását nem tudta kifejteni, mivel a protoplasztok nagy uracil raktárral rendelkeznek és elég hosszú idő szükséges ahhoz, hogy az uracil egyrésze 2-TU-ra cserélődjön. Mire a kicserélődés megtörténik, a protoplasztokban már annyira felszaporodik a vírus, hogy a 2-TU nem tudja gátló hatását kifejteni.

Annak eldöntésére, hogy ez a jelenség fennáll-e, elvégeztem a következő kísérletet, amelyben *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi leveleket usztattam tápoldaton 2-TU jelenlétében és hiányában 48 órát, majd protoplasztokat izolál-

tam a féllevelekből és virussal szimultán fertőztem. Az ily módon DMV-sal fertőzött protoplasztokat 2-TU-t tartalmazó és nem tartalmazó tápoldatban inkubáltam 24 órát a virusszaporodás érdekében, majd a mintákból virust vontam ki. Spektrofotométeren 260 nm-nél mértem a kivont preparátumok virus koncentrációját. A kapott eredmények átlagát az 5. táblázat tartalmazza.

levelek usztatása /48 óra/	+ 2-TU		- 2-TU	
protoplaszt izolálás, fertőzés virussal, inkubálás /24 óra/	+ 2-TU	- 2-TU	+ 2-TU	- 2-TU
a kivont virus /OD ₂₆₀ /ml/	0,465	0,485	0,370	0,375

5. táblázat

Az 5. táblázat adatai azt mutatják, hogy a 2-TU-lal telített protoplasztokat is ugyanolyan hatásfokkal lehet fertőzni, mint a kezeletleneket. A 2-TU-lal kezelt és a kontrol mintákból kivonható virusmennyiségek között lényeges különbség nincs. Ezek a kísérletek szintén alátámasztják azt az eredményt, hogy a 2-TU a virusok szaporodását nem gátolja szimultán fertőzött protoplasztokban.

4.1.3 A 2-TU hatása a vírusok infektivitására

A víruskivonással párhuzamosan teszteltem a kivont vírusok fertőzőképességét. A 2-TU-lal kezelt és a kontrol mintákból kivont azonos koncentrációjú mintákkal elvégeztem a biológiai tesztet /fél-levél módszer/. A specifikus infektivitás kiszámolása után a 2-TU hatására bekövetkező infektivitás veszteség a 6. táblázatban látható.

kísérlet	kivont vírus /OD ₂₆₀ /ml/	specifikus infektivitás	infektivitás vesztés %/
No.1 - 2-TU	0,45	373	89,8
+ 2-TU	0,45	38	
No.2 - 2-TU	0,40	696,6	76,2
+ 2-TU	0,34	166,2	
No.3 - 2-TU	0,42	351	90,6
+ 2-TU	0,43	33,1	
átlag:			85,5

6. táblázat

A fenti kísérletek eredményei alapján átlagban közel 85%-os infektivitás csökkenést kaptam a 2-TU-t tartalmazó vírusok esetében a kontrolhoz viszonyítva, tehát a 2-TU-t

tartalmazó vírus preparátumban a vírus részecskék 85%-a elvesztette azt a képességét, hogy levél rendszerben fertőzni tudja a szomszédos sejteket.

4.2 A 2-TU hatása a vírusok terjedésére

Ezekhez a kísérletekhez 1 mg/ml DMV-sal fertőzött dohány leveleket usztattam 2-TU-t tartalmazó és nem tartalmazó tápoldaton 48 órát, majd a mintákból protoplasztot izoláltam és további 24 óráig inkubáltam. A fluoreszcens festés elvégzése után a vírusfertőzött protoplasztokat megszámláltam a mintákban. A kapott eredményeket a fertőzöttségi százalék kiszámolása után a 7. táblázat tartalmazza.

kísérlet	vírusfertőzött protoplasztok aránya a mintában %/	
	- 2-TU	+ 2-TU
No. 1	50,7	20,3
No. 2	65,1	21,8
No. 3	57,5	21,2
átlag:	57,7	21,1

A táblázat eredményei azt mutatják, hogy a 2-TU-lal kezelt mintákban közel 63%-kal kevesebb protoplaszt volt fertőzött a kontrolhoz viszonyítva.

Hasonló körülmények közt virust is vontam ki a 2-TU-lal kezelt és a kontrol virusfertőzött levelekből a 48 órás usztatás után. A kapott adatokat a 8. táblázat tartalmazza.

kísérlet	OD ₂₆₀ /ml	
	- 2-TU	+ 2-TU
No. 1	0,248	0,112
No. 2	0,360	0,157
No. 3	0,264	0,156
átlag:	0,290	0,141

8. táblázat

Az így kapott eredmények alátámasztják a fluoreszcens festéssel kapottakat: a 2-TU-lal kezelt virusfertőzött levélfelekből 50-60%-kal kevesebb virust kaptam, mint a kontrol felekből.

Az általunk kapott eredmények látszólag ellentmondanak az irodalomból ismerteknek.

Francki /25/ és Meyer és mts.-i /49/ által kapott adatok szerint a 2-TU hatásosan gátolja a vírusok RNS szintézisét és szaporodását DMV-sal fertőzött dohány levelekben a fertőzés után közvetlenül adagolva. De az általuk kapott eredmények alapján - a kísérleti rendszer lényegéből adódóan - nem lehet eldönteni, hogy a 2-TU ténylegesen a vírusok replikációját akadályozza-e meg vagy a terjedésüket gátolja.

A kísérleteinkben használt szimultán fertőzött protoplaszt rendszer alkalmas ennek eldöntésére, azáltal, hogy ebben a rendszerben a vírusok terjedése kizárt, csak a vizsgált vírusinhibitor vírus replikációra kifejtett hatása vizsgálható.

Az így kapott eredmények szerint a 2-TU, 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva, nem gátolja a vírus-RNS szintézist és a virusképződést sem az elsődlegesen vírusfertőzött sejtekben. A 2-TU-nak azonban vírusgátló hatása van /14, 25, 49/, ami egyedül azzal magyarázható, hogy valamilyen módon megakadályozza a vírusfertőzöttség tovaterjedését.

A korábbi nem szimultán fertőzött és az általunk használt szimultán fertőzött rendszeren kapott eredmények közt csak látszólagos ellentmondás van, ami a két rendszer lényegét ismerve feloldható.

A DMV-sal fertőzött levél rendszer alkalmazása esetén a levél közel 10^7 sejtje közül csak 600-700-t tudunk megfertőzni, bármennyire körültekintően végezzük is el az inokulálást, ezért nagy a fertőzetlen sejtek okozta háttér. Az inkubálás idején a vírusfertőzött sejtekben felszaporodik a vírus és szabadon terjed sejtről-sejtre. Az inkubációs idő végén nemcsak azokat a vírus részecskéket mutatjuk ki, amelyek az eredetileg megfertőzött sejtekben képződnek, hanem azokat is, amelyek másodlagos fertőződés útján jönnek létre. Ha az elsődleges fertőzéssel egyidőben 2-TU-lal kezeljük a leveleket, lényegesen kevesebb vírust kapunk, mint amit a kezeletlen mintából vonunk ki. Ha a 2-TU-os kezelést a fertőzés utáni 10. órában alkalmazzuk, lényegesen kisebb a gátló hatása, mint 0 órában adagolva /25/. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a fertőzés után a sejtekben felszaporodott vírusok szabadon terjedhetnek a vírusfertőzött levélben a 2-TU-os kezelés idejéig, így lényegesen nagyobb vírus koncentrációt kapunk az inkubáció végén, mint a 0 órában 2-TU-lal kezelt minta esetében.

Ahogy a fent leírt adatok bizonyítják, a 2-TU nem gátolja a vírus-RNS szintézist és a virusképződést sem az elsődlegesen fertőzött sejtekben, amely sejteket kísérleteinkben a szimultán fertőzött protoplaszt rendszer reprezentált. A 2-TU, mint nukleinsav bázisanalóg, beépül a

DMV-RNS-be és hibás virus-RNS molekulák képződnek a hatására /29/, ezért a képződött új virus részecskék nem fertőzőképesek. Ez a feltevés egybeesik Francki és Matthews /27/ 1962-ben kapott adataival. Ezzel a hipotézissel magyarázhatók a levél rendszeren kapott eredmények is. Tehát a 2-TU-os kezelés hatására nem fertőzőképes virus részecskék képződnek, s ezek levél rendszeren nem képesek a szomszéd sejteket megfertőzni. Ennek következtében ebben a rendszerben csak az a látszólagos eredmény kapható, hogy a 2-TU a virus-RNS szintézist az elsődlegesen fertőzött sejtekben is gátolja /49/.

Az általunk kapott eredmények alapján a 2-TU gátolja a virusfertőzöttség tovaterjedését és ez a gátló hatás valószínű, hogy több folyamat eredményeként jön létre a virusfertőzött levél rendszerben.

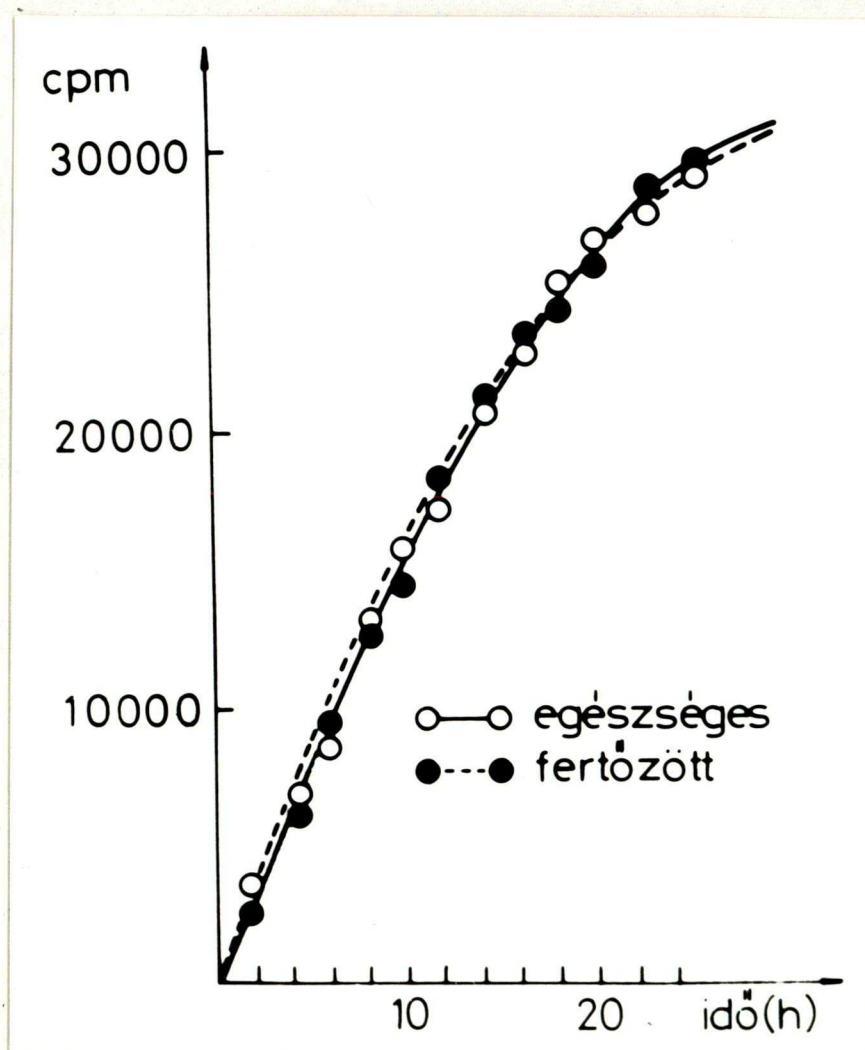
Egyrészt a 2-TU jelenlétében képződött virus részecskék 50-80%-kal kevésbé fertőzőképesek, mint a kontrol, másrészt feltételezhető, hogy a 2-TU valamilyen módon hat a sejtmembrán szerkezetére és ezáltal gátolhatja vagy lelassíthatja a virusok terjedését a virusfertőzött levelekben.

Ezt a feltételezést alátámasztják azok a kísérleteink, amelyek a ^{32}P felvételét és beépülését mutatják 2-TU-lal kezelt és kezeletlen virusfertőzött protoplasztok esetében.

A ^{32}P felvételét és beépülését vizsgáltam az idő függvényében 2-TU-lal kezelt és kezeletlen egészséges és DMV-fertőzött protoplasztokban. Az inkubációs médiumban lévő mintákat ^{32}P -ral jelöltem a fertőzés utáni 0 órában /25 $\mu\text{Ci/ml}$ /, majd mindegyikből 2 óránként mintát vettem. Az így kivett mintákban meghatároztam a protoplasztok által felvett és a beépült ^{32}P mennyiségét. A kapott eredményeket grafikonon ábrázoltam /4.5.6.7. ábra/.

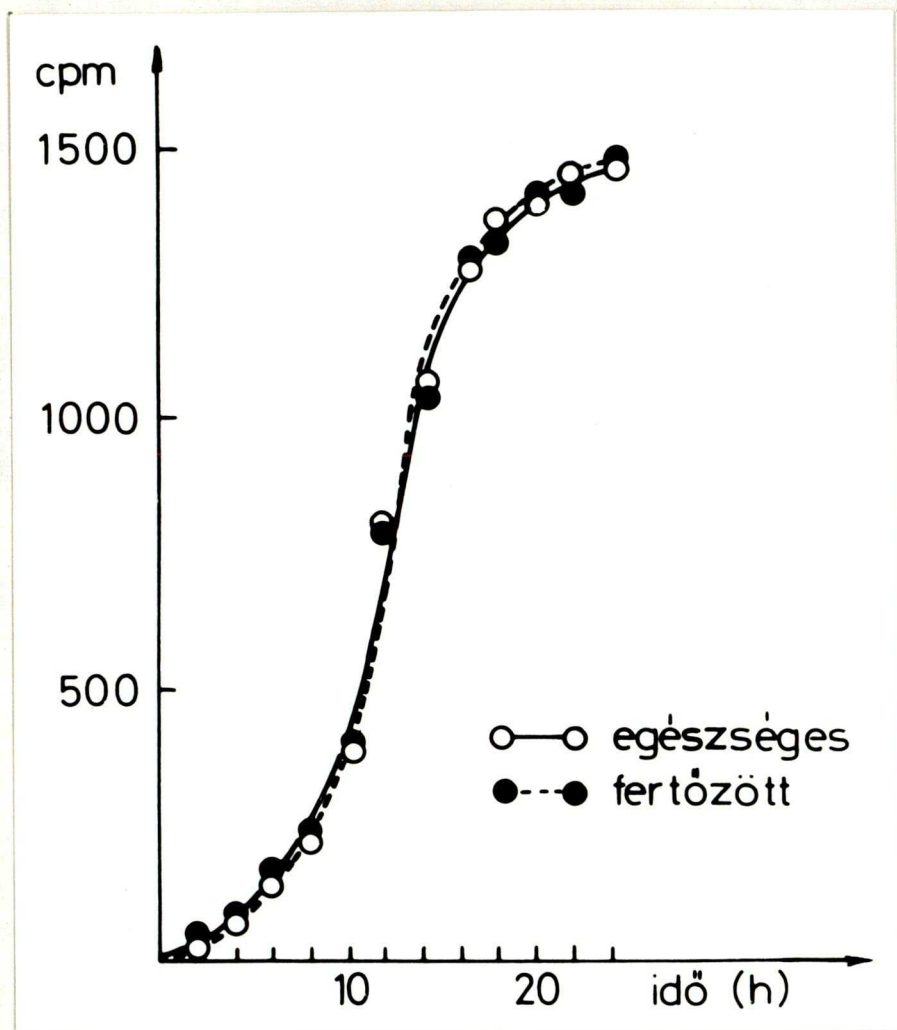
A felrajzolt ábrákról megállapíthatjuk, hogy lényeges különbség nincs a ^{32}P felvételében és beépülésében az egészséges és a virusfertőzött protoplasztok közt. Míg a ^{32}P felvétele lineáris a jelölés utáni 20. óráig, majd lassan telítési értéket ér el /4. ábra/, addig a ^{32}P beépülési görbe a kezdeti lag periódus után többé-kevésbé lineáris a jelölés utáni 10-16 óra között /5. ábra/. A 2-TU-lal kezelt és kezeletlen egészséges és virusfertőzött protoplasztokkal végzett kísérletekből kapott adatok azt mutatják, hogy a 2-TU-lal kezelt protoplasztokban a jelölést követően 18 óráig a ^{32}P felvétele gátolt /6. ábra/, ennek megfelelően a ^{32}P beépülés szempontjából lineáris időszak nyolc órával eltolódik a kontrolhoz képest /7. ábra/.





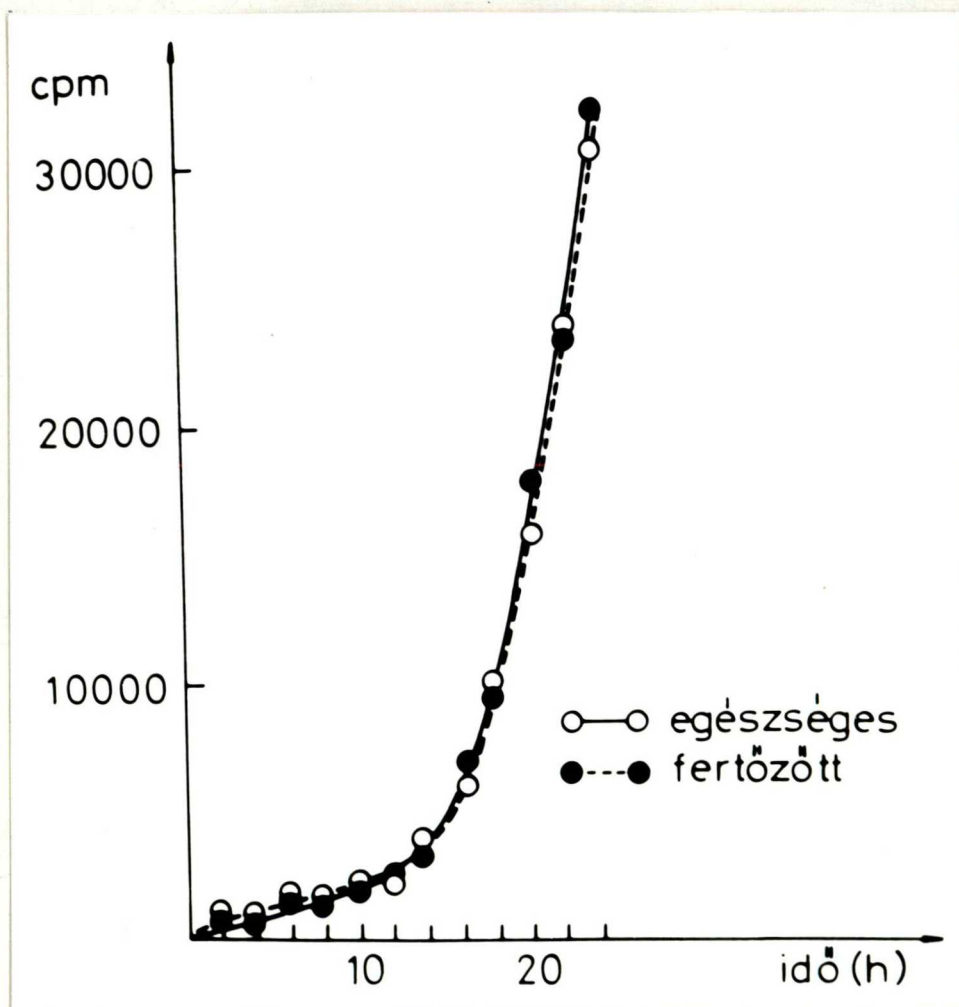
4. ábra

A ^{32}P felvétele egészséges és DMV-fertőzött proto-
plasztokba



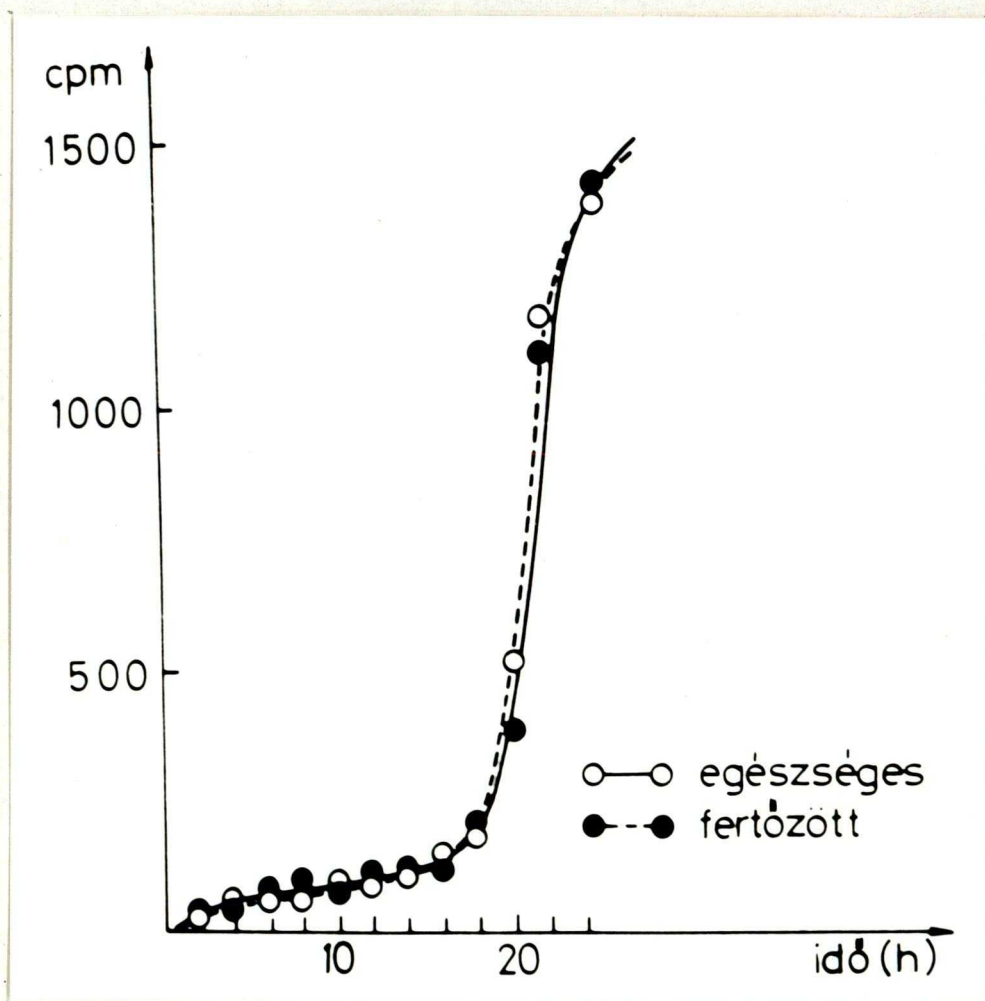
5. ábra

A ^{32}P beépülése egészséges és DMV-fertőzött proto-
plasztok nukleinsavaiba



6. ábra

A ^{32}P felvétele a fertőzés után 0 órában 2-TU-lal kezelt
egészséges és DMV-fertőzött protoplasztokba



7. ábra

A ^{32}P beépülése a fertőzés után 0 órában 2-TU-lal kezelt
egészséges és DMV-fertőzött protoplasztok
nukleinsavaiba

Ezekből a kísérletekből látható, hogy a 2-TU valamilyen módon hat a sejtmembrán szerkezetére. Feltételezhető, hogy hasonló jelenség játszódik le a vírusok terjedésének gátlásakor is 2-TU jelenlétében.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy 10^7 vírus képződik protoplasztonként. Ha 2-TU jelenlétében ennek a 90%-a nem fertőzőképes, akkor is egy millió ép vírus képződik a protoplasztban, s ez elegendő lenne a virusterjedés biztosításához, mivel egy vírus részecske is elegendő a sikeres fertőzés létrehozásához. Ennek ellenére a 2-TU-lal kezelt levélben 60%-kal kevesebb sejt vált fertőzötté, mint a kontrolban.

A kísérleti eredmények alapján indokolt annak feltételezése, hogy a 2-TU befolyásolja a sejtmembrán szerkezetét és ezáltal gátolja vagy akadályozza a vírusok sejtről-sejtre való terjedését.

A 2-TU hatásának vizsgálatával kapcsolatban az irodalomban felmerült egy probléma, amire a válasz máig sem ismert: miért csökken az infektivitás különbség a 2-TU-t tartalmazó és a kontrol vírus preparátum között a virus-tisztítás során?

Ezzel kapcsolatban elvégeztem a következő kísérletet: 2-TU-t tartalmazó és normál DMV-t centrifugáltam /SW 27 rotor, 24000rpm, 2,5 óra/ tridesztillált vízzel, Na-pirofoszfát /0,1M, pH 7,25/ és foszfát /0,01M, pH 8,5/ pufferrel készi-

tett 10-35%-os lineáris cukorgradiensén. A kapott eredmények a 8.9.10. ábrán láthatók.

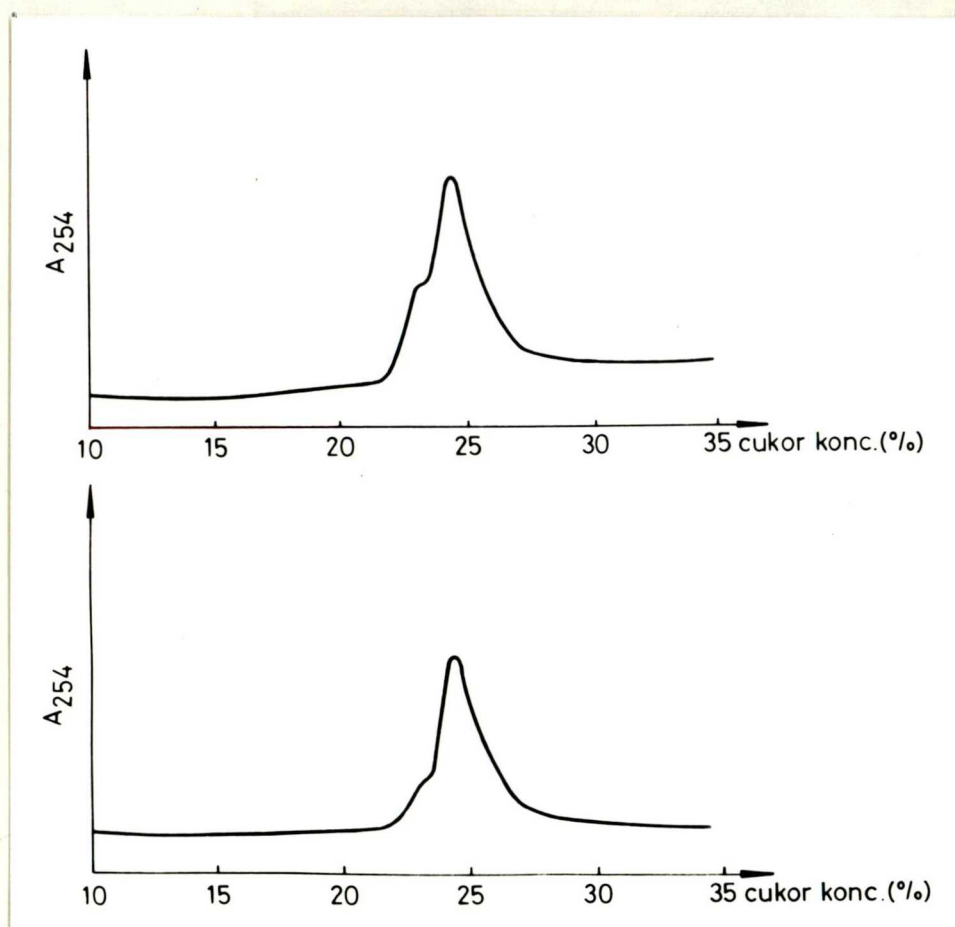
A kapott görbék alapján megállapítható: a tridesztillált vízzel és foszfát pufferrel készített gradiensén futtatott vírus profilja eltér a Na-pirofoszfát pufferrel készíttetten futtatottétól. A Na-pirofoszfát puffer elősegíti a vírus-RNS és fehérje spontán összekapcsolódását, így mind a 2-TU-t tartalmazó, mind a normál DMV ebben a közegben vállal módosított egy csucst ad.

A tridesztillált vízzel és foszfát pufferrel készített gradiensén futtatott vírusok profilja azt mutatja, hogy ezekben a közegekben a vírus részecskék törnek, és a Na-pirofoszfát puffer kivételével minden más közegben a 2-TU-t tartalmazó vírus törékenyebbnek bizonyul a kontrolnál.

Mivel a víruskivonásokat általában tridesztillált vizes vagy foszfát pufferes közegben végzik, és a virust polietilén-glikollal vonják ki a vizes oldatból, így az ábrák alapján magyarázható a két minta közti infektivitás különbség csökkenése a tisztítás során.

Mivel a 2-TU-t tartalmazó mintából a kivonás során képződött kis fragmentumok nem nyerhetők vissza polietilén-glikolos kezeléssel és a kivonás minden lépésénél a 2 minta specifikus infektivitását hasonlítják össze, így a 2-TU-t tartalmazó vírusmintában a kivonás során egyre növekszik az ép vírusok aránya az összeshez képest.

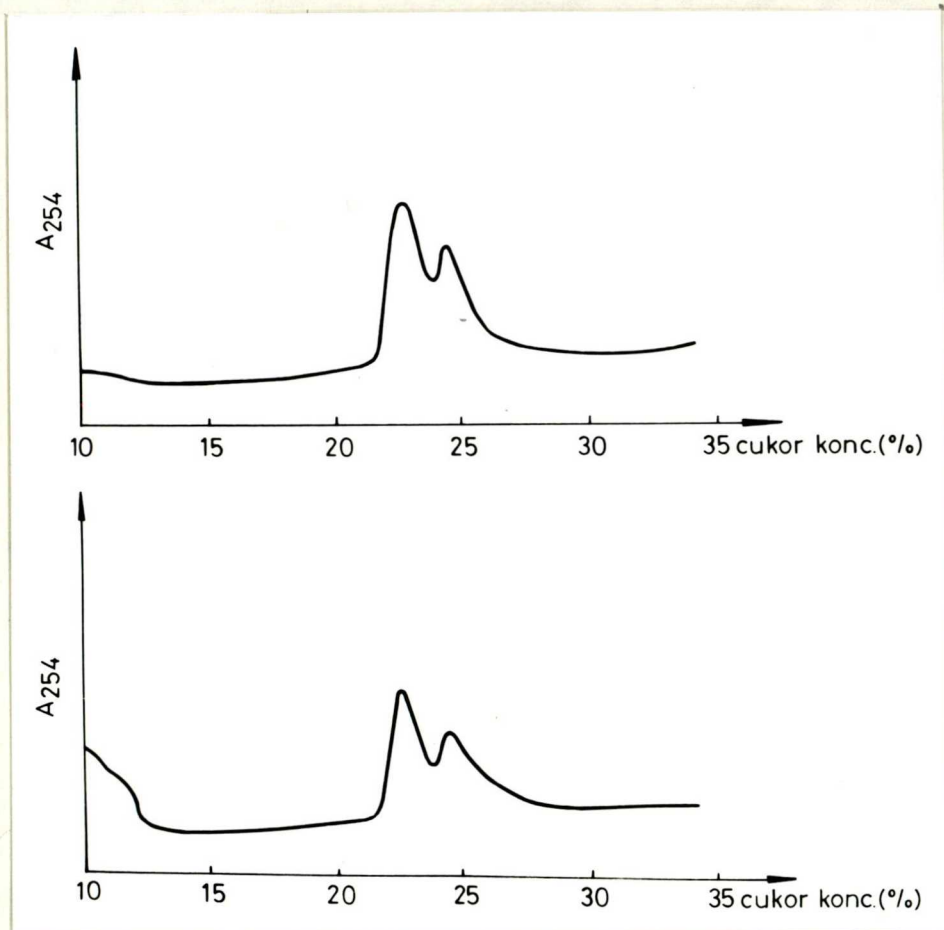
Végeredményként a 2-TU-t tartalmazó virusmintában az ép virusok relativ mennyiségének növekedése okozhatja a két virus preparátum közti infektivitás különbség csökkenését.



8. ábra

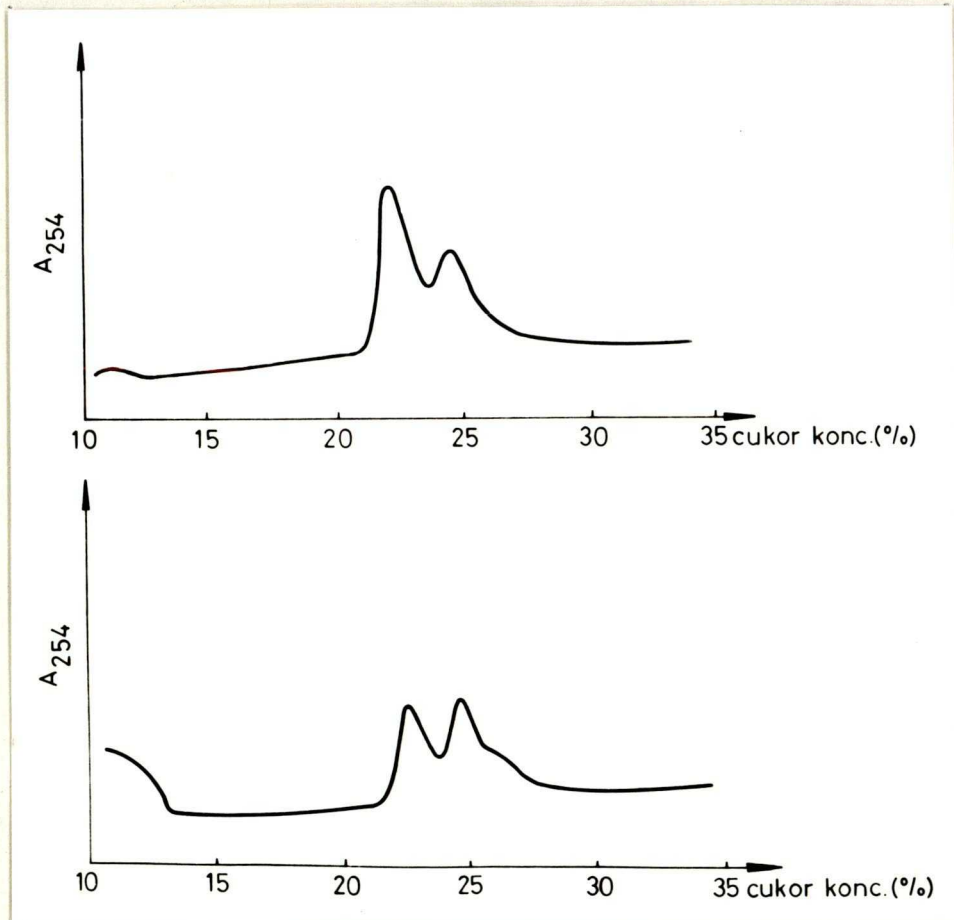
Na-pirofoszfát pufferrel készített cukorgradiensén futtatott DMV /fent/ és 2-TU-DMV /lent/ optikai densitás profilja





9. ábra

Desztillált vízzel készített cukorgradiensén futtatott
DMV /fent/ és 2-TU-DMV /lent/ optikai denzitás
profilja



10. ábra

Foszfát pufferrel készített cukorgradiensén futtatott.
DMV /fent/ és 2-TU-DMV /lent/ optikai denzitás
profilja

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A 2-tiouracil hatásmódjának vizsgálatára dohánymozaik virussal szimultán fertőzött dohány protoplaszt rendszert alkalmaztam. Dohány protoplasztokban tanulmányoztam a 2-tiouracil hatását a dohánymozaik vírus-RNS szintézisre, a virusképződésre, a képződött vírusok infektivitására - levél rendszerrel kombinálva - a vírusok terjedésére és összehasonlítottam a 2-tiouracilt tartalmazó és a normál dohánymozaik vírus stabilitását.

A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a 2-tiouracil nem gátolja sem a vírus-RNS szintézist, sem a virusképződést - ellentétben az irodalmi adatokkal - a virussal szimultán fertőzött protoplasztokban a fertőzés után közvetlenül adagolva sem, és a 2-tiouracil jelenlétében képződött vírusok 80%-a nem fertőzőképes. A virussal szimultán fertőzött protoplaszt rendszer az elsődlegesen vírusfertőzött sejtekben lejátszódó folyamatokat reprezentálja, kizárva a vírusok sejtről-sejtre történő terjedését.

A vírusfertőzött levél és protoplaszt rendszer segítségével kapott adatok azt mutatják, hogy a 2-tiouracillal kezelt vírusfertőzött levélben 60%-kal kevesebb sejt válik fertőzötté, mint a kontrolban.

A 2-tiouracilt tartalmazó és a normál dohánymozaik vírus stabilitásának összehasonlítása azt mutatja, hogy a virustisztításhoz általánosan használt tridesztillált vizes vagy foszfát

pufferes közegben a 2-tiouracilt tartalmazó dohánymozaik vírus törékenyebb a kontrolnál, így a virustisztítás során növekszik az ép vírusok relatív mennyisége a 2-tiouracilt tartalmazó virusmintában.

Részben az irodalmi adatok, részben az itt leírt kísérletek eredményei alapján azt mondhatjuk, hogy a 2-tiouracil gátló hatása valószínű több folyamat eredményeként jön létre: egyrészt, a 2-tiouracil hatására képződött vírusok 80%-a nem fertőzőképes, másrészt, a 2-tiouracil valamilyen módon hat a sejtmembrán szerkezetére, s ezáltal gátolja, akadályozza a vírusok terjedését a virusfertőzött levélben.



6. IRODALOM

1. Aoki, S. and Takebe, I. 1969: Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid.
Virology 39, 439-448.
2. Aoki, S. and Takebe, I. 1975: Replication of tobacco mosaic virus RNA in tobacco mesophyll protoplasts inoculated in vitro.
Virology 65, 343.
3. Backus, R.C. and Williams, R.C. 1950: Use of spraying methods of volatile suspending media in the preparation of specimens for electronmicroscopy.
J. Appl. Phys. 21, 11-15.
4. Barta, A., Föglein, F.J. and Sum, I.: 2-thiouracil is not an inhibitor of tobacco mosaic virus multiplication in synchronously infected protoplasts.
/előkészületben/
5. Bawden, F.C. and Kassanis, B. 1954: Some effects of thiouracil on virusinfected plants.
J. Gen. Microbiol. 10, 160-173.
6. Beachy, R.N. and Zaitlin, M. 1975: Replication of tobacco mosaic virus. VI. Replicative intermediate and TMV-RNA-related RNAs associated with polyribosomes.
Virology 63, 84-97.

7. Burgess, J., Motoyoshi, F. and Flemming, E.N. 1973: Effect of poly-L-ornithine on isolated tobacco mesophyll protoplasts: Evidence against stimulated pinocytosis. *Planta* 111, 199.
8. Clark, M.F. and Adams, A.N. 1977: Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant viruses.
J. Gen. Virol. 34, 475-483.
9. Cocking, E.C. 1960: A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles.
Nature 187, 927-929.
10. Cocking, E.C. 1966: An electron microscopic study of the initial stages of infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus.
Planta 68, 206-214.
11. Cocking, E.C. and Pojnar, E. 1969: An electron microscopic study of the infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus.
J. gen. Virol. 4, 305-312.
12. Cocking, E.C. 1972: Plant Cell Protoplasts - Isolation and Development.
Ann. Rev. Plant Physiol. 23, 29-50.
13. Commoner, B. and Mercer, F.L. 1951: Inhibition of biosynthesis of tobacco mosaic virus by thiouracil.
Nature 1968, 113-114.
14. Commoner, B. and Mercer, F.L. 1952: The effect of thiouracil on the rate of tobacco mosaic virus biosynthesis.
Arch. Biochem. Biophys. 35, 278-289.

15. Dawson, W.O. and Schlegel, D.E. 1975: Synthesis of tobacco mosaic virus in intact tobacco leaves systemically inoculated by differential temperature treatment. *Virology* 65, 565-573.
16. Dawson, W.O. and Schlegel, D.E. 1976: The sequence of inhibition of tobacco mosaic virus synthesis by actinomycin D, 2-thiouracil and cycloheximide in a synchronous infection. *Phytopathology* 66, 177-181.
17. Ellis, E.L. and Delbrück, M. 1939: The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 22, 365-384.
18. Engwall, E. and Perlmann, P. 1972: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109, 129-135.
19. Fleck, J., Durr, A., Lett, M.C. and Hirth, L. 1979: Changes in protein synthesis during the initial stage of life of tobacco protoplasts. *Planta* 145, 279.
20. Föglein, F.J., Kalpagam, C., Bates, D.C., Premecz, Gy., Nyitrai, Á. and Farkas, G.L. 1975: Viral RNA synthesis is renewed in protoplasts isolated from TMV-infected Xanthi tobacco leaves in an advanced stage of virus infection. *Virology* 67, 74-79.

21. Fraenkel-Conrat, H. and Singer, B. 1964: Reconstitution of tobacco mosaic virus. IV. Inhibition by enzymes and other proteins, and use of polynucleotides. *Virology* 23, 354-362.
22. Fraenkel-Conrat, H. and Williams, R.C. 1955: Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid component. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 41, 690-698.
23. Francki, R.I.B. and Matthews, R.E.F. 1959: Effect of thio-uracil on the infectivity of tobacco mosaic virus. *Biochim. Biophys. Acta* 34, 570-571.
24. Francki, R.I.B. 1960: Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus containing 2-thiouracil. *Virology* 10, 374-376.
25. Francki, R.I.B. 1962: The inhibition of plant virus multiplication in two host species by thiouracil. *Virology* 17, 1-8.
26. Francki, R.I.B. 1962: Infectivity of tobacco mosaic virus from tobacco leaves treated with 2-thiouracil. *Virology* 17, 9-21.
27. Francki, R.I.B. and Matthews, R.E.F. 1962: Relation between incorporation of 2-thiouracil into tobacco mosaic virus nucleic acid and virus inhibition. *Virology* 17, 22-29.
28. Furusawa, I. and Okuno, T. 1978: Infection with BMV of mesophyll protoplasts isolated from five plant species. *J. Gen. Virol.* 40, 489.

29. Geller, M., Pohorille, A. and Jaworski, A. 1973:
Electronic structure of thiouracils and their interaction with adenine.
Biochim. Biophys. Acta 331, 1-8.
30. Gooding, G.V. and Hiebert, T.T. 1967: A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities.
Phytopathology 57, 1285.
31. Grout, W.W., Willison, I.H.M. and Cocking, E.C. 1972:
Interaction at the surface of plant cell protoplasts; an electrophoretic and freezeetch study. In the role of membrane structure in biological energy transduction.
J. Bioenerg. /special issue/
32. Gulyás, A. and Farkas, G.L. 1978: Is cell-to-cell contact necessary for the expression of N-gene in *Nicotiana tabacum* nc. plants infected by TMV?
Phytopathol. Z. 91, 182.
33. Ingle, I. and Burns, R.G. 1968: The loss of ribosomal ribonucleic acid during the preparation of nucleic acid from certain plant tissues by the detergent-phenol method.
Biochem. J. 110, 605-606.
34. Jeener, R. 1957: Biological effects of the incorporation of thiouracil into the ribonucleic acid of tobacco mosaic virus.
Biochim. Biophys. Acta 23, 351-361.

35. Jeener, R. 1965: Effects on the antigenic determinants of tobacco mosaic virus of a small number of base replacements in the ribonucleic acid.
Virology 26, 10-15.
36. Harrison, B.D. 1955: Studies on the multiplication of plant viruses in inoculated leaves.
PhD thesis. Univ. London, London.
37. Hibi, T., Yora, K., Asuyama, H. 1968: TMV infection of *Petunia* protoplasts.
Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 34, 375./Abstr., in Japanese/
38. Kassanis, B. 1967: Plant tissue culture. In Method in Virology, ed. K. Maramorosch, H. Kaprowski, 1, 537-566. New York, Academic. 640 pp.
39. Kassanis, B. and White, R.F. 1974: A simplified method of obtaining tobacco protoplasts for infection with tobacco mosaic virus.
J. Gen. Virol. 24, 447-452.
40. Kassanis, B., White, R.F., Turner, R.H. and Woods, R.D. 1977: The mechanism of virus entry during infection of tobacco protoplasts with tobacco mosaic virus.
Phytopathol. Z. 88, 215.
41. Kopp, M., Geoffroy, P. and Fritig, B. 1979: Phenylalanine ammonia-lyase levels in protoplasts isolated from hypersensitive tobacco preinfected with tobacco mosaic virus.
Planta 146, 451-457.

42. Kubo, S., Harrison, B.D. and Robinson, D.I. 1974: Effect of phosphate on the infection of tobacco protoplasts by tobacco rattle virus.
Intervirology 3, 382-287.
43. Kulikowski, R.R. and Mascarenhos, J. P. 1978: RNA synthesis in whole cells and protoplasts of *Centaurea*.
Pl. Physiol. 61, 575.
44. Lázár, G., Borbély, Gy., Udvardy, J., Premecz, Gy., and Farkas, G.L. 1973: Osmotic shock triggers an increase in ribonuclease level in protoplasts isolated from tobacco leaves.
Plant Sci. Lett. 1, 53.
45. Loening, U.E. 1967: The fractionation of high molecular weight ribonucleic acid by polyakrilamide-gel electroforesis.
Biochim. J. 102, 251-257.
46. Matthews, R.E.F. 1956: Thiouracil in tobacco mosaic virus.
Biochim. Biophys. Acta 19, 559.
47. Mayo, M.A. and Roberts, I. M. 1978: Inoculation of tobacco protoplasts with tobacco rattle virus: Experiments with aggregates formed in inocula.
J. Gen. Virol. 40, 19.
48. Mayo, M.A. 1978: The effect of protoplasts concentration during the infection of tobacco protoplasts.
Intervirology 9, 184.
49. Meyer, M., Föglein, F.J. and Farkas, G.L. 1977: The effect of 2-thiouracil on viral RNA synthesis in tobacco leaves infected with TMV.
Phytopath. Z. 90, 139-146.



50. Motoyoshi, F. and Oshima, N. 1968: Multiplication of tobacco mosaic virus in suspension culture of tobacco cells.
Japan. J. Microbiol. 12, 317-320.
51. Motoyoshi, F. Bancroft, J.B., Watts, J.W. and Burgess, J. 1973: The infection of tobacco protoplasts with cowpea chlorotic mottle virus and its RNA.
J. Gen. Virol. 20, 177-193.
52. Motoyoshi, F., Hull, R. 1974: The infection of tobacco protoplasts with pea enation mosaic virus.
J. Gen. Virol. 24, 89-99.
53. Motoyoshi, F., Bancroft, J.B. and Watts, J.W. 1974: The infection of tobacco protoplasts with a variant of brome mosaic virus.
J. Gen. Virol. 25, 31-36.
54. Motoyoshi, F., Watts, J.W. and Bancroft, J.B. 1975: Factors influencing the infection of tobacco protoplasts by cowpea chlorotic mottle virus.
J. Gen. Virol. 25, 245-256.
55. Motoyoshi, F. Oshima, N. 1977: Expression of genetically controlled resistance to tobacco mosaic virus infection in isolated tomato protoplasts.
J. Gen. Virol. 34, 499.
56. Murakishi, H.H. 1968: Infection of tomato callus cells in suspension with TMV-RNA.
Phytopath. 58, 993-996.
57. Mühlbach, H.P., Camacho-Henriquez, A. and Sängner, H.L. 1977: Infection of tomato protoplasts by ribo-

nucleic acid of TMV and by viroids.

Phytopath. Z. 90. 289-305.

58. Nagata, T. and Melchers, G. 1978: Surface charge of protoplasts and their significance in cell-cell interaction.
Planta 142, 235.
59. Nichols, C.W. 1953: Thiouracil inhibition of tobacco mosaic virus multiplication.
Phytopathology 43, 555-557.
60. Nichols, C.W. 1954: Adsorption of thiouracil by tobacco leaf tissue and inhibition of tobacco mosaic virus multiplication.
Phytopathology 44, 92-93.
61. Nishiguchi, M., Motoyoshi, F. and Oshima, N. 1978:
Behaviour of a temperature sensitive strain of tobacco mosaic virus in tomato leaves and protoplasts.
J. Gen. Virol. 39, 53.
62. Okuno, T. and Furusawa, I. 1978: The use of osmotic shock for the inoculation of barley protoplasts with brome mosaic virus.
J. gen. Virol. 39, 187.
63. Okuno, T., Furusawa, I. 1978: Factors influencing the infection of barley mesophyll protoplasts with brome mosaic virus.
J. Gen. Virol. 41, 63-75.
64. Otsuki, Y., Takebe, I. 1969: Fluorescent antibody staining of tobacco mosaic virus antigen in tobacco mesophyll protoplasts.
Virology 38, 497-499.

65. Otsuki, Y. and Takebe, I. 1969: Isolation of intact mesophyll cells and their protoplasts from higher plants
Plant Cell Physiol. 10, 917-921.
66. Otsuki, Y., Takebe, I., Honda, Y. and Matsui, C. 1972:
Ultrastructure of infection of tobacco mesophyll
protoplasts by tobacco mosaic virus.
Virology 49, 188-194.
67. Otsuki, Y., Shimomura, T. and Takebe, I. 1972: Tobacco
mosaic virus multiplication and expression of the
N gene in necrotic responding tobacco varieties.
Virology 50, 45-50.
68. Otsuki, Y., Takebe, I. 1973: Infection of tobacco meso-
phyll protoplasts by cucumber mosaic virus.
Virology 52, 433-438.
69. Otsuki, Y., Takebe, I., Honda, Y., Kajita, S., and Matsui,
C. 1974: Infection of tobacco mesophyll protoplasts
by potato virus X.
J. Gen. Virol. 22, 375-385.
70. Otsuki, Y., Takebe, I. 1975: Double infection of isolated
tobacco leaf protoplasts with two strains of tobacco
mosaic virus.
In Induction Mechanism of Biochemical and Cytologi-
cal Response in Diseased Plants, ed. K. Tomiyama,
Tokyo Univ. Press, Tokyo
71. Otsuki, Y. and Takebe, I. 1976: Double infection of iso-
lated tobacco protoplasts by unrelated plant viruses
J. Gen. Virol. 30, 309.

72. Otsuki, Y., Takebe, I. 1976: Double infection of isolated tobacco leaf protoplasts by two strains of tobacco mosaic virus.
Biochemistry and Cytology of Plant-Parasite Interaction, Kodansha, Tokyo, 213.
73. Otsuki, Y. and Takebe, I. 1978: Production of mixedly coated particles in tobacco mesophyll protoplasts doubly infected by strains of tobacco mosaic virus.
Virology 84, 162-171.
74. Paterson, R. and Knight, C.A. 1975: Protein synthesis in tobacco protoplasts infected with TMV.
Virology 64, 10-22.
75. Power, I.B. and Cocking, E.C. 1969: A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase.
Proc. Biochem. Soc., Biochem. J. 111, 33.
76. Power, I.B. and Cocking, E.C. 1970: Isolation of leaf protoplasts: Macromolecule uptake and growth substances response.
J. Exp. Bot. 21, 64-70.
77. Ralph, R.K., Matthews, R.E.F. and Matus, A.J. 1965: Effect of 2-thiouracil on the formation of double-stranded plant viral ribonucleic acid.
Biochem. Biophys. Acta 108, 53-66.
78. Ralph, R.K. and Wojcik, S.J. 1976: Inhibition of turnip yellow mosaic virus synthesis by pyrimidine analogues.
Biochem. Biophys. Acta 444, 261-268.
79. Rappaport, I. and Wildman, S.G. 1957: A kinetic study of local lesion growth on *Nicotiana glutinosa* resulting

from tobacco mosaic virus infection.
Virology 4, 265-274.

80. Reddi, K.K. 1963: Studies on the formation of tobacco mosaic virus ribonucleic acid. II. Degradation of host ribonucleic acid following infection.
Proc. Nat. Acad. Sci. 50, 75-81.
81. Reddi, K.K. 1963: Studies on the formation of TMV-RNA. III. Utilisation of ribonucleosides of host ribonucleic acid.
Proc. Nat. Acad. Sci. 50, 419-425.
82. Reddi, K.K. 1964: Studies on the formation of TMV-RNA. IV. Rate of synthesis of virus-induced proteins and ribonucleic acid following infection.
Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 619-626.
83. Reddi, K.K. 1964: Studies on the formation of TMV-RNA. V. Presence of TMV in the nucleus of the host cell.
Proc. Nat. Acad. Sci. 52, 397-401.
84. Reddi, K.K. 1966: Studies on the formation of TMV-RNA. VII. Fate of TMV after entering the host cell.
Proc. Nat. Acad. Sci. 55, 593-598.
85. Reddi, K.K. 1969: Studies on the formation of TMV-RNA. VIII. Fate of parental viral RNA in the host cell.
Proc. Nat. Acad. Sci. 62, 604-611.
86. Romaine, C.P. and Zaitlin, M. 1978: RNA-dependent RNA-polymerases in uninfected and tobacco mosaic virus-infected leaves: Virus induced stimulation of a host polymerase activity.
Virology 86, 241-253.

87. Ruzicska, P., Mettrie, R. Dorokhov, Y.L., Premecz, Gy., Oláh, T. and Farkas, G.L. 1979: Polyribosomes in protoplasts isolated from tobacco leaves. *Planta* 145, 199.
88. Sakai, F., Takebe, I. 1970: RNA and protein synthesis in protoplasts isolated from tobacco leaves. *Biochem Biophys. Acta* 224, 531-540.
89. Sakai, F. and Takebe, I. 1972: A non-coat protein synthesized in tobacco mesophyll protoplasts infected by tobacco mosaic virus. *Mol. Gen. Genet.* 118, 93-96.
90. Sakai, F. and Takebe, I. 1974. Protein synthesis in tobacco mesophyll protoplasts induced by tobacco mosaic virus infection. *Virology* 62, 426-433.
91. Sarkar, S., Upadhyya, M.D. and Melchers, G. 1974: A highly efficient method of inoculation of tobacco mesophyll protoplasts with ribonucleic acid of tobacco mosaic virus. *Mol. Gen. Genet.* 135, 1-9.
92. Shaw, J.G. 1978: The influence of protoplasts concentration on retention of tobacco mosaic virus by tobacco protoplasts. *Virology* 84, 544-546.
93. Sum, I., Németh, M. and Pacsa, A.S. 1979: Detection of maize dwarf mosaic virus with enzyme-linked immunosorbent assay /ELISA/. *Phytopath. Z.* 95, 274-278.

94. Suzuki, M., Takebe, I., Kajita, S., Honda, Y. and Matsui, C.
1977: Endocytosis of polystyrene spheres by tobacco leaf protoplasts.
Exptl. Cell. Res. 105, 127.
95. Takebe, I. Otsuki, Y. and Aoki, S. 1968: Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state.
Plant Cell Physiol. 9, 115-124.
96. Takebe, I. and Otsuki, Y. 1969: Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus.
Proc. Nat. Acad. Sci. 64, 843-848.
97. Takebe, I. Otsuki, Y., Honda, Y., Nishio, T. and Matsui, S.
1973: Fine structure of isolated mesophyll protoplasts of tobacco.
Planta 113, 21-27.
98. Takebe, I., Otsuki, Y., Honda, Y. and Matsui, S. 1974:
Penetration of plant viruses into isolated tobacco leaf protoplasts.
Proc. 1st Intersect. Congr. Int. Assoc. Microbiol. Soc., ed. Hasegawa, 3, 55-64. Tokyo, Jpn. Assoc. Microbiol. 5 vols. 662 pp.
99. Takebe, I. 1975: The use of protoplasts in plant virology.
Ann. Rev. Phytopath. 13, 105-125.
100. Takebe, I. 1979: Protoplasts as a host cell system for plant viruses.
101. Van Slogteren, D.H.M. 1955: Serological microreactions with plant viruses under paraffin oil.
Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, 1954. 51-54.

102. Van Weemen, B.K. and Schurs, A.H.W.M. 1972: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.
FEBS Letters 15, 232-235.
103. Voller, A., Bartlett, A., Bidwoll, D.E., Clark, M.F. and Adams, A.N. 1976: The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay /ELISA/.
J. Gen. Virol. 33, 165-167.
104. Watts, I.N., Motoyoshi, F., and King, I. 1974: Problems associated with the production of stable protoplasts of cells of tobacco mesophyll.
Ann. Bot. 38, 667-671.
105. Weintraub, M. and Ragetli, H.W.J. 1964: Studies on the metabolism of leaves with localised virus infection. Particulate fractions and substrates in TMV infected *Nicotiana glutinosa*.
Can. J. Bot. 42, 533-540.



Köszönetet mondok Dr. Farkas Gábor akadémikusnak, hogy lehetővé tette számomra a doktori értekezés elkészítését. Szívből köszönöm Dr. Föglein Ferenc tud. munkatársnak, hogy sokrétű tapasztalatait átadta, értékes elméleti és gyakorlati tanácsaival hozzájárult tudásom gyarapításához.

Megköszönöm Sum István tud. segédmunkatársnak az ELISA módszer elsajátításában nyújtott segítségét.