

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

KÜNSTLER ANDRÁS

MOSONMAGYARÓVÁR
2012

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

KÜNSTLER ANDRÁS

MOSONMAGYARÓVÁR
2012

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Egyes növényi rezisztenciaformák biokémiai és
molekuláris biológiai mechanizmusának feltárása**

Írta:

Künstler András

**NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG-ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR
MOSONMAGYARÓVÁR**

Precíziós Növénytermesztési Módszerek Doktori Iskola

Doktori Iskola vezető:
Dr. Neményi Miklós akadémikus
egyetemi tanár, rektorhelyettes

***Növényvédelmi módszerek és növénykezelések precíziós
termelésorientált integrálása program***

Programvezető:
Dr. Reisinger Péter CSc
egyetemi tanár

Témavezető:
Dr. Király Lóránt Ph.D.
tud. főmunkatárs

**MOSONMAGYARÓVÁR
2012**

**Egyes növényi rezisztenciaformák biokémiai és molekuláris
biológiai mechanizmusának feltárása**

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:

Künstler András

Készült a Nyugat-Magyarországi Egyetem

Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar

”Precíziós növénytermesztési módszerek” Alkalmazott

Növénytudományi Doktori Iskola

”Növényvédelmi módszerek és növénykezelések precíziós termelésorientált
integrálása program” programja keretében.

Témavezető: Dr. Király Lóránt

Elfogadásra javaslom (igen/nem)

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton%-ot ért el,

Mosonmagyaróvár,

a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen/nem)

Első bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

Második bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Mosonmagyaróvár,

.....

a Bírálóbizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése

.....

Az EDT elnöke

KIVONAT

Egyes növényi rezisztenciaformák biokémiai és molekuláris biológiai mechanizmusának feltárása

Szerző disszertációjában a növény nem specifikus és specifikus rezisztenciájának biokémiai és molekuláris hátterét vizsgálta. Az általános (nem specifikus) rezisztenciaformák közül a nemgazda-rezisztencia és a nekrotikus betegségtünetekkel szemben hatásos ellenálló képesség egyik típusának mechanizmusát vizsgálta. Ezenkívül a specifikus rezisztencia egyik formáját elemezte, mégpedig azt, hogy az *N*-rezisztenciagén csendesítése milyen hatással van két, egymással nem rokon vírus fertőzésére.

A nem specifikus rezisztenciaformák közül szerző a tünetmentes nemgazda-rezisztenciát hasonlította össze a specifikus, hiperszenzitív reakcióval párosuló gazda-rezisztenciával, ill. a fogékonysággal. Ezen vizsgálatok homlokterében a rezisztencia jelenségekkel összefüggő reaktív oxigén fajták (ROS) szerepének vizsgálata állt. A kísérletek szerint olyan inkompatibilis gazda/patogén kombinációkban, ahol az ellenálló képesség a hiperszenzitív reakció (HR) kialakulásával párosul, a reaktív oxigénfajtáknak (ROS) központi szerepe van, mert 48 órával a fertőzések után a szuperoxid-anion ($O_2^{\cdot-}$) felhalmozódik. A tünetmentes nemgazda-rezisztens kombinációkban, ahol a növény egyáltalán nem alkalmas a betegség kialakulására, a szuperoxid jóval korábban, a fertőzések után kb. 24 óra múlva halmozódik fel. Ez utóbbi esetben a szuperoxid patogéneket ölő hatása korán érvényesül, és a növény tünetmentes marad. A fertőzött nemgazda-rezisztens növényekben a NADPH-oxidáz is korán aktiválódik.

Ez az enzim a szuperoxid-képzésben központi szerepet tölt be. A fogékony gazda/patogén kombinációkban a szuperoxid egyáltalán nem akkumulálódik a fertőzés során. E vizsgálatok homlokterében a nemgazda-rezisztencia jelenségével összefüggő ROS szerepének a tisztázása állt.

A nekrotikus tünetekkel szembeni szintén nem specifikus ellenálló képesség viszont a növény fokozott antioxidáns kapacitásával illetve jelentős szalicilsav felhalmozódásával jellemezhető. A *Nicotiana edwardsonii* dohánynövény egyik változata, a var. Columbia rezisztenciája azonban a dohány nektrózis vírus (TNV) és a dohány mozaik vírus (TMV) lokális nekrotikus tüneteivel (HR) szemben azért (is) lehet hatásos, mert a var. Columbia dohánynövények már egészségesen is, de a vírusfertőzés után még kifejezettebben, nagymértékű szalicilsav-felhalmozódást mutatnak. A szalicilsav mesterséges csökkentése a rezisztencia megszűnésével vagy jelentős csökkenésével jár együtt. A 'Columbia' növényekben a TNV replikációja is jelentősen gátlódik, nem csak a tünetek szorulnak vissza. Ez a szalicilsavval összefüggő rezisztencia, amely a var. Columbia növényeket jellemzi, olyan nekrotikus tünetekkel szemben is érvényesül, amelyeket két baktériumfaj, ill. egy abiotikus stressz (paraquat-stressz) idéz elő. A baktériumos fertőzéseknel a 'Columbia' növények fokozott rezisztenciája a kórokozó szaporodásgátlásában is megnyilvánult.

A specifikus rezisztencia egyik formája a géncsendesítéssel kapcsolatos jelenség. A TMV-vel szemben hatásos *N*-rezisztenciagén csendesítése ("gene silencing") a *Nicotiana edwardsonii*-ban a várakozásnak megfelelően fokozza a TMV terjedését, azaz csökkenti a rezisztenciát. Ezzel szemben a nem rokon TNV fertőzésekor éppen ellenkező hatás jelentkezik: az *N*-gén csendesítése ebben az esetben fokozza a rezisztenciát, azaz csökkenti a tüneteket és a vírus mennyiségét. Ezek

szerint egy adott vírus ellen ható rezisztenciagén - vagy egy ahhoz nagymértékben hasonló nukleotid szekvenciájú gén - terméke egy másik vírus fertőzésekor fogékonysági faktorként hathat.

ABSTRACT

Biochemical and molecular mechanisms of different forms of plant disease resistance

This dissertation is dealing with the mechanism of two types of non-specific disease resistance: non-host plant resistance and a special type of symptom's resistance effective to tissue necrotization. In addition, the author investigated a form of specific resistance, namely the effect of gene silencing of a virus resistance gene (*N* gene) on the replication and movement of a host virus and a non-related virus.

According to the results obtained from several host/pathogen combinations, one can summarize the possible role of reactive oxygen species (ROS) in two types of plant resistance and plant susceptibility as follows: in the case of the common plant host resistance associated with the hypersensitive response (HR), accumulation of a reactive oxygen species, the superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), occurs 48 hours after inoculation. If the plant is a non-host for the infecting pathogen, the mechanism of disease resistance is associated with an early accumulation of $O_2^{\bullet-}$ after infection ("non-host resistance"). In this case the pathogen is arrested or killed very early (24 hours after infection), and this seems to be the cause of the lack of necrotic symptoms. In the infected non-host resistant symptomless plants the early activation of an enzyme, NADPH-oxidase, occurs, which has a pivotal role in the production of $O_2^{\bullet-}$. In compatible host/pathogen combinations where the plant exhibits susceptibility, there is no accumulation of superoxide. Thus, superoxide seems to have a central biochemical role in the direct inhibition or killing of pathogens in resistant plants.

Generally speaking, resistance of plants to necrotic symptoms is associated with the activation of plant antioxidant capacity and high levels of salicylic acid. However, a relatively new variety of *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia exhibits resistance to both virus replication and symptom production caused by *Tobacco necrosis virus* (TNV) and *Tobacco mosaic virus* (TMV) because Columbia plants exert a high salicylic acid activity. These plants have high salicylic acid contents both in healthy or infected states. Artificial decrease in salicylic acid contents results in lack of resistance or substantial reduction of virus resistance. The Columbia plants exhibit resistance also to necrotic symptoms caused by two pathogenic bacterial species and to paraquat induced abiotic stress.

Gene silencing of the resistance gene *N* in *Nicotiana edwardsonii* is specifically effective against TMV and produces an unexpected action on a non-related virus, TNV. Gene silencing of the *N* gene results in reduction of resistance to TMV infection because it stimulates systemic movement of the virus within the plant. On the contrary, in case of TNV-infection, gene silencing of the *N* gene reduces replication of the virus, stimulating thereby virus resistance.

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés és szakirodalmi összefoglaló.....	7
Bevezetés.....	7
Szakirodalmi összefoglaló.....	10
Anyag és módszer.....	28
Eredmények és azok értékelése.....	43
Kísérleti eredmények.....	43
A nemgazda-rezisztencia és a gazdarezisztencia lényegének tisztázása.....	43
Nekrotikus tünetekkel szembeni rezisztencia.....	55
A dohány mozaik vírus (TMV) ellen ható <i>N</i> rezisztenciagén csendesítésének hatása a nem rokon dohány nekrosis vírus (TNV) által előidézett fertőzésre.....	69
Értékelés.....	77
A nemgazda-rezisztencia mechanizmusa.....	78
Nekrotikus tünetekkel szembeni rezisztencia.....	83
Az <i>N</i> rezisztenciagén csendesítésének nem várt hatása.....	88
Összefoglalás.....	92
Új tudományos eredmények.....	96
Köszönetnyilvánítás.....	99
Irodalomjegyzék.....	100
Az értekezés témaköréhez kapcsolódóan megjelent tudományos közlemények.....	120

BEVEZETÉS ÉS SZAKIRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

BEVEZETÉS

A növényekben az evolúció során sokféle rezisztenciaforma alakult ki az őket támadó kórokozókkal szemben. A növényi betegségekkel szembeni rezisztencia különböző formáit az **1. táblázat** foglalja össze.

1. táblázat

A növényi rezisztencia formái (cf. Király et al., 2007)

A rezisztencia formái	Mechanizmus
VELESZÜLETETT (<i>innate</i>) REZISZTENCIA	
Nem specifikus (általános) rezisztencia	
- Nembgazdanövény-rezisztencia	HR, ROS, BAX-inhibitor, PEN gének
- Alap (bazális) rezisztencia baktériumok ellen	Flagellin/FLS2 interakció, ROS, antimikrobiális vegyületek
- Nem rasszspecifikus <i>mlo</i> rezisztencia és kvantitatív rezisztencia (lassú sporulálás) gombapatogének ellen	Sejtfalvastagodás, antimikrobiális vegyületek, ROS
- Nekrózisos tüneteket okozó stresszek elleni rezisztencia	Nagy antioxidáns kapacitás
Specifikus rezisztencia (fajta / patogén rassz specificitás)	
- Extrém rezisztencia (tünetmentes gén-génnel szembeni rezisztencia)	Ismeretlen
• <i>Rx</i> vírusrezisztencia HR nélkül	
•Tünetmentes rozsdarezisztencia HR nélkül	
- Gén-génnel szembeni rezisztencia (<i>R</i> -gén/ <i>Avr</i> -gén kölcsönhatás) HR-rel	ROS, fitoalexinek, fenoloxidáció, stresszproteinek
- Rezisztencia a patogének toxinjai ellen	Enzimes detoxifikálás, toxinreceptorok hiánya
- Géncsendesítés	Idegen RNS felismerése és lebontása ribonukleázokkal
SZERZETT (<i>acquired</i>) REZISZTENCIA	
Egy primér fertőzés után szerzett rezisztencia egy második fertőzés ellen „Stressz-memória”	Szalicilsav, antioxidánsok, géncsendesítés, rizobaktériumok

Különbséget kell tennünk veleszületett (*innate*) rezisztencia, ill. immunitás és szerzett (*acquired*) rezisztencia között. A veleszületett rezisztencia lehet (1) számos kórokozóval szemben ható általános, azaz nem specifikus ellenállóság, és lehet (2) specifikus ellenállóság, amely annyit jelent, hogy egy adott növényfajta rezisztens a patogén egy vagy néhány adott törzsével (patogén rasszával) szemben.

A növényvilágban a legáltalánosabb, nem specifikus ellenállósági forma az ún. nemgazdanövény-rezisztencia (Heath, 2000; Kamoun, 2001; Nürnberger és Lipka, 2005), amikor egy adott növényfaj minden egyede ellenáll a legtöbb kórokozó faj valamennyi törzsével szemben. Ez az általában tünetmentes rezisztencia igen tartós és gyakori, hiszen a legtöbb növény ellenáll a legtöbb kórokozóval szemben.

Egy másik nem specifikus (általános) rezisztenciaforma az ún. nekrotikus tünetekkel szembeni ellenállóság, melyben általában csak tüneti szinten mutatnak rezisztenciát a növények (Balázs et al., 1977; Doss és Hevesi, 1981; Barna et al., 1993, 2008; Naylor et al., 1998; Devadas és Raina, 2002). A rezisztencia kialakulásában elsősorban a szalicilsavnak és egyes antioxidánsoknak van meghatározó szerepe (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990; Barna et al., 1993; Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994; Fodor et al., 1997; Király et al., 2002).

A specifikus rezisztencia egyik formája az ún. poszttranszkripcionális géncsendesítés (PTGS) mechanizmusán alapul (cf. Barna és Király 2004; Ding et al., 2004). Ez a folyamat egyaránt működik növényekben és állatokban, és az evolúció során a „parazita” nukleinsavak, így a viroidok, vírusok és a transzpozonok ellen alakult ki. A PTGS valójában egy nukleinsavszinten működő immunitásnak tekinthető.

Disszertációmban az általános (nem specifikus) ellenállósági formák közül a nemgazda-rezisztencia és a nekrotikus betegségtünetek ellen hatásos rezisztencia egyik típusának biokémiai, molekuláris biológiai mechanizmusát kívántam feltárni.

A specifikus rezisztencia egyik típusát vizsgálva tisztázni kívántam azt is, hogy egy adott vírus ellen hatásos rezisztencia gén csendesítése milyen hatással lehet egy másik, nem rokon vírus által előidézett fertőzésre?

Disszertációm fő célkitűzései a következők voltak:

1. Egyes prooxidánsok (reaktív oxigénfajták, ROS), elsősorban a szuperoxid és antioxidánsok szerepének tisztázása tünetmentes nemgazda-rezisztencia során. Prooxidánsokat, antioxidánsokat, ill. egy programozott sejthalálgátló fehérjét kódoló gének expressziójának vizsgálata rezisztens árpa árpalisztharmatos, ill. búzalisztharmatos fertőzése során.
2. A *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia fajhibrid által vírusfertőzéseknél mutatott tüneti (nekrózis) rezisztencia együtt jár-e a vírusfelhalmozódás gátlásával? A *N. edwardsonii* var. Columbia tüneti rezisztenciája hatásos-e más kórokozók és abiotikus stressz által előidézett nektrózisokkal szemben is? A nekrotikus tünetekkel szembeni rezisztencia kialakulásában szerepet játszanak-e az antioxidánsok, illetve a szalicilsav?
3. Egy adott vírussal (dohány mozaik vírus, TMV) szemben hatásos rezisztenciagén (*N*) csendesítése hatással lehet-e egy másik, nem rokon vírus (dohány nektrózis vírus, TNV) fertőzésére?

SZAKIRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

A növényi ellenálló képességgel kapcsolatban az első beszámoló 110 évvel ezelőtt jelent meg (Ward, 1902). Itt egy olyan „immunreakcióról” van szó, amely a rozsok barnarozsdával szembeni rezisztencia tényét ismerteti. Ezt a reakciót később Stakman (1915), aki a búza szárrozsdájával foglalkozott, hiperszenzitív reakciónak (HR) nevezte el, mert az ellenálló képesség kapcsolódott egy szimptomával, amely szövetnekrózisok gyors kialakulásában nyilvánult meg. Később a HR-t vírusos fertőzések (Holmes, 1929) valamint baktériumos fertőzések (Klement et al., 1964) esetében is bizonyították.

A legismertebb és leginkább kutatott növényi rezisztenciaforma a gén-génnel szembeni specifikus rezisztencia. E rezisztenciaforma felhasználásával a kutatók több rezisztens növényfajtát tudtak előállítani, ám hamar kiderült, hogy az ilyen típusú ellenálló képesség egy adott kórokozó csak egyetlen vagy néhány rasszával szemben biztosít rezisztenciát, és a kórokozó új törzsek kialakításának segítségével hamar le tudja törni a növény ezen típusú védekezését (Flor, 1971; Martin et al., 2003; Mudgett, 2005; Ellis et al., 2006; Bent és Mackey, 2007). A kutatók ekkor kezdtek el érdeklődni más rezisztenciaformák irányában, melyek általános (nem specifikus) rezisztenciát biztosítanak több kórokozóval szemben, és a specifikus rezisztenciánál tartósabbak.

A növények általános, azaz nem specifikus rezisztenciája (Abramovich et al., 2006) az állatok veleszületett („innate”) immunrendszeréhez hasonló feladatot lát el. Bár a humán immunológiában csak jóval az adaptív immunrendszer (Morel et al., 1991) felfedezése után jöttek rá a veleszületett immunrendszer lényeges szerepére. Az emberi és

állati immunrendszeren belül tehát két immunitási típust lehet megkülönböztetni: a veleszületett („innate”) immunitást és az adaptív immunitást: az előbbi esetében az állati szervezet kórokozót érzékelő szenzorok, az ún. mintafelismerő receptorok („pattern recognition receptors”, PRR), amelyek a mikroorganizmusokban található stabilis molekuláris mintákat detektálják. Ezeket a molekuláris mintákat az orvosi immunológiában patogénekkal kapcsolatos mintáknak („pathogen-associated molecular patterns”, PAMP) nevezik. A veleszületett felismerő immunrendszer nem specifikus, és genetikailag programozott. Ezzel szemben az adaptív immunrendszer, amely szomatikus rekombináción alapul, olyan antigén receptorokkal (T és B limfociták) működik, amelyeket az állat *de novo* generál a fertőzés után. Ezek nincsenek genetikailag kódolva, hanem adaptív módon alakulnak ki. Az adaptív immunválasz tehát nagymértékben specifikus. A veleszületett immunrendszer a támadó kórokozók nagy részét gátolja vagy elpusztítja. Abban az esetben, ha ez nem sikerül, akkor a specifikus adaptív immunválasz beindítását és a két rendszer összehangolását végzi el (Iwasaki és Medzhitov, 2010; Vivier et al., 2011). Egyre több adat utal arra, hogy a növények esetében is egymásra épülnek az általános és specifikus rezisztencia folyamatai (Ausubel, 2005; Abramovich et al., 2006; Tsuda és Katagiri, 2010; Deller et al., 2011; Maekawa et al., 2011; Spoel és Dong, 2012), bár az adaptív immunitási mechanizmus a növényekben nem ismert.

A nemgazdanövény-rezisztencia jelentősége – a reaktív oxigénfajták és antioxidánsok lehetséges szerepe

A nemgazdanövény-rezisztencia a legáltalánosabb ellenállósági forma a növényvilágban a kórokozók támadásával szemben (Heath, 2000; Kamoun, 2001; Nürnberger és Lipka, 2005). Ez azt jelenti, hogy egy kórokozó összes patogén rasszával szemben rezisztenciát mutat egy adott növényfaj minden egyede, vagyis a növény nem alkalmas arra, hogy a patogén gazdanövénye legyen. Ez valójában egy igen tartós ellenállóképesség, és ez a forma a leggyakoribb a természetben, hiszen a legtöbb növény ellenálló a legtöbb kórokozóval szemben. A sikeres fertőzés és a növényi betegség kialakulása tulajdonképpen ritka eset, gyakorlati szempontból azért mégis fontos jelenség.

A nemgazda-rezisztencia jelensége ugyan régóta ismert, de a mechanizmussal kapcsolatban eddig hiányoznak a meggyőző érvek (Chisholm et al., 2006; Jones és Dangl, 2006; Schulze-Lefert és Panstruga, 2011). Az ellenállóképesség olykor párosul a hiperszenzitív reakcióval (lokális sejt-, ill. szöveti nekrotizáció, HR), de általában nincs látható tünet (lásd pl. Mysore és Ryu, 2004). Smedegaard-Petersen és Stølen (1981) elsőként mutatta ki, hogy az árpalevél felületén élő különböző mikroorganizmusok ugyan igyekeznek behatolni a nemgazdanövény szövetei közé, de nem tudnak előidézni semmilyen tünetet, vagyis nem betegítik meg a nemgazdanövényt. Legalábbis a behatolási kísérletnek nincs látható következménye a növényben. Kísérleteik azonban kimutatták, hogy az ilyen nemgazdanövények sejtlégzése fokozódik, de ennek jelentőségét eddig nem sikerült tisztázni. Feltételezhető, hogy ebben az esetben a HR-nek olyan esetével állunk szemben, amelynek nincs látható tünete, de

kapcsolatban lehet a nemgazda-rezisztenciával. Egy másik közlemény azt is felveti, hogy a nemgazda-rezisztencia a szalicilsav lebontásától függ (van Wees és Glazebrook, 2003). Legújabb kutatási eredmények szerint a glukozinolátok is szerepet játszhatnak a nemgazda-rezisztenciában (Bednarek et al., 2009; Schulze-Lefert és Panstruga, 2011). Hangsúlyozandó viszont, hogy a nemgazda-rezisztencia mechanizmusának lényege, vagyis az a kérdés, hogy mi gátolja vagy öli meg a kórokozót, ezekből a kísérletekből nem derült ki.

Az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében, a Kóréletani és a Biotechnológiai Osztályok közös projektje során azt a célt tűztük ki, hogy a reaktív oxigénfajták (ROS) illetve az antioxidánsok szerepét igyekezzünk tisztázni a tünetmentes nemgazda-rezisztencia esetében, összehasonlítva ezt az ellenállósági esetet az általánosan ismert (HR-tüneteket mutató) gazda-rezisztenciával, illetve a fogékonyság esetével. Azért vizsgáltuk a reaktív oxigénfajták (ROS) nemgazda-rezisztenciában játszott lehetséges funkcióját, mert újabban számos kutatás bizonyította, hogy a ROS (esetleg az antioxidánsok módosító hatásával kombinálva) lényeges szerepet kaphat a növényi rezisztenciában, azaz a kórokozók gátlásában, de olykor a tünetek visszaszorításában is (Doke, 1983; Doke és Ohashi, 1988; Ádám et al., 1989; Levine et al., 1994; Wu et al., 1995; Chamnongpol et al., 1998; Hafez és Király, 2003; Apel és Hirt, 2004).

A növények előbb vagy utóbb reagálnak arra a számos környezeti hatásra (szárazság, hőmérsékletváltozás, kórokozó fertőzés) melyekkel életük során találkoznak. A különböző hatásokra válaszul többek között a növény anyagcsere folyamatai is módosulnak, stressz- anyagcsere folyamatok indulnak be, melyekben legtöbbször megfigyelhető a reaktív oxigénfajták (ROS) felhalmozódása, amely oxidatív stresszhez vezet.

Oxidatív stressz során a növényben felborul a ROS (prooxidánsok) és az antioxidánsok közötti egyensúly a ROS javára. A reaktív oxigénfajták közé tartoznak a párosítatlan elektronnal rendelkező oxigén szabadgyökök (pl. $O_2^{\cdot-}$, OH) valamint olyan molekulák, mint a H_2O_2 és a szingulett oxigén (1O_2), melyekből reakcióik során szabad gyökök képződnek.

Reaktív oxigén fajták keletkezésének forrásai növényekben:

- Fotoszintézis PSI és PSII fotokémiai rendszere (Asada és Takashi, 1987).
- Légzési elektron transzport lánc (Dat et al., 2000, Maxwell et al., 1999).
- Glikolát oxidáz (Corpas et al., 2001).
- NADPH-oxidáz (Hammond-Kosack és Jones, 1996, Grant és Loake 2000).
- Oxalát oxidáz (Dat et al., 2000).
- Xanthine oxidáz (Corpas et al., 2001).
- Amin oxidáz (Allan és Fluhr, 1997).
- Zsírsvak β -oxidációja (Corpas et al., 2001)

Reaktív oxigénfajták folyamatosan képződnek az egészséges növényekben is anyagcseréjük melléktermékeként, de a növények aktívan is képesek reaktív oxigénfajták előállítására kórokozók támadása esetén. Doke volt az első, aki felhívta a figyelmet a reaktív oxigénfajták közül a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) növény-kórokozó kapcsolatokban játszott szerepére. Kísérleteiben megfigyelte, hogy inkompatibilis *Phytophthora infestans*-ból származó hifa sejtfal komponensek (hyphal wall components, HWC) szuperoxid termelődést váltanak ki burgonya protoplaszt tenyészetben, tehát

rezisztencia esetén szuperoxid felhalmozódást detektált. Azonban, ha kompatibilis *Phytophthora infestans*-ból származó vízben oldódó glükánokat (water soluble glucans, WSG) adott a protoplaszt tenyészetéhez, nem tapasztalt szuperoxid felhalmozódást, tehát a fogékonyságot a szuperoxid hiánya jellemezte (Doke, 1983). Doke volt az első, aki felhívta a figyelmet a NADPH-oxidázokra is, mint a betegségellenálló növény szuperoxid termelődésében szerepet játszó fő komponensekre (Doke, 1982). Úgy vélte, hogy inkompatibilis vírusfertőzés során szintén NADPH-oxidáz függő szuperoxid felhalmozódás tapasztalható. A kompatibilis növény-vírus kapcsolatban viszont nem volt szuperoxid akkumuláció. Ebben a kísérletben (Doke és Ohashi, 1988) *N* rezisztencia gént tartalmazó dohányokat fertőztek dohány mozaik vírussal (TMV). A fertőzést követően a növényeket 30 °C-ra helyezték, ez a hőmérséklet megakadályozta a szuperoxid felhalmozódást és a lokális nekrotikus tünetek (HR) kialakulását, miközben a vírus terjedni tudott a növényben. Harminchat órával később a növényeket visszahelyezték 20 °C-ra és azonnali szuperoxid felhalmozódást tapasztaltak, majd 6-7 órával később gyűrű alakú nekrotikus foltok jelentek meg a leveleken, a növények tehát visszanyerték vírusrezisztenciájukat. Ezek a korai kísérletek már az 1980-as évek végén rámutattak a reaktív oxigénfajták (elsősorban a szuperoxid) növényi rezisztencia folyamatokban betöltött jelentős szerepére.

Az egyik leginkább ismert ROS, a szuperoxid termelődéséért felelős növényi enzimek a NADPH-oxidázok (Marino et al., 2012). A NADPH-oxidázok a sejtmembránban található hat alegységből álló enzim komplexek, melyek a szuperoxid termelődést a következő reakció során katalizálják (Sagi és Fluhr, 2006): $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+$. A kórokozók a fertőzés során különböző jelátviteli utakon keresztül

indíthatják be a NADPH-oxidázok aktiválódását. Az egyik ilyen ismert jelátviteli út a kalcium-függő protein kinázokon (CDPK) keresztül történő NADPH-oxidáz aktiváció (Yoshioka et al., 2011). A NADPH-oxidázok hatása a betegséggellenállóságra eltérő lehet biotróf és nekrotróf kórokozók fertőzése során (Marino et al., 2012). Biotróf kórokozók fertőzése esetén a NADPH-oxidáz gének kifejeződésének hiánya csökkent rezisztenciával jár együtt pl: *Arabidopsis thaliana*/*Golovinomyces cichoracearum* (Berrocal-Lobo et al., 2010) vagy *Hordeum vulgare*/*Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Proels et al., 2010). Nekrotróf kórokozókkal fertőzött NADPH-oxidáz hiánymutáns növényekben a rezisztencia nem változik vagy fokozódik pl: *Arabidopsis thaliana*/*Alternaria brassicicola* (Pogány et al., 2009), illetve *Nicotiana benthamiana*/*Botrytis cinerea* (Asai és Yoshioka 2009).

A nemgazda-rezisztenciával kapcsolatban csak az utóbbi években jelentek meg szakirodalmi eredmények a ROS szerepéről. Az első közlemény ezzel kapcsolatban 1998-ból származik: H₂O₂ felhalmozódást figyeltek meg II-es típusú (lokális nekrotikus tünetekkel, azaz HR-rel együttjáró) nemgazda-rezisztencia esetén *Lactuca sativa* /*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* kapcsolatban (Bestwick et al., 1998). Yoda és munkatársai (2009) bizonyították a poliaminok és a H₂O₂ szerepét a HR-t eredményező nemgazda-rezisztenciában: baktériumfertőzés hatására (*Nicotiana tabacum*/*Pseudomonas cichorii*) poliaminok halmozódtak fel a növény apoplastjában, és megnőtt a poliamin oxidáz aktivitás is. A poliaminok oxidációja H₂O₂ képződéshez vezetett az apoplastban a HR-t eredményező nemgazda-rezisztencia során. Ha a poliamin oxidáz gént a növényben csendesítették, a HR tünetek eltűntek, a H₂O₂ mennyisége csökkent, míg a baktériumszám emelkedett. Ezek szerint tehát a H₂O₂ valóban jelentős szerepet játszik a HR tünetekkel járó nemgazda-

rezisztenciában (Yoda et al., 2009). Szintén 2009-ben jelent meg egy cikk a kloroplasztiszból termelődő ROS szerepéről a HR-t eredményező nemgazda-rezisztenciában (Zurbriggen et al., 2009). A kísérletek szerint *Nicotiana tabacum/Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* nemgazda-kórokozó kapcsolatban a kloroplasztiszból származó ROS szükséges a lokális sejthalál kialakulásához. Egy későbbi cikkükben (Zurbriggen et al., 2010) arra a következtetésre jutottak, hogy a HR tünetekkel járó nemgazda-rezisztenciánál a kloroplasztiszból származó ROS szignál aktiválja a sejtmembránban található NADPH-oxidázt, és ez a reakciósor vezet a lokális sejthalálhoz. Kwak és munkatársai (2009) szerint HR-t eredményező nemgazda-rezisztenciában (*Capsicum annuum/Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* nemgazda-kórokozó kapcsolatban) mind a szuperoxid, mind a H_2O_2 korábban halmozódik fel, mint gazda-rezisztencia esetén.

A tünetmentes (I-es típusú) nemgazda-rezisztencia esetében, ahol nem tapasztalunk szabad szemmel látható lokális nekrotizálódást, még kevesebb irodalmat találunk a reaktív oxigénfajták szerepéről. Lisztharmatfertőzés által kiváltott nemgazda-rezisztenciánál (*Hordeum vulgare/Blumeria graminis* f.sp. *tritici* nemgazda-kórokozó kapcsolatban) H_2O_2 felhalmozódás volt megfigyelhető a gomba behatolásának helyén (Hückelhoven et al., 2001a). Hasonló, lokális H_2O_2 felhalmozódást tapasztaltak nemgazda-rezisztenciát kiváltó *Vigna unguiculata/Erysiphe cichoracearum* nemgazda-kórokozó kapcsolatban is (Mellersh et al., 2002). Ebben a kísérletben egy antioxidáns enzim (kataláz) növényekbe juttatásával részlegesen sikerült letörni a behatolási rezisztenciát. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a H_2O_2 a behatolási (penetrációs) rezisztencia egyik fontos tényezője lehet.

Kérdés, hogy a H_2O_2 milyen további funkciót tölt be a tünetmentes (HR nélküli) nemgazda-rezisztenciában a kórokozó behatolás közvetlen gátlásán kívül? Tisztázandó az is, hogy a fertőzések után az egyik legkorábban keletkező ROS, a szuperoxid, hogyan befolyásolja a tünetmentes nemgazda-rezisztenciát? Disszertációm során ezért az egyik fő célkitűzésünk volt, hogy a szuperoxid tünetmentes nemgazda-rezisztenciában játszott szerepét tisztázzuk.

Enyhe stressz esetén az egészséges növényben a képződő reaktív oxigénfajtákat különböző nem-enzimatis és enzimatis antioxidánsok semlegesítik.

Nem-enzimatis antioxidánsok:

- aszkorbinsav (Asada 1989, Noctor és Foyer 1998).
- glutation (Asada 1989, Noctor és Foyer 1998).
- E-vitamin (Asada és Takashi, 1987).
- karotinoidok (Asada és Takashi, 1987).

Tipikus enzimatis antioxidánsok:

- szuperoxid-dizmutáz (Bowler et al., 1992).
- aszkorbát-peroxidáz (Asada és Takashi, 1987, Asada 1989).
- kataláz (Willekens et al., 1999)

A prooxidánsokkal (reaktív oxigénfajtákkal) szemben a védelem első vonalát a szuperoxid-dizmutázok (SOD) jelentik az enzimatis antioxidánsok közül. Az általuk katalizált reakció során szuperoxidból hidrogén peroxid képződik: $2 \text{O}_2^{\cdot -} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. A szuperoxid számára átjárhatatlan a foszfolipid sejtmembrán (Takashi és Asada, 1983),

ezért lebontásukra ott kerül sor, ahol képződnek. A szuperoxid-dizmutázokat a bennük található fémek alapján három csoportba sorolják: vas szuperoxid-dizmutázok (FeSOD), mangán szuperoxid-dizmutázok (MnSOD) és réz-cink szuperoxid-dizmutázok (Cu-ZnSOD). A különböző szuperoxid-dizmutázok közül mindhárom típus megtalálható a magasabb rendű növényekben. Az egyes enzimtípusok eltérő növényi sejtalkotókban fordulnak elő (Alscher et al., 2002). A vastartalmú szuperoxid-dizmutázokat (FeSOD) több magasabb rendű növényből is kimutatták, pl: *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana plumbaginifolia* (Van Camp et al., 1990). A vas szuperoxid-dizmutázokra jellemző, hogy a növényi sejt kloroplasztiszában fejtik ki hatásukat. A másik nagy csoport a mangán szuperoxid-dizmutázok (MnSOD) csoportja. Az ebbe a csoportba tartozó enzimek eukarióta sejtek mitokondriumaiban és peroxiszómáiban találhatóak (del Río et al., 1983; Zhu és Scandalios 1993). A harmadik csoportba tartoznak a réz-cink szuperoxid-dizmutázok (Cu-Zn SOD), melyek a citoplazmában a periplazmatikus térben, illetve a kloroplasztiszokban és az extracelluláris térben találhatóak (Ogawa et al., 1996). Az antioxidánsok növényekben épp olyan fontos hatással lehetnek a növény rezisztenciájára vagy fogékonyságára, mint a reaktív oxigénfajták. Fogékony növényekben magas antioxidáns (SOD, aszkorbát-peroxidáz) kapacitás tapasztalható biotróf kórokozó fertőzés hatására (El-Zahaby et al., 1995; Vanacker et al., 1998; Mittler et al., 1998; Harrach et al., 2008). Ezekben a növényekben jelentősen csökken a reaktív oxigén fajták felhalmozódása, hiszen a nagy tömegben keletkező antioxidánsok semlegesítik őket, és a reaktív oxigén fajták nem tudják kifejteni gátló hatásukat a kórokozókkal szemben, lehetővé téve a fertőzés kialakítását a növényen. Ezért tehát a fogékony növények nagymértékű antioxidáns kapacitása részlegesen szerepet játszhat a biotróf kórokozókkal

szembeni fogékonyságban (Pogány et al., 2006). Hemibiotróf és nekrotróf kórokozók fertőzésénél fordított a helyzet: a növény magas antioxidáns kapacitása meggátolja a nekrotikus tünetek kialakulását, ezáltal a nekrotróf kórokozóknak nem biztosít megfelelő körülményeket a fertőzéshez (cf. Király, 2000). Ezt a jelenséget bizonyítja egy érdekes kísérlet, ahol a hemibiotróf *Phytophthora nicotianae*-val fertőztek dohány növényeket. A hemibiotróf kórokozókra jellemző, hogy a fertőzés kezdetén biotrófként viselkednek, nem nekrotizálják a növényt, azonban az idő előrehaladtával nekrotikus tünetek alakulnak ki a növényen, a kórokozó nekrotróffá válik. Dohány növényeket fertőzve *Phytophthora nicotianae*-vel (Blackman és Hardham, 2008) azt tapasztalták, hogy a kórokozó meggátolja a növény kataláz termelését, ezzel fogékonnyá téve a növényt a fertőzésre. A gomba által termelt kataláz aktivitása azonban fokozódik, így védve magát a növény által termelt reaktív oxigénfajtáktól.

A fent említett példákban is látható, hogy milyen összetett szerepük van a reaktív oxigénfajták és az antioxidánsok közötti egyensúly felborulásának a növényi rezisztencia – többek között a nemgazda-rezisztencia – vagy fogékonyság kialakulásában.

A nekrotikus tünetekkel szembeni ellenállóság növényekben - a szalicilsav és az antioxidánsok szerepe

A nemgazda-rezisztencia mellett egy másik nonspecifikus (általános) rezisztenciaforma a nekrotikus tünetekkel szembeni ellenállóság, melyben általában csak tüneti szinten mutatnak rezisztenciát a növények (Balázs et al., 1977; Doss és Hevesi, 1981; Barna et al., 1993, 2008; Naylor et al., 1998; Devadas és Raina, 2002). Olykor azonban előfordulhat valódi

kórokozó gátlás is, tehát a kórokozó felhalmozódásának csökkenése is (Chivasa et al., 1997; Naylor et al., 1998; Devadas és Raina, 2002; Wong et al., 2002; Barna et al., 2008). Ezen rezisztenciaforma kialakulásában elsősorban a szalicilsavnak és egyes antioxidánsoknak van meghatározó szerepe (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990; Barna et al., 1993; Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994; Fodor et al., 1997; Király et al., 2002; Vlot et al., 2009). A szalicilsav kórélettani szerepére növényekben először White (1979) hívta fel a figyelmet, aki kísérleteiben aszpirint és szalicilsavat injektált dohánylevelekbe, és azt tapasztalta, hogy a növények rezisztensebbé válnak dohány mozaik vírus (TMV) fertőzésével szemben, és ún. patogenezissel kapcsolatos (PR) fehérjék halmozódnak fel a szalicilsav-injektálás hatására.

A PR ('pathogenesis-related') gének, ill. fehérjék vizsgálatát azért tartják a kutatók fontosnak, mert ezek jelenléte, ill. aktivitása jelzi a rezisztencia előfordulását. Fontos azonban megjegyezni, hogy a PR gének és termékeik, mint stressz markerek megjelenése elsősorban a szöveti nekrozissal kapcsolatos. Tekintve, hogy a rezisztencia igen gyakran, de nem mindig, hiperszenzitív szövetelhalásokkal párosul, a PR gének kifejeződésének monitorozása gyakorlati szempontból fontos lehet. Azt azonban hangsúlyozni kell, hogy a PR gének, ill. termékeik ezek szerint valójában nem a növény ellenálló képességét jelzik, hanem olyan stresszek hatását, amelyek szövetelhalással kapcsolatosak. A PR fehérjéket tizenhét családba sorolták be (Van Loon., 2006). Ezek a fehérjék nagyon sok funkciót töltenek be a növényben, azonban az irodalmi adatokból látható, hogy a PR fehérjék éppúgy összefügghetnek a rezisztenciával, mint a fogékonysággal.

A PR fehérjék indukcióját elsőként dohány mozaik vírussal (TMV) fertőzött dohány növényen mutatták ki (Van Loon és Van Kammen, 1970, Gianinazzi et al., 1970). Vírusfertőzések esetén csak egy ismert irodalmi adat van arra, hogy egy PR gén közvetlenül kapcsolatba hozható a rezisztenciával (Park et al., 2004). Ebben a cikkben a szerzők arról számolnak be, hogy a kérdéses PR-10 gén egy ribonukleázt kódol, amelynek közvetlen szerepe van a vírusrezisztenciában, a vírus genomi RNS lebontása révén. Egy másik PR fehérje, a PR-2 viszont fogékonyabbá teszi a növényt vírusfertőzésekkel szemben (Bucher et al., 2001). A PR-2 fehérje, a β -1,3-glükanáz, a növényi sejtfalak enzimátikus fellazításával ugyanis a kórokozó vírus sejtről-sejtre terjedését segíti elő. Bakteriális fertőzéseknel sem egyértelmű a PR fehérjék szerepe a rezisztencia folyamatokban. Rayapuram et al., (2008) ugyan bizonyította azt, hogy a PR-13 fehérje antimikrobiális vegyületként viselkedik a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000-el fertőzött *Nicotiana attenuata*-ban, azonban ugyanebben a cikkben leírják, hogy a PR-1 nem fejt ki antimikrobiális hatást, csak markere a rezisztenciának. Növénykórokozó gombákkal kapcsolatban először a 90-es évek elején mutattak rá egyértelműen a PR fehérjék funkciójára (Brogue et al., 1991). Ebben a kísérletben olyan transzgenikus dohánynövényeket hoztak létre, amelyek egy babból származó kitináz gént fejeztek ki. A transzgenikus dohány *Rhizoctonia solani*-val szemben fokozott rezisztenciát mutatott, feltehetően azért, mert a nagy mennyiségben termelt kitináz hatékonyan bontotta a kórokozó gomba sejtfalában található kitint. A későbbiekben további fontos eredmények bizonyították, hogy a gombás fertőzésekkel szembeni rezisztenciában közvetlen szerepe lehet egyes PR géneknek, ill. fehérjéknek, több kórokozó esetében is: *Phytophthora infestans*, PR-5 (Vigers et al., 1992), *Uromyces fabae*, PR-1

(Rauscher et al., 1999), *Rhizoctonia solani*, PR-5 (Liu et al., 2011). Az eredmények szerint a PR-1 és PR-5 fehérje közvetlenül gátolja a gombakórokozók hifáinak növekedését és differenciálódását. Ugyanakkor Yeom et al., (2011) felhívja arra a figyelmet, hogy egy másik patogenezissel kapcsolt fehérje, a PR-4 éppen a fogékonyságért lehet felelős a *Capsicum annuum* és *Phytophthora capsici* kapcsolatában. A fertőzött növényekben a PR-4 túltermelése növelte, gátlása pedig csökkentette a *P. capsici* felhalmozódását és az ezzel együtt járó szöveti nekrozist. A PR fehérjék tehát egyes gazda-kórokozó kapcsolatokban közvetlenül felelősek lehetnek a rezisztenciáért, míg bizonyos esetekben fogékonysági faktorok. A legtöbb gazda-kórokozó kapcsolatban viszont elsősorban a szöveti nekrozissal együtt járó stressz markerei.

A szalicilsavnak a nekrotikus tünetekkel szembeni rezisztenciában játszott központi szerepére mutattak rá azok a kísérletek is, ahol olyan transzgenikus dohány (*Nicotiana tabacum*) és lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) növényeket vizsgáltak, melyek a *nahG* transzgént tartalmazták. A *nahG* növények egy bakteriális eredetű szalicilát-hidroxiláz gént fejeznek ki. A *nahG* fehérje a szalicilsavat katekollá bontja le, így ezek a növények képtelenek szalicilsavat felhalmozni, szalicilsav hiányában nem aktiválódnak a PR-gének, és a transzgenikus növények fokozottan fogékonyak a sejt és szöveti nekrozisra a vad típusú növényhez képest (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994). Az *in vivo* szintetizálódott szalicilsav általában valamilyen raktározott formává alakul át a növényekben. A leggyakrabban képződő forma a szalicilsav *O*- β -glükózid (SAG) melynek képződéséért a patogén-indukált szalicilsav glükóziltranszferáz (SGT) felelős (Lee és Raskin, 1999; Song, 2006). *Arabidopsis thaliana*-ban két patogén-indukált szalicilsav

glükóziltranszferázt sikerült kimutatni. Az egyik enzim a már előbb leírt folyamatot katalizálja, ennek a folyamatnak a végterméke a SAG, a másik enzim azonban a szaliciloil glükóz észter (SGE) kialakításában vesz részt (Dean és Delaney, 2008), amely egy másik raktározott szalicilsav forma. A szalicilsav növényekben továbbalakulhat metilszalicilsavvá (MeSA), melynek szintén létezik glükózilált formája (MeSAG) (Seskar et al., 1998; Dean et al. 2003). A szalicilsav glükozidok biológiai funkciója nem ismert (Hennig et al., 1993; Seskar et al., 1998), bár egy újabb közlemény szerint baktériumos fertőzés elleni rezisztenciában az SAG-nak közvetlen szerepe lehet (Pastor et al., 2011). Egy 2007-es közlemény szerint viszont a MeSA a növényi ún. szisztémikus szerzett rezisztencia egyik központi szignál molekulája (Park et al., 2007).

Disszertációm témaválasztásakor a nekrotikus tünetekkel szembeni rezisztencia mechanizmusának kérdése a következő megfigyelés kapcsán vetődött fel. Cole et al. (2004) azt tapasztalta, hogy a tüneti (nekrózis) rezisztencia tekintetében különbség van a két – azonos szülőktől (*Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana clevelandii*) származó – dohányfajhibrid, a *Nicotiana edwardsonii* és a *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia között. A *N. edwardsonii* var. Columbia dohány mozaik vírusos (TMV) és dohány nekrosis vírusos (TNV) fertőzéssel szemben tünetileg ellenállóbb volt, mint a *N. edwardsonii*. A var. Columbia-ban ugyanis a lokális nekrotikus tünetek jelentősen enyhébbek voltak, mindemellett ezek a növények egészségesen is jóval több szalicilsavat tartalmaztak és nagy mennyiségben termeltek egy patogenezissel kapcsolatos fehérjét (PR-1). A *N. edwardsonii* fajhibrid haploid szinten két kromoszómával kevesebbet tartalmaz, mint a *N. edwardsonii* var. Columbia (Cole et al., 2001). Ez a genetikai különbség nyilvánvalóan hozzájárul a Columbia növények tüneti rezisztenciájához.

Érdekes, hogy ez a rezisztencia és a velejáró biokémiai változások a var. Columbia-ban csak 50 naposnál idősebb korban jelentkeztek, és nem jártak együtt a szalicilsav-túltermelő növényekre általában jellemző spontán nekrozisok kialakulásával (Cole et al., 2004). Célkitűzésem tehát az volt, hogy tisztázzam, a tüneti rezisztencia ezen esete együtt jár-e a vírus (TMV és TNV) felhalmozódásának gátlásával is, illetve ez a rezisztencia hatásos-e más kórokozókkal, illetve abiotikus stresszekkel szemben is? Továbbá tisztázni kívántam a szalicilsav, illetve az antioxidánsok szerepét ebben a rezisztenciatípusban.

A poszttranszkripcionális géncsendesítés kapcsolata a növényi betegségrezisztenciával

A specifikus rezisztencia egyik nemrég felfedezett formájának mechanizmusa a géncsendesítés poszttranszkripcionális típusa (PTGS) (cf. Barna és Király 2004). A PTGS egy ősi eukariota mechanizmus, amely az evolúció során a „parazita” nukleinsavak, így a viroidok, vírusok és a transzpozonok ellen alakult ki. Ez a folyamat egyaránt működik növényekben, állatokban és gombákban, feltehetően már a közös egyszélű ős is rendelkezett ezzel a védelmi eszközzel (Pickford et al., 2002; cf. Ding et al., 2004; Wang et al., 2006). A PTGS működésének alapja, az, hogy ha a növényi sejtek idegen RNS-t (általában kettősszálú RNS-t) észlelnek, akkor ezeket az RNS-eket lebontják azokkal a saját mRNS molekulákkal együtt, amelyek homológiát mutatnak az idegen RNS-el. A folyamat során a kettősszálú RNS-ek kisebb (20-25 nukleotid) nagyságú szakaszokra darabolódnak fel, ezeket a rövid RNS szakaszokat nevezzük kis interferáló RNS-eknek (*small interfering RNA*, siRNS). Az siRNS-ek beépülnek egy fehérje

komplexbe, és így egy RNS indukálta RNS hasító komplex jön létre (*RNA-induced silencing complex*, RISC). A PTGS folyamata során a RISC felismer és hasít minden egyes RNS-t, amely komplementer a RISC komplexbe beépült siRNS szálaival (Hutvágner és Zamore, 2002).

A PTGS tehát egy specifikus rezisztenciaforma amely többek között növényi vírusos fertőzésekkel szemben is hatásos. A fertőzések során ugyanis a növénybe jutott vírus nukleinsav, mint idegen RNS (a vírusreplikáció során kettősszálú RNS) saját maga ellen ható géncsendesítést indukál, vagyis vírus nukleinsav-lebontást okoz („RNA-mediated virus resistance”) (lásd pl. Lindbo és Dougherty, 2005; Voinnet, 2005; Burgyán, 2007). A PTGS-t azonban eredetileg transzgenikus növényekben fedezték fel, ahol egyes vonalakban a transzgének meglepően gyengén expresszálódtak (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990). A csendesült gén ugyan átíródott a transzgenikus növényben, de a messenger RNS degradálódott. Ez a mechanizmus a növénynemesítésben nem kívánatos jelenségnek számít, amennyiben a cél egyes gének túlkifejztetése, viszont hasznos lehet, ha egy növényi gén funkciójának tisztázásához az adott gént csendesíteni szeretnénk. A PTGS jelensége tehát lehetőséget biztosít a genetikusok számára egyes gének funkciójának megértéséhez oly módon, hogy egy adott gén PTGS-t indukáló („idegen”) változatát is kifejztetik a növényi szervezetben. A folyamat végeredménye az adott gén lecsendesítése, működésének inaktiválása.

Az MTA Növényvédelmi Kutatóintézet Biotechnológia Osztálya és az amerikai University of Missouri, Department of Plant Pathology, Columbia MO, USA közötti együttműködés keretében olyan transzgenikus *Nicotiana edwardsonii* dohánynövényeket állítottak elő, amelyekben a TMV-vel szembeni ellenállóságot kódoló rezisztencia gén (*N*)

poszttranszkripcionálisan csendesített, ennek megfelelően a növények TMV-vel szembeni rezisztenciája csökkent mértékű (Balaji et al., 2007). Kutatásaim során azt a kérdést kívántam megválaszolni, hogy a TMV ellen hatásos *N* rezisztenciagén „kikapcsolása” (csendesítése) milyen hatással lehet egy másik, nem rokon vírus, a TNV által előidézt fertőzésre, azaz egy rezisztencia gén milyen nem várt mellékhatásokat okozhat?

Összefoglalva, disszertációmban az általános (nem-specifikus) ellenállósági formák közül a nemgazda-rezisztencia („non-host resistance”) és a nekrotikus betegsége tünetek ellen hatásos rezisztencia egyik típusának biokémiai, molekuláris biológiai mechanizmusát kívántam feltárni. A növényi immunológiának ezek a területei, az ellenállóság mechanizmusai ugyanis jelenleg nincsenek kellő alaposággal tisztázva. Ezen kívül a specifikus rezisztencia egyik típusát vizsgálva tisztázni kívántam, hogy a TMV ellen hatásos *N* rezisztencia gén csendesítése milyen hatással lehet egy nem rokon vírus, a TNV által előidézt fertőzésre?

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérletekhez felhasznált növények:

Hordeum vulgare cv. Ingrid Mla, *H. vulgare* cv. Ingrid Mlo,

H. vulgare cv. Ingrid mlo

H. vulgare cv. Botond

Triticum aestivum cv. MV-Emma, *T. aestivum* cv. Buzogány

Cucumis sativus cv. Budai csemege, *C. sativus* cv. Rajnai fürtös

Solanum lycopersicum cv. Kecskeméti 549,

S. lycopersicum cv. Kecskeméti 3F

Nicotiana tabacum cv. Xanthi, *N. tabacum* cv. Xanthi nahG

Nicotiana benthamiana

Nicotiana edwardsonii, *N. edwardsonii* var. Columbia

Solanum tuberosum cv. White Lady, *S. tuberosum* cv. Hópehely

Vitis vinifera cv. Nimrang, *V. vinifera* cv. Kismish vatkana

V. vinifera cv. Bianca (interspecifikus hibrid)

A növények üvegházban nőttek 18-23 °C-os hőmérsékleten, 16 órás fotoperiódus mellett, kiegészítő világítással ($160 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) és 75-80% -os relatív páratartalmnál.

A kísérletekhez felhasznált kórokozók:

Árpalisztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* A6 rassz)

Búzalisztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici* magyar izolátum)

Uborkalisztharmat (*Podosphaera xanthii*)

Paradicsom-lisztharmat (*Oidium neolycopersici*, BP-P5)

Dohánylisztharmat (*Golovinomyces orontii*, BP-1TOB)

Fitoftóra (*Phytophthora infestans*)

Szőlőlisztharmat (*Erysiphe necator*)

Árparozsda (*Puccinia hordei*)

Búzarozsda (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*)

Zabrozsda (*Puccinia coronata* f.sp. *avenae*)

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000

P. syringae pv. *tabaci*

Dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV, U1 törzs)

Dohány nekrosis vírus (*Tobacco necrosis virus*, TNV, E törzs)

A lisztharmatok fenntartása gazdanövényeiken történt növénynevelő kamrában, ill. üvegházban. Az árpalisztharmatot *Hordeum vulgare* cv. Ingrid *Mlo* növényeken tartottuk fenn növénynevelő kamrában, 20 °C-os hőmérsékleten, 16 órás fotoperiódus mellett. A búzalisztharmat fenntartása növénynevelő kamrában történt *Triticum aestivum* cv. Buzogány növényeken, 20 °C-os hőmérsékleten, 16 órás fotoperiódus mellett. Az uborka– paradicsom- dohány és szőlőlisztharmat, valamint az árpa - búza - és zabrozsda fenntartása üvegházi körülmények között (18-23 °C-os

hőmérsékleten, 16 órás fotoperiódus mellett kiegészítő világítással [$160 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$] és 75-80% -os relatív páratartalmnál) történt gazdanövényeiken.

A *Phytophthora infestans* fenntartása borsótáptalajon történt (lásd Nagy, 2006), 20 °C-os hőmérsékleten.

A növénypatogén baktériumok (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, pv *tomato*) fenntartása szilárd KING B táptalajon történt, 26-28 °C-os hőmérsékleten.

A dohány mozaik vírust, illetve a dohány nekrosis vírust -20 °C-on tároltuk lefagyasztott dohánylevél mintákban, és a fertőzés előtt felszaporítottuk a vírusokat gazdanövényeiken. Ezen növényekről származó vírussal fertőzött levelekből indítottuk a fertőzést.

A búza- ill. árpalisztharmatos fertőzést saját készítésű fertőzőtoronyban (üres kartonpapír dobozban) végeztük. Lisztharmattal történő fertőzés során a 7 napos egylevelű növényekre szórtuk a konídiumokat a fertőzőtorony tetején található nyíláson át, majd a fertőzőtorony belsejében a levegő keverésével értük el az egyenletes lisztharmat-borítottságot a növényeken. A légkeverés után 15-20 percig hagytuk a konídiumokat megtapadni a levél felületén, és a fertőzött növényt a fertőzőtoronyból kivéve használhattuk további vizsgálatainkhoz.

Paradicsom- uborka- és dohánylisztharmatos fertőzés során az inokulumforrásként szolgáló növény leveleit hozzáérintettük az általunk fertőzni kívánt növény leveleihez.

A búza- árpa- és zabrozdával 7 napos egy leveles növényeket fertőztünk. A fertőzéshez az uredospórákat keményítő szuszpenzióban (3,3 g háztartási keményítő/100 ml víz) szuszpendáltuk, és ezzel a rozsdaszuszpenzióval fertőztünk. Fertőzés után a növényeket sötét 80-100%-os páratartalmú, 18 °C ill. 25 °C-os hőmérsékletű nedveskamrába, helyeztük 24 órára, majd ezután használtuk fel a vizsgálatokhoz.

*Phytophthora infestans*szal való fertőzéshez sporangiumszuszpenziót készítettünk. Ehhez légszárazra szárított burgonyaszeleteket állítottunk elő, és ezek alá helyeztük a dugófúróval kivágott *Phytophthora*t tartalmazó agarkorongokat. A fertőzött burgonyaszeleteket nedveskamrába helyeztük, majd megvártuk, míg a kórokozó átnő a burgonyaszeleten, és a szeletek felső oldalának leöblítésével nyert szuszpenziót átszűrtük 2 rétegű gézen. Így a micéliumok nagy részétől mentes sporangiumszuszpenziót permetezhettünk a levelekre. A *Phytophthora* fertőzést Bakonyi József (MTA NKI, Növénykórtani osztály) útmutatása szerint végeztem.

Pseudomonas syringae (pv. *tabaci* és pv. *tomato*) baktériumokkal való fertőzéshez az 1 napos baktériumtenyészeteket lemostuk a szilárd King's B táptalajról 10 mM-os magnézium-szulfát oldattal. A

baktériumszuszpenzióban beállítottuk a kívánt sejtkoncentrációt (7×10^5 cfu/ml, ill. 7×10^8 cfu/ml), a növény levelét megsebezve injekciós fecskendővel juttattuk a baktériumot a növény levelébe.

Dohány mozaik vírus, ill. dohány nekrosis vírussal való fertőzés során mozsárban eldörzsöltük a vírust tartalmazó leveleket karborundummal és csapvízzel (kb. 1 g levél és 10 ml csapvíz), és ezzel az inokulummal kentük be a fertőzni kívánt növény leveleit.

Szuperoxid-dizmutáz és kataláz bejuttatása árpalevélbe

Antioxidánsokkal történő kezeléshez szuperoxid-dizmutáz (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország) 3000 U/ml, és kataláz (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország) 5000 U/ml vizes oldatát készítettük el, és ezt az oldatot juttattuk a növények levágott leveleibe (Király et al., 2008). Infiltrálás után megvártuk, amíg a víz elpárolog a levelek sejtközötti járataiból, és ezután történt a fertőzés.

Árpalevek hőkezelése

Árpaleveket hőkezeltünk a reaktív oxigénfajták felhalmozódásának megakadályozása céljából. Az intakt árpaleveket 49 °C-os vízbe

merítettük 45 másodpercre, majd hagytuk a leveleket megszáradni (kb. 20-30 perc), ezután történt azok fertőzése. A módszer Barna Balázs (MTA NKI) megfigyelésén alapszik.

A szuperoxid felhalmozódás kimutatása biokémiai módszerrel

A szuperoxid-szabadgyök mérése nitro-blue-tetrazolium (NBT) segítségével történt. A szuperoxid reakcióba lép az NBT-vel, és sötétkék színű formazán képződik, amely detektálható. A méréshez 10 mM kálium-foszfát-pufferben (pH 7,8) oldott 0,1 w/v % töménységű NBT-t használtunk (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország), amit vákuuminfiltrálással juttattuk a levelekbe (Ádám et al., 1989). A leveleket 20 percig megvilágítottuk, majd színtelenítő oldatba (0,15 w/v % triklórecetsav, etanol és kloroform 4:1 arányú elegyében) helyeztük egy napra (Hückelhoven et al., 1999). Az elszíntelenedett leveleket ezután glicerín és víz 1:1 arányú keverékében tároltuk. A kék szín időbeli megjelenését regisztráltuk.

Génkifejeződési vizsgálatok

A fertőzést követően a levelekből teljes növényi RNS-t vontunk ki szilikagélmembrán-oszlopos módszerrel (Viogene Plant Total RNA

Extraction Miniprep System, Tajvan) a készlethez mellékelt utasításoknak megfelelően. A kivont RNS mennyiségét és tisztaságát spektrofotométeren (NanoDrop ND-1000) ellenőriztük. Az RNS (és DNS) elnyelési maximuma 260 nm hullámhossznál van, a fehérjéké pedig kb. 280 nm-nél. Az RNS mennyiségét a mintákban az A_{260} értékkel határoztuk meg: RNS koncentráció = $A_{260} \times \text{hígítás}/25$ (moláris kioltási együttható). Az A_{280} érték pedig a fehérjével való szennyezettségre utalt. Az A_{260}/A_{280} arányt 1,6 és 2,0 szélsőértékek között fogadtuk el megfelelőnek. Ezt követően a mintákat megfuttattuk 1%-os formaldehid-agaróz-gélen, és az elektroforézis után a kivont RNS koncentrációját és épségét etídiumbromidos festéssel UV-fényben ellenőriztük. A génkifejeződés vizsgálatához reverz transzkripcióval egybekötött nukleinsav-sokszorosítást (RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction*) használtunk. Először a hírvivő (*messenger*) RNS-t szaporítottuk fel (RT lépés, azaz cDNS szintézis), oligoDT indítószekvencia segítségével, a reagenst gyártó utasításainak megfelelően (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Vilnius, Litvánia). A következő lépésben az adott génnek megfelelő cDNS-t sokszorosítottuk (PCR). A PCR-t még a folyamat exponenciális fázisában állítottuk le, tehát minden vizsgált génnél olyan, külön-külön beállított ciklusszámmal dolgoztunk, ahol még megmaradtak a különbségek a különböző átíródási szintek között. Az RT-PCR-t követően a

génexpressziós különbségek kimutatásához a mintákat 1%-os agarózgélben futtattuk meg, referenciának (konstitutív kontroll) dohánynál egy aktin, árpánál egy ubiquitingén expresszióját tekintettük. Ezzel a módszerrel a génkifejeződés szemikvantitatív módon mérhető. A génkifejeződés érzékenyebb, kvantitatív kimutatásához az ún. valós idejű (*real time*) kvantitatív RT-PCR módszert használtuk, a reagenst gyártó (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA) útmutatása szerint. A génkifejeződés különbségeinek számszerűsítéséhez az ún. $2^{-\Delta\Delta CT}$ módszert (Livak és Schmittgen, 2001) alkalmaztuk, belső referenciaként a korábban említett gének (dohány aktingénje és árpa ubiquitingénje) szolgáltak. PCR-hoz az alábbi génekre specifikus indítószekvencia-párokat (primereket) használtuk **(2. táblázat)**.

2. táblázat

A génkifejeződési vizsgálatok során használt primerek adatai

Gén neve, génbanki azonosító száma	Előre- és visszainduló primer nukleinsav-sorrendje	Primer kapcsolódási hőmérséklet (<i>annealing</i> <i>temperature</i> , T_a)
Hv Ubi M60175	5'-ACCCTCGCCGACTACAACAT-3' 5'-CAGTAGTGGCGGTCTGAAGTG-3'	$T_a = 60^\circ \text{C}$
Hv pNAox AJ251717	5'-TGCTCGGTCAGCACT-3' 5'-TCCGCAATAGAACACTCC-3'	$T_a = 50^\circ \text{C}$
Hv SOD TC109315	5'-TCAAGGGCACCATCTTYTTC-3' 5'-TTCCRAGGTCACCRGCAT-3'	$T_a = 59^\circ \text{C}$
Hv BI AJ290421	5'-ATGTTCTCGGTGCCAGTCT-3' 5'-GGGCGTGCTTGATGTAGTC-3'	$T_a = 56^\circ \text{C}$
Nt Act X69885	5'-CGGAATCCACGAGACTACATAC-3' 5'-GGGAAGCCAAGATAGAGC-3'	$T_a = 60^\circ \text{C}$
Ng PR-1 U49241	5'-ACTTGGGACGACGAGGTA-3' 5'-GCACAATGATTTGAGCC-3'	$T_a = 50^\circ \text{C}$
Ng N U15605	5'-TTCTTTGTACCTTTTGCTGGCTTAT-3' 5'-CTCTGGTCCTTCTTTATACAACAAA- 3'	$T_a = 48^\circ \text{C}$
Nt AOX S71335	5'-GAAACAGTGGCTGCAGTGCC-3' 5'-GTGATACCCAATTGGTGC-3'	$T_a = 48^\circ \text{C}$
Ng CAT AF006067	5'-TCCGCTTGATGTGACTAAA-3' 5'-TCCACCCACCGACGAATA-3'	$T_a = 48^\circ \text{C}$
Nt SGT AF190634	5'-AAAGAAGTTGGCTCGGATA-3' 5'-TTGGCTTGAAGACACTAAGG-3'	$T_a = 47^\circ \text{C}$

Szabad és kötött szalicilsav mérése *Nicotiana edwardsonii* növényekben

Szabad és kötött (savasan hidrolizálható) szalicilsav méréséhez a Meuwly and Métraux (1993), ill. Cole et al. (2004) által leírt módszert alkalmaztuk. A méréseket Szalai Gabriella és munkacsoportja (MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár) végezte. A kivonáshoz vivőanyagként *para*-hidroxibenzoésavat, belső standardként 2-metoxibenzoésavat használtak. Az elsődleges feltárás során a növényi mintát 8000 g-n centrifugálták 20 percig, a felülúszót félretették, utána az üledéket reszuszpendálták 90% (v/v) metanolban, és újracentrifugálták a már leírt paraméterekkel. A két felülúszó frakciót kombinálva a metanolt szobahőmérsékleten, vákuumcentrifugában elpárologtatták, majd 1 ml 5%-os (w/v) triklórecetsavat adtak a mintához és lecentrifugálták (8000 g, 10 perc). A felülúszót kétszer extrahálták etilacetát:ciklohexán 1:1 arányú keverékével. A szabad szalicilsav meghatározásához a felső, szabad fenolvegyületeket tartalmazó szerves réteget -20 °C-on tárolták, a kötött szalicilsav meghatározásához pedig az alsó vizes fázist hidrolizálták sósavval, majd centrifugálás (6000 g, 10 perc) után a felülúszót kétszer szerves extrakciónak vetették alá a fent leírt módon, az így kapott szerves frakciót tárolták -20 °C-on. Magát a szalicilsav mérést nagy teljesítményű folyadék kromatográfiával (high performance liquid chromatography,

HPLC), deaktivált, reverz fázisú oszlop segítségével, fluorometriás detektorral végezték, Meuwly and Métraux (1993) leírása szerint.

Paraquatos kezelés *Nicotiana edwardsonii* és *N. edwardsonii* var. Columbia növényekben

A kísérlet során 25 µM és 50 µM-os paraquatoldatot készítettünk csapvízben. A paraquatoldatokat a levélbe injektáltuk, és az injektált területet körberajzoltuk. A megjelenő nekrosis nagyságából és terjedéséből vontunk le következtetéseket a paraquattal szembeni rezisztenciára. Negatív kontrollként a leveleket csapvízzel infiltráltuk, de ez nem okozott nekrotikus tüneteket.

Növénypatogén vírusok kimutatása

Dohány mozaik vírus (TMV) és dohány nekrosis vírus (TNV) kimutatása enzimhez kötött ellenanyag vizsgálat (ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay) segítségével

Nicotiana edwardsonii és *N. edwardsonii* var. Columbia TMV-vel történő fertőzése után 2 nappal vettünk mintákat a növényekről, TNV fertőzés után 5 nappal történt a mintavétel. A levélmintákat 0,8% Tween 20-

at tartalmazó 50 mM-os PBS (Na és K foszfáttal puffereelt NaCl) oldatban (pH = 7,4) homogenizáltuk és hígítottuk tovább 1:10, 1:20 és 1:50 arányban. A víruskoncentráció kimutatásához (vírus köpenyfehérje detektálása ELISA-val) Clark és Adams (1977) valamint Tóbiás et al. (1982) módszerét használtuk. TMV detektáláshoz Bioreba (Reinach, Svájc), míg TNV kimutatáshoz Loewe (Sauerlach, Németország) gyártmányú egységcsomagot használtunk, TMV U1, ill. TNV-E szerotípusra generált antitestekkel. Az ELISA leolvasóról 405 nm-en, 10, 20, ill. 30 perccel a szubsztrát inkubációja után olvastuk le az abszorbanciaértékeket.

Dohány mozaik vírus (TMV) és dohány nekrosis vírus (TNV) köpenyfehérjéjének termelődéséért felelős gén kimutatása polimeráz láncreakció (RT-PCR) alkalmazásával

Növénypatogén vírusok kimutatásához a vírusfertőzött növényekből teljes növényi RNS-t vontunk ki szilikagélmembrán-oszlopos módszerrel (Viogene Plant Total RNA Extraction Miniprep System, Tajvan). A kivont RNS-ből reverz transzkripcióval egybekötött nukleinsav-sokszorosítást (RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction*) végeztünk, a gyártó utasításainak megfelelően (Fermentas RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit). A reverz transzkripcióhoz (cDNS szintézis) a vírus köpenyfehérjéjének termelődéséért felelős génre tervezett reverz

(visszainduló) indítószekvenciát alkalmaztuk, hiszen az általunk vizsgált két növénypatogén vírus RNS-e nem rendelkezik polyA farokkal, így oligoDT indítószekvenciával nem szaporítható fel. A köpenyfehérje termelődéséért felelős génre tervezett reverz indítószekvencia használatával csak a vírus RNS-t írtuk át cDNS-sé, és ebből a cDNS-ből végeztük el a polimeráz láncreakciót a vírus köpenyfehérjéjének termelődéséért felelős génre specifikus indítószekvenciák felhasználásával **3. táblázat**.

3. táblázat

Növénypatogén vírusok kimutatásához szükséges primerek adatai

Gén neve, génbanki azonosító száma	Előre- és visszainduló primer nukleinsav-sorrendje	Primer kapcsolódási hőmérséklet (<i>annealing</i> <i>temperature</i> , T_a)
TNV CP U62546 AY616760	5' -CTTCTGGGCTTAGTTTCC - 3' 5' - CCTGCGTTCCTGTCGTA - 3'	$T_a = 50^\circ\text{C}$
TMV CP AF165190	5' - CTTGTCATCGTGGGC - 3' 5' - AAGTCACTGTCAGGGAAC - 3'	$T_a = 47^\circ\text{C}$

Növénykórokozó baktériumok (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *tabaci*) kimutatása *Nicotiana edwardsonii* és *N. edwardsonii* var. *Columbia* növényekből

A baktériumok számának meghatározásához a fertőzött növény leveleiből 0,9 cm átmérőjű levélkorongokat vágunk dugófúróval. A levélkorongokat 10 mM-os kálium-foszfát-pufferben (pH = 7) eldörzsöltük, és ebből számos hígítást készítettünk. A növényi kivonatot King's B tápoldatra szélesztettük, majd a megjelenő kolóniákat megszámláltuk (Ott et al., 2006)

NADPH-oxidáz enzim aktivitásának mérése

A NADPH-oxidáz enzim aktivitásának megállapításához sejtmembránt izoláltunk (Xia et al., 2009). A kivonáshoz négyszeres térfogatú kivonó puffert (50 mM Tris-HCL, pH 7,5, 0,25 M szaharóz, 1 mM aszkorbinsav, 1 mM EDTA, 0,6% PVP, 1 mM PMSF) használtunk. Az eldörzsölt növényi mintákat 120000 g-n centrifugáltuk 30 percig ultracentrifugában (BECKMAN L7-55). A centrifugálás végén kapott csapadékot újraszuszpendáltuk a kivonó pufferben, és a szuszpendált csapadékot használtuk fel azonnal a NADPH-oxidáz aktivitásának

megállapításához. A fotométeres meghatározás során a reakcióelegybe (50 mM HEPES pH 6,8, 0,2 mM NADPH, 0,3 mM NBT) 50 µl szuszpendált csapadékot adtunk. A NADPH-oxidáz aktivitásának specifikus detektálásához a reakcióelegybe tettünk 40 unit/ml SOD-ot (szuperoxid-dizmutáz) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország). Az enzimaktivitás kimutatásához ugyanazt a mintát lemértük SOD nélkül és SOD-dal, a két érték különbsége adta az enzimaktivitást (Ádám et al. 1997).

EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE

KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

A nemgazda-rezisztencia és a gazdarezisztencia lényegének tisztázása

A növénykórtani és kóréletani kutatások a múltban szinte kizárólag a gazdarezisztenciával foglalkoztak, mert gyakorlati szempontból, vagyis a növénynemesítés számára ez a rezisztenciatípus a legfontosabb. A nemgazda-rezisztencia – bár a leginkább elterjedt rezisztenciaforma a természetben – kezdetben nem kötötte le a kutatók figyelmét, mert nincs gyakorlati jelentősége, de ez a rezisztenciaforma tartós, így a növénynemesítés szempontjából mégis érdekes. A kétféle ellenállósági forma lényegét a következő növény/patogén párok leírásával lehet érzékeltetni: Az árpa lisztharmatos betegségét olyan gomba idézi elő, amely csak az árpát betegíti meg, a többi növényfajt nem. Az árpán, mint gazdafajon belül azonban lehetnek olyan *fajták*, amelyek rezisztenciát mutatnak a kórokozó ellen. Ez tehát az ún. *gazdarezisztencia*. Ha az árpát a búzára specializált búzalisztharmat fertőzné meg akár a természetben, akár mesterségesen (a kísérletező kutató által), az árpa minden fajtája ellenálló lesz, mert az árpa nem gazdája a búzalisztharmatnak. A természetben a növényfajok sokféle fertőző ágenssel kerülnek kapcsolatba, de megbetegedésre nem kerül sor, hiszen a gazdanövény csak a specifikus kórokozójával szemben fogékony, az összes többivel szemben azonban ellenálló: ez a *nemgazda-rezisztencia*, amely általában tünetmentes, de megnyilvánulhat HR-rel is. A mechanizmus azonban még nincs tisztázva,

legalábbis az nem ismert, hogy közvetlenül mi gátolja vagy öli meg a patogéneket a rezisztens növényben.

A gazdaságilag fontosabb, ún. gazdarezisztencia igen sokszor párosul a hiperszenzitív reakció (HR) megjelenésével, fitoalexinek felhalmozódásával, sejtfalerősődéssel, reaktív oxigénfajták (ROS) felszaporodásával, stb. Korai vizsgálatok (Király et al., 1972) igazolták, hogy a HR és a fitoalexinek nem elsődleges okai a rezisztenciának, hanem inkább az ellenállóság kísérő jelenségei. Újabb kísérletek szerint minden bizonnyal a reaktív oxigénfajták (ROS) mikrobaölő hatásának van nagyobb jelentősége a gazdarezisztenciában. (cf. Doke, 1983; Levine et al., 1994, Baker és Orlandi, 1995; Barna et al., 2003; Király et al., 2007;)

A tünetmentes nemgazda-rezisztencia lényegének tisztázása érdekében a következő kísérletsorozatot hajtottuk végre: Összehasonlítottuk fogékony, gazdarezisztens és tünetmentes nemgazda-rezisztens növény/kórokozó párok esetében a fertőzés utáni szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) felhalmozódást. A szuperoxid általában abiotikus stresszek és fertőzések hatására keletkezik nagyobb mennyiségben, és további reakciói folytán hidrogén-peroxid (H_2O_2), ill. hidroxil-szabadgyök (OH^{\cdot}) is felhalmozódhat. Ezek a ROS-típusok károsíthatják a kórokozót, tehát alapjai lehetnek az ellenállásnak, de károsíthatják a gazdanövényt, ill. a nemgazda sejtjeit, szöveteit is (HR).

A szuperoxid felhalmozódását az ún. nitroblue-tetrazolium (NBT)-festéssel teszteltük (lásd az Anyag és Módszerek részt). A fertőzések után 1, 2 és 3, olykor 4 nappal mértük a szuperoxid-akkumulációt a fertőzött levelekben. Az egyes növény/patogén párok esetében kapott eredményeket a **4. táblázat** foglalja össze.

4. táblázat

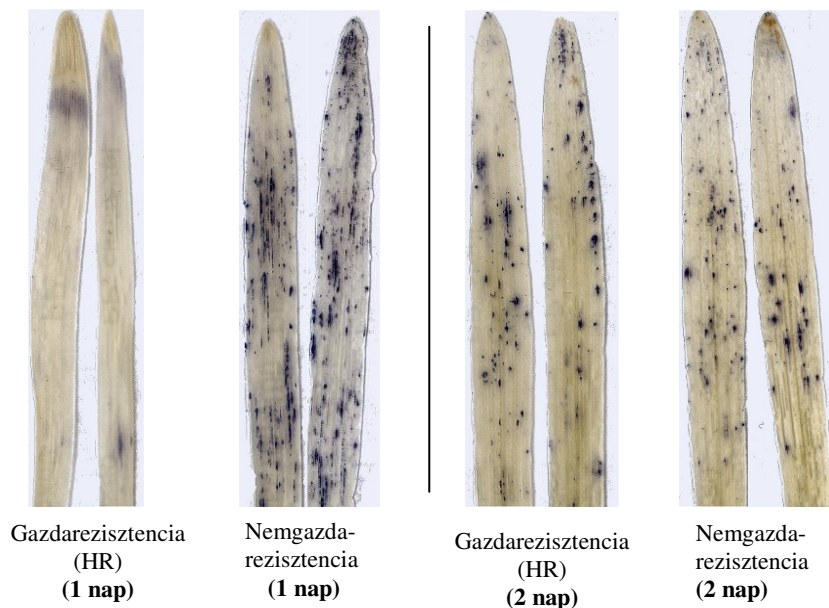
**Szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) detektálása különböző növény/kórokozó
kombinációkban**

<u>Növény/kórokozó kombináció</u>	<u>Reakció</u>	<u>Szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) kimutathatósága</u>
ÁRPA – árpalisztharmat (Blumeria graminis f.sp. hordei, A6)	gazdafogékonyság	0 (nincs) 2 nap múlva sincs
ÁRPA – árpalisztharmat	gazdarezisztencia	2 nap múlva
ÁRPA – búzalisztharmat (Blumeria graminis f.sp. tritici, magyar izolátum)	nemgazda- rezisztencia	1 nap múlva
ÁRPA – árparozsda (Puccinia hordei)	gazdafogékonyság	0 (nincs) 2 nap múlva sincs
ÁRPA – árparozsda	gazdarezisztencia	2 nap múlva
ÁRPA – búzarozsda (Puccinia recondita f.sp. tritici)	nemgazda - rezisztencia	1 nap múlva
BÚZA – búzarozsda	gazdafogékonyság	0 (nincs) 4 nap múlva sincs
BÚZA – búzarozsda	gazdarezisztencia	4 nap múlva
BÚZA – árparozsda	nemgazda - rezisztencia	3 nap múlva
BÚZA – zabrozsda (P. coronata f.sp. avenae)	nemgazda - rezisztencia	2 nap múlva
DOHÁNY – dohánylisztharmat (Golovinomyces orontii, BP-1TOB)	gazdafogékonyság	0 (nincs) 1 nap múlva sincs
DOHÁNY – árpalisztharmat	nemgazda - rezisztencia	1 nap múlva
PARADICSOM – paradicsom lisztharmat (Oidium neolycopersici, BP-P5)	gazdafogékonyság	0 (nincs) 1 nap múlva sincs
PARADICSOM – uborkalisztharmat (Podosphaera xanthii)	nemgazda - rezisztencia	1 nap múlva
UBORKA – uborkalisztharmat	gazdafogékonyság	0 (nincs) 1 nap múlva sincs
UBORKA – paradicsom lisztharmat	nemgazda - rezisztencia	1 nap múlva
SZŐLŐ – szőlőlisztharmat (Erysiphe necator)	gazdafogékonyság	0 (nincs) 2 nap múlva sincs
SZŐLŐ – búzalisztharmat	nemgazda - rezisztencia	2 nap múlva
BURGONYA – fitoftóra (Phytophthora infestans)	gazdafogékonyság	0 (nincs)
BURGONYA – fitoftóra	gazdarezisztencia	2 nap múlva
BURGONYA – árpalisztharmat	nemgazda- rezisztencia	1 nap múlva

Az előzőekben említett kísérletek azt jelzik, hogy míg a fogékony (kompatibilis) gazda/patogén kapcsolatokban nincs szuperoxid-felhalmozódás, a gazdarezisztenciát mutató kombinációkban van szuperoxid-képződés, ill. akkumuláció, és a nemgazda-rezisztenciát mutató kombinációkban, amelyek tünetmentesek, szintén van, de *korábban* észlelhető a felhalmozódás (**1. ábra**). Jogosnak látszik az a feltételezés, hogy a korai szuperoxid-felhalmozódás lehet az egyik oka a nemgazda ellenálló képességnek és az ezzel általában együtt járó tünetmentességnek. A gazdarezisztencia esetében később halmozódnak fel a reaktív oxigénfajták, és ez lehet az oka a rendszerint megjelenő hiperszenzitív válaszreakciónak (HR), amely sok kombinációban jellemzője ennek az ellenállósági formának. A fogékony gazda/patogén pároknál a kórokozók gátlás nélkül fejlődhetnek, hiszen nem képződik szuperoxid, ill. más ROS, és így a tipikus tünetekkel járó betegség kifejlődhet.

Amennyiben a szuperoxid-képződés valóban oka a kétféle rezisztenciának, akkor a szuperoxid-akkumuláció gátlása mérsékelheti vagy meg is szüntetheti az ellenálló képességet. Kísérleti eredményeinket ezért ebből a szempontból is tovább elemeztem.

Búzalisztharmattal fertőzött árpaleveleket difenil-jodóniummal (DPI) infiltráltunk, azonnal a fertőzés után. Mivel a DPI gátolja a szuperoxid-termelődést, elvileg várható a nemgazda-rezisztencia gyengülése vagy eltűnése. A kísérletek azonban nem voltak kielégítőek: a fertőzött és DPI-vel kezelt rezisztens árpaleveknek csak 5%-ában észleltünk gyenge lisztharmatképződést. Feltételezhető, de nem igazolható az, hogy ha a szuperoxid-képződés hatásosabban gátlódna, ez a nemgazda-rezisztencia megszűnéséhez vezetne.

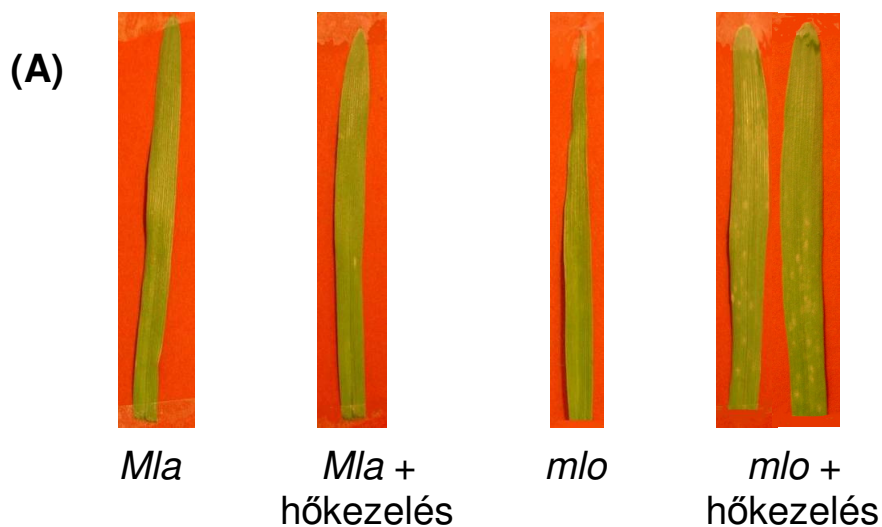


1. ábra: Szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) kimutatása gazda- és nemgazda-rezisztenciánál, árpában (cv. Ingrid *Mla*), a fertőzés után egy és két nappal. Az árpalisztharmatos (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzése gazdarezisztenciát (HR), míg a búzalisztharmatos (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, magyar izolátum) fertőzés tünetmentes nemgazda-rezisztenciát eredményezett. A szuperoxid detektálását nitroblue-tetrazolium (NBT) festéssel végeztük. Egy nappal a fertőzés után csak a nemgazda-rezisztens kombinációban van szuperoxid-felhalmozódás. Két nappal a fertőzés után már a gazdarezisztencia esetében is észlelhető a $O_2^{\bullet-}$ -akkumuláció.

Egy további kísérletben két antioxidáns enzimet, a szuperoxid-dizmutázt (SOD) és katalázt (CAT) infiltráltunk a levelekbe, amelyek ellensúlyozzák a szuperoxid, ill. hidrogén-peroxid hatását. Itt sem volt sikeres az a törekvés, hogy a szuperoxidot hatástalanító SOD+CAT – kezelésekkel megváltoztassuk az ellenálló képességet.

Sikerre vezetett azonban a Barna Balázs (MTA NKI) eredeti észlelésére alapozott következő kísérletünk. Eszerint egy hőkezeléses sokk (a levelek 49 °C-os vízbe merítése 45 másodpercig) megváltoztathatja a

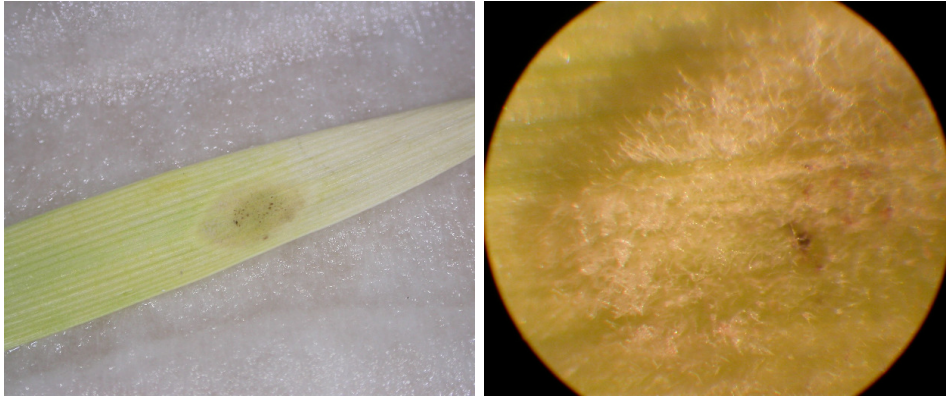
lisztharmat-rezisztens árpa reakcióját, mind az *Mla* gén által irányított gazda-rezisztencia (HR) esetén, mind az *mlo* géntől függő ún. horizontális (minden árpalisztharmat-rasz ellen érvényesülő) gazdarezisztenciánál. Kimutattuk, hogy hőhatásra az eredetileg rezisztens növényekben fogékonysági tünet (micélium- és konídiumképződés) jelent meg (**2. A ábra**) előtte azonban szignifikánsan csökkent, ill. megszünteti az NBT-festéssel detektálható szuperoxid-képződést is (**2. B ábra**). Az ún. *mlo*-rezisztencia az árpaleveleken tünetmentességben nyilvánul meg, azaz az ellenálló képességet nem kíséri a HR nekrotikus tünete. Az *mlo*-rezisztencia ennyiben hasonlít a nemgazda-rezisztenciára. Ez adta az ötletet ahhoz, hogy a hősokkos kísérletet elvégezzük egy tünetmentes nemgazda-rezisztenciát eredményező növény/patogén kombinációnál is (árpa fertőzve búzalisztharmattal). A rezisztens reakció csak akkor változott meg (csak akkor fordult fogékonysági reakcióba), ha a hősokkot kombináltuk a SOD+CAT kezeléssel is. Gyenge lisztharmat telepek fejlődtek ki az eredetileg rezisztens leveleken, de a lisztharmatos tünetek szomszédságában HR-re utaló nekrotikus léziók is kifejlődtek (**3. ábra**).





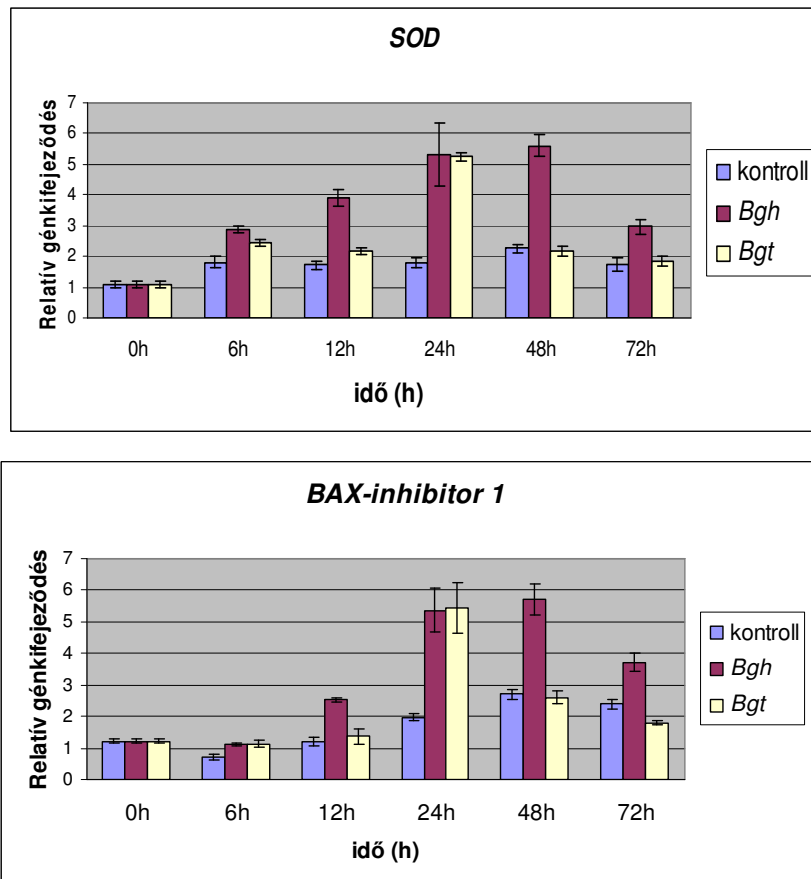
2. ábra: Hőkezeléses sokk hatása lisztharmatrezisztens árpalevelek reakciójára az *Mla* és *mlo* gén által meghatározott rezisztenciátípusnál (rasszspecifikus, ill. horizontális gazdarezisztencia). **(A):** Lisztharmatos tünetek az árpalisztharmatos (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzés és hőkezelés után 8 nappal. **(B):** A szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) mennyiségének csökkenése az árpalisztharmatos fertőzés és hőkezelés után 3 nappal. A hőkezelés közvetlenül a fertőzés előtt, a szuperoxid detektálása nitroblue-tetrazolium (NBT)-festéssel történt.

Ez arra utal, hogy a tünetmentes nemgazda-rezisztenciát csak részben sikerült fogékony reakcióvá konvertálni. A képződött gombával búzaleveleket fertőztünk vissza, amelyeken normális lisztharmatos betegség tüneteket észleltünk. Ez igazolta azt, hogy az árpán képződött lisztharmatgomba valóban búzalisztharmat volt. Ez a gombapatogén azért tudott gyenge fertőzést létrehozni a nemgazda árpaleveleken, mert a nemgazda-rezisztencia részlegesen gátlódott, azaz a szuperoxid-képződés csökkent. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a gazdarezisztencia és a tünetmentes nemgazda-rezisztencia során tapasztalható szuperoxid-felhalmozódás milyen génexpressziós változásokra vezethető vissza? A növényekben fertőzések hatására beinduló szuperoxid-termelésért elsősorban a NADPH-oxidázok felelősek.



3. ábra: Hőkezeléses sokk és antioxidáns enzimek (SOD és CAT) infiltrálásának együttes hatása árpalevelek nemgazda-rezisztenciájára, búzalisztharmatos (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici* magyar izolátum) fertőzés esetén. Gyenge lisztharmatos tünetek (gombatelepek) és HR-re utaló lokális nekrotikus léziók megjelenése a fertőzés és kezelés után 8 nappal. A hőkezelés (a levelek 49 °C-os vízbe merítése 45 másodpercig) közvetlenül a fertőzés előtt, az antioxidáns enzimkeverék (SOD és CAT, 3000, ill. 5000 unit/levél) levélbe infiltrálása közvetlenül a fertőzés után történt.

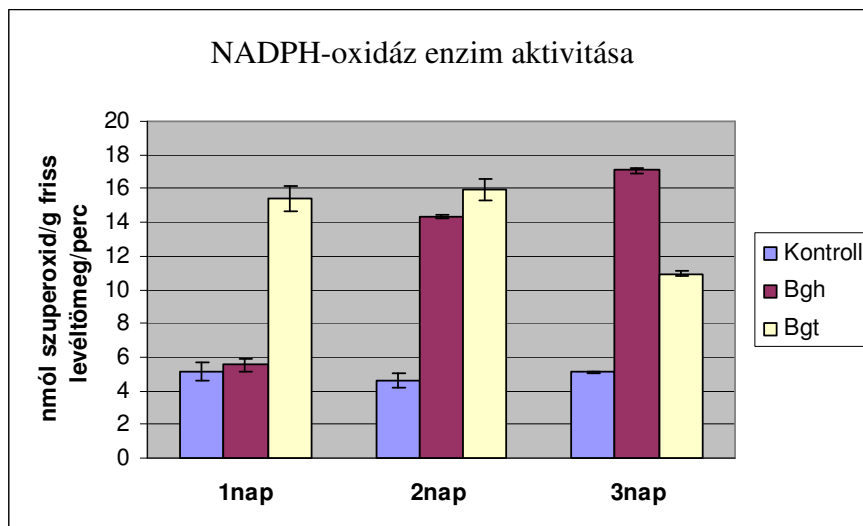
Valós idejű RT-PCR módszerrel mérve azonban egy általunk vizsgált árpa-NADPH-oxidáz-gén (lásd Hüchelhoven et al., 2001b) mindkét rezisztenciatípusnál, hasonló mértékben indukálódott. Egy *SOD*-gén expressziója viszont érdekes módon eltérést mutatott a gazda-rezisztencia, ill. tünetmentes nemgazda-rezisztencia esetében. Ha az árpát saját lisztharmatgombájával fertőztük (gazda-rezisztencia), a *SOD*-génexpressziója fokozódott a fertőzés után, és tartósan így is maradt. A nemgazda kombinációban (árpa/búzalisztharmat) viszont a *SOD*-gén expressziója csak átmenetileg (a fertőzés után 24 órával) emelkedett meg jelentősebben. Később az expresszió visszaesett az eredeti szintre, feltehetően azért, mert a patogén korán elhalt (**4. ábra**).



4. ábra: Egy antioxidáns (*SOD*) és egy programozott sejthalálgátlást meghatározó gén (*BAX-inhibitor 1*) expressziójának változása gazda- és nemgazda-rezisztenciánál, árpában (cv. Ingrid *Mla*), a fertőzést követő három napban. Az árpalisztharmat (*Blumeria. graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzés gazda rezisztenciát (HR), míg a búzalisztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, magyar izolátum) fertőzés tünetmentes nemgazda-rezisztenciát eredményezett. A génextpressziót valós idejű RT-PCR-rel mértük. Az ordinátán az 1 = a fertőzés után 0 órával detektált génextpresszió. kontroll = fertőzetlen árpa (cv. Ingrid *Mla*). *Bgh* = árpa (cv. Ingrid *Mla*) árpalisztharmattal (*Blumeria. graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzve. *Bgt* = árpa (cv. Ingrid *Mla*) búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, magyar izolátum) fertőzve.

Feltételezhető, hogy a HR hiánya ennél a rezisztencia-formánál ezzel a jelenséggel is összefügg. A *BAX-inhibitor 1* gén expressziója az említett *SOD* génhez hasonló változást mutatott: az expresszió a nemgazda-rezisztens árpa/búzalisztharmat kombinációban csak átmenetileg fokozódott (**4. ábra**). A *BAX-inhibitor 1* gén, ill. fehérje-termékének hatása abban nyilvánul meg, hogy a programozott sejthalált (pl. a HR-t) gátolja (Hückelhoven, 2004; Watanabe és Lam, 2006). Mivel a nemgazda-rezisztenciát általában a HR hiánya jellemzi, feltételezhető, hogy a búzalisztharmat fertőzést követő 24 óra után a *BAX-inhibitor 1* génexpresszió csökkenése is ezzel függ össze.

Mivel vizsgálataink során nem kaptunk különbséget a gazdarezisztens és tünetmentes nemgazda-rezisztens fertőzött növényekben az általunk vizsgált NADPH-oxidáz gén expressziójában, továbbra is kérdés maradt, hogy nemgazda-rezisztencia során mi okozza a korai szuperoxid felhalmozódást? Ezért az árpanövényekben megmértük árpa-, illetve búzalisztharmat fertőzés után a NADPH-oxidáz enzimaktivitást (**5. ábra**). A nemgazda kombinációban látható, hogy fertőzés után már egy nappal megnő a NADPH-oxidáz enzim aktivitása, míg a gazda-rezisztens kombinációban csak egy nappal később, azaz a második napon tapasztalható emelkedés az enzim aktivitásában. Ez az enzimaktivitásbeli eltérés lehet az oka annak, hogy miért tapasztaljuk a nemgazda kombinációban a szuperoxid korai felhalmozódását, a gazda- rezisztens kapcsolathoz képest.



5. ábra Az NADPH-oxidáz enzimaktivitás változása árpában (cv. Ingrid *Mla*), a gazda- és nemgazda-rezisztenciát kiváltó lisztharmatos fertőzés utáni első 3 napon. A nemgazda rezisztenciát kiváltó búzalisztharmatos fertőzésnél már egy nappal a fertőzés után tapasztalható a NADPH-oxidáz aktivitásának jelentős növekedése, a kontroll, ill. a gazdarezisztens (árpalisztharmattal fertőzött) növényekéhez képest. Kontroll = fertőzetlen árpa (cv. Ingrid *Mla*). Bgh = árpa (cv. Ingrid *Mla*) árpalisztharmattal (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzve. Bgt = árpa (cv. Ingrid *Mla*) búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, magyar izolátum) fertőzve.

A kísérleti eredmények összefoglalása:

1. Az általunk vizsgált fogékony gazda/patogén kapcsolatokban nincs mérhető szuperoxid-felhalmozódás, a HR-rel együtt járó gazdarezisztens növényekben viszont 48 óra körül felhalmozódik ez a ROS. A nemgazda-rezisztencia esetében a szuperoxid-akkumuláció korán (24 órával a fertőzés után) következik be, amely összefüggésbe hozható ennek az ellenállósági típusnak tünetmentességével (nincs hiperszenzitív reakció, HR). A szuperoxid

korai felhalmozódása együtt jár a képzésében fontos szerepet játszó NADPH-oxidáz enzim korai aktiválódásával.

2. Ha a rezisztens növényben a fertőzés utáni szuperoxid-képződést visszaszorítjuk vagy gátoljuk (pl. hőszókkal), ezzel elősegítjük a fogékonysági tünetek kialakulását az eredetileg ellenálló levelekben.
3. A nemi gazda rezisztenciában a *SOD* és a *BAX-inhibitor 1* gén időleges aktiválásának, majd visszaszorulásának szerepe lehet a HR hiányában (a tünetmentességben).
4. A rezisztens növényekben a fertőzés után felhalmozódó reaktív oxigénfajták (pl. szuperoxid, feltehetően hidrogén-peroxid és hidroxil-szabadgyök) gátolják vagy ölik el a kórokozót.

Nekrotikus tünetekkel szembeni rezisztencia

Vizsgálataim egyik célja a beteg növények nekrotikus tünetekkel szembeni ellenálló képesség biokémiai és molekuláris hátterének tisztázása volt. Itt elsősorban tüneti rezisztenciáról van szó, tisztázandó azonban, hogy az ellenálló növényben gátlódik-e a kórokozó is. A folyamat együtt jár számos biokémiai és molekuláris változással. Többek között megnő az endogén szalicilsavszint és megemelkedik több stresszgén - ún. patogenezissel kapcsolatos gén, ill. antioxidánsgén - expressziója (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990; Ward et al., 1991; Fodor et al., 1997; Király et al., 2002).

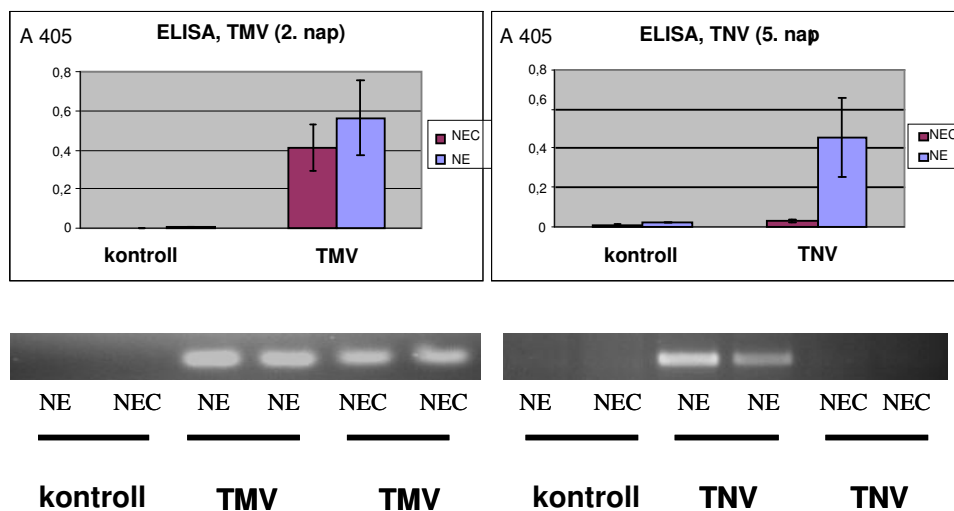
Korábbi kutatások szerint egy újabban előállított interspecifikus dohányhibrid (*Nicotiana edwardsonii* var. Columbia) (Cole et al., 2001) fokozottan rezisztens két növényi vírus (dohány mozaik vírus, TMV és dohány nekrozis vírus, TNV) által okozott lokális nekrotikus tünetekkel szemben, és fertőzetlenül is lényegesen nagyobb szalicilsavszintet és antioxidáns enzim aktivitást/génexpressziót (glutathion-S-transferáz és aszkorbát-peroxidáz) mutat, mint az ugyanazon szülőkből korábban előállított kontroll (*N. edwardsonii*) növények (Cole et al., 2004; Király et al., 2003, 2004). Feltételezhető, hogy a vírusfertőzés által indukált nekrozissal szemben rezisztens 'Columbia' növényekben egy genetikailag meghatározott, állandóan aktivált állapotú „szerzett” rezisztencia működik. Az említett kutatási előzmények alapján a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. A *N. edwardsonii* var. Columbia interspecifikus hibridben vírusfertőzéseknél megfigyelt tüneti (nekrózis) rezisztencia együtt jár-e a kórokozó replikációjának gátlásával?
2. A *N. edwardsonii* var. Columbia nekrosisrezisztenciájában valóban szerepet játszik-e a szalicilsav felhalmozódása és a fokozott antioxidáns kapacitás, ill. gén-indukció?
3. Tisztázandó, hogy a *N. edwardsonii* var. Columbia növények egy olyan genetikailag meghatározott, állandóan aktivált állapotú rezisztenciát mutatnak-e, amely hatásos más - nem vírus - kórokozók, ill. abiotikus stresszek által okozott nekrotikus tünetek ellen is?

Mint említettem, az újabban előállított interspecifikus dohányhibrid (*N. edwardsonii* var. Columbia) fokozottan rezisztensnek bizonyult két növényi vírus (TMV és TNV) által okozott lokális nekrotikus tünetekkel szemben a kontroll (*N. edwardsonii*) növényekhez képest. A 'Columbia' növények fokozott rezisztenciája elsősorban a lokális léziók számának és méretének jelentős (legalább 50 %-os) csökkenésében nyilvánul meg (Cole et al., 2004). Felmerül a kérdés, hogy ez a nekrosisrezisztencia együtt jár-e a vírus replikáció gátlásával, azaz a *N. edwardsonii* var. Columbia valódi vagy csak korlátozott (tüneti) rezisztenciát mutat az említett két kórokozó vírussal szemben? A kérdés tisztázásához a két *Nicotiana*-hibridben TMV-, ill. TNV-fertőzés során a vírusreplikációt kétféle módszer segítségével követtük nyomon: 1. a virionkoncentrációt köpenyfehérjére specifikus antitestek felhasználásával mértük, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

módszerrel, 2. a vírus-RNS-ek felhalmozódását pedig kétlépéses szemikvantitatív RT-PCR-rel (reverz transzkripcióval egybekötött polimeráz láncreakció) detektáltuk, a TMV és TNV genom köpenyfehérjét kódoló régiójának felszaporításával. A vírusreplikációt a TMV, ill. TNV fertőzés után abban az időpontban (2, ill. 5 nappal a vírusos fertőzés után) mértük, amikor az inokulált leveleken a léziószám már nem változik.

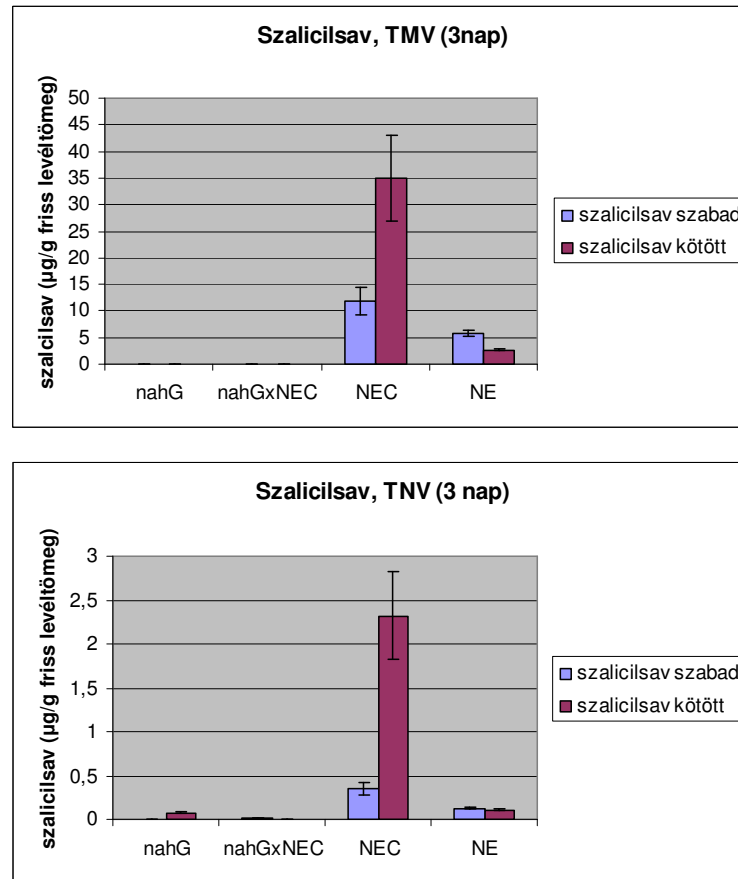
TMV-s fertőzésnél a vírusreplikáció közel ugyanolyan mértékű volt mindkét növénytípusban (*N. edwardsonii* és *N. edwardsonii* var. Columbia), bár a 'Columbia' növényekben kicsit alacsonyabb értékeket kaptunk. Érdekes viszont, hogy TNV-s fertőzésnél a 'Columbia' növényekben szinte alig detektáltunk vírusreplikációt (**6. ábra**). Ezek szerint TNV-s fertőzésnél a 'Columbia' növények rezisztenciája nemcsak a lokális nekrotikus tünetekkel (léziók), hanem a vírusreplikációval szemben is megnyilvánul. Mindez feltehetően összefügg azzal, hogy TNV-s fertőzés esetén a tüneti rezisztencia hatékonyabb (akár 80 %-os léziószám- és méretcsökkenés), mint TMV-fertőzésnél, ahol csak kb. 50%-os léziószám- és lézióméretcsökkenés tapasztalható (Cole et al., 2004). A *N. edwardsonii* var. Columbia vírusos fertőzésekkel szembeni rezisztenciája tehát TNV-s fertőzés esetén nemcsak a lokális nekrotikus tüneteket, hanem a vírus replikációját is gátolja. Korábbi vizsgálatok szerint a *N. edwardsonii* var. Columbia lokális vírusos fertőzéseknel (TMV és TNV) megfigyelt fokozott mértékű rezisztenciája egy genetikailag aktivált „szerzett” rezisztenciának fogható fel, amely együtt jár egyes védekezési folyamatok állandó megnyilvánulásával, pl. a fertőzés nélkül is rendkívül magas szabad és kötött szalicilsavszinttel és egy patogenezissel kapcsolatos fehérje (PR-1) túltermelésével (Cole et al., 2004).



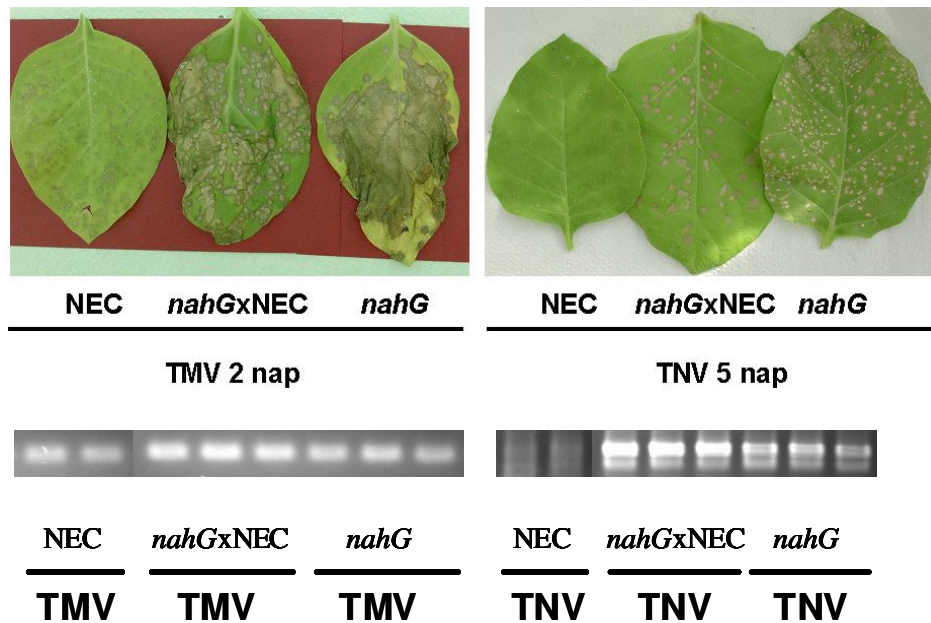
6. ábra: Dohány mozaikvírus és dohány nektrózis vírus (TMV és TNV) replikációja *Nicotiana edwardsonii* (NE) és *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) növények inokulált leveleiben, a fertőzés után 2, ill. 5 nappal. A felső ábrákon az ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel, az alsó ábrákon az RT-PCR (kétlépéses szemikvantitatív reverz transzkripció/polimeráz láncrakció) módszerrel kapott eredmények láthatók. Kontroll = (mechanikai stressz). Az RT-PCR-nél (TMV, ill. TNV köpenyfehérjéjén expressziója) valamennyi minta azonos mennyiségű (1,5 µg) teljes RNS-t reprezentál. A 405 nm = 405 nm-en mért abszorpció.

A magas szalicilsavszint és a lokális vírusfertőzéseknél tapasztalt fokozott rezisztencia közötti kapcsolat egyértelmű tisztázásához az *N. edwardsonii* var. Columbia növényeket kereszteztük egy szalicilsav-felhalmozásra képtelen transzgenikus (*nahG*) dohányjal (*N. tabacum* cv. Xanthi *nahG*). Az F₁ fajhibridekben nyomon követhető, hogy a szalicilsav hiánya mennyiben befolyásolja a vírusrezisztenciát a tüneti (nektrózis) rezisztencia, ill. a vírusreplikáció szintjén. Megemlítendő, hogy a *nahG* dohány a vad típushoz képest fokozottan fogékony a sejt- és szöveti nektrózisra és az ilyen tünetekkel járó fertőzésekre (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994). Kimutattuk, hogy a Columbia x *nahG* F₁ hibridekben

a szabad és kötött szalicilsav a *nahG* dohánynál mérhető nullához közeli szintre csökken (**7. ábra**), és a fokozott vírusrezisztencia megszűnik. A TMV és TNV által okozott lokális nekrotikus tünetek és a vírus replikáció mértéke egyaránt a *nahG* dohánynál mérhető szintre emelkedik (**8. ábra**).



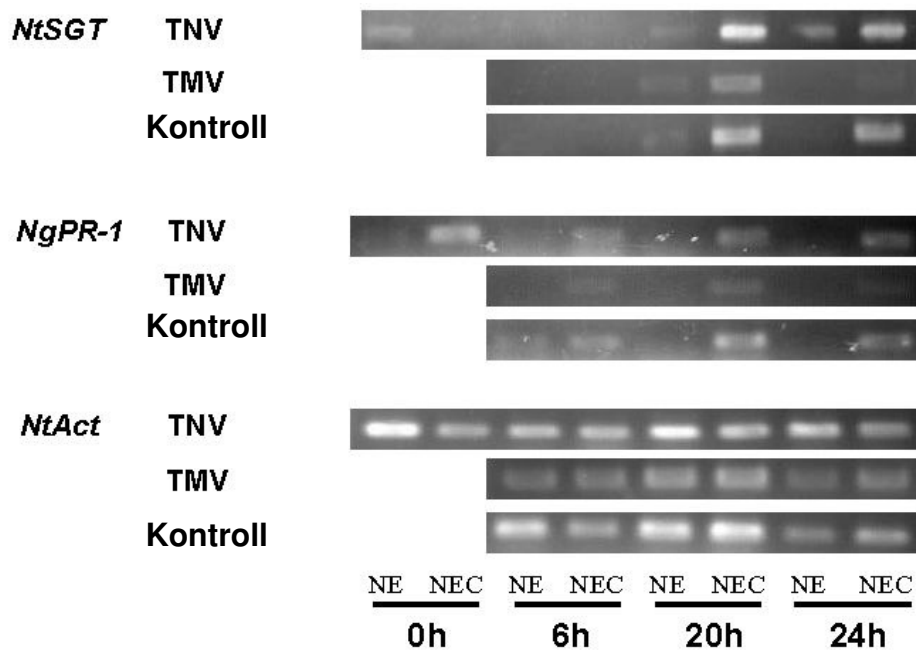
7. ábra: Dohány mozaikvírussal és dohány nekrotízis vírussal (TMV és TNV) fertőzött *Nicotiana edwardsonii* (NE), *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC), *nahG* dohány valamint *nahG* x Columbia F₁ hibrid növények szabad- és kötött szalicilsav tartalma a fertőzés után 3 nappal, nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás módszerrel (HPLC) mérve.



8. ábra: A szalicilsav-felhalmozás hiánya megszünteti a fokozott vírusrezisztenciát. A felső ábrákon a dohány mozaikvirussal és dohány nekrotízis vírussal (TMV és TNV) fertőzött *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia (NEC), *nahG* x Columbia F₁ hibrid, valamint *nahG*-dohánynövényekben a lokális nekrotikus tünetek mértéke látható 2 (TMV), ill. 5 nappal (TNV) a vírusfertőzés után. Alsó ábrák: TMV és TNV replikációja (TMV, ill. TNV köpenyfehérjéjén expressziója) kétlépéses szemikvantitatív RT-PCR-rel mérve *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC), *nahG* x Columbia F₁ hibrid, valamint *nahG*-dohánynövényekben, a fertőzés után 2 (TMV), ill. 5 nappal (TNV). Valamennyi minta azonos mennyiségű (1,5 µg) teljes RNS-t reprezentál.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a szalicilsav ténylegesen szerepet játszik a *N. edwardsonii* var. Columbia fokozott vírusrezisztenciájában. Feltűnő, hogy a 'Columbia' növényekben elsősorban a kötött szalicilsav halmozódik fel (7. ábra), amelynek nagy része valószínűleg szalicilsav-glikozid (SAG). Ha a kötött (glikozidos) szalicilsav kulcsszerepet játszik a növényi vírusrezisztenciában, várható, hogy a SAG-

bioszintézis kulcsenzimjét kódoló gén(ek) expressziója is fokozottabb a 'Columbia' növényekben. Egy szalicilsav-glikozilálásért felelős gén (UDP-glükóz: szalicilsav glükozil-transzferáz, *NtSGT*) expressziója TMV-s és TNV-s fertőzés után valóban igen erősen indukálódott a *N. edwardsonii* var. Columbia-ban, míg a *N. edwardsonii*-ban jóval kevésbé volt detektálható a gén expressziója (9. ábra).

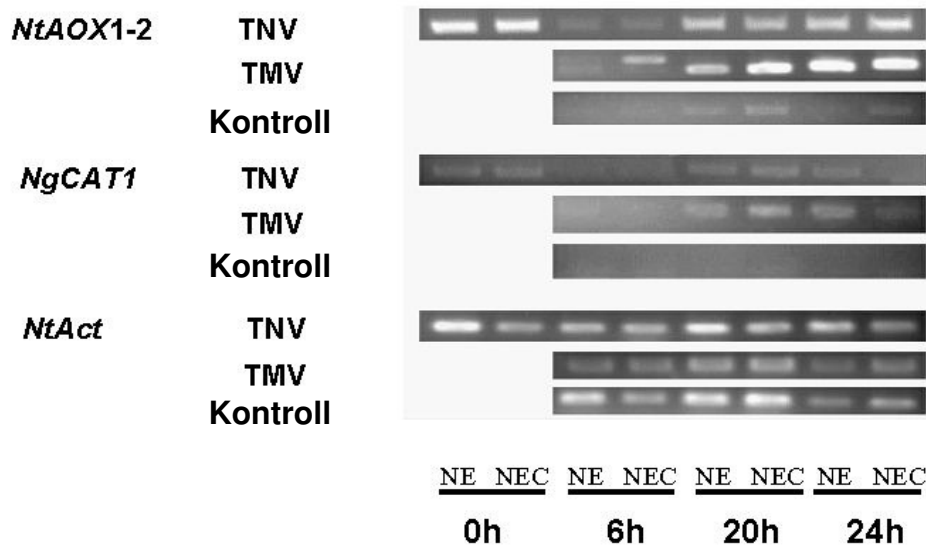


9. ábra: Egy szalicilsav-glikozilálásért felelős gén (*NtSGT*) és egy patogenezissel kapcsolatos gén (*NgPR-1*) expressziójának változásai dohány mozaik vírussal és dohány nekrotízis vírussal (TMV és TNV) fertőzött *Nicotiana edwardsonii* (NE) és *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) növényekben, a vírusosfertőzés után különböző időpontokban. Kontroll = (mechanikai stressz). A génexpressziót egy kétlépéses szemikvantitatív reverz transzkripció/polimeráz láncrakció módszerrel (RT-PCR) mértük, referenciának egy dohány aktingén (*NtAct*) expresszióját tekintettük.

A nekrozisgátlással együtt járó növényi rezisztenciaformák (pl. szerzett rezisztencia, hiperszenzitív reakció) egyik legfontosabb kísérőjelensége a szalicilsav és az ún. patogenezissel kapcsolatos (PR) gének indukciója. A *N. edwardsonii* var. Columbia-ban megfigyelt fokozott vírusrezisztencia csak kb. 50 napos kor után jelentkezik, amikor a növények fertőzés nélkül is nagy mennyiségben kezdenek el termelni egy patogenezissel kapcsolatos fehérjét (PR-1). (Cole et al., 2004). Vizsgálataink kimutatták, hogy az mRNS-szintű *NgPR-1*-génexpresszió szintén rendkívül erős már a fertőzetlen 'Columbia' növényekben is, míg a *N. edwardsonii*-ban még 24 órával a vírusos fertőzések után is alig detektálható a gén expressziója (**9. ábra**).

A fokozottan vírusrezisztens *N. edwardsonii* var. 'Columbia' növények fertőzetenül is valamivel nagyobb antioxidáns enzimaktivitást/génexpressziót (glutathion-S-transzferáz és aszkorbát peroxidáz) mutatnak, mint a viszonylag fogékonyabb *N. edwardsonii* (Király et al., 2003, 2004). Bizonyos antioxidánsok viszont feltehetően nem járulnak hozzá a 'Columbia' növények fokozott vírus (nekrozis)-rezisztenciájához: két másik antioxidáns hatású enzim kódoló gén (egy kataláz, *NgCAT1* és alternatív oxidáz, *NtAOX1-2*) expressziója hasonló módon változott mindkét *N. edwardsonii* hibridben (**10. ábra**). Ezek szerint az említett gének, ill. az általuk kódolt izoenzimek valószínűleg nem játszanak döntő szerepet a fokozott vírus (nekrozis)-rezisztencia kialakításában és fenntartásában. Érdekes viszont, hogy mindkét *N. edwardsonii* hibridben az *NgCAT1* és *NtAOX1-2* gén expressziója a vírusfertőzés után 6 órával átmenetileg visszaszorul (**10. ábra**). Ez a jelenség feltehetően a programozott sejthalál indukciójához járul hozzá,

amely előfeltétele a lokális nekrotikus tünetek (HR) kialakulásának (Künstler et al., 2007).



10. ábra: Két antioxidáns hatású enzimet kódoló gén (kataláz, *NgCAT1* és alternatív oxidáz, *NtAOX1-2*) expresszióváltozásai dohány mozaik vírussal és dohány nekrotízis vírussal (TMV és TNV) fertőzött *Nicotiana edwardsonii* (NE), *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) növényekben, a vírusfertőzés után különböző időpontokban. Kontroll (mechanikai stressz). A génexpressziót egy kétlépeses szemikvantitatív reverz transzkripció/polimeráz láncrakció módszerrel (RT-PCR) mértük, referenciának egy dohány-aktingén (*NtAct*) expresszióját tekintettük.

Az antioxidáns kapacitás és a szalicilsavszint mellett megvizsgáltuk a növény szuperoxid-tartalmát is, és azt tapasztaltuk, hogy a *N. edwardsonii* var. Columbia növényekben már fertőzetlen állapotban is magasabb szuperoxidszint detektálható a fogékonyabb növényhez képest (**11. ábra**). A 'Columbia' növények fokozott szuperoxid-termelése feltehetően a genetikailag állandóan aktivált „szerzett rezisztencia” egyik biokémiai markere. A növények szerzett rezisztenciája hosszan tartó védelmet biztosít kórokozó vírusokkal, baktériumokkal és gombákkal szemben egyaránt (Gaffney et al., 1993; Vernooij et al., 1995; Friedrich et al., 1996). A

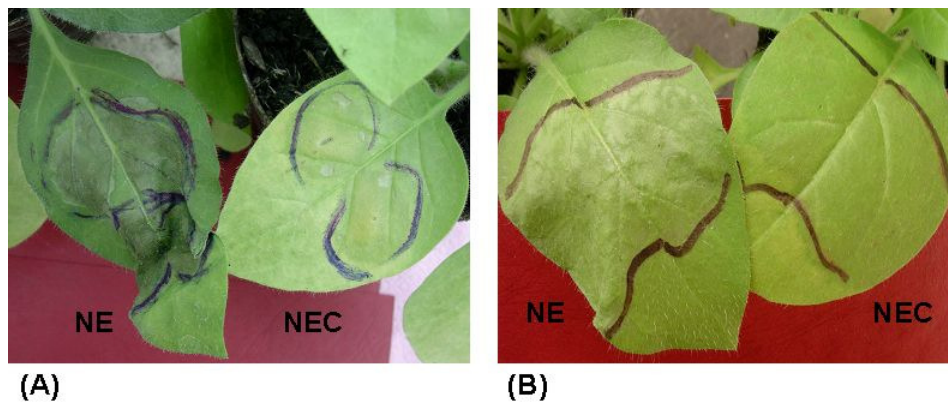
szerzett rezisztencia megjelenésével párhuzamosan megnő az endogén szalicilsavszint mind a fertőzött, mind az egészséges növényi szövetekben (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990). Mindezek alapján feltételezhető volt, hogy a *N. edwardsonii* var. Columbia vírusos fertőzések esetén mutatott fokozott rezisztenciája hatásos lehet egyéb, nekrotikus tüneteket előidéző kórokozók, ill. abiotikus stresszek ellen is.



11. ábra: Szuperoxid-felhalmozódás *Nicotiana edwardsonii* (NE) és *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) fertőzetlen növényekben. A szuperoxid felhalmozódását kék szín jelöli (nitro-blue-tetrazolium [NBT] festés).

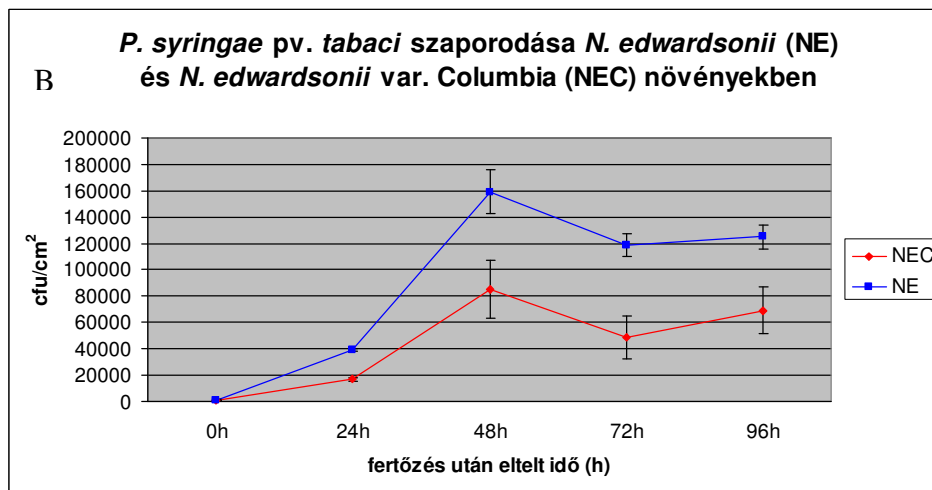
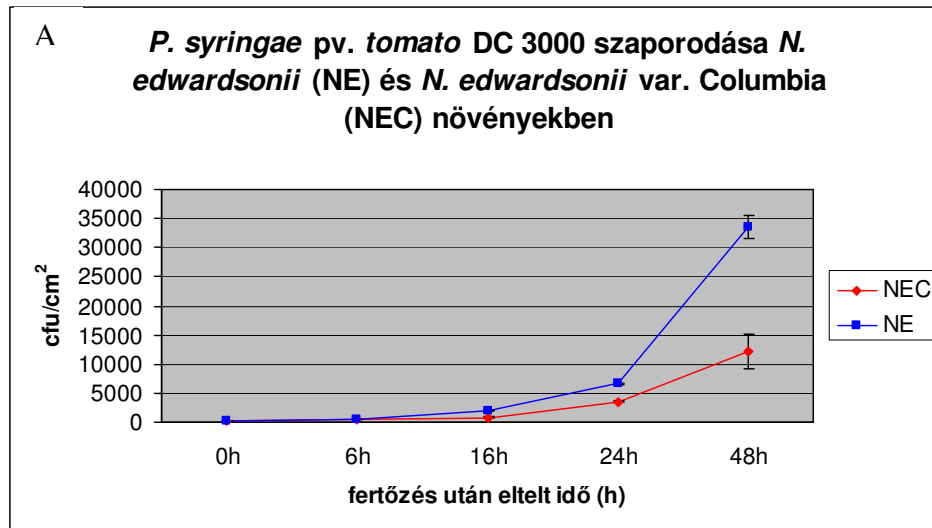
Kísérleteink szerint a 'Columbia' növények nekrosisrezisztenciája tüneti szinten érvényesül baktériumos fertőzéseknél is (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 és *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) (**12. ábra**).

Tisztázni kívántuk ebben az esetben is hogy a 'Columbia' növényekben csak tüneti rezisztenciáról van-e szó, vagy pedig a baktériumok szaporodása is gátlódik.



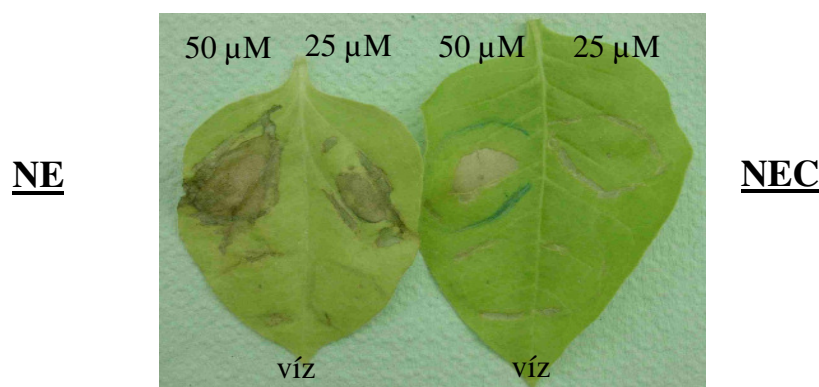
12. ábra: A *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia a kontrollhoz (*N. edwardsonii*) viszonyítva fokozottan ellenáll két baktérium kórokozó, a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (A) és a *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000 (B) által okozott lokális nekrotikus tünetekkel szemben. A baktériumos fertőzéseknél a levelekbe infiltrált baktériumszuszpenzió töménysége 7×10^5 cfu/ml volt (az infiltrált terület tollal körberajzolva).. A felvételek 2 nappal a fertőzések után készültek. NE = *N. edwardsonii*, NEC = *N. edwardsonii* var. Columbia, cfu = colony-forming unit (telepformáló egység).

A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 baktériummal szemben mindkét növény ellenálló. A fertőzés (7×10^5 cfu/ml inokulumkoncentráció) után a 'Columbia' fajhibridben a baktériumszám a fertőzést követő 48 órán belül csak kb. 30 %-a volt a *N. edwardsonii*-ban mért értéknek (**13A. ábra**). Nagyobb inokulumkoncentrációnál (7×10^8 cfu/ml) viszont a 'Columbia' növények fokozott rezisztenciája nem, vagy csak kevésbé érvényesült. A mindkét növényben kompatibilis fertőzést (normoszenzitív nekrozist) okozó *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* baktériummal szemben a 'Columbia' növények szintén ellenállóbbnak bizonyultak (kb. 50 %-al kisebb baktériumszám), de csak az alacsonyabb (7×10^5 cfu/ml) inokulumkoncentráció esetén (**13B. ábra**).



13. ábra: A baktérium szaporodásának időbeli változása *Nicotiana edwardsonii* (NE) és *N. edwardsonii* var. *Columbia* (NEC) növényekben HR-típusú rezisztenciát kiváltó *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (A) és kompatibilis fertőzést (normoszenzitív nektróvizist) kiváltó *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (B) fertőzésénél. Az inokulum koncentráció mindkét esetben 7×10^5 cfu/ml volt. cfu= colony-forming unit (telepformáló egység).

Ismeretes, hogy a szerzett rezisztencia nemcsak bizonyos nekrotikus tüneteket okozó kórokozókkal szemben, hanem a növényekben nekrozist előidéző, reaktív oxigénszármazékokat generáló herbicidekkel szemben is érvényesül (Strobel és Kuć, 1995). Ezért megvizsgáltuk, hogy a 'Columbia' növények tüneti (nekrozis) rezisztenciája érvényesül-e egy nekrotikus tüneteket (oxidatív stresszt) előidéző herbiciddel (a paraquattal) szemben is? A növények leveleit paraquat 25 és 50 μM -os vizes oldatával infiltráltuk. A 'Columbia' növényekben a paraquat által okozott nekrotikus tünetek jóval enyhébbek voltak, és lassabban terjedtek (tünetek csak az infiltrált területen belül), mint a *N. edwardsonii*-ban (**14. ábra**).



14. ábra: A *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia (NEC) fokozottan ellenáll egy nekrotikus tüneteket (oxidatív stresszt) előidéző herbicid hatásának. A növények leveleit paraquat 25 és 50 μM -os vizes oldatával, negatív kontrollként az alsó levélrészeket csapvízzel infiltráltuk (az infiltrált terület tollal körberajzolva). A felvétel 2 nappal a kezeléseket után készült. NE = *N. edwardsonii*.

A kapott eredmények szerint tehát a *N. edwardsonii* var. Columbia fokozott rezisztenciája nemcsak kórokozó fertőzések, hanem abiotikus stresszek által okozott nekrotikus tünetekkel szemben is érvényesül. Ebből a

szempontból a 'Columbia' növények hasonlítanak egy paraquat toleráns dohány (cv. Samsun) vonalra, amely szintén „multirezisztens” többféle kórokozó és abiotikus stressz által indukált nekrozissal szemben (Barna et al., 1993).

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy

1. a *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia valódi rezisztenciát mutat dohány nekrozis vírus (TNV) fertőzésével szemben, mind a vírusreplikációval mind a tünetek szintjén. A dohány mozaik vírus (TMV) fertőzése esetén viszont elsősorban tüneti rezisztenciáról beszélhetünk.
2. a szalicilsav jelentős szerepet játszik ebben a rezisztenciafolyamatban, hiszen ha egy szalicilsav-felhalmozásra képtelen transzgenikus (*nahG*) dohányvonallal keresztezzük a Columbia növényt, teljesen lecsökken a szalicilsavszint, és megszűnik a vírusrezisztencia.
3. feltételezhető, hogy a *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia növényekben egy állandóan aktivált „szerzett rezisztencia” működik.
4. a szalicilsav által biztosított rezisztenciafolyamat hatásos nekrotikus tüneteket előidéző baktériumokkal (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* és *P. syringae* pv. *tomato*) és abiotikus stresszekkel (paraquat) szemben is.

A dohány mozaik vírus (TMV) ellen ható *N* rezisztenciagén csendesítésének hatása a nem rokon dohány nektrózis vírus (TNV) által előidézett fertőzésre

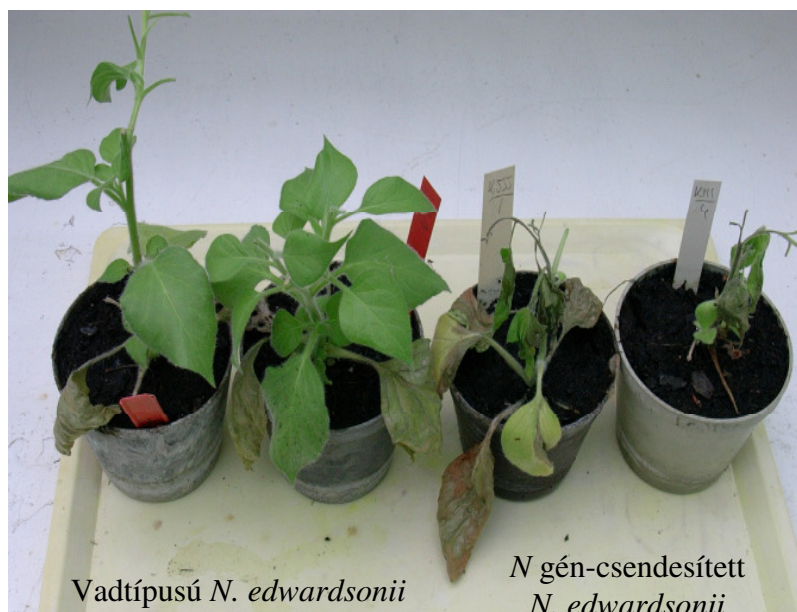
Az egyik legismertebb növényi vírus-rezisztenciagén (az *N* gén) lokális nektrózis ellenállósági reakciót (HR) határoz meg dohányban a dohány mozaik vírus (TMV) ellen. Balaji et al. (2007) ezt a gént csendesítették *Nicotiana edwardsonii*-ban, és ennek következtében a növény rezisztenciája csökkent a TMV-vel szemben. Azt tapasztalták, hogy az inokulált levelekben a vírusszám nem változott jelentősen, azonban a vírus sejtről-sejtre terjedése fokozódott, míg a rezisztencia tünetei (HR) később jelentek meg a géncsendesített növényekben a vad típusú dohányhoz képest. Laboratóriumunkban ezen *N*-géncsendesített *N. edwardsonii* növényeket használtuk fel kísérleteinkhez. Két kérdésre kívántunk választ kapni munkánk során:

1. Az *N* gén csendesítése hatással van-e a TMV szisztemikus terjedésére?
2. Az *N* gén csendesítése hatással van-e egy másik, a TMV-vel nem rokon vírus (dohány nektrózis vírus, TNV) fertőzésére?

Munkánk kezdetén megismételtük Balaji et al. (2007) kísérletét, és hasonló eredményeket kaptunk, azaz az *N*-géncsendesített *N. edwardsonii*-ban (NE) TMV fertőzés után a lokális nekrotikus tünetek (HR) késve alakultak ki a vad típusú növényhez viszonyítva. Ismert, hogy *N. edwardsonii*-ban a HR kialakulását követően a TMV képes szisztemizálódni és nekrotikus tüneteket okozni a nem inokulált levelekben is (Cole et al.,

2004). A szisztemikus terjedés vizsgálatához vad típusú és géncsendesített NE növényeket fertőztünk TMV-vel, és azt tapasztaltuk, hogy a szisztemikus nekrotizálódás 3-5 nappal korábban jelentkezik a géncsendesített növényekben (**15. ábra**). Balaji et al. (2007), valamint laboratóriumunk eredményei arra utalnak, hogy az *N*-rezisztenciagén szerepe elsősorban a TMV lokális és szisztemikus terjedésének akadályozásában nyilvánul meg.

Ha a növényeket a TMV-vel nem rokon dohány nekrozis vírussal (TNV) fertőztük, a vad típusú NE növényeken a TNV-re jellemző lokális nekrotikus tünetek (HR) alakultak ki, míg az *N*-géncsendesített növényekben kevesebb lokális nekrozis képződött (**16. ábra**).



15. ábra: A szisztemikus nekrotizálódás tünete a vad típusú és *N*-géncsendesített *Nicotiana edwardsonii* növények dohány mozaik vírus (TMV) fertőzése után 9 nappal. Látható hogy a szisztemikus nekrozis előbb jelenik meg az *N*-géncsendesített növényeken a vad típusúhoz képest. A vad típusú növényen a szisztemikus nekrozis tünetei csak 12-14 nappal a fertőzés után jelennek meg.

A TNV indukálta nekrotikus léziók hiánya a géncsendesített növényekben két lehetőséget vet fel:

1. a növény rezisztenssé vált a TNV-vel szemben, ezért csökkennek a lokális nekrotikus tünetek az *N*-gén csendesítésének hatására, vagy
2. a növény fogékonyá vált a TNV-vel szemben, ezért csökkennek a lokális nekrotikus tünetek az *N*-gén csendesítésének hatására.



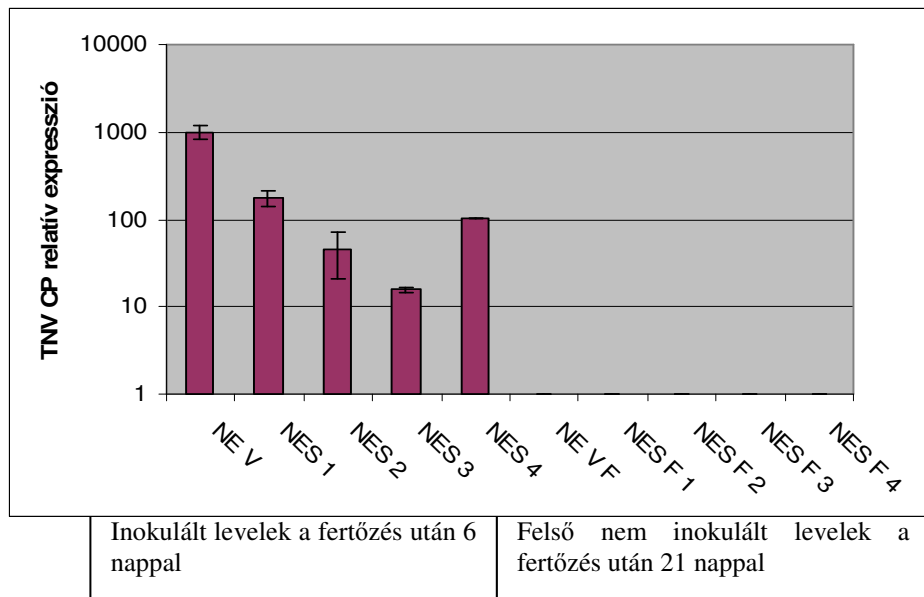
Vadtípusú
N. edwardsonii

***N*-géncsendesített transzgenikus**
N. edwardsonii

16. ábra: Az *N*-gén csendesítésének hatása a dohány nekrozis vírus (TNV) fertőzésére 6 nappal a fertőzés után, *Nicotiana edwardsonii*-ban. A vadtípusú levélen jól láthatók a vírusra jellemző lokális nekrotikus tünetek (HR), míg az *N*-géncsendesített levélen jelentősen kevesebb nekrozis látható.

A kérdés eldöntéséhez tisztázni kívántuk a vírusszint alakulását az *N*-géncsendesített, illetve a vadtípusú NE növényekben. E célból a TNV köpenyfehérje-termelődésért felelős génjére indítoszekvenciákat terveztünk. A növényekből teljes RNS-t vontunk ki, és a tervezett reverz

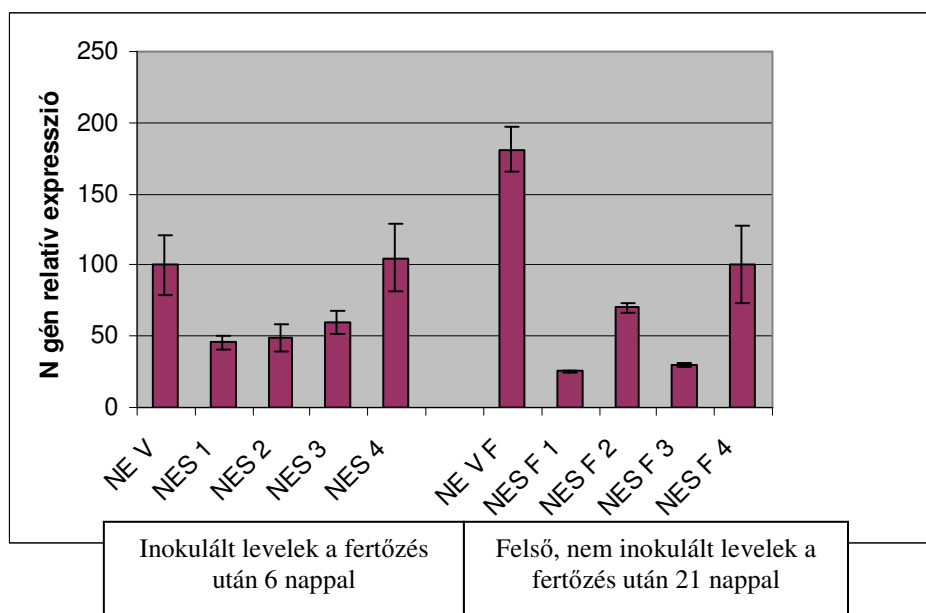
indítószekvencia felhasználásával c-DNS-t írtunk, majd ebből valós idejű (real-time) PCR használatával állapítottuk meg a vírusrészecskék mennyiségét. Valójában a köpenyfehérje (CP) gén expresszióját mértük (17. ábra).



17. ábra: A dohánynekrózis vírus (TNV) köpenyfehérje (CP)-gén relatív expressziójának csökkenése az *N*-gén csendesítésének hatására vírusfertőzött *Nicotiana edwardsonii*-ban (valós idejű RT-PCR). Az ábra bal oldalán van ábrázolva az inokulált levelekben a csendesítés hatására mért vírusszintcsökkenés a vad típusúhoz képest. Az ábra jobb oldalán van érzékeltetve az, hogy a felső, nem inokulált levelekben a vírus képtelen volt a szisztemizálódásra, ugyanis nem tudtuk vírust kimutatni ezekben a levelekben. NE V = Vad típusú *Nicotiana edwardsonii*, inokulált levelek. NES = *N*-gécscsendesített *N. edwardsonii*, inokulált levelek. NE V F = Vad típusú *N. edwardsonii*, felső levelek. NES F = *N*-gécscsendesített *N. edwardsonii*, felső levelek.

A TNV-köpenyfehérjéjén (TNV-CP) expressziója, azaz a vírus mennyisége nem növekedett a gécscsendesített inokulált levelekben, hanem csökkent, vagyis az *N* gén csendesítése bizonyos mértékű rezisztenciát

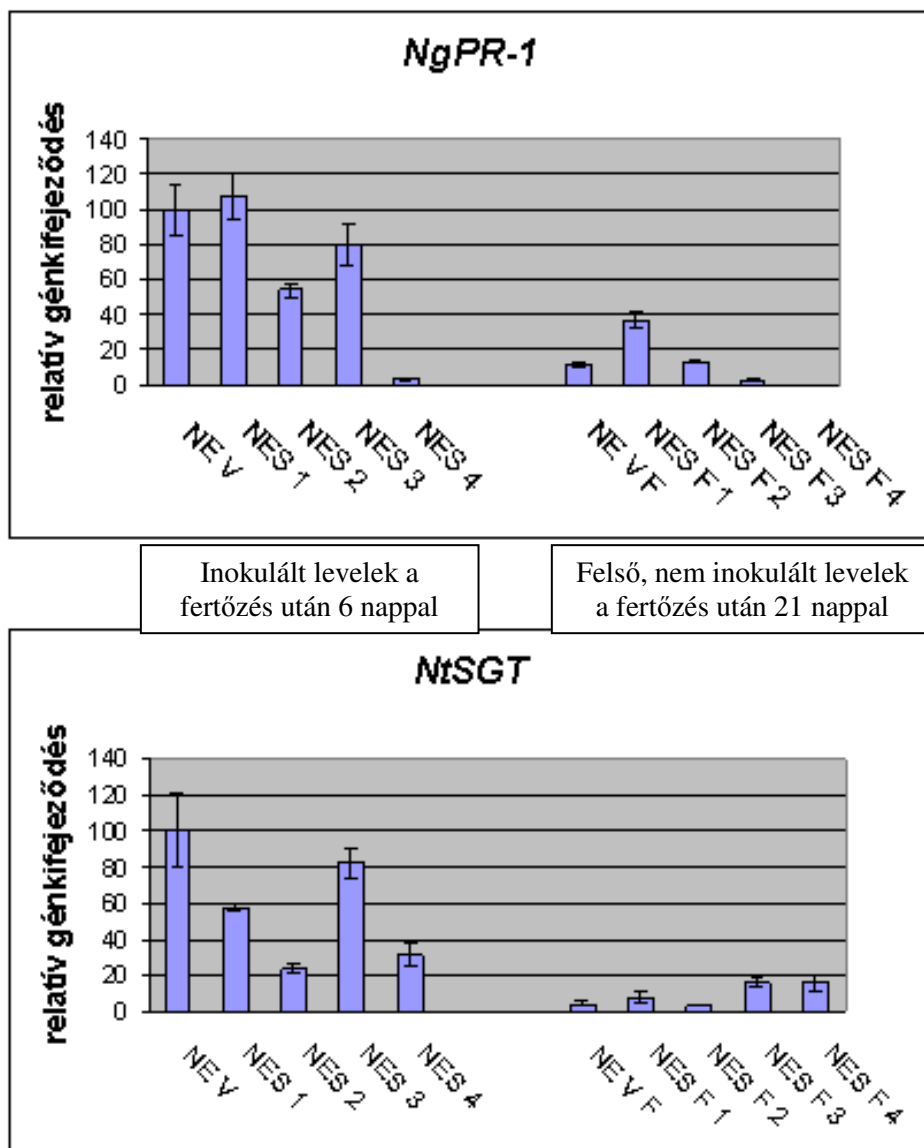
okozott. Így elmondhatjuk, hogy az *N*-géncsendesített növények leveleiben TNV-fertőzés esetén valódi vírusreplikáció-gátlásról van szó, nemcsak tüneti rezisztenciáról. A **17. ábrán** az is látható, hogy az *N*-gén csendesítésének nem volt hatása a TNV növényen belüli szisztemikus terjedésére, hiszen a felső nem inokulált levelekből nem tudtunk vírust kimutatni még 21 nappal a fertőzés után sem. Azt is ellenőriztük, hogy a géncsendesített növényekben valóban csökkent az *N*-gén kifejeződése, a gént specifikus primerek használatával, valós idejű (real-time) RT-PCR módszerrel (**18. ábra**).



18. ábra. Az *N*-gén expressziójának csökkenése géncsendesített, dohány nekrotízis vírussal (TNV) fertőzött *Nicotiana edwardsonii* levelekben (valós idejű RT-PCR). Az ábra bal oldalán látható az *N* gén relatív expressziójának csökkenése (egy eset kivételével) az inokulált levelekben a csendesítés hatására a vad típusú növényhez viszonyítva. Az *N* gén expressziójának csökkenése a vad típusú növényhez képest 21 nappal a fertőzés után a felső, nem inokulált levelekből is kimutatható. NE V = Vad típusú *N. edwardsonii*, inokulált levelek. NES = *N*-géncsendesített *N. edwardsonii*, inokulált levelek. NE V F = Vad típusú *N. edwardsonii*, felső levelek. NES F = *N*-géncsendesített *N. edwardsonii*, felső levelek.

A kísérletek tehát azt mutatják, hogy az *N*-gén csendesítése a *N. edwardsonii* TMV általi fertőzésére úgy hat, hogy a vírusrezisztencia csökken, azaz a fogékonyság fokozódik. Ezzel szemben, ha TNV-vel fertőzzük a növényt, a géncsendesítés nem csökkenti, hanem fokozza a vírusrezisztenciát, vagyis a TNV mennyisége jelentősen csökken. Ebből érdekes módon az is látható, hogy egy rezisztenciagén csendesítése egy nem rokon vírus fertőzésére éppen ellenkezően hathat.

Azt, hogy az *N*-gén milyen szerepet játszhat ebben a folyamatban, pontosan nem tudjuk, de megvizsgáltuk a géncsendesített növényekben, hogy a TNV-vel szembeni rezisztencia erősödése együtt jár-e egyes védekezési gének fokozott indukciójával? Egy patogenezissel kapcsolatos és a szalicilsav-glikozilálás kulcsenzimjét kódoló gén (*NgPR-1* és *NtSGT*) expresszióját vizsgáltuk a vad típusú és *N*-géncsendesített növényekben, az inokulált levelekben 6 nappal a TNV fertőzés után, ill. a szisztemikus levelekben 21 nappal a TNV fertőzés után. A két védekezési gén expressziója az *N*-géncsendesített növényekben a TNV fertőzést követően kb. ugyanolyan mértékben vagy kevésbé indukálódott, mint a vad típusban (**19. ábra**), míg az egészséges, fertőzetlen növényekben nem volt detektálható génexpresszió, egyik genotípusban sem. Ezek szerint az *N*-géncsendesítés hatására *N. edwardsonii*-ban kialakuló, TNV-vel szembeni fokozott rezisztenciában nincs szerepe a vizsgált gének emelt szintű indukciójának.



19. ábra: Védekezési gének (*NgPR-1* és *NtSGT*) expressziója vad típusú (NE) és *N*-géncsendesített transzgenikus *N. edwardsonii* inokulált és szisztémikus leveleiben, a dohány nekrotízis vírus (TNV) fertőzés után 6, ill. 21 nappal. Valós idejű RT-PCR módszerrel mérve. **100** = a vad típusban detektált génexpresszió. NE V = Vad típusú *N. edwardsonii*, inokulált levelek. NES = *N*-géncsendesített *N. edwardsonii*, inokulált levelek. NE V F = Vad típusú *N. edwardsonii*, felső levelek. NES F = *N*-géncsendesített *N. edwardsonii*, felső levelek.

A fenti kísérletek összefoglalásaként elmondható, hogy

1. az *N*-vírusrezisztencia-gén csendesítése a *N. edwardsonii*-ban a TMV fertőzés után csökkenti az ellenállóképességet, azaz fokozza a fogékonyságot, mert a tünetek (nekrózisok) szisztemikus megjelenése (a vírus terjedése) több nappal korábban észlelhető a géncsendesített növényekben, mint a nem csendesített kontrollban.
2. az *N*-gén csendesítése a TNV-vel fertőzött dohányban ellenkező hatást fejt ki, mert nem csökkenti, hanem fokozza a rezisztenciát, azaz a TNV mennyisége csökken.
3. az *N*-vírusrezisztencia-gén csendesítése tehát nem egyformán, hanem ellenkező módon hat a TMV, illetve a TNV (két nem rokon vírus) elleni rezisztenciára.
4. a *N. edwardsonii*-ban az *N*-gén csendesítésekor kialakuló fokozott TNV-rezisztencia oka feltehetően nem a patogenezissel kapcsolatos (védekezési) gének indukciója, mivel két védekezési gén (*NgPR-1* és *NtSGT*) expressziója TNV fertőzés után hasonló mértékben vagy kevésbé aktiválódott a vad típusú növényekben, mint a transzgenikus géncsendesített dohányokban.

ÉRTÉKELÉS

A növényi betegségrezisztencia kutatásának történetében a legelső közlemény (Ward, 1902), valamint ennek folytatása (Stakman, 1915) szinte a mai napig meghatározta a növényi rezisztenciabiológiai kutatást. Az említett két közlemény, majd Holmes (1929), valamint később Klement et al. (1964) eredményei azt igazolták, hogy az egyik legfontosabb és könnyen vizsgálható ellenállósági forma a hiperszenzitív reakcióval (HR) párosuló „rassz-specifikus” vagy „törzsspecifikus” rezisztencia. Ez rendszerint egy géntől függő ellenállóképesség és hatása mélyreható („vertikális”). Egy évszázad elteltével azonban a kutatók újabban azt a következtetést vonták le a tapasztalatokból, hogy a HR-típusú rezisztencia ugyan könnyen vizsgálható mind a növénynemesítő, mind a növénypatológus szempontjából, viszont mégsem hasznos az agrárium szemszögéből értékelve, mert a rezisztencia csak egy vagy néhány kórokozó törzs (rassz) ellen érvényesül és ezért igen rövid életű. Új rasszok, amelyekre ez a rezisztenciaforma már nem hat, 6-10 év alatt rendszeresen kialakulnak a patogénpopulációkban, más szóval az eddig ellenálló növény elveszítheti rezisztenciáját.

A kutatás tehát kezdett érdeklődni az egyéb rezisztenciaformák iránt is, így a jelenlegi kutatásokban ez a fő irányzat. A végcél ugyanis a növénynemesítés eszközeivel olyan ellenálló képesség kialakítása, amely tartós rezisztenciát biztosít a termesztett növényekben. Az 1. táblázat bemutatja az eddig ismert rezisztenciaformákat, amelyek közül három forma esetében igyekeztem új ismeretekre szert tenni.

A nemgazda-rezisztencia mechanizmusa

A nemgazda- (non-host) rezisztencia a leggyakoribb ellenállósági forma a természetben, hiszen a legtöbb növény – tekintve, hogy nem gazdája a legtöbb patogénnek – eleve ellenálló a legtöbb kórokozóval szemben. Ez tehát sokoldalú, tartós rezisztencia, amelynek növénynemesítési felhasználása fontos lehet a gyakorlat szempontjából. A nemgazda ellenálló képességének pontos mechanizmusa azonban a mai napig nem tisztázódott (Humphry et al., 2006. Schulze-Lefert és Panstruga, 2011).

Saját eredményeink szerint a reaktív oxigén fajták (ROS) kórokozót gátló vagy ölő hatásának a tünetmentes nemgazda-rezisztenciában, illetve a HR tüneteket mutató gazdarezisztenciában van központi jelentősége. Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált 21 növény/patogén kapcsolatban a jól ismert gazdarezisztenciában, de a tünetmentes nem gazda ellenálló képességben is a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) anion felhalmozódik, és gátló-ölő hatást fejt ki. Kísérleteink során azt az eredményt kaptuk, hogy a fogékony növényekben (a kompatibilis gazda/patogén kombinációkban) a gombás fertőzések hatására nincs szuperoxid-felhalmozódás. A kórokozók a fogékony növényekben akadálytalanul szaporodnak, és előidézik a szokványos betegség tüneteket. A rezisztens növényekben azonban a szuperoxid kb. 48 óra után felhalmozódik, és kifejtheti a kórokozót gátló-ölő hatását. A tünetmentes nemgazda-rezisztencia ezzel szemben úgy jellemezhető, hogy a kórokozókat gátló szuperoxid korábban, már a fertőzés utáni 24 óra elteltével felhalmozódik, és gátló-ölő hatását a patogének behatolása közben igen korán ki tudja fejteni. Ez a jelenség okozhatja, hogy a legtöbb nemgazda-rezisztencia esetében a HR kialakulása is

megakadályozódik, vagyis látható tünetek nem jelennek meg a fertőzött, de rezisztens növényi részeken. Ismeretes, hogy a szuperoxid felhalmozódása következtében egyéb ROS típusok is keletkezhetnek, amelyeknek ugyancsak szerepük lehet a patogén gátlásában, ill. a HR során a lokális nekrotikus tünetek kialakulásában. A leggyakoribb ROS típusok a hidrogén-peroxid (H_2O_2), valamint a belőle keletkező hidroxil-szabadgyök (OH^\bullet). A hidrogén-peroxid káros hatását több rezisztens növény/patogén kombinációban is észlelték (cf. Király et al., 2007). A OH^\bullet gyök kimutatása technikailag nehéz, ezért tudtunkkal nincs adat arra, hogy ez a szabadgyök valójában szerepet kap-e a rezisztens reakciókban.

Felmerül a kérdés, hogy ha a szuperoxid képződése valóban főszerepet visz a rezisztenciában, akkor e szabadgyök felhalmozódásának gátlása csökkentheti vagy meg is akadályozhatja az ellenálló képességet. Az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében Barna Balázs (nem közölt eredmények) korábban kimutatta, hogy árpanövények hőkezelése ($49^\circ C$ vízben 45 másodpercig) megváltoztathatja a növény lisztharmattal szembeni gazdarezisztenciáját, és részben fogékonyá teszi a fertőzött leveleket. Kísérleteim során kimutattam, hogy ez a hőkezelés csökkenti, illetve meg is szüntetheti a fertőzött levelekben a szuperoxid-felhalmozódást (**2. ábra**). A hősokkos kezelés azonban nem változtatta meg a tünetmentes, nemgazdarezisztenciát mutató árpalevelek ellenállóságát a búzalisztharmat fertőzésével szemben. Változást észleltünk, ha a hősokkot kombináltuk az antioxidáns szuperoxid-dizmutáz (SOD) + kataláz (CAT) enzimes kezeléssel. A rezisztencia ebben az esetben gyengült, mert gyéren búzalisztharmat-telepek fejlődtek ki az árpa leveleken, bár ezek szomszédságában HR-re emlékeztető szövetelhalások is láthatók voltak (**3. ábra**). Érdekes, hogy egy újabb közlemény szerint az általunk alkalmazott

hősokkhoz hasonló kezelés (50° C, 20 másodpercig) dinnyecsíranövényekben rezisztenciát indukál egy nekrotróf kórokozó (*Botrytis cinerea*) fertőzése ellen (Widiastuti et al., 2011). Ezek szerint egy rövid ideig tartó hősokk biotróf kórokozók (pl. lisztharmat) ellen fogékonyságot, míg nekrotróf kórokozó ellen rezisztenciát indukálhat. A jelenség feltehetően a szuperoxidszint csökkenésével van összefüggésben.

Ezzel kapcsolatban azt is érdemes megfontolni, hogy Király et al. (2008) szerint a dohány mozaik vírusra (TMV) rezisztens Xanthi-nc dohány tartós hőkezelése 30 °C-on a növényt fogékonyá tette a vírusos fertőzéssel szemben, és egyúttal gátolta a szuperoxid felhalmozódását és a szuperoxidképzésben központi szerepet vivő NADPH-oxidáz génjének expresszióját és a NADPH-oxidáz enzim aktivitását is. Ennek tudatában vizsgáltuk a NADPH-oxidáz enzim aktivitását nemgazda-rezisztens árpalevelekben is lisztharmatos fertőzés után. Az **5. ábra** mutatja, hogy a nemgazda-rezisztens fertőzött levelekben korábban aktiválódik az enzim, mint a gazdarezisztens árpákban, és ez az aktiválódás szinte azonos időben történik, mint a korai szuperoxid-felhalmozódás. Nem tudni, milyen oknál fogva, de egy általunk vizsgált árpa NADPH-oxidáz génjének (*HvRBOHF2*) expressziójában viszont nem kaptunk különbséget a gazdarezisztens és nemgazda-rezisztens fertőzött növények között, holott az enzim aktiválódása a nemgazda-rezisztenciánál korán bekövetkezett. Ez két dologra utalhat: 1. a NADPH-oxidáz biokémiai hatása nem a génexpresszió, hanem az enzimaktivitás szintjén szabályozódik, 2. a NADPH-oxidáz enzim aktivitásához az *HvRBOHF2* gén mellett vagy helyett más gének működése járul hozzá. Nemrég bizonyították, hogy az *HvRBOHF2* gén kulcsszerepet játszik az árpa lisztharmattal szembeni gazdarezisztenciájában (Proels et al., 2010). Ismeretes viszont, hogy árpában összesen legalább hat különböző NADPH-

oxidáz gén található (Lightfoot et al., 2008). Mindezek ellenére jogosnak tűnik az a feltevés, hogy a nemgazda-rezisztens növényekben a fertőzés után bizonyos génexpressziós változás(ok) után aktiválódik a NADPH-oxidáz enzim, és ennek következtében beindul a szuperoxid felhalmozódása, majd a kórokozó gátlása, és - legalább is a gazdarezisztens növények esetében - a HR típusú levélszöveti nekrotizálódás is.

A rezisztencia kialakulása során egyéb génexpressziós változások is bekövetkeznek. A gazdarezisztencia esetében, amikor pl. a rezisztens árpát árpalisztharmattal fertőztük, egy *SOD*-gén expressziója fokozódott, és tartósan így is maradt. Ha azonban az árpát a nem kompatibilis búzalisztharmattal fertőztük („nemgazda-rezisztencia”), akkor a *SOD*-gén expressziója csak rövid időre, átmenetileg fokozódott, mert a fertőző gomba feltehetően korán elhalt (4. ábra). A *SOD*-gén átmeneti aktiválódása a fertőzés után 24 órával következett be, abban az időpontban, amikor a szuperoxid ($O_2^{\bullet -}$) korai felhalmozódást is észleltük. Ebből arra is lehet következtetni, hogy a nemgazda-rezisztencia eseteiben a HR hiánya (vagyis a tünetmentesség) és a kórokozó gyors gátlása az antioxidáns *SOD* korai, bár átmeneti aktivitásával függ össze. Egy másik fontos gén, a *BAX-inhibitor 1* expressziója hasonlóan rövid ideig, de korán (a fertőzés után 24 órával) aktiválódott. Ez a gén, ill. fehérje terméke a programozott sejthalált (esetünkben a HR nekrotizálódást) gátolja (Hückelhoven, 2004, Watanabe és Lam, 2006). Eredményeinkből feltételezhető, hogy a *BAX-inhibitor 1* átmeneti aktiválódása, majd csökkenése jelzi a HR hiányát, ill. a kórokozó gyors gátlását a nemgazda-rezisztens növény/patogén kombinációban, vagyis akkor, amikor az árpát búzalisztharmattal fertőzzük. A *BAX-inhibitor 1* gén aktiválódását mások is vizsgálták tünetmentes nemgazda-rezisztencia esetén (Eichmann et al., 2004) más árpafajtával és más búzalisztharmat

rasszal egy kevésbé érzékeny módszer segítségével. Kutatási eredményeik alátámasztják a mi eredményeinket, tehát ők is a *BAX inhibitor 1* gén tranziens emelkedését figyelték meg nemgazda-rezisztencia esetén. Kísérleteikben továbbá *BAX inhibitor 1* gént jutattak be az árpa epidermiszsejtjeibe, és azt tapasztalták, hogy a *BAX inhibitor 1* gén expressziójának mesterséges növelése részben gátolja a nemgazda-rezisztenciát (a gomba könnyebben hatol be az epidermisz sejtekbe). Munkánk során mi is tapasztaltuk, hogy a *BAX inhibitor 1* gén kifejeződése tovább (a fertőzés után 48-72 óráig) marad magas szinten gazdarezisztencia (HR) esetén a nemgazda-rezisztenciához viszonyítva, és szabad szemmel látható nekrozisok alakulnak ki, tehát a kórokozó a növényben terjedni képes pár sejt távolságra. Ezek szerint a *BAX inhibitor 1* magas szintű, tartós kifejeződése kapcsolatba hozható a lokális nekrotikus tünetek (HR) kialakulásával, míg nemgazda-rezisztenciánál a *BAX inhibitor 1* gén kifejeződésének gyors csökkenése a HR gátlásával függ össze.

Az utóbbi két évben kutatók arra hívták fel a figyelmet, hogy mind a gazda-, mind a nemgazda-rezisztenciában a glukozinolátok felhalmozódásának is lehet szerepe (Bednarek et al., 2009, Schulze-Lefert és Panstruga, 2011). Ha olyan *Arabidopsis thaliana* mutánsokat fertőztek lisztharmatgombákkal, amelyekben a glukozinolát képződése gátolva volt, az ilyen mutáns nemgazda-rezisztens növények olyan tüneteket mutattak két inkompatibilis gomba (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, azaz árpalisztharmat és borsólisztharmat, az *Erysiphe pisi*) fertőzése után, amelyek hasonlóak voltak a fogékonysági szimptomákhoz. Az a kérdés, hogy a fokozott glukozinolátképződés valamilyen módon kapcsolatba hozható-e a korai és fokozott ROS (szuperoxid)-képződéssel, a jövőben kiderítésre vár, amelyet további tervezett kísérleteinkben szeretnénk tisztázni.

Kísérleteink végső tanulsága tehát az, hogy mind a gazdarezisztencia, mind a nemgazda-rezisztencia a ROS felhalmozódásának következménye a patogének fertőzése után. A tünetmentes nemgazda-rezisztencia eseteiben a szuperoxid akkumulációja korán következik be, és emiatt a kórokozók korán elhalnak vagy gátlást szenvednek, és az ellenálló növény tünetmentes lehet, míg a gazdarezisztencia eseteiben a ROS ölő hatása később érvényesül, és így az ellenálló képességgel együtt járó HR típusú tünetek kialakulhatnak. A fogékony növényben fertőzés után nincs ROS-akkumuláció. A kórokozó akadálytalanul szaporodik a növényben, és a betegség szimptomái kialakulhatnak.

Nekrotikus tünetekkel szembeni rezisztencia

A tüneti rezisztencia eredeti jelentése az, hogy az ellenálló növény csak a betegség káros szimptomáival szemben rezisztens, a kórokozók szaporodása és/vagy növekedése azonban nem szenved gátlást vagy csak jelentéktelen mértékben csökken. A tüneti rezisztencia elsősorban olyan kórokozók által előidézett betegségek esetében bír jelentőséggel, ahol a fogékonysági tünetek sejt-, ill. szöveti elhalással (nekrózissal) járnak együtt. A növényi nekrozisok azonban a hiperszenzitív reakcióval (HR-rel) is párosulhatnak, amely köztudottan a rasszspecifikus (vertikális) rezisztencia kísérő jelensége, de nem oka (cf. Király et al., 1972). A nekrotikus tünetekkel szembeni rezisztencia különös jelentőséggel bír az ún. szisztemikus szerzett rezisztencia (SAR) eseteiben, amikor egy primér nekrotikus levélkárosodás néhány vagy egyetlen levélen rezisztenciát indukál egy második fertőzéssel szemben, mégpedig olyan növényi részeken, amelyek távol esnek a primér

fertőzés helyétől. Ezekben az esetekben elsősorban nekrotikus tünetek ellen érvényesül az ellenállóképesség úgy, hogy a második fertőzés után létrejött elhalásos tünetek száma és/vagy mérete csökken (Ross, 1961; Kuć és Richmond, 1977).

Kísérleteinkben egy különleges növényi ellenálló képességgel foglalkoztunk, ahol két azonos eredetű dohányfajhibrid tüneti rezisztenciája jelentős különbségeket mutatott. A kísérletben kontrollnak számított az a *Nicotiana edwardsonii*, amelyet Christie és Hall (1979) állított elő a *Nicotiana glutinosa* és a *N. clevelandii* keresztezésével. Ezt a hibridizációt Cole et al. (2001) megismételte, és előállította a *N. edwardsonii* var. Columbia fajhibridet. A két fajhibrid között feltűnő különbség az, hogy a 'Columbia' növényekkel szemben a kontrollnak számító *N. edwardsonii* haploid szinten két kromoszómával kevesebbet tartalmaz. További fontos különbségnek tűnt az a tapasztalat, hogy a 'Columbia' növények sokkal rezisztensebbek voltak két dohányvírus (TMV és TNV) által okozott lokális elhalásos tünetekkel (HR) szemben, mint a kontroll *N. edwardsonii*. Cole et al. (2004) eredményei szerint a var. Columbia tüneti rezisztenciája TNV (*Tobacco necrosis virus*) fertőzés esetén hatékonyabb (akár 80%-os léziószám- és lézióméret csökkenés), mint TMV (*Tobacco mosaic virus*) fertőzésnél, ahol csak kb. 50%-os léziószám- és lézióméret-csökkenés tapasztalható (Cole et al., 2004). Annak az alapvető kérdésnek a tisztázása, hogy a 'Columbia' fokozott rezisztenciája csak a nekrotikus tünetek mérséklését jelenti-e, vagy a vírus replikációja is gátlást szenved, meglepő eredményt hozott. A TNV replikációja a 'Columbia' növényekben markánsan (kb. 90 százalékkal) csökkent. Ezzel szemben a TMV replikációja közel ugyanolyan mértékű volt mindkét fajhibridben, bár a 'Columbia' növényekben kicsit alacsonyabb értékeket kaptunk. A 'Columbia' TNV-fertőzés elleni fokozott rezisztenciája

tehát két faktorral jellemezhető: az ellenálló képesség egyrészt a kórokozó gátlását jelenti, másrészt a tünetek is mérséklődnek („tüneti rezisztencia”). A TMV elleni fokozott rezisztencia esetében viszont elsősorban tüneti ellenálló képességről lehet szó. A TNV-vel és TMV-vel szembeni fokozott rezisztencia eltérő jellegére nehéz magyarázatot találni. Elképzelhető, hogy a különbség egy vírusreplikációt irányító enzim eltérő működésére vezethető vissza. Ilyen enzim lehet pl. a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH). *Nicotiana benthamiana*-ban ugyanis a GAPDH-génexpresszió gátlásának hatására visszaszorul két TNV-vel rokon vírus (paradicsom bokrosodás törpülés vírus, TBSV és uborka nekrozis vírus, CNV) replikációja is, míg a nem rokon TMV replikációja változatlan marad (Wang és Nagy, 2008). Terveink között szerepel annak tisztázása, hogy a 'Columbia' növényekben gátlódik-e a GAPDH működése.

Az ellenálló képesség mechanizmusát illetően a szalicilsav (SA) szerepére terelődött a figyelem, mert a SA és a rezisztencia közötti okozati összefüggésekre előzetesen már többen rámutattak a növényi kórélettani irodalomban (Métraux et al., 1990, Malamy et al., 1990, Gaffney et al., 1993, Friedrich et al., 1996). Cole et al. (2004) előzetes vizsgálatai szerint a 'Columbia' növényekben fertőzés nélkül is igen magas a szabad és kötött SA-szint, és egy patogenezissel kapcsolatos fehérje, a PR-1 túltermelése is kimutatható. Kísérleteink szerint, ha egy SA-felhalmozásra képtelen vagy csak korlátozottan képes transzgenikus dohánnyal (*nahG*) keresztezzük a 'Columbia' változatot, a SA-szint az F₁ utódokban teljes mértékben lecsökken, és a vírusrezisztencia is megszűnik. Az F₁ utódokban mind a TNV, mind a TMV által okozott nekrotikus lokális tünetek erőssége, de a vírus replikációja is a *nahG*-dohány szintjére emelkedik, azaz a rezisztencia eltűnik. Több laboratórium (Gaffney et al., 1993, Delaney et al., 1994) azt is

kimutatta, hogy a *nahG* -dohány fokozottan fogékony a szöveti nekrozisokkal szemben, amelyeket különböző kórokozók idézhetnek elő.

Az már korábban általánosan ismert volt, hogy a növény kötött SA-tartalma, amely elsősorban szalicilsav-glikozid (SAG), összefüggésbe hozható a növények ellenálló képességével (Hennig et al., 1993, Malamy és Klessig 1992) . Az SAG – mint a növényi glikozidok nagy része – biológiailag inaktív, bár egy újabb közlemény szerint baktériumos fertőzés elleni rezisztenciában közvetlen szerepe lehet (Pastor et al., 2011). Figyelemre méltó viszont, hogy az SAG szalicilsavvá történő hidrolíziséhez mindössze kb. 2 óra szükséges, míg a szabad SA szintéziséhez legalább 24 óra kell. Feltételezhető, hogy a növény fertőzés esetén elsősorban az SAG hidrolízisével képes gyorsan mobilizálni szalicilsav készleteit, és beindítani a védekezési reakciókat (Hennig et al., 1993; Malamy és Klessig, 1992). Mi egy SA glikozilálásért felelős gén, az UDP-glükóz:szalicilsav-glükozil-transzferáz (*NtSGT*) expresszióját vizsgáltuk TMV és TNV fertőzések után. Mindkét vírus hatására igen intenzíven indukálódott a gén a *N. edwardsonii* var. Columbia-ban, de a kontroll *N. edwardsonii*-ban az indukálás sokkal kisebb mértékű volt.

Ismeretes, hogy a rezisztenciajelenségeket gyakran molekuláris markerek megjelenése, aktiválása kísérheti. Vírusfertőzéseknél a rezisztencia megbízható markere az ún. patogenezissel kapcsolatos („pathogenesis-related”, *PR*) gének indukciója (Dumas és Gianinazzi, 1986, Cutt et al., 1989, Linhorst et al., 1989). A 'Columbia' növények fokozott vírusellenálló képessége kb. 50 napos kor után alakul ki, amikor a növények fertőzés nélkül is nagy mennyiségben kezdenek el termelni egy PR fehérjét (PR-1). A PR-1 fehérje termelésének beindulása egygénes, dominánsan öröklődő tulajdonság, amelyet a *TPRI* (Temporal expression of PR-proteins1) lókuszt határozza meg

(Cole et al., 2004). Vizsgálataink szerint 'Columbia' növényekben az *NgPR-1* gén mRNS-szintű expressziója szintén rendkívül nagymértékű, már egészséges állapotban és vírusfertőzés után is, míg a kontroll *N. edwardsonii*-ban alig észlelhető a gén működése.

A nekrotikus tünetekkel szembeni ellenálló képesség több kutatócsoport eredménye szerint igen gyakran együtt jár az antioxidáns-kapacitás fokozódásával (Levine et al., 1994; Gullner et al., 1995; Fodor et al., 1997; Király et al., 2002; Mittler et al., 1999; Mou et al., 2003; Magbanua et al., 2007; Baltruschat et al., 2008; Faize et al., 2011; López-Gresa, 2011). Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a fokozottan ellenálló 'Columbia' dohányokban a glutation-S-transzferáz (GST) és aszkorbinsav peroxidáz (APX) enzimek aktivitása és egy GST és APX gén expressziója is intenzívebb, még egészséges, fertőzetlen állapotban is, ha az aktivitásokat a kontroll *N. edwardsonii*-hoz hasonlítjuk (Király et al., 2003, 2004). A nekrotikus tünetek csökkentéséhez ez a két antioxidáns (glutacion-S-transzferáz és aszkorbinsav peroxidáz) feltehetőleg hozzájárul, bár ezt közvetlenül még igazolni kell. Két másik fontos antioxidáns hatású enzim (kataláz és alternatív oxidáz) azonban úgy tűnik, nem kap szerepet az ellenállóságban. Egy kataláz (*NgCAT1*)- és egy alternatív oxidáz (*NtAOXI-2*) gén expressziójának változásait vizsgáltuk mindkét típusú *N. edwardsonii* növényben. A génexpressziók azonban hasonlóan változtak mindkét típusban, vagyis ezek a gének, ill. az általuk kódolt izoenzimek feltehetően nem játszhatnak fontos szerepet a fokozott vírusrezisztenciában, ill. a nekrotikus tünetekkel szembeni ellenálló képességben. Érdekes viszont, hogy e gének expressziója mindkét típusú növényben mind a TMV, mind a TNV fertőzésekor átmenetileg csökken (a fertőzés után kb. 6 órával), majd később (a fertőzés után kb. 20 órával) visszaáll az eredeti szintre. Mindez a lokális

léziós hiperszenzitív vírusrezisztenciára jellemző szöveti nekrotizációval, pontosabban az azt előidéző programozott sejthalál kialakulásával lehet összefüggésben. Erre korábban már több publikáció is rámutatott (Mittler et al., 1998, Yi et al., 1999, 2003, Künstler et al. 2007). A feltételezés igazolása céljából egyes programozott sejthalálban szerepet játszó gének expressziójának vizsgálatát tervezzük TMV-vel és TNV-vel fertőzött növényekben.

Kísérleteink szerint a 'Columbia' dohányok fokozott rezisztenciája más, a vírusokon kívül olyan baktériumokkal (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* és pv. *tabaci*) szemben is érvényesül, amelyek nekrotikus tüneteket okoznak. Vizsgálatainkból továbbá az is kiderült, hogy a 'Columbia' fokozott tüneti ellenálló képessége egy abiotikus stresszel (a paraquat károsításával) szemben is hatásos. A 'Columbia' dohánynak ezt az általános rezisztenciáját úgy lehet magyarázni, hogy ennek a növénynek eleve, minden fertőzéstől és stressztől függetlenül is, magas a szalicilsav- és szuperoxid tartalma is. Többek között ezek a biokémiai jellemzők járulhatnak hozzá ahhoz, hogy a növény folyamatosan egy genetikailag állandóan aktivált, a szerzett rezisztenciához hasonló készenléti állapotban van. Ismert, hogy a növények szerzett rezisztenciája hosszan tartó védelmet biztosíthat vírusokkal, baktériumokkal és gombákkal szemben egyaránt (Gaffney et al., 1993; Vernooij, 1995; Friedrich et al., 1996).

Az *N* rezisztenciagén csendesítésének nem várt hatása

Az egyik legismertebb növényi vírusrezisztenciagén (az *N*-gén) lokális nekrotikus ellenállósági reakciót (HR) határoz meg dohányban a dohány

mozaik vírus (TMV) ellen (Holmes, 1938). Az *N*-gén eredetileg *Nicotiana glutinosa*-ból származik, és hatására a TMV lokalizálódik a nekrotikus léziók környékén, és a vírus képtelen szisztemizálódni a növényben. Az *N*-gén rezisztenciát biztosít az összes ismert TMV törzzsel szemben. Az egyetlen TMV-vel közeli rokon vírus, amely le tudja törni az *N*-gén által biztosított rezisztenciát az Óbuda paprika vírus (*Óbuda pepper virus*, ObPV) (Tóbiás et al., 1982). Megemlítendő, hogy az első molekulárisan izolált és jellemzett növényi vírusrezisztenciagén az *N* gén volt (Whitham et al., 1994). Érdekes jelenség még, hogy az *N* gén által biztosított TMV rezisztencia hőmérsékletfüggő. 28 °C hőmérséklet alatt a rezisztencia működik, 28 °C fölött viszont a TMV szisztemizálódni tud a növényben (Samuel, 1931).

Az *N* vírusrezisztenciagén tehát igen hatásosnak bizonyult, de az a mai napig nem ismert, hogy ennek a rezisztenciagénnek más, TMV-vel nem rokon vírusok fertőzésekor is lehet-e hatása az ellenálló képességre? Saját kísérleteink azt mutatták, hogy a szóban forgó gén csendesítése („gene silencing”) egy nem rokon vírus fertőzésére éppen ellenkezően hatott, mint azt várni lehetett. A géncsendesítés ugyanis a TMV-vel szembeni rezisztenciát a dohányban csökkenti, de a TNV-fertőzés esetében a rezisztencia fokozódik, azaz a vírus mennyisége csökken.

Balaji et al. (2007) az *N*-gént *Nicotiana edwardsonii* (NE)-ban csendesítették, és azt észlelték, hogy ennek hatására a rezisztencia csökkent a TMV-vel szemben. Ezt a kísérletet megismételtük, ill. megerősítettük: ezek szerint az *N*-géncsendesített *N. edwardsonii*-ban TMV fertőzés után a lokális nekrotikus tünetek (HR) késve alakultak ki a vad típusú növényhez viszonyítva. A jelenség hátterében az áll, hogy a csendesített növényekben a léziók körül a TMV sejtről sejtre történő (lokális) terjedése fokozódik (Balaji et al., 2007). A TMV szisztemikus terjedésének vizsgálatánál saját

kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a géncsendesített növényekben a szisztémikus nekrotizálódás 3-5 nappal korábban jelentkezik a vadtípushoz képest, mert a vírus terjedése intenzívebbé válik. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *N*-gén a vírus lokális és szisztémikus terjedésére hat elsősorban, azaz a vírus gazdanövényen belüli terjedését akadályozza, vagyis emiatt rezisztens az *N*-génnel bíró növény.

Kísérleteink szerint az *N*-gén csendesítése a TNV-re úgy hat, hogy a tünetek, azaz a nekrotikus lokális léziók száma lényegesen csökken. Meglepő eredmény volt viszont, hogy ebben az esetben a vírus mennyisége is jelentősen csökken, vagyis itt valódi vírusreplikáció-gátlásról van szó! A TMV ellen ható *N*-rezisztenciagén csendesítése tehát a TNV fertőzésekor a rezisztenciát növelte, mégpedig valódi vírusellenes rezisztenciát okozott, nemcsak tüneti ellenálló képességet. Azt is igazoltuk, hogy a TNV-vel szembeni fokozott rezisztenciában nem visz szerepet két jól ismert védekezési gén, egy patogenezissel kapcsolatos (PR) gén (*NgPRI*) és a szalicilsav-glikozilálás kulcsenzimjét kódoló gén (*NtSGT*). A két gén expressziója az *N*-géncsendesített növényekben a TNV fertőzése után ugyanolyan mértékben vagy kevésbé indukálódott, mint a vad típusú növényekben. Mindez arra utal, hogy az *N*-géncsendesített *N. edwardsonii*-ban a TNV-vel szembeni fokozott rezisztencia oka nem a védekezési rendszer emelt szintű indukciója.

Valóban meglepő, hogy kísérleteink szerint egy adott vírussal (TMV) szemben hatásos rezisztenciagén csendesítése éppen ellenkezően hathat egy nem rokon vírus (a TNV) fertőzésére. A jelenség mechanizmusát nem ismerjük, de nem kizárt, hogy a TMV ellen ható *N*-rezisztenciagén terméke egy nem rokon vírus (TNV) fertőzésekor fogékonysági faktorként működik. Erre vannak példák gombás betegségek esetében (Lorang et al., 2007; Sweat et al., 2008). Ismert példa az árpa lisztharmat elleni rezisztenciájáért felelős

mlo5 gén hatása is, amely két másik, nekrotróf növénypatogén gomba fertőzésekor fogékonyságot indukál (Jarosch et al., 1999; Kumar et al., 2001). Figyelemre méltó, hogy a *N. edwardsonii*-ban található *N*-gén szekvenciája 9 nukleotidnál mutat eltérést a Whitham et al. (1994) által elsőként publikált dohánysekvenciától, és ezekből 2 pontmutáció az aminosavszekvencia megváltozását eredményezi (Cole et al., 2004). Elképzelhető tehát, hogy az *N*-gén által kódolt fehérje *N. edwardsonii*-ban működő változata a TMV-vel szemben rezisztenciát határoz meg, míg egy másik vírus, a TNV fertőzésénél fogékonysági faktorként hat. Jelenleg természetesen nem kizárható az sem, hogy ezt a faktort egy, az *N*-génnel rokon gén kódolja, hiszen egy adott gén csendesítése a vele legalább 80%-ban homológ szekvenciájú rokon gének működését is gátolja (Baulcombe, 1999). Erre utalnak Balaji et al. (2007) eredményei: egy, az *N*-génnel 83%-ban homológ *N. edwardsonii*-szekvencia csendesítésével is sérül a TMV-vel szembeni rezisztencia: tehát akár ez vagy egy hasonló *N*-génhomológ is kódolhatja a TNV fogékonysági faktort.

ÖSSZEFOGLALÁS

A növényi betegségrezisztencia különböző formái és mechanizmusai közül (lásd: **1.** táblázat) az ún. gén-génnel szembeni rezisztencia, amely rendszerint a hiperszenzitív reakció (HR) tüneteivel kapcsolatos, a legismertebb. Az volt a múltban az általános vélemény, hogy ez az ellenállósági forma a növénynemesítés szempontjából is a legfontosabb. A gyakorlat azonban erre a véleményre rácafélt, mert kiderült, hogy ez a rendkívül specifikus, gén-génnel szembeni ellenálló képesség nem tartós. Azt tapasztalták, hogy mintegy 6-10 éven belül a legtöbb esetben a rezisztencia elvész, mert a kórokozó populációban kialakulnak olyan törzsek (patogén rasszok), amelyek képesek az előzőekben ellenálló növényfajtákat is megfertőzni. A disszertáció olyan tartós rezisztencia jelenségekkel foglalkozik, amelyek részletei kidolgozásra várnak.

1.) Az egyik kérdés az, hogy a gazdanövény rezisztencia, ill. a nemgazda-rezisztencia esetében milyen szerepe van az ellenálló képességben a reaktív oxigénfajtáknak (ROS)? Ez a disszertáció az egyik legfontosabbnak vélt ROS, a szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) szabadgyök szerepével foglalkozik. Az elmúlt két évtizedben végzett kutatások szerint a különböző reaktív oxigénfajtáknak központi szerepe lehet a rezisztens növényben a kórokozók gátlásában vagy elölésében. A disszertációban vázolt kísérletek szerint a fogékony növényekben, ahol a patogén a betegségre jellemző tüneteket kialakítja, nincs $O_2^{\bullet-}$ felhalmozódás a fertőzés után. A biotrófokkal és a *Phytophthora infestans*-szal szemben rezisztens növényekben a $O_2^{\bullet-}$ mindig felhalmozódik, rendszerint 48 órával a fertőzés után. Az eredmények szerint a tünetmentes nemgazda-rezisztencia mechanizmusa abban különbözik a gazdarezisztenciától, hogy az említett ROS sokkal korábban, 24 óra múlva halmozódik fel a fertőzött, de ellenálló növényben. Ezt a tényt a

disszertációban vázolt kísérletek 21 növény/patógén kombináció esetében igazolták. Valószínűleg ez a biokémiai jelenség az egyik oka annak, hogy a nemgazda-rezisztencia általában tünetmentes, azaz nem észlelhető a HR, mert a $O_2^{\bullet-}$ kórokozót gátló, ill. ölő hatása igen korán érvényesül a növényben. Ezekből a kísérletekből az is kiderült, hogy a specifikus gazdarezisztenciát, de a nem specifikus tünetmentes nemgazda-rezisztenciát is ugyanaz a mechanizmus irányítja. Csupán abban van különbség a két ellenállósági forma között, hogy az elsőben a patogéneket gátló $O_2^{\bullet-}$, valamint a bioszintézisében központi szerepet vivő NADPH-oxidáz aktivitása is viszonylag későn fejti ki hatását, a nem specifikus nemgazda-rezisztencia esetében azonban a fertőzés után igen korai időpontban aktiválódik mind a NADPH-oxidáz enzim, mind a szuperoxid.

2.) A másik nem specifikus rezisztenciaforma, amelyet vizsgálat tárgyává tettünk, a nekrotikus tünetekkel szembeni ellenálló képesség. Ezt a kérdést két *Nicotiana edwardsonii* fajhibrid összehasonlításával vizsgáltuk. Előző kutatásokból kiderült, hogy a *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia hibrid lényegesen rezisztensebb a dohány mozaik vírus (TMV) és a dohány nekrotízis vírus (TNV) által okozott lokális nekrotikus tünetekkel (HR) szemben, mint a régebben előállított *Nicotiana edwardsonii*. A disszertációban leírt eredmények szerint a TNV-vel szembeni ellenállóság mind a vírusreplikáció visszaszorításával, mind a tünetek mérséklésével kapcsolatban van. A fokozott TMV-rezisztencia azonban elsősorban tüneti ellenálló képesség, mivel a vírus replikációja az ellenálló növényekben lényegében változatlan marad.

A nekrotikus tünetekkel szembeni fokozott ellenálló képesség mechanizmusának fő eleme a szalicilsav, hiszen a var. Columbia növényekben fertőzetlen, azaz egészséges állapotban is magas a

szalicilsavszint, de fertőzés után a kontroll növényekkel összehasonlítva a 'Columbia' növényekben a szalicilsav-képződés még fokozódik. A kötött szalicilsav bioszintézisének egyik kulcsenzimjét kódoló gén expressziója is fokozottan indukálódik a 'Columbia' növényekben. Ez a gén az UDP-glükóz:szalicilsav-glükozil-transzferáz (*NtSGT*), amelynek aktiválódása intenzívebb volt a var. Columbiában, mint a kontroll hibridben. Érdekes megjegyezni, hogy a var. Columbia növényekben fertőzetlen állapotban a szuperoxid szint is magasabb. Egyes irodalmi adatok szerint a szalicilsav jelenléte, ill. hatása és a ROS aktiválása között összefüggés lehet. A szalicilsav, mint rezisztenciafaktor korábbi rezisztens gazda/parazita kapcsolatokban is bizonyítást nyert. A disszertáció azzal bizonyította a szalicilsav központi szerepét ebben a rezisztenciaformában, hogy a kísérletekbe egy transzgenikus *N. tabacum* cv. Xanthi (*nahG*) növényt vont be, amely a szalicilsav képzésére csaknem képtelen. A var. Columbia növényeket kereszteztük a *nahG*-növényekkel, amelynek következtében az első keresztezési utódnemzedékben (F₁) a szalicilsavszint szinte teljesen lecsökkent, és a vírusrezisztencia is megszűnt.

A szalicilsavval összefüggő rezisztenciafolyamat megnyilvánul más kórokozókkal szemben is, olyanokkal amelyek nekrotikus tüneteket okoznak. A disszertáció kimutatta, hogy a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* és a pv. *tomato* baktériumok által okozott nekrotikus tünetekkel, valamint az abiotikus paraquat stresszel szemben is érvényesült a 'Columbia' növények magas szalicilsav-tartalommal, összefüggő tüneti rezisztenciája. A baktériumos fertőzéseknél a 'Columbia' növények fokozott rezisztenciája a kórokozó szaporodásának gátlásában is megnyilvánult.

3.) A harmadik téma a rezisztencia és a géncsendesítés viszonyát vizsgálja. A TMV ellen hatásos *N*-rezisztenciagén csendesítése a vártakozásoknak

megfelelően a TMV-vel szembeni rezisztenciát gátolja. Kísérleteink eredményei szerint a *Nicotiana edwardsonii*-ban az *N*-rezisztenciagén csendesítése fokozza a TMV növényen belüli terjedését; a nekrotizisok szisztémikus megjelenése, vagyis a vírus terjedése több nappal korábban észlelhető ezekben a növényekben, mint a nem csendesített kontrollban. Ezzel szemben kimutattuk, hogy a TMV-vel nem rokon TNV fertőzése ellen éppen ellenkezőleg hat az *N*-gén csendesítése. Ebben az esetben ugyanis fokozódik a rezisztencia, azaz csökken a vírus mennyisége, és a tünetek is mérséklődnek. A kísérletek szerint *Nicotiana edwardsonii*-ban az *N*-gén csendesítése a TNV elleni rezisztencia során nincs kapcsolatban két patogenezissel kapcsolatos védekezési gén, az *NgPRI* és az *NtSGT* expressziójának változásával. Kísérleteink szerint a két védekezési gén expressziója TNV fertőzés után ugyanolyan mértékben aktiválódik a vad *N. edwardsonii* növényekben, mint a transzgenikus, géncsendesített dohány növényekben. Mindez arra enged következtetni, hogy az *N*-gén csendesítése által kialakuló fokozott TNV-rezisztencia nem a védekezési gének aktiválásán keresztül valósul meg. A részletesebb mechanizmus kiderítése a jövőre vár. Az *N*-gén csendesítésével kapcsolatos kísérletek talán legfontosabb tanulsága, hogy egy adott vírus ellen ható rezisztenciagén - vagy egy ahhoz nagymértékben hasonló nukleotidszekvenciájú gén - terméke egy másik vírus fertőzésekor fogékonysági faktorként hathat.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A növényi rezisztenciaformák mélyebb megismerése céljából végzett kísérleteink két olyan ellenállósági típust elemeztek, amelyek a nem specifikus rezisztenciacsoportba tartoznak, valamint egy olyan specifikus rezisztenciaformát vizsgáltak biokémiai és molekuláris biológiai szempontból, amely egy ismert rezisztenciagén csendesítésével („gene silencing”) volt kapcsolatos. Az új tudományos eredmények a következők:

1. Huszonegy növény/patogén kombinációban egy fontos ROS, szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a fogékony kapcsolatokban (amikor a tipikus betegség kialakul), a fertőzés után *nincs* $O_2^{\bullet-}$ felhalmozódás. Az olyan gazdarezisztens növényekben, ahol a hiperszenzitív reakció (HR) is kialakul, *van* $O_2^{\bullet-}$ akkumuláció, mégpedig a fertőzés után 48 óra körül. A nemgazda-rezisztens növényekben jelentősen *korábban*, kb. 24 óra után *van* $O_2^{\bullet-}$ akkumuláció, és ez összefüggésbe hozható a tünetmentességgel. A tünetmentes nemgazda-rezisztens növényekben a $O_2^{\bullet-}$ korai felhalmozódása együtt jár az NADPH-oxidáz enzim korai aktiválódásával, amely a szóban forgó reaktív oxigénforma képzésében központi szerepet játszik.
2. A rezisztens növények fertőzés utáni $O_2^{\bullet-}$ képződésének gátlásával vagy visszaszorításával, az eredetileg rezisztens növény részlegesen fogékonyvá válik. Ezek szerint a $O_2^{\bullet-}$ (feltehetően a hidrogénperoxid [H_2O_2] és hidroxil szabadgyök [OH^{\bullet}] is) a növénykórokozók gátlásának vagy elölésének fontos – bár nem kizárólagos - meghatározó tényezője. A nemgazda-rezisztenciában egy

szuperoxid dizmutáz (SOD) és a *BAX-inhibitor1* génjének átmeneti aktiválódása szerepet játszhat a tünetmentességben (a HR gátlásában).

3. Korábbi vizsgálatok szerint a *Nicotiana edwardsonii* egyik változata, a var. Columbia, azért mutat rezisztenciát a dohány nekrózis vírus (TNV) és dohány mozaik vírus (TMV) fertőzés lokális nekrotikus tüneteivel szemben, mert egészségesen, de fertőzés után is nagy mennyiségű szalicilsavat halmoz fel, vagyis genetikailag állandóan aktivált „rezisztens” állapotban van. Kimutattuk, hogy a szalicilsav mesterséges csökkentésének következtében az ellenálló képesség megszűnik, vagy nagyon jelentősen csökken.
4. A rezisztencia a TNV-fertőzött *N. edwardsonii* var. Columbia növényekben nemcsak a tünetekkel szemben érvényesül, hanem a TNV replikációja is gátlódik. A TMV-vel szemben viszont elsősorban a tünetek (nekrózisok) gátlásában nyilvánul meg a var. Columbia ellenálló képessége, a vírusreplikáció alig gátlódik. Ez a rezisztencia jelentősen csökkenti két baktérium fertőzésének nekrotikus tüneteit, valamint a baktériumszaporodást, és hatásos egy abiotikus (paraquat-) stressz szöveti elhalásai ellen is.
5. A TMV-vel szemben hatásos *N*-rezisztenciagén csendesítése a *N. edwardsonii*-ban éppen ellenkezően hat a TNV, azaz egy nem rokon vírus fertőzésére, mint a TMV-re. Az *N*-gén csendesítése fokozza a TMV terjedését, vagyis a rezisztencia csökken, míg a TNV-fertőzés esetén a rezisztencia fokozódik, azaz a vírus mennyisége csökken. *N. edwardsonii* növényekben az *N* gén-csendesítése nincs hatással egy patogenezissel kapcsolatos gén (*NgPRI*), valamint egy szalicilsav anyagcserével kapcsolatos gén (*NtSGT*) kifejeződésére, vagyis a

TNV-vel szembeni fokozott rezisztencia nem ezek segítségével valósul meg. Ezek szerint egy adott vírus ellen ható rezisztenciagén, vagy egy ahhoz nagymértékben hasonló nukleotidszekvenciájú gén, terméke egy másik vírus fertőzésekor fogékonysági faktorként hathat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok témavezetőimnek, Dr. Király Lórántnak és Dr. Király Zoltánnak, akik lehetőséget biztosítottak arra, hogy a feldolgozott témákban sokrétű, eredményekben gazdag kutatómunkát végezhettem, és akik szakmai tudásukkal, útmutatásukkal, tanácsaikkal nagy segítséget nyújtottak mind a kísérletek elvégzésében, mind az értekezés megírásában.

Köszönöm továbbá az MTA ATK Növényvédelmi Intézet korábbi és jelenlegi igazgatóinak, Dr. Kőmíves Tamásnak, Dr. Barna Baláznak és Dr. Kiss Leventének hogy biztosították számomra a feltételeket dolgozatom elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom a Nyugat-magyarországi Egyetem Precíziós Növénytermesztési Módszerek Doktori Iskola vezetőjének, Dr. Neményi Miklósnak és a Doktori program vezetőjének, Dr. Reisinger Péternek a doktori munkámmal kapcsolatban tanúsított türelmükért és bizalmukért.

Köszönettel tartozom Dr. Szalai Gabriellának (MTA ATK Mezőgazdasági Intézet), aki a szalicilsav meghatározásában nyújtott segítséget.

Külön köszönettel tartozom az MTA ATK NÖVI minden munkatársának, akik segítettek munkámat. Külön szeretném kiemelni Dr. Fodor Józsefet, aki az enzimaktivitás mérésekben, ill. Dr. Vajna Lászlót és Dr. Pogány Miklóst, akik a mikroszkópos felvételek elkészítésében voltak segítségemre.

IRODALOMJEGYZÉK

ABRAMOVICH R.B., ANDERSON J.C., MARTIN G.B. (2006): Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Rev. Molec. Cell Biol.* 7:601-611.

ÁDÁM A., DEISING H., BARNA B., GULLNER G., KIRÁLY Z., MENDGEN K. (1997): Imbalances in free radical metabolism: roles in the induction of hypersensitive response and local acquired resistance of plants. In *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens (Developments in Plant Pathology)*, vol. 9, pp. 111–121. Edited by K. Rudolph, T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian & J. von Kiezell. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

ÁDÁM A.L., FARKAS T., SOMLYAI G., HEVESI M., KIRÁLY Z. (1989): Consequence of $O_2^{\bullet -}$ generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 34:13-26.

ALLAN A. C., FLUHR R. (1997): Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9: 1559-1572.

ALSCHER L.G., ERTURK N., HEATH L.S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53:1331-1341.

APEL K., HIRT H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373–399.

ASADA K., TAKAHASHI M. (1987): Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition* (Kyle, D.J Osmond, C.B. and Arntzen, C.J., eds). New York: Elsevier Science Publishers, pp. 227–287.

ASAI S., YOSHIOKA K. (2009): Nitric-oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molec. Plant Microbe Interact.* 22:619-629.

AUSUBEL F.M. (2005): Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* 6:973-979.

BAKER C.J., ORLANDI E.W. (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:299-321.

BALAJI B., CAWLY J., ANGEL C., ZHANG Z.Y., PALANICHELVAM K., COLE A., SCHOELZ J. (2007): Silencing of the *N* family of resistance genes in *Nicotiana edwardsonii* compromises the hypersensitive response to toombusviruses. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 20:1262-1270.

BALÁZS E., SZIRÁKI I., KIRÁLY Z. (1977): The role of cytokinins in systemic acquired resistance of tobacco hypersensitive to tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* 11:29-37.

BALTRUSCHAT H., FODOR J., HARRACH B. D., NIEMCZYK E., BARNA B., GULLNER G., JANECKO A., KOGEL K. H., SCHÄFER P., SCHWARCZINGER I., ZUCCARO A., SKOCZOWSKI, A. (2008): Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol.* 180:501-510.

BARNA B., ÁDÁM A., KIRÁLY Z. (1993): Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* 80:420-422.

BARNA B., FODOR J., POGÁNY M., KIRÁLY Z. (2003): Role of reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance. *Pest Manag. Sci.* 59:459-464.

BARNA B., KIRÁLY L. (2004.): Host-pathogen relations; diseases caused by viruses, subviral organisms, and phytoplasmas. In: B. Hock, E.F. Elstner (eds): *Plant Toxicology*. Marcel Dekker Inc., pp. 519-554.

BARNA B., SMIGOCKI A.C., BAKER J.C. (2008): Transgenic production of cytokinin suppresses bacterially induced hypersensitive response symptoms and increases antioxidative enzyme levels in *Nicotiana* spp. *Phytopathology* 98:1242-1247.

BAULCOMBE D.C. (1996): Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8:1833-1844.

BAULCOMBE D.C. (1999): Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:109-113.

BEDNAREK P., PIŚLEWSKA-BEDNAREK M., SVATOŠ A., SCHNEIDER B., DOUBSKÝ J., MANSUROVA M., HUMPHRY M., CONSONNI C., PANSTRUGA R., SANCHEZ-VALLET M., MOLINA A., SCHULZE-LEFERT P. (2009): A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Nature* 323:101-106.

BENT A.F., MACKEY D. (2007): Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:399-436.

BERROCAL-LOBO M., STONE S., YANG X., ANTICO J., CALLIS J., RAMONELL K.M., SOMERVILLE S. (2010): ATL9, a RING zinc finger protein with e3 ubiquitin ligase activity implicated in chitin- and nadph oxidase-mediated defense responses. *PLoS ONE* 5:e14426.

BESTWICK C.S., BROWN I.R., MANSFIELD J.W. (1998): Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* 118:1067–1078.

BLACKMAN L.M., HARDHAM A.R. (2008): Regulation of catalase activity and gene expression during *Phytophthora nicotianae* development and infection of tobacco. *Mol. Plant. Pathol.* 9:495-510.

BOWLER C., VAN MONTAGU M., INZÉ D. (1992): Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 43:83-116.

BROGUE K., CHET I., HOLLIDAY M., CRESSMAN R., BIDDLE P., KNOWLTON S., MAUVAIS C.J., BROGLIE R. (1991): Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254:1194-1197.

BUCHER G.L., TARINA C., HEINLEIN M., DI SERIO F., MEINS F JR., IGLESIAS V.A. (2001): Local expression of enzymatically active class I β -1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *Plant J.* 28:361-369.

BURGYÁN J. (2007): Role of silencing in plant-virus interactions. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 42:173-183.

CHAMNONGPOL S., WILLEKENS H., MOEDER W., LANGEBARTELS C., SANDERMANN H., VAN MONTAGU M., INZÉ D., VAN CAMP W. (1998): Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5818-5823.

CHISHOLM S.T., COAKER G., DAY B., STASKAWICZ B.J. (2006): Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell 124:803-814.

CHIVASA S., MURPHY A.M., NAYLOR M., CARR J.P. (1997): Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. Plant Cell 9:547-557.

CHRISTIE S.R., HALL D.W. (1979): A new hybrid species of *Nicotiana* (*Solanaceae*). Bailey 20:133-136.

CLARK M.F., ADAMS A.N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483.

COLE A.B., KIRÁLY L., LANE L.C., WIGGINS E.B., ROSS K., SCHOELZ J.E. (2004): Temporal expression of PR-1 and enhanced mature plant resistance to virus infection is controlled by a single dominant gene in a new *Nicotiana* hybrid. Molec. Plant-Microbe Interact. 17:976-985.

COLE A.B., KIRÁLY L., ROSS K., SCHOELZ J.E. (2001): Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of *Nicotiana* species to *Cauliflower mosaic virus* infection. Molec. Plant-Microbe Interact. 14:31-41.

CORPAS F.J., BARROSO J.B., del RÍO LA. (2001): Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. Trends Plant Sci. 6:145-150.

COVEY S.N., AL-KAFF N.S., LANGARE A., TURNER D.S. (1997): Plants combat infection by gene silencing. Nature 385:780-781.

CUTT J.R., HARPSTER M.H., DIXON D.C., CARR J.P., DUNSMUIR P., KLESSIG D.F. (1989): Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR1b gene. *Virology* 173:89-97.

DAT J, VANDENABEELE S, VRANOVÁ E, VAN MONTAGU M, INZÉ D, VAN BREUSEGEM F. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Molec. Life Sci.* 57: 779–795.

DEAN J.V., DELANEY S.P. (2008): Metabolism of salicylic acid in wild-type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 132:417–425.

DEAN J.V., SHAH R.P., MOHAMMED L.A. (2003): Formation and vacuolar localization of salicylic acid glucose conjugates in soybean cell suspension cultures. *Physiol. Plant.* 118:328-336.

DELANEY T.P., UKNES S., VERNOOIJ B., FRIEDRICH L., WYMAN K., NEGROTTO D., GAFFNEY T., GUT-RELLA M., KESSMAN H., WARD E., RYALS J.A. (1994): A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 226:1247-1250.

DELLER S., HAMMOND-KOSACK K.E., RUDD J.J. (2011): The complex interactions between host immunity and non-biotrophic fungal pathogens of wheat leaves. *J. Plant Physiol.* 168:63-71.

del RIÓ L.A., SANDALIO L.M., PALMA J.M., BUENO P., CORPAS F.J. (1983): Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localisation of manganese superoxide dismutase in leaf protoplast from higher plant. *Planta* 158:216-224.

DEVADAS S.K., RAINA R. (2002): Preexisting systemic acquired resistance suppresses hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis hrr11* mutant. *Plant Physiol.* 128:1234-1244.

DING S.W., LI H., LU R., LI F., LI W.X. (2004): RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res.* 102:109-115.

DOKE N. (1982): Activation of NADPH-dependent $O_2^{\bullet-}$ generating system in potato tuber tissues by infection with incompatible race of *Phytophthora infestans* and its suppression by water soluble glucans from compatible races. Proceeding of the annual Kansai Branch meeting of the Phytopathological Society of Japan. pp.46. (Abstract in Japanese).

DOKE N. (1983): Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during hypersensitive response to hyphal wall components and specific inhibition of the reaction with suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 23:359-367.

DOKE, N., OHASHI Y. (1988): Involvement of an $O_2^{\bullet-}$ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 32:163-175.

DOSS M.M., HEVESI M. (1981): Systemic acquired resistance of cucumber to *Pseudomonas lachrymans* as expressed in suppression of symptoms but not in multiplication of bacteria. *Acta Phytopathol. Hung.* 16:269-272.

DUMAS E., GIANINAZZI S. (1986): Pathogenesis-related (b) proteins do not play a central role in TMV localization in *Nicotiana rustica*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 11:69-76.

EICHMANN R., SCHULTHEISS H., KOGEL K.-H., HÜCKELHOVEN R. (2004): The barley apoptosis suppressor homologue Bax Inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 17:484-490.

ELLIS J., CATANZARITI A.M., DODDS P. (2006): The problem of how fungal and oomycete avirulence proteins enter plant cells. *Trends Plant Sci.* 2:61-63.

EL-ZAHABY H.M., GULLNER G., KIRÁLY Z. (1995): Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate–glutathione cycle and other antioxidants in different host-pathogen interactions. *Phytopatology* 85:1225–1230.

FAIZE M., BURGOS L., FAIZE L., PIQUERAS A., NICOLAS E., BARBA-ESPIN G., CLEMENTE-MORENO M.J., ALCOBENDAS R., ARTLIP T., HERNANDEZ J.A. (2011): Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *J. Exp. Bot.* 62:2599-2613.

FLOR H.H. (1971): Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275-296.

FODOR J., GULLNER G., ÁDÁM A.L., BARNA B., KŐMÍVES T., KIRÁLY Z. (1997): Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid. *Plant Physiol.* 114:1443-1451.

FRIEDRICH L., LAWTON K., RUESS W., MASNER P., SPECKER N., GUT RELLA M., MEIER B., DINCHER S., STAUB T., UKNES S., MÉTRAUX J.-P., KESSMAN H., RYALS J. (1996): A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10:61-70.

GAFFNEY T., FRIEDRICH L., VERNOOIJ B., NEGROTTO D., NYE G., UKNES S., WARD E., KESSMAN H., RYALS J. (1993): Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261:754-756.

GIANINAZZI S., MARTIN C., VALÉE J.-C. (1970): Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270D:2383-2386.

GRANT J.J., LOAKE G.J. (2000): Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant Physiology* 124:21-29.

GULLNER G., FODOR J., KIRÁLY L. (1995): Induction of glutathione-S-transferase activity in tobacco by tobacco necrosis virus infection and by salicylic acid. *Pesticide Sci.* 45:290-291.

HAFEZ, Y.M., KIRÁLY, Z. (2003): Role of hydrogen peroxide in symptom expression of barley susceptible and resistant to powdery mildew. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 38:227-236.

HAMMOND-KOSACK K. E., JONES J. D. G. (1996): Inducible plant defence mechanisms and resistance gene function. *The Plant Cell* 8:1773-1791.

HARRACH B.D, FODOR J., POGÁNY M., PREUSS J., BARNA B. (2008): Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* 121: 21-33.

HEATH M.C. (2000): Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:315–319.

HENNIG J., MALAMY J., GRYNKIEWICZ G., INDULSKI J., KLESSIG D.F. (1993): Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant J.* 4:593-600.

HOLMES F.O. (1929): Local lesions in tobacco mosaic. *Botanical Gazette* 87:39-70.

HOLMES F.O. (1938): Inheritance of resistance to tobacco mosaic virus disease in tobacco. *Phytopathology* 28:553-561.

HUMPHRY M, CONSONNI C., PANSTRUGA R. (2006): *mlo*-based powdery mildew immunity: silver bullet or simply non-host resistance? *Mol. Plant. Pathol.* 7:605–610.

HUTVÁGNER G., ZAMORE P.D. (2002): RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:225-32.

HÜCKELHOVEN R. (2004): BAX inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 9:299-307.

HÜCKELHOVEN R., DECHERT C., KOGEL K-H. (2001a): Non-host resistance of barley is associated with a hydrogen peroxide burst at sites of attempted penetration by wheat powdery mildew fungus. *Molec. Plant Pathol.* 2:199-205.

HÜCKELHOVEN R., DECHERT C., TRUJILLO M., KOGEL K-H. (2001b): Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* 47:739-748.

HÜCKELHOVEN R., FODOR J., PREIS C., KOGEL K-H. (1999): Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with H₂O₂ but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* 119:1251-1260.

IWASAKI A., MEDZHITOV R. (2010): Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327:291-295.

JAROSCH B., KOGEL K.H., SCHAFFRATH U. (1999): The ambivalence of the barley *Mlo* locus: Mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis f. sp. hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 12: 508–514.

JONES J.D.G., DANGL J.L. (2006): The plant immune system. *Nature* 444:323-329.

KAMOUN S. (2001): Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:295-300.

KIRÁLY L. (1999): The silencing of (trans) genes – A mechanism of virus resistance in plants. *Acta Phytopathol.* 34:263-275.

KIRÁLY L., BARNA B., KIRÁLY Z. (2007): Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. *J. Phytopathol.* 155:385-396.

KIRÁLY L., COLE A.B., BOURQUE J.E., SCHOELZ J.E. (1999): Systemic cell death is elicited by the interaction of a single gene in *Nicotiana* and gene VI of cauliflower mosaic virus. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 12:919-925.

KIRÁLY L., COLE A.B., SCHOELZ J. (2003): Temporal expression of pathogenesis-related protein 1 (PR-1) in *Nicotiana edwardsonii* - a dominant Mendelian trait correlated with enhanced resistance to virus-induced necrotization and increases in salicylic acid levels. Conference on Plant Stress, Reactive Oxygen and Antioxidants, Freising-Weihenstephan, Germany. Abstract. Free Rad. Res. 37(Suppl. 2), 16.

KIRÁLY L., HAFEZ Y.M., FODOR J., KIRÁLY Z. (2008): Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotisation in tobacco at high temperature is associated with down-regulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase. J. Gen. Virol. 89:799-808.

KIRÁLY L., OTT P., HAFEZ Y.M., COLE A.B., SCHOELZ J.E. (2004): Enhanced resistance to virus- and bacteria-induced necrotization and increases in salicylic acid and antioxidants are correlated with temporal expression of pathogenesis-related protein 1 (PR-1) in *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia. 14-th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Cracow, Poland. Abstract. Acta Physiol. Plant. 26(Suppl. 3), 262.

KIRÁLY Z., BARNA B., ÉRSEK T. (1972): Hypersensitivity as a consequence, not the cause, of plant disease resistance to infection. Nature 239:215-219.

KIRÁLY Z. (2000): New aspects of breeding crops for disease resistance: The role of antioxidants. In: Use of Agriculturally Important Genes in Biotechnology. Ed. By G. Hrazdina IOS Press, Amsterdam, pp. 124-130.

KIRÁLY Z., BARNA B., KECSKÉS A., FODOR J. (2002): Down-regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by tobacco mosaic virus. Free Rad. Res. 36:981-991.

KLEMENT Z., FARKAS G.L. LOVREKOVICH L. (1964): Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology 54:474-477.

KUĆ J., RICHMOND S. (1977): Aspects of the protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. Phytopathology 67:533-536.

KUMAR J., HÜCKELHOVEN R., BECKHOVE U., NAGARAJAN S., KOGEL K.H. (2001): A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology* 91: 127–133.

KÜNSTLER A., HAFEZ Y.M., KIRÁLY L. (2007): Transient suppression of a catalase and an alternative oxidase gene during virus-induced local lesion formation (hypersensitive response) is independent of the extent of leaf necrotization. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 42:185-196.

KWAK J-S., HAN K.S., LEE J.H., LEE K., CHUNG W.S., MYSORE K.S., KWON J.S., KIM H.K., BAE D-W. (2009): Different oxidative burst patterns occur during host and nonhost resistance responses triggered by *Xanthomonas campestris* in pepper. *J. Plant Biotechnol.* 36:244-254.

LEE H.I., RASKIN I. (1999): Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* 274:36637–36642.

LEVINE A., TENHAKEN R., DIXON R., LAMB, C. (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.

LIGHTFOOT D.J., BOETTCHER A., LITTLE A., SHIRLEY N. AND ABLE, A.J. (2008): Identification and characterisation of barley (*Hordeum vulgare*) respiratory burst oxidase homologue family members. *Funct. Plant Biol.* 35: 347-359.

LINDBO J.A, DOUGHERTY W.G. (2005): Plant pathology and RNAi: a brief history. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:191-204.

LINHORST H.J.M., MEUWISSEN R.L.J., KAUFFMANN S., BOL J.F. (1989): Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PRS in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell* 1:285-291.

LIU L., ZHANG Z., ZHAO M., WANG J., LIN H., SHEN Y., PAN G. (2011): Molecular cloning and characterization of pathogenesis-related protein 5 in *Zea mays* and its antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *African J. Biotech.* 10:19286-19293.

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408.

LÓPEZ-GRESA M.P., TORRES C., CAMPOS L., LISÓN P., RODRIGO I., BELLÉS J.M., CONEJERO V. (2011): Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environ. Exp. Bot.* Doi:10.1016/j.envexpbot.2011.06.003.

LORANG J.M., SWEAT T.A., WOLPERT T.J. (2007): Plant disease susceptibility conferred by a „resistance” gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:14861-14866.

MAEKAVA T., KUFER T.A., SCHULZE-LEFERT P. (2011): NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nat. Immunol.* 12:818-826.

MAGBANUA Z.V., DE MORAES C.M., BROOKS T.D., WILLIAMS W.P., LUTHE D.S. (2007): Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? *Mol. Plant-Microbe. Interact.* 20:697-706.

MALAMY J., CARR J.P., KLESSIG D.F. AND RASKIN I. (1990): Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002-1004.

MALAMY J., KLESSIG D.F. (1992): Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant J.* 2:643-654.

MARINO D., DUNAND C., PUPPO A., PAULY N. (2012): A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.* 17:9-15.

MARTIN G.B., BOGDANOVA A.J., SESSA G. (2003): Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:23-61.

MAXWELL D.P., WANG Y., McINTOCH L. (1999): The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8271-8276.

MELLERSH D.G., FOULDS I.V., HIGGINS V.J., HEATH M.C. (2002): H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant J.* 29:257-268.

MÉTRAUX J.-P., SIGNER H., RYALS J., WARD E., WYSS-BENZ M., GAUDIN J., RASCHDORF K., SCHMIDT E., BLUM W., INVERARDI B. (1990): Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250:1004-1006.

MEUWLY P., MÉTRAUX J.-P. (1993): *Ortho*-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal. Biochem.* 214:500-505.

MITTLER R., FENG X., COHEN M. (1998): Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* 10:461-473.

MITTLER R., HERR E.H., ORVAR B.L., VAN CAMP W., WILLEKENS H., INZÉ D., ELLIS B.E. (1999): Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14165-14170.

MOREL F., DOUSSIÈRE J., VIGNAIS P.V. (1991): The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells-physiological, molecular, and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.* 201:523-546.

MOU Z., FAN W., DONG X. (2003): Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113:935-944.

MUDGETT M.B. (2005): New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:509-531.

MYSORE K.S., RYU CM. (2004): Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* 2:97-104.

NAGY Z.Á. (2006): Intra- és interspecifikus kölcsönhatások a *Phytophthora* nemzetségben. Doktori értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő.

NAPOLI C., LEMIEUX C., JORGENSEN R. (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289.

NAYLOR M., MURPHY A.M., BERRY J.O., CARR J.P. (1998) Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 11:860-868.

NOCTOR G., FOYER C.H. (1998): Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 49:249–279.

NÜRNBERGER T., LIPKA V. (2005): Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molec. Plant Pathol.* 6:335-345.

OGAWA K., KANEMATSU S., ASADA K. (1996): Intra- and extracellular localization of 'cytosolyc' CuZn superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* 37:790-799.

OTT P.G., VARGA G.J., SZATMÁRI Á., BOZSÓ Z., KLEMENT É., MEDZIHRADESKY K.F., BESENYEI E., CZELLENG A., KLEMENT Z. (2006): Novel extracellular chitinases rapidly and specifically induced by general bacterial elicitors and suppressed by virulent bacteria as a marker of early basal resistance in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:161–172.

PASTOR V., BARRERA C., CERESO M., FLORS V. (2011): New chromatographic approaches reveal an active role of glucosyl salicylates against *P. syringae* in priming mutants. Joint International Workshop on PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects. Abstract, p. 58.

PARK C.-J., KIM K.-J., SHIN R., PARK J.M., SHINY-C., PEAK K.-H. (2004): Pathogenesis related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J.*, 37:186-198.

PARK S-W., KAIMOYO E., KUMAR D., MOSHER S., KLESSIG D.F. (2007): Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318:113-116.

PICKFORD A.S., CATALANOTTO C., COGONI C., MACCINO G. (2002): Quelling in *Neurospora crassa* *Adv. Gen.* 46:277-303.

POGÁNY M., HARRACH B.D., HAFEZ Y. M., BARNA B., KIRÁLY Z., PÁLDI E. (2006): Role of reactive oxygen species in abiotic and biotic stresses in plants. *Acta Phytopathol. Entomol. Hun.* 41: 23–35.

POGÁNY M., von RAD U., GRÜN S., DONGÓ A., PINTYE A., SIMONEAU P., BAHNWEIG G., KISS L., BARNA B., DURNER J. (2009): Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an arabidopsis-alternaria pathosystem. *Plant Physiol.* 151:1459-1475.

PROELS R.K., OBERHOLLENZER K., PATHURI I.P., HENSEL G., KUMLEHN J., HÜCKELHOVEN R. (2010): RBOHF2 of barley is required for normal development of penetration resistance to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molec. Plant- Microbe Interact.* 23:1143-1150.

RAUSCHER M., ÁDÁM A.L., WIRTZ S., GUGGENHEIM R., MENDGEN K., DEISING H.B. (1999): PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant J.* 19:625-633.

RATCLIFF F.G., HARRISON B.D., BAULCOMBE D.C. (1997): A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276:1558-1560.

ROSS A.F. (1961): Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology* 14: 340–358.

SAGI M. FLUHR R. (2006): Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* 141:336–340.

SAMUEL G. (1931): Some experiments on inoculating methods with plant viruses and on local lesions. *Ann. Appl. Biol.* 18:494-507.

SANCHEZ-VALLET M., MOLINA A., SCHULZE-LEFERT P. (2009): A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Nature* 323:101-106.

SCHULZE-LEFERT P., PANSTRUGA R. (2011): A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends Plant Sci.* 16:117-125.

SESKAR M., SHULAEV V., RASKIN I. (1998): Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. *Plant Physiol.* 116:387-392.

SMEDEGAARD-PETERSEN V., STØLEN O. (1981): Effect of energy requiring defense reactions on yield and grain quality in a powdery mildew-resistant barley cultivar. *Phytopathology* 71:396-399.

SONG J.T. (2006): Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, *AtSGT1*, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. *Molec. Cells* 22:233-238.

SPOEL S.H., DONG X. (2012): How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev. Immunol.* 12:89-100.

STAKMAN E.C. (1915): Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. Agricult. Res.* 4:193-199.

STROBEL N.E., KUĆ J. (1995): Chemical and biological inducers of systemic resistance to pathogens protect cucumber and tobacco plants from damage caused by paraquat and cupric chloride. *Phytopathology* 85:1306-1310.

SWEAT T.A., LORANG J.L., BAKKER E.G., WOLPERT T.J. (2008): Characterisation of natural variation in the LOV1 gene, a CC-NB-LRR gene conferring victorin sensitivity and disease susceptibility in *Arabidopsis*. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 21:7-9.

TAKAHASHI M.A., ASADA K. (1983): Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 226: 558-566.

TÓBIÁS I., RAST A., TH B., MAAT D.Z. (1982): Tobamoviruses from pepper and eggplant: a comparison with tobacco mosaic virus (TMV) by test plants and serology. *Neth. J. Plant Pathol.* 88:257-268.

TSUDA K., KATAGIRI F. (2010): Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13:459-465.

VANACKER H., HARBINSON J., RUISCH J., CARVER T.L.W., C. H. FOYER. (1998): Antioxidant defences of the apoplast. *Protoplasma* 205:129-140.

VAN CAMP W., BOWLER C., VILLARROEL R., TSANG E.W.T., VAN MONTAGU M., INZÉ D. (1990): Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9903-9907.

VAN DER KROL A.R., MUR L.A., BELD M., MOL J., STUITJE A.R. (1990): Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2:291-299.

VAN WEES S.C.M., GLAZEBROOK J. (2003): Loss of nonhost resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J.* 33: 733–742.

VERNOOIJ B., FRIEDRICH L., AHL GOY P., STAUB T. KESSMAN H. AND RYALS J.A. (1995): 2,6-dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 8:228-234.

VIGERS A.J., WIEDEMANN S., ROBERTS W.K., LEGRAND M., SELITRENNIKOFF C.P., FRITIG B. (1992): Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Sci.* 83:155-161.

VIVIER E., RAULET D.H., MORETTA A., CALIGIURI M.A., ZITVOGEL L., LANIER L.L., YOKOYAMA W.M., UGOLINI S. (2011): Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331:44-49.

VLOT A.C., DEMPSEY D.A., KLESSIG D.F. (2009): Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:177-206.

VOINNET O. (2005): Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Gen.* 6:206-220.

VAN LOON L.C., REP M., PIETERSE C.M.J. (2006): Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162.

VAN LOON L.C., VAN KAMMEN A. (1970): Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. II. Changes in protein constitution after infection with TMV. *Virology* 40:199-201.

WANG X.H., ALIYARI R., LI W.X., LI H.W., KIM K., CARTHEW R., ATKINSON P., DING S.W. (2006): RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* 312:452-454.

WANG R.Y., NAGY P.D. (2008): Tomato bushy stunt virus co-opts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis. *Cell Host Microbe* 3:178-187.

WARD E.R., UKNES S.J., WILLIAMS S.C., DINCHER S.S., WIEDERHOLD D.L., ALEXANDER D.C., AHL-GOY P., MÉTRAUX J.-P., RYALS J.A. (1991): Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3:1085-1094.

WARD H.M. (1902): On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust, *Puccinia dispersa* (Erikss.). *Annals of Botany* 16:233-315.

WATANABE N., LAM E. (2006): *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J.* 45:884-894.

WATERHOUSE P.M., SMITH N.A., WANG M.B. (1999): Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci.* 4:452-457.

WHITE R.F. (1979): Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99:410-412.

WHITHAM S., DINESH-KUMAR S.P., CHOI D., HEHL R., CORR C., BAKER B. (1994): The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78:1101-1115.

WIDIASTUTI A., YOSHINO M., ZHOU S., ODANI H., HASEGAWA M., NITTA Y., SATO T. (2011): Effect of heat shock treatment in inducing melon plant resistance against *Botrytis cinerea*. Joint International Workshop on PR-proteins and Induced Resistance against Pathogens and Insects. Abstract, p. 137.

WILLEKENS H., CHAMNONGPOL S., DAVEY M., SCHRAUDNER M., LANGEBARTELS C., VAN MONTAGU M., INZÉ D., VAN CAMP W. (1997): Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J.* 16:4806-4816.

WONG C.E., CARSON R.A.J., CARR J.P. (2002): Chemically induced virus resistance in *Arabidopsis thaliana* is independent of pathogenesis-related protein expression and the *NPR1* gene. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 15:75-81.

WU G., SHORTT B.J., LAWRENCE E.B., LEVINE E.B., FITZSIMMONS K.C., SHAH D.M. (1995): Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7:1357-1368.

XIA X.J., WANG Y.J., ZHOU Y.H., TAO Y., MAO W.H., SHI K., TADAO A., CHEN Z., JU J.Q. (2009): Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber^{1[W]} *Plant Physiol.* 150:801-814.

YEOM S-I., BAEK H-K., OH S-K., KANG W-H., LEE S.J., LEE J.M., SEO E., ROSE J.K.C., KIM B-D., CHOI D. (2011): Use of a secretion trap screen in pepper following *Phytophthora capsici* infection reveals novel functions of secreted plant proteins in modulating cell death. *Molec Plant Mic. Interact.* 24:671-687.

YI S.Y., YU S.H., CHOI D. (1999): Molecular cloning of a catalase cDNA from *Nicotiana glutinosa* L. and its repression by tobacco mosaic virus infection. *Molec. Cells* 9:320-325.

YI S.Y., YU S.H., CHOI D. (2003): Involvement of hydrogen peroxide in repression of catalase in TMV-infected resistant tobacco. *Molec. Cells* 15:364-369.

YODA H., FUJIMURA K., TAKAHASHI H., MUNEMURA I., UCHIMIYA H., SANO H. (2009): Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host- and non host hypersensitive response during pathogen infection. *Plant Molec. Biol.* 70:103-112.

YOSHIOKA H., MASE K., YOSHIOKA M., KOBAYASHI M., ASAI S. (2011): Regulatory mechanisms of nitric oxide and reactive oxygen species generation and their role in plant immunity. *Nitric Oxide* 25:216-221.

ZHU D., SCANDALIOS J.G. (1993): The maize mitochondrial manganese superoxide dismutases (MnSOD's) are a differentially expressed multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9310-9314.

ZURBRIGGEN M.D., CARRILLO N., HAJIREZAEI M-R. (2010): ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? *Plant Signal. Behav.* 4:393-396.

ZURBRIGGEN M.D., CARRILLO N., TOGNETTI V.B., MELZER M., PEISKER M., HAUSE B., HAJIREZAEI M-R. (2009): Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant J.* 60:962-973.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓAN
MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Nemzetközi impakt faktoros folyóiratban megjelent publikációk

Gullner, G., Künstler, A., Király, L., Pogány, M., Tóbiás, I. 2010. Up-regulated expression of lipoxygenase and divinyl ether synthase genes in pepper leaves inoculated with *Tobamoviruses*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74, 387-393. **IF: 1,407**

Höller, K., Király, L., Künstler, A., Müller, M., Gullner, G., Fattinger, M., Zechmann, B. 2010. Enhanced glutathione metabolism is correlated with sulfur induced resistance in *Tobacco mosaic virus*-infected genetically susceptible *Nicotiana tabacum* plants. *Mol.-Plant-Microbe Interact.* 23, 1448-1459. **IF: 4,407**

Hafez, Y.M., Bacsó, R., Király, Z., Künstler, A., Király, L. 2012. Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of H₂O₂ suppresses necrotic disease symptoms. *Phytopathology* 102, 848-856. **IF: 2,799**

Király, L., Künstler, A., Höller, K., Fattinger, Juhász, Cs., M., Müller, M., Gullner, G., Zechmann, B. 2012. Sulfate supply influences compartment specific glutathione metabolism and confers enhanced resistance to *Tobacco mosaic virus* during a hypersensitive response. *Plant Physiol. Biochem.* 59, 44-54. **IF: 2,838**

Hazai tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Künstler, A., Fodor, J., Hafez, Y.M., Király, Z., Hevesi, M. 2005. Relationship between H₂O₂-detoxification, tolerance to H₂O₂ and virulence of some phytopathogenic bacteria. *Acta Biol. Szeged.* 49, 85-87.

Künstler, A., Hafez, Y.M., Király, L. 2007. Transient suppression of a catalase and an alternative oxidase gene during virus-induced local lesion formation (hypersensitive response) is independent of the extent of leaf necrotization. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 42, 185–196.

Künstler, A., Király, L., Pogány, M., Tóbiás, I., Gullner, G. 2007. Lipoxygenase and glutathione peroxidase activity in tobacco leaves inoculated with *Tobacco Mosaic Virus*. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 42, 197–207.

Nemzetközi tudományos konferencián bemutatott posztterek

Király, L., Künstler, A., Schoelz, J.E. 2006. Enhanced resistance to virus infections in *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia can suppress both local necrotic symptoms and virus titers and is dependent on salicylic acid. Symposium on Non-specific and Specific Innate and Acquired Plant Resistance, Budapest, Hungary. Abstract, p. 68.

Gullner, G., Künstler, A., Király, L., Pogány, M., Tóbiás, I. 2006. Lipoxygenase-dependent defense reactions in pepper leaves inoculated with Tobamoviruses. Symposium on Non-specific and Specific Innate and Acquired Plant Resistance, Budapest, Hungary. Abstract, p. 64.

Gullner, G., Künstler, A., Király, L., Pogány, M. and Tóbiás, I. 2007. Lipid peroxidation and oxylipin formation in pepper leaves inoculated with Tobamoviruses. International Symposium on 'Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants', Ghent, Belgium. Abstract, p. 90.

Király L., Künstler, A., Cawly, J., Balaji, B., Schoelz, J. 2007. Silencing a gene family related to the *N* resistance gene may compromise resistance to *Tobacco necrosis virus* in *Nicotiana edwardsonii*? XIII. International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Sorrento, Italy. Abstract, p. 287, poster PS 12-579.

Gullner, G., Künstler, A., Király, L., Pogány, M., Tóbiás, I. 2008. Upregulation of divinyl ether synthase gene transcription in pepper leaves inoculated with *Tobamoviruses*. 18th International Symposium on Plant Lipids, Bordeaux, France. Abstract, p. 201, poster P119.

Gullner, G., Szatmári, Á., Bozsó, Z., Király, L., Künstler, A., Tóbiás, I. 2008. Transcription of glutathione S-transferase genes is markedly induced in resistant tobacco leaves after tobacco mosaic virus infection. International Symposium on Glutathione and Related Thiols in Microorganisms and Plants, Nancy, France. Abstract, p. 24.

Király, L., Künstler, A., Hafez, Y.M. 2008. Alternative oxidase genes can be transiently suppressed during local lesion formation in different plant-virus interactions. First International AOX Symposium, Évora, Portugal. Abstract, p. 46.

Bacsó, R., Hafez, Y.M., Künstler, A., Király, L. 2009. Induction of certain defense-associated genes is dampened during immunization of tobacco with hydrogen peroxide against localized viral symptoms. 4th Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology, Cracow, Poland. Abstract. Acta Biol. Cracoviensia Ser. Bot. 51(Suppl. 2), 30.

Gullner, G., Künstler, A., Király, L., Pogány, M., Tóbiás, I. 2009. Upregulation of the lipoxygenase pathway in resistant pepper leaves inoculated with *Tobamoviruses*. SFRR Plant Oxygen Group Meeting on Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Helsinki, Finland. Abstract, p. 103, poster P-307.

Király, L., Hafez, Y.M., Künstler, A., 2009. Enhanced superoxide ($O_2^{\cdot-}$) accumulation during plant non-host resistance to biotrophic fungal pathogens. SFRR Plant Oxygen Group Meeting on Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Helsinki, Finland. Abstract, p. 107, poster P-311.

Gullner, G., Künstler, A., Király, L., Müller, M., Zechmann, B. 2010. Sulfur supply influences the up-regulation of tobacco genes encoding key enzymes of cysteine and glutathione biosynthesis following TMV inoculation. 18-th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Valencia, Spain. Abstract, p. 185, poster P17-021.

Király, L., Künstler, A., Cawly, J., Schoelz, J. 2010. Unexpected effects of silencing the virus resistance gene *N* in *Nicotiana edwardsonii*. 18-th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Valencia, Spain. Abstract, p. 187, poster P17-029.

Juhász, Cs., Künstler A., Király, L., Tóbiás I., Gullner, G. 2011. Up-regulated expression of a 13-lipoxygenase gene in pepper leaves inoculated with *Tobamoviruses*. 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. Abstract, p. 248, poster P-156.

Király, L., Künstler, A., Angel, C., Schoelz, J. 2012. The virus resistance gene *N* functions as a susceptibility factor in *Nicotiana benthamiana* during infection by *Tobacco necrosis virus*. FESPB-EPSO Plant Biology Congress, Freiburg, Germany. Abstract, p. 703, poster P-10-017.

Künstler, A., Hafez, Y.M., Pogány, M., Király, Z., Bacsó, R., Király, L. 2012. Early enhanced accumulation of superoxide in mesophyll chloroplasts during symptomless non-host resistance of barley to wheat powdery mildew. FESPB-EPSO Plant Biology Congress, Freiburg, Germany. Abstract, pp. 706-707, poster P-10-019.

Hazai tudományos konferencián tartott magyar nyelvű előadások

Künstler, A., Fodor, J., Hafez, Y.M., Hevesi, M., Király, Z. 2005. Néhány növénykórokozó baktérium H_2O_2 - bontása, -toleranciája és virulenciája közti kapcsolat. 8. Magyar Növényélettani Kongresszus, Szeged 2005. augusztus 22-25.

Künstler, A., Király, L. 2006. A szalicilsav szerepe egy dohány fajhibrid (*Nicotiana edwardsonii* var. Columbia) nekrotikus tünetekkel szembeni fokozott ellenálló képességében kórokozó fertőzéseknel és herbicid-stressznél. XVI. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum, Keszthely, 2006. január 26. Előadáskivonatok, p. 58.

Künstler, A., Hafez, Y.M., Király, L. 2007. A szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) szabadgyök szerepe a nem-gazda növényi rezisztenciában ("non-host resistance"). Magyar Szabadgyök Kutató Társaság IV. Kongresszusa, Pécs. Előadáskivonat. Folia Hepatologica 11(Suppl. 3), 25.

Künstler, A., Hafez, Y.M., Király, L. 2008. Fokozott szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) felhalmozódás növények nem-gazda rezisztenciája során. XVIII. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum, Előadáskivonatok, p. 15.

Künstler, A., Cawly, J., Schoelz, J., Király, L. 2010. Egy TMV-rezisztencia gén (N) csendesítésének nem várt hatása: fokozott ellenálló képesség dohány nekrosis vírussal (TNV) szemben. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok, Előadáskivonatok, p. 22.