

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS  
TÉZISEI**

**KÜNSTLER ANDRÁS**

**MOSONMAGYARÓVÁR  
2012**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**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**

## BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Mind a növényi, mind az állati (humán) betegségrezisztenciának sokféle formája van. Mindkét esetben hatásos lehet a veleszületett (*innate*) rezisztencia és a szerzett (*acquired*) rezisztencia. Az előzőnél megkülönböztethetünk nem specifikus (általános), ill. specifikus ellenálló képességet. Az utóbbi esetben immun-memóriát vagy a növényeknél stressz-memóriát. A növényi betegség-ellenállóság különböző formáit az 1. táblázat foglalja össze.

### 1. táblázat

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

A rezisztencia formái	Mechanizmus
<b>VELESZÜLETETT (<i>innate</i>) REZ.</b>	
<b>Nem specifikus (általános) rez.</b>	
- Nembgazdanövény-rezisztencia	HR, ROS, BAX-inhibitor, PEN gének
- Alap (bazális) rezisztencia baktériumok ellen	Flagellin/FLS2 interakció, ROS, antimikrobiális anyagok
- Nem rasszspecifikus <i>mlo</i> rezisztencia és kvantitatív rezisztencia (lassú sporulálás) gombapatogégek ellen	Sejtfalvastagodás, antimikrobiális vegyületek, ROS
- Nekrózisos tüneteket okozó stresszek elleni rezisztencia	Nagy antioxidáns kapacitás
<b>Specifikus rezisztencia (fajta / patogén rassz specificitás)</b>	
- Extrém rezisztencia (tünetmentes gén-génnel szembeni rezisztencia)	Ismeretlen
•Rx 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
<b>SZERZETT (<i>acquired</i>) REZISZ</b>	
Egy primér fertőzés után szerzett rezisztencia egy második fertőzés ellen „Stressz-memória”	Szalicilsav, antioxidánsok, géncsendesítés, rizobaktériumok

A veleszületett nem specifikus rezisztencia számos különböző patogénnel szemben is hatásos lehet. A specifikus ellenállóképesség azt jelenti, hogy egy *növényfajta* csupán egy vagy néhány *kórokozó törzssel* (rasszal) szemben mutat rezisztenciát, másokkal szemben azonban nem. Itt tehát fajta/patogén törzs specificitásról van szó. Ez a rezisztencia a fertőzési helyeken sok esetben lokális nekrozisok (hiperszenzitív reakció, HR) kialakulásával járhat együtt, más esetekben tünetmentes.

A nem specifikus rezisztenciaformák közül a növényvilágban a legáltalánosabb a **nemgazda-rezisztencia**. A szokványos növény-kórokozó kapcsolat általában tünetmentes nemgazda-rezisztenciát eredményez, azaz a növény minden egyede ellenálló, mert nem alkalmas arra, hogy a kórokozók gazdanövénye legyen. Ez a jelenség ugyan régóta ismert, de a mai napig nem tisztázódott, hogy mi gátolja vagy öli meg a kórokozót a nemgazda-rezisztens növényben. (cf. Schulze-Lefert és Panstruga, 2011). Több kutatóhely – így a Növényvédelmi Kutatóintézet – eredményei szerint a nemgazda-rezisztencia egyik elsődleges oka lehet az ún. reaktív oxigénfajták (ROS) és az ezek hatását semlegesítő antioxidánsok kölcsönhatása (Ádám et al., 1989; Hafez és Király, 2003; Apel és Hirt, 2004).

A növények különböző stresszekre (pl. szárazság, hőmérsékletváltozás, kórokozó fertőzés) adott válasza többek között 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.  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ) valamint olyan molekulák, mint a  $H_2O_2$  és a szingulett oxigén ( $^1O_2$ ), melyekből reakcióik során szabad gyökök képződnek.

A reaktív oxigénfajták közül a szuperoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ) specifikus (HR tünetekkel együtt járó) növényi betegség rezisztenciában játszott szerepére először Doke és munkatársai hívták fel a figyelmet (Doke, 1983; Doke és Ohashi, 1988). Később többen is rámutattak arra, hogy a HR tünetekkel együtt járó nemgazda-rezisztenciában többféle ROS-nak is lehet szerepe (Bestwick et al., 1998; Zurbriggen et al., 2009; Kwak et al., 2009).

Egy másik nem specifikus rezisztenciaforma a **nekrotikus tünetekkel szembeni ellenálló képesség**. Ilyenkor a növények csak tüneti szinten mutatnak ellenállóságot, a kórokozó gátlására vagy elölésére szükségszerűen nem kerül sor (Barna et al., 1993; Devadas és Raina, 2002). Az ilyen típusú rezisztenciában a szalicilsavnak (SA) és egyes

antioxidánsoknak van alapvető szerepe (Barna et al., 1993; Vlot et al., 2009). Saját kísérleteim egyik előzménye Cole et al. (2004) megfigyelése: vírusfertőzés után a nekrotikus tünetekkel szembeni rezisztencia nem egyforma két dohány fajhibridben, amelyek azonos szülőktől származtak (*Nicotiana glutinosa* x *N. clevelandii*). A *N. edwardsonii* var. Columbia TMV és TNV vírusfertőzésekkel szemben tünetileg rezisztensebb volt, és egészségesen is jóval több szalicilsavat tartalmazott, mint a másik fajhibrid, a *N. edwardsonii*.

A specifikus növényi rezisztencia egyik nemrég felfedezett formája a **géncsendesítés poszttranszkripcionális típusa** (PTGS). Ez a mechanizmus a „parazita” nukleinsavak, így a viroidok, vírusok és transzpozonok ellen alakult ki. A fertőzések során pl. a vírus nukleinsav, mint idegen RNS, saját maga ellen ható géncsendesítést indukál, vagyis vírus nukleinsav-degradálódást okoz (Baulcombe, 1996; Burgyán, 2007). A csendesült gén ilyenkor ugyan átíródik, de a messenger RNS degradálódik. Ez a mechanizmus a transzgenikus növényeket előállító növénynemesítésben (ahol a hasznos gén csendesülésére kerülhet sor), nem kívánatos jelenség. Hasznos viszont, ha egy növényi gén funkciójának tisztázásához az adott gént csendesíteni szeretnénk.

Jelen disszertáció a nem specifikus rezisztenciaformák közül a nemgazda-rezisztencia és a nekrotikus betegség tünetekkel szembeni ellenálló képesség egyik típusának biokémiai és molekuláris biológiai mechanizmusát kívánja megvilágítani. A specifikus rezisztenciával kapcsolatban egy olyan új esetet mutat be, amikor egy adott vírus ellen hatásos rezisztencia gén csendesítése (*gene silencing*) egy másik, nem rokon vírussal kapcsolatban nem fogékonytságot eredményez, hanem rezisztenciát.

#### **A disszertáció fő célkitűzései:**

1. Prooxidánsok (reaktív oxigénfajták, ROS), elsősorban a szuperoxid és az antioxidánsok szerepének tisztázása a tünetmentes (HR-től nem függő) nemgazda-rezisztenciában, árpa-, ill. búza-lisztharmattal szembeni inkompatibilis árpa reakciókban.

2. Egy nekrotikus tünetekkel szembeni rezisztencia kialakulásában szerepet kapnak-e az antioxidánsok, illetve a szalicilsav?

3. Egy vírus rezisztencia gén (*N*) csendesítése hatással van-e egy nem rokon, másik vírus fertőzésére?

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### A kísérletekhez felhasznált növények:

*Hordeum vulgare* cv. Ingrid Mla, Mlo, 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, cv. Kecskeméti 3F  
*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi, *N. tabacum* cv. Xanthi nahG  
*N. benthamiana* *N. edwardsonii*, *N. edwardsonii* var. Columbia  
*Solanum tuberosum* cv. White Lady, *S. tuberosum* cv. Hópehely  
*Vitis vinifera* cv. Nimrang, cv. Kismish vatkana cv. Bianca

### 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 nekrozis vírus (*Tobacco necrosis virus*, TNV, E törzs)

A búza- ill. árpalisztharmatos fertőzést fertőzőtoronyban végeztük, 7 napos egylevelű növényekre szórtuk a konídiumokat. Paradicsom- uborka- és dohánylisztharmatos fertőzés során az inokulumforrásként szolgáló növény leveleit hozzáérintettük az általunk fertőzni kívánt növény leveleihez.

A búza- árpa- és zabrozsdával 7 napos egy levelű növényeket fertőztünk. A fertőzéshez az uredospórákat keményítő oldatban (3,3 g /100 ml víz) szuszpendáltuk.

*Phytophthora infestans*-szal történő fertőzéshez sporangiumszuszpenziót készítettünk, ezt a szuszpenziót permetezzük a levelekre.

*Pseudomonas syringae* baktériumokkal való fertőzéshez az 1 napos baktériumtenyészetekből szuszpenziót készítettünk ( $7 \times 10^5$  cfu/ml, ill.  $7 \times 10^8$  cfu/ml), melyet sebzés után a levelekbe infiltráltunk.

TMV-vel és TNV-vel történő fertőzés során a vírust tartalmazó leveleket karborundummal és csapvízzel (kb. 1 g levél és 10 ml csapvíz) mozsárban eldörzsöltük, ezzel az inokulummal kentük be a fertőzni kívánt növény leveleit.

#### **Szuperoxid-dizmutáz és kataláz bejuttatása árpalevélbe**

Antioxidánsokkal történő kezeléshez szuperoxid-dizmutáz 3000 U/ml, és kataláz 5000 U/ml vizes oldatát infiltráltuk a növények levágott leveleibe (Király et al., 2008).

#### **Árpalevelek hőkezelése**

Az intakt árpaleveleket 49 °C-os vízbe merítettük 45 másodpercre, a leveleket száradás után fertőztük.

#### **A szuperoxid felhalmozódás kimutatása biokémiai módszerrel**

A szuperoxid-szabadgyök reakcióba lép a nitro-blue-tetrazoliummal (NBT), és sötétkék színű formazán képződik. Az NBT-t vákuuminfiltrálással juttattuk a levelekbe (Ádám et al., 1989). A leveleket 20 percig megvilágítottuk, majd színtelenítő oldatba helyeztük. A kék szín időbeli megjelenését regisztráltuk.

#### **Génkifejeződési vizsgálatok**

A fertőzött levelekből teljes növényi RNS-t vontunk ki szilikagélmembrán-oszlopos módszerrel. Az adott génnek megfelelő cDNS szintéziséhez és sokszorosításához az RNS-ből reverz transzkripcióval egybekötött nukleinsav-sokszorosítást (RT-PCR) végeztünk. A génexpressziós különbségek kimutatásához a mintákat 1%-os agarózgélben futtattuk meg, referenciának (konstitutív kontroll) dohánynál egy aktin-, árpánál egy ubiquitingén expresszióját tekintettük. A génkifejeződés kvantitatív kimutatásához az ún. valós idejű (*real time*) kvantitatív RT-PCR módszert használtuk. A génkifejeződés különbségeinek számszerűsítéséhez az ún.  $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszert (Livak és Schmittgen, 2001) alkalmaztuk, első referenciaként a korábban említett gének szolgáltak.

#### **Szabad és kötött szalicilsav mérése**

Szabad és kötött (savasan hidrolizálható) szalicilsav méréséhez a Meuwly and Métraux (1993), ill. Cole et al. (2004) által leírt módszert alkalmaztuk. A szalicilsav mérést nagy teljesítményű folyadék kromatográfiával (high performance liquid chromatography, HPLC), deaktivált, reverz fázisú oszlop segítségével, fluorometriás detektorral végeztük.

#### **Paraquatos kezelés**

25  $\mu$ M és 50  $\mu$ M-os paraquatoldatot készítettünk csapvízben. Az oldatokat levelekbe injektáltuk, az injektált területet körberajzoltuk. A megjelenő nekrosis nagyságából és terjedéséből következtettünk a

paraquattal szembeni rezisztenciára. Negatív kontrollként a leveleket csapvízzel infiltráltuk.

#### **Növénypatogén vírusok kimutatása**

*TMV és TNV kimutatása enzimhez kötött ellenanyag vizsgálat (ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay) segítségével*

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.

*TMV és 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. Az adott vírusgénnek megfelelő cDNS szintéziséhez és sokszorosításához az RNS-ből reverz transzkripcióval egybekötött nukleinsav-sokszorosítást (RT-PCR) végeztünk. A cDNS szintézishez az adott vírusgénre tervezett reverz (visszainduló) indítószekvenciát alkalmaztuk. A kapott cDNS-ből végeztük el a polimeráz láncreakciót az adott vírusgénre specifikus indítószekvenciák felhasználásával.

#### **Növénykórokozó baktériumok (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *tabaci*) kimutatása**

A baktériumszám meghatározásához a fertőzött növény leveleiből kivágott 0,9 cm átmérőjű levélkorongokat 10 mM-os kálium-foszfát-pufferben (pH 7,0) dörzsöltük el, majd többféle hígításban King's B táptalajra szélesztettük, és a megjelenő kolóniákat megszámláltuk (Ott et al. 2006).

#### **NADPH-oxidáz enzim aktivitásának mérése**

A NADPH-oxidáz enzimaktivitás megállapításához először sejtmembránt izoláltunk (Xia et al. 2009). Fotométeres meghatározás során a reakcióelegybe (50 mM HEPES pH 6,8, 0,2 mM NADPH, 0,3 mM NBT) 50 µl szuszpendált csapadékot adtunk (Ádám et al. 1997).



## EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE

### 1. A nemgazda-rezisztencia és a gazdarezisztencia lényegének tisztázása

Huszonegy gazda/patogén kombinációban meghatároztam, hogy a szuperoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ) felhalmozódás a fertőzés után mikor következik be. A gazda/patogén kombinációkban fogékony, ún. gazdarezisztens és nemgazdarezisztens növények fordultak elő. A szuperoxid felhalmozódását a nitroblue-tetrazolium (NBT)-festéssel teszteltem.

- A fogékony gazda/patogén kölcsönhatások esetében nincs szuperoxid felhalmozódás. A gazdarezisztens növényekben (ahol a HR is megjelenik), a fertőzés után 48 óra körül akkumulálódik ez a ROS. A nemgazdarezisztens növényekben mindig korábban (24 órával a fertőzés után) észlelhető a  $O_2^{\bullet-}$  felhalmozódása. Ez a korai akkumuláció összefüggésbe hozható a nemgazdarezisztens típus tünetmentességével (a HR hiányával). A korai  $O_2^{\bullet-}$  képzés viszont kapcsolatban van a NADPH-oxidáz aktiválódásával, amely enzim központi szerepet visz a szuperoxid-képzésben.

- A nemgazdarezisztencia egyes eseteiben a *SOD* és a *BAX-inhibitor1* gén időlegesen aktiválódik, de később visszaszorul. Ennek a folyamatnak szerepe lehet a tünetmentességben, azaz a HR hiányában

- Ha a liztharmat-ellenálló árpában a fertőzés utáni  $O_2^{\bullet-}$ -képzést hőszökkel gátoljuk vagy visszaszorítjuk, ezzel elősegítjük a fogékony növényi reakciót az eredetileg ellenálló árpalevelekben. Ezek szerint a rezisztens növényekben a fertőzés hatására felhalmozódó ROS-vegyületek (elsősorban a  $O_2^{\bullet-}$  de feltehetően a  $H_2O_2$  és a  $OH^{\bullet}$  is) a kórokozók gátlásának vagy előlésének fontos – bár nem kizárólagos - meghatározó tényezői.

## 2. Nekrotikus tünetekkel szembeni rezisztencia mechanizmusának vizsgálata

Két dohányfaj keresztezéséből (*Nicotiana glutinosa* x *N. clevelandii*) származik a *Nicotiana edwardsonii*. Egy újabb, hasonló keresztezés eredménye a *N. edwardsonii* var. Columbia. A két keresztezési származék egymástól eltérő rezisztenciát mutat a vírus-okozta nekrotikus tünetekkel szemben. A rezisztencia mechanizmusát vizsgálva a következő eredményekre jutottam:

- A *N. edwardsonii* var. Columbia a dohány nekrosis vírus (TNV) fertőzésével szemben valódi rezisztencia-válasszal tűnik ki, ami azt jelenti, hogy mind a vírus replikációja, mind a nekrotikus tünetek képzése visszaszorul, ha a reakciókat a másik keresztezési származék válaszához hasonlítjuk. Ha a 'Columbia' növényeket a dohány mozaik vírussal (TMV) fertőzzük, akkor elsősorban csak tüneti rezisztenciáról beszélhetünk, a vírus-replikáció gátlásáról kevésbé.

- Ha a var. Columbia dohánynövényt egy szalicilsav-felhalmozódásra nem képes transzgenikus (*nahG*) dohánnyonallal keresztezzük, a szalicilsavszint teljesen lecsökken, és a vírusrezisztencia (TNV és TMV fertőzésénél egyaránt) megszűnik. A szalicilsav tehát fontos szerepet játszik a 'Columbia' növények rezisztenciájában.

- A kísérletek alapján feltételezhető, hogy a 'Columbia' növényekben egy állandóan aktivált „szerzett rezisztencia” működik, mert ezekben a növényekben nemcsak a szalicilsav-, de a  $O_2^{\cdot -}$  koncentráció is már fertőzetlen állapotban is magasabb, mint a fogékonyabb másik keresztezési származékban.

- A növényi rezisztenciát jelző patogenezissel kapcsolatos egyik fehérje génjének expressziója (*NgPRI*) a 'Columbia' növényekben már fertőzetlenül is rendkívül erős, míg a fogékonyabb *N. edwardsonii*-ban még a vírusos fertőzés után is alig detektálható. A *NgPRI* gén aktiválódása is jelzi a 'Columbia' növények fokozott rezisztenciáját.

- A szalicilsav által biztosított rezisztenciafolyamat elhalásos tüneteket előidéző baktériumokkal (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* és *P. syringae* pv. *tomato*) szemben és abiotikus stresszekkel (paraquat) szemben is hatásosnak mutatkozott.

### 3. A TMV ellen ható *N* vírusrezisztencia gén csendesítésének hatása egy nem rokon vírus (TNV) által előidézett fertőzésre

A kutatási eredmények választ adnak arra a kérdésre, hogy a dohány mozaik vírus (TMV) ellen hatásos *N* rezisztencia gén „kikapcsolása”, azaz posztttranszkripcionális csendesítése milyen hatással van egy másik, nem rokon vírus, a dohány nekrozis vírus (TNV) által előidézett fertőzésre.

- Ha a *Nicotiana edwardsonii*-ban az *N* rezisztencia gént csendesítjük, csökken a növény rezisztenciája a TMV fertőzéssel szemben, vagyis fokozódik a fogékonyság, mert a vírus terjedése a géncsendesített növényben több nappal korábban észlelhető, mint a nem csendesített kontrollban.

- Az *N*-gén csendesítése a TNV-vel fertőzött dohányban nem csökkenti, hanem fokozza a rezisztenciát, vagyis a TNV mennyisége és a kiváltott tünetek (HR) erőssége csökken. Ez az *N* géncsendesítés tehát eltérő hatást fejt ki a nekrozis vírussal kapcsolatban, mint a TMV-vel.

- A *N. edwardsonii*-ban az *N*-gén csendesítése által kiváltott fokozott TNV rezisztencia oka nem a patogenezissel kapcsolatos gének indukciója, mivel két ilyen védekezési gén (*NgPR-1* és *NtSGT*) expressziója TNV fertőzés után közel azonos mértékben aktiválódott mind a vad típusú, mind a transzgenikus géncsendesített növényekben.

Értékelésként megállapítható, hogy a nem-gazda rezisztencia egyik meghatározó oka a korai  $O_2^{\cdot-}$  felhalmozódás. 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 részekben. A gazdarezisztens növényekben is felhalmozódik a  $O_2^{\cdot-}$ , amely itt is gátolja a patogéneket, de legtöbb esetben a később bekövetkező gátlás miatt a hiperszenzitív reakció (HR) kialakulhat. Fogékony növényekben a fertőzés után nem halmozódik fel a káros  $O_2^{\cdot-}$ . Ezt a törvényszerűséget huszonegy gazda/patogén kapcsolatban igazoltam. 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•). A hidrogén-peroxid káros hatását több rezisztens növény/patogén kombinációban is észlelték (cf. Király et al., 2007).

A nekrotikus tünetekkel szembeni vírus rezisztencia (TMV és TNV) egyik alapja a szalicilsav rezisztenciát fokozó hatása. Ez a rezisztencia nagymértékben csökken azokban a *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia növényekben, amelyeket egy szalicilsav-felhalmozásra képtelen transzgenikus (*nahG*) dohányvonallal kereszteztem. A 'Columbia' növényekben egy állandóan aktivált rezisztencia működik, mert ezekben a növényekben nemcsak a szabad- és kötött szalicilsav-, de a  $O_2^{\bullet-}$  koncentráció is már fertőzetlen állapotban is magasabb, mint a fogékonyabb változatban. A szalicilsav által biztosított rezisztencia a nekrotikus tüneteket előidéző baktériumokkal és abiotikus stresszel szemben is hatásos. A 'Columbia' növényekben egy PR1 protein génjének expressziója már fertőzetlenül is rendkívül erős, míg a fogékony *Nicotiana edwardsonii*-ban alig kimutatható, még a vírusfertőzés után is. Ez a jelenség a 'Columbia' növények fokozott rezisztenciájának megbízható markere.

Kísérleteim során beigazolódott, hogy egy vírusrezisztencia gén csendesítése egy növényi vírusfertőzésre eltérő módon hat különböző, nem rokon vírusok fertőzésére. A kísérletekben kimutattam, hogy az *N* vírusrezisztencia-gén csendesítése teljesen ellenkező módon hat a dohány mozaik vírusra, mint a dohány nekrotízis vírusra.

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Huszonegy gazda/patogén kombináció vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a fogékony kapcsolatokban (amikor a tipikus betegség kialakul), a fertőzés után *nincs* szuperoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) felhalmozódás. Az olyan gazdarezisztens növényekben, ahol a hiperszenzitív reakció (HR) is kialakul, *van*  $O_2^{\cdot-}$  akkumuláció, mégpedig a fertőzés után 48 óra körül. A nemgazda-rezisztens növényekben jelentősen *korábban*, kb. 24 óra után *van*  $O_2^{\cdot-}$  akkumuláció, és ez összefüggésbe hozható a tünetmentességgel. A nemgazda-rezisztens növényekben a  $O_2^{\cdot-}$  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  $O_2^{\cdot-}$  képződésének gátlásával vagy visszaszorításával, az eredetileg rezisztens növény részlegesen fogékonnyá válik. Ezek szerint a  $O_2^{\cdot-}$  (feltehetően a hidrogén-peroxid [ $H_2O_2$ ] és hidroxil szabadgyök [ $OH^{\cdot}$ ] 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 nekrozis 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 (nekrozisok) gátlásában nyilvánul meg a var. Columbia ellenálló képessége, a vírusreplikáció alig gátlódik. A szalicilsavtartalommal összefüggő rezisztencia jelentősen csökkenti két baktériumos fertőzés 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.

## IRODALOMJEGYZÉK

APEL K., HIRT H. (2004): *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373–399.

ÁDÁM A., DEISING H., BARNA B., GULLNER G., KIRÁLY Z., MENDGEN K. (1997): 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): *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 34:13-26.

BARNA B., ÁDÁM A., KIRÁLY Z. (1993): *Naturwissenschaften* 80:420-422.

BAULCOMBE D.C. (1996): *Plant Cell* 8:1833-1844.

BESTWICK C.S., BROWN I.R., MANSFIELD J.W. (1998): *Plant Physiol.* 118:1067–1078.

BURGYÁN J. (2007): *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 42:173-183.

COLE A.B., KIRÁLY L., LANE L.C., WIGGINS E.B., ROSS K., SCHOELZ J.E. (2004): *Molec. Plant-Microbe Interact.* 17:976-985.

CLARK M.F., ADAMS A.N. (1977): *J. Gen. Virol.* 34:475-483.

DEVADAS S.K., RAINA R. (2002): *Plant Physiol.* 128:1234-1244.

DOKE N. (1983): *Physiol. Plant Pathol.* 23:359-367.

DOKE, N., OHASHI Y. (1988): *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 32:163-175.

HAFEZ, Y.M., KIRÁLY, Z. (2003): *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 38:227-236.

KIRÁLY L., BARNA B., KIRÁLY Z. (2007): *J. Phytopathol.* 155:385-396.

KIRÁLY L., HAFEZ Y.M., FODOR J., KIRÁLY Z. (2008): *J. Gen. Virol.* 89:799-808.

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): *J. Plant Biotechnol.* 36:244-254.

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. (2001): *Methods* 25:402–408.

MEUWLY P., MÉTRAUX J.-P. (1993): *Anal. Biochem.* 214:500-505.

OTT P.G., VARGA G.J., SZATMÁRI Á., BOZSÓ Z., KLEMENT É.,  
MEDZIHRADESKY K.F., BESENYEI E., CZELLENG A., KLEMENT Z.  
(2006): *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:161–172.

SCHULZE-LEFERT P., PANSTRUGA R. (2011): *Trends Plant Sci.* 16:117-  
125.

TÓBIÁS I., RAST A., TH B., MAAT D.Z. (1982): *Neth. J. Plant Pathol.*  
88:257-268.

VLOT A.C., DEMPSEY D.A., KLESSIG D.F. (2009): *Annu. Rev.*  
*Phytopathol.* 47:177-206.

XIA X.J., WANG Y.J., ZHOU Y.H., TAO Y., MAO W.H., SHI K.,  
TADAO A., CHEN Z., JU J.Q. (2009): *Plant Physiol.* 150:801-814.

ZURBRIGGEN M.D., CARRILLO N., TOGNETTI V.B., MELZER M.,  
PEISKER M., HAUSE B., HAJIREZAEI M-R. (2009): *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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxification, tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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. 4<sup>th</sup> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- 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 fertőzéseknél 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<sub>2</sub><sup>•-</sup>) 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<sub>2</sub><sup>•-</sup>) 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.