

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**A BAKTÉRIUMOK ÁLTAL KIVÁLTOTT NÖVÉNYI ÁLTALÁNOS VÉDEKEZÉS (BR)  
HATÁSA VÍRUSFERTŐZÉSRE,  
VALAMINT BR SORÁN MEGVÁLTOZOTT AKTIVITÁSÚ GÉNEK VIZSGÁLATA**

**ZSIROS LÁSZLÓ**

**TÉMAVEZETŐK:**

**PALKOVICS LÁSZLÓ, DSC**

**BOZSÓ ZOLTÁN, PHD**



---

BUDAPESTI  
**CORVINUS**  
EGYETEM

---

**Kertészettudományi Kar**

**BUDAPEST**

**2012**

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna

egyetemi tanár, DSc

Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,

Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezetők: Dr. Palkovics László,

Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,

Növénykórtani Tanszék

Dr. Bozsó Zoltán,

Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont,  
Növényvédelmi Intézet

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2012. október 2-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:**

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke**

**Lukács Noémi, DSc.**

**Tagjai**

**Bernáth Jenő, DSc.**

**Janda Tibor, DSc.**

**Takács András Péter, PhD.**

**Horváthné Petróczy Marietta, PhD.**

**Opponensek**

**Süle Sándor, DSc.**

**Jakab Gábor, PhD.**

**Titkár**

**Horváthné Petróczy Marietta, PhD.**

# Tartalom

Rövidítések jegyzéke .....	7
1. Bevezetés .....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. A növények és a kórokozók kapcsolata .....	9
2.2. A növényi rezisztenciaformák.....	9
2.2.1. <i>A hiperszenzitív reakció (HR)</i> .....	12
2.2.1.1. A baktériumok által kiváltott HR kialakulása .....	13
2.2.2. <i>Általános rezisztencia (BR – basal resistance)</i> .....	15
2.3. A dohány TMV-vel szembeni rezisztenciája .....	23
2.4. Vírussal kiváltott géncsendesítés (VIGS – Virus Induced Gene Silencing) .....	25
3. A megoldandó feladatok ismertetése .....	28
4. Anyag és módszer .....	30
4.1. Felhasznált növények .....	30
4.2. Felhasznált baktériumok.....	30
4.2.1. A baktériumok hővel előlése .....	31
4.3. Felhasznált vírusok.....	31
4.4. A növények kezelésénél felhasznált kémiai anyagok .....	32
4.5. Kezelések és mintavétel .....	34
4.5.1. Kombinált baktérium- és vírusfertőzés.....	34
4.5.2. A növény befecskendezése (infiltrációja).....	35
4.5.3. Baktériumos fertőzés nedvesítőszerek használatával .....	35
4.5.4. Vírusfertőzések kivitelezése .....	35
4.6. Növényi minták feldolgozása.....	36
4.6.1. Növényi mRNS kivonása, cDNS írása (génkifejeződési vizsgálatokhoz) .....	36
4.6.2. Génkifejeződés vizsgálata valós idejű PCR-rel.....	36
4.6.3. A növényi minták előkészítése proteináz-aktivitás méréséhez .....	39
4.6.4. Microarray vizsgálatok .....	39
4.7. Kallózkimutatás.....	40
4.7.1. Kallózfelhalmozódás meghatározása szövetfestéssel .....	40
4.7.2. Kallóztartalom kvantitatív meghatározása .....	41
4.8. Proteináz-aktivitás mérése dohányban .....	41
4.9. A géncsendesítéshez kapcsolódó anyagok és módszerek .....	42
4.9.1. Plazmidtisztítás .....	43
4.10. <i>In silico</i> módszerek.....	43

4.10.1. Primertervezés .....	43
4.10.2. Dohányban a BR során aktivitást mutató gének ortológjainak keresése <i>Arabidopsis</i> ban .....	44
4.10.3. A pVE349 plazmid bázissorrendjének meghatározása.....	44
4.10.4. Statisztikai módszerek .....	44
5. Eredmények .....	45
5.1. A baktériumok által kiváltott általános rezisztencia vírusfertőzés lefolyására gyakorolt hatása .....	45
5.1.1. A tünetek gátlásának vizsgálata (kompatibilis dohány-TMV kapcsolat) .....	45
5.1.2. A vírusreplikáció gátlásának vizsgálata (kompatibilis dohány-TMV kapcsolat).....	45
5.1.3. A vírus okozta HR gátlásának vizsgálata (inkompatibilis dohány-TMV kapcsolat) .....	46
5.1.4. A vírusreplikáció gátlásának vizsgálata (inkompatibilis dohány-TMV kapcsolat).....	50
5.1.5. A növényi védekezési reakciókkal kapcsolatba hozható gének aktivitásának vizsgálata (inkompatibilis dohány-TMV kapcsolat) .....	50
5.2. A BR során a jelátviteli folyamatokban és protein lebontásban részt vevő, megváltozott aktivitást mutató gének vizsgálatai.....	53
5.2.1. Jelátvitellel kapcsolatba hozható gének aktivitásának változásai a BR alatt.....	53
5.2.2. Jelátvitel-gátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt .....	54
5.2.3. Jelátvitelgátlók génkifejeződésre gyakorolt hatásának vizsgálatai microarray módszerrel .....	57
5.2.4. Proteináz-gének aktivitásának változása a BR alatt .....	61
5.2.5. Proteinázgátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt.....	62
5.2.6. Sejtfalli kallózbeépülés változása a proteinázgátlók alkalmazásának hatására <i>Arabidopsis</i> ban .....	66
5.3. Az egyes gének funkcionális vizsgálatához szükséges módszerek kidolgozása .....	68
5.3.1. Proteináz-aktivitás mérése .....	68
5.3.2. BR kimutatása anilin-kék szövetfestéssel.....	70
5.3.3. <i>Arabidopsis</i> modell alkalmazása funkcionális genomikai vizsgálatokhoz.....	72
5.3.4. Géncsendesítés dohányban ( <i>N. tabacum</i> ) .....	76
5.3.4.2. <i>Agrobacterium</i> vektor konstrukció létrehozása az STMV szatellit vírus átmeneti expressziójához növényi szövetben .....	77
5.4. Új tudományos eredmények.....	80
6. Következtetések és javaslatok.....	81
6.1. A baktériumok által kiváltott általános rezisztencia vírusfertőzés lefolyására gyakorolt hatása .....	81
6.2. A BR során megváltozott aktivitást mutató jelátviteli folyamatokban és protein lebontásban részt vevő gének vizsgálatai .....	84

6.2.1. Jelátvitellel kapcsolatba hozható gének aktivitásának változásai a BR alatt.....	84
6.2.2. Jelátvitel-gátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt.....	85
6.2.3. Proteináz-gének aktivitásának változása a BR alatt .....	86
6.2.4. Proteinázgátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt.....	87
6.2.5. Sejtfali kallózbeépülés változása a proteinázgátlók alkalmazásának hatására .....	87
6.3. Az egyes gének funkcionális vizsgálataihoz kidolgozott módszerek értékelése .....	88
6.3.1. Proteináz-aktivitás mérése .....	88
6.3.2. BR kimutatása anilin-kék szövetfestéssel.....	88
6.3.3. Arabidopsis modell alkalmazása funkcionális genomikai vizsgálatokhoz.....	89
6.3.4. Géncsendesítés dohányban ( <i>N. tabacum</i> ).....	90
7. Összefoglalás .....	91
8. Summary.....	93
Köszönetnyilvánítás .....	95
1. melléklet: Publikációk listája.....	96
2. melléklet: Irodalom.....	97

## Rövidítések jegyzéke

avr	avirulencia (gén)
BR	<i>basal resistance</i> , általános védekezés
CC	<i>coiled-coil</i> (motívum)
Col	<i>Columbia</i> (ökotípus <i>Arabidopsis thaliana</i> növénynél)
CP	<i>capsid protein</i> , köpenyfehérje
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i> , sérüléshez kapcsolható molekuláris mintázat
DAB	diamino-benzidin
DCFH-DA	dikloro-fluoreszcein-diacetát
Ef-Tu	<i>elongation factor thermo unstable</i> , nem hőstabil elongációs faktor
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , (fokozott kifejeződésű) zöld fluoreszcens fehérje
flg	flagellin (gén)
FLS	<i>flagellin sensing</i> (receptor)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , zöld fluoreszcens fehérje
GTP	guanozin-trifoszfát
HR	<i>hypersensitive response</i> , hiperszenzitív reakció / hiperszenzitív rezisztencia (túlérzékenységi válasz)
hrc	<i>hypersensitive response and conserved</i> , hiperszenzitív válasz és konzervált (gén)
hrp	<i>hypersensitive response and pathogenicity</i> , hiperszenzitív válasz és patogenitás (gén)
LPS	lipopoliszacharid
LRR	<i>leucine-rich repeat</i> , leucinben gazdag ismétlődés
MAP	<i>mitogen-activated protein (kinase)</i> , mitogén által aktivált protein (kináz)
MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i> , mikrobákhoz kapcsolható molekuláris mintázat
MCA	<i>metacaspase</i> , metakaspáz
MP	<i>movement protein</i> , mozgási fehérje
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i> , Nottinghami Arabidopsis Törzsgyűjtemény
NBS	<i>nucleotide binding site</i> , nukleotid-kötő hely
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> , nukleotid kötő oligimerizációs domén
OD	<i>Optical Density</i> , optikai sűrűség
SAR	<i>systemically acquired resistance</i> , szisztémikusan szerzett rezisztencia
SEL	<i>size exclusion limit</i> , méretkizárási határ
SVISS	<i>satellit virus induced silencing system</i> , szatellitvírussal kiváltott csendesítés rendszere
STMV	<i>satellite tobacco mosaic virus</i> , a dohány mozaik vírus szatellitvírusa
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> , patogénekhez kapcsolható molekuláris mintázat
PCD	<i>programmed cell death</i> , programozott sejthalál
PDS	<i>phytoene desaturase</i> , fitoén-deszaturáz
PLA	foszfolipáz-A
PLC	foszfolipáz-C
PLD	foszfolipáz-D
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , mintázatfelismerő receptor
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i> , PAMP által kiváltott immunitás
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TMGMV	<i>tobacco mild green mosaic virus</i> , dohány enyhe zöld mozaik vírus
TMV	<i>tobacco mosaic virus</i> , dohány mozaik vírus
VIGS	<i>virus-induced gene silencing</i> , vírussal kiváltott géncsendesítés
VPE	<i>vacuolar processing enzyme</i> , vakuólum-feldolgozó enzim

## 1. Bevezetés

A növények sejtközötti járataiban a baktériumok ideális szaporodási feltételeket találhatnának. Az asszimilátákban gazdag szövetnedvek és a külső környezeti ártalmaktól való védettség egyaránt kedvezhetne a mikroorganizmusok elszaporodásának. Hogy mindez mégsem így van, az annak köszönhető, hogy a növények az evolúció során különböző védekezési mechanizmusokat fejlesztettek ki a mikroorganizmusok ellen. Ezek lehetnek passzív és aktív védekezési formák. Az előbbi során a növény fizikailag gátolja a kórokozók bejutását a szövetekbe (pl. vastag kutikulával), míg az utóbbi esetben a már behatolt kórokozókkal veszi fel a harcot. Amíg az állati (és humán) immunrendszerben specializálódott, helyváltoztatásra képes sejtek állnak készen a kórokozók leküzdésére, addig a növényekben a védekezés feladata a fertőzésben érintett sejtekre hárul. Az ilyen védekezési feladatok igen energiaigényesek, ezért nem működnek folyamatosan, csak akkor, ha a fertőzés bekövetkezett. Ilyenkor a bejutott kórokozó maga váltja ki a növényben a védekezési reakciót.

Akárcsak az állatokban, a növényekben is két fontos védekezési rendszer fordul elő: egy általános és egy kórokozó-specifikus. Az előbbire jellemző, hogy minden – a növény számára – idegen mikroorganizmus aktiválja, és többnyire tünetmentes, míg az utóbbi csak meghatározott kórokozó-növény kapcsolatban működik, és gyakran hiperszenzitív rezisztenciában (HR) – a fertőzés környékén levő sejtek elhalásában – nyilvánul meg. A védekezés beindításához elengedhetetlen, hogy a növényi sejt érzékelje a kórokozó jelenlétét. A felismerési folyamatot többnyire a kórokozó által kiválasztott, vagy a felszínén megtalálható bizonyos molekulák, vagy a patogén által a növényben okozott sérülések során keletkezett jelek indítják. Az általános és a specifikus rezisztencia válasz egymással párhuzamosan is kialakulhat, mivel az őket kiváltó jelek egyidejűleg is felléphetnek (Klement, 1982; Klement 2004).

Ebben a dolgozatban azoknak a munkáknak az eredményeit foglalom össze, melyeket az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének (jelenlegi nevén MTA Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézete) Bakteriológiai csoportjába bekapcsolódva végezhettem Bozsó Zoltán témavezetésével. Bár a munkák jelentős része – a disszertáció címéhez híven – az általános védekezéshez köthető folyamatok funkcionális genomikai kutatómunkáikhoz kapcsolódnak, ezeket időrendben olyan vizsgálatok előzték meg, melyek célja a baktériumok által kiváltott általános védekezés vírusfertőzések lefolyására gyakorolt hatásának feltárása volt. Ezeknek az eredményei szintén helyet kaptak a következő oldalakon.



## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A növények és a kórokozók kapcsolata

A mezőgazdasági termesztés talán legfontosabb célja a jól értékesíthető, egészséges termények előállítása. A kórokozók által előidézett betegségek nem csak a termés hozamot csökkenthetik, hanem ronthatják a beltartalmi értéket és a külső megjelenést (és így a *piacosságot*) is. Az értékesítés szempontjából egy növény egy adott kórokozóra nézve lehet *fogékony* (tehát betegségre hajlamos) és *ellenálló* (tehát egészséges). Ilyen megközelítésben egy adott kórokozóval szemben *toleráns* növényről akkor beszélhetünk, ha a betegségre jellemző tünetek nem, vagy csak nagyon enyhén jelentkeznek, mindenesetre – gazdasági kár – szinte nem is jelentkezik.

Ez a külső megjelenés alapján való felosztás azonban már aligha elégíti ki a kóréletteni szempontokat. Az e területen kutatók elsősorban nem a növények külső megjelenésére, hanem a növények (növényi sejtek) és a kórokozók közötti kapcsolatra összpontosítanak.

A növények és kórokozók kapcsolatát vizsgálva többféle megközelítéssel találkozhatunk: a növénytermesztők, a -nemesítők és a növényi kórélettenal foglalkozó szakemberek mást és mást érthetnek hasonló fogalmak alatt.

Ha egy kórokozó megfertőzi a gazdanövényét, és abban jelentősen szaporodni képes, akkor kettejük között *kompatibilis kapcsolatról* beszélünk. Ebben az – egyébként ritkább – esetben a kórokozó képes a növényben terjedni, és kialakulhatnak a betegségre jellemző tünetek.

Ezzel szemben ha a növény az adott kórokozónak nem gazdája (ún. *nem-gazda*), vagy a gazdanövény rezisztenciagént hordoz a kórokozó adott rassaival szemben, kapcsolatuk *inkompatibilis* lesz, a növényt pedig ellenállónak, vagyis rezisztensnek mondhatjuk (Klement 1982; Király és Barna 2007).

A növényeknek valószínűleg azóta kell felvenniük a harcot a különböző mikroorganizmusokkal, amióta megjelentek a Földön. A különféle mechanizmusokon alapuló védelmi rendszer kimunkálása a fennmaradásuk záloga volt.

### 2.2. A növényi rezisztenciaformák

A baktériumok bejutásának a növények bőrszövete fizikai gátat szab. Ez a védelmi vonal természetesen állandóan (*preformáltan*) jelen van a növényen. Az ezen esett sebzés azonban utat nyithat a mikroorganizmusoknak (Klement 2004). Az utóbbi években megdőlni látszik az a feltételezés, hogy a gázcsere nyílások a sebzésekhez hasonlóan könnyen járható utat biztosítanak a levél belső szövetei felé. Egyes növényeknél, mint például az *Arabidopsis*-nál már sikerült igazolni,

hogy a zárósejtek igyekeznek újtát állni a betolakodóknak, ha azok sejtfelszíni molekuláris mintázatait érzékelik (Underwood és mtsai. 2007).<sup>1</sup>

A bejutó mikroorganizmusoknak aztán az általuk “bekapcsolt” ún. *indukált* vagy *aktív* védekezési mechanizmussal kell szembenéznük (Király és Barna, 2007). Megjegyzendő, hogy az irodalom nem egységes abban a tekintetben, hogy az indukált és az aktív védekezés egymással megfeleltethető fogalmak-e. Az esetleges különbségtétel, hogy az indukált rezisztencia egy későbbi felülfertőzéssel szemben lesz hatásos, míg az aktív forma már rögtön az azt kiváltó első betolakodók ellen hatni fog (Szatmári, 2008).

Király és mtsai. (2007) a témakört áttekintő szemleciükben a védekezési mechanizmusokat két fő osztályra bontják: *öröklött (innate, “veleszületett”)* és *szerzett (acquired)* védekezésre (2.1. ábra).

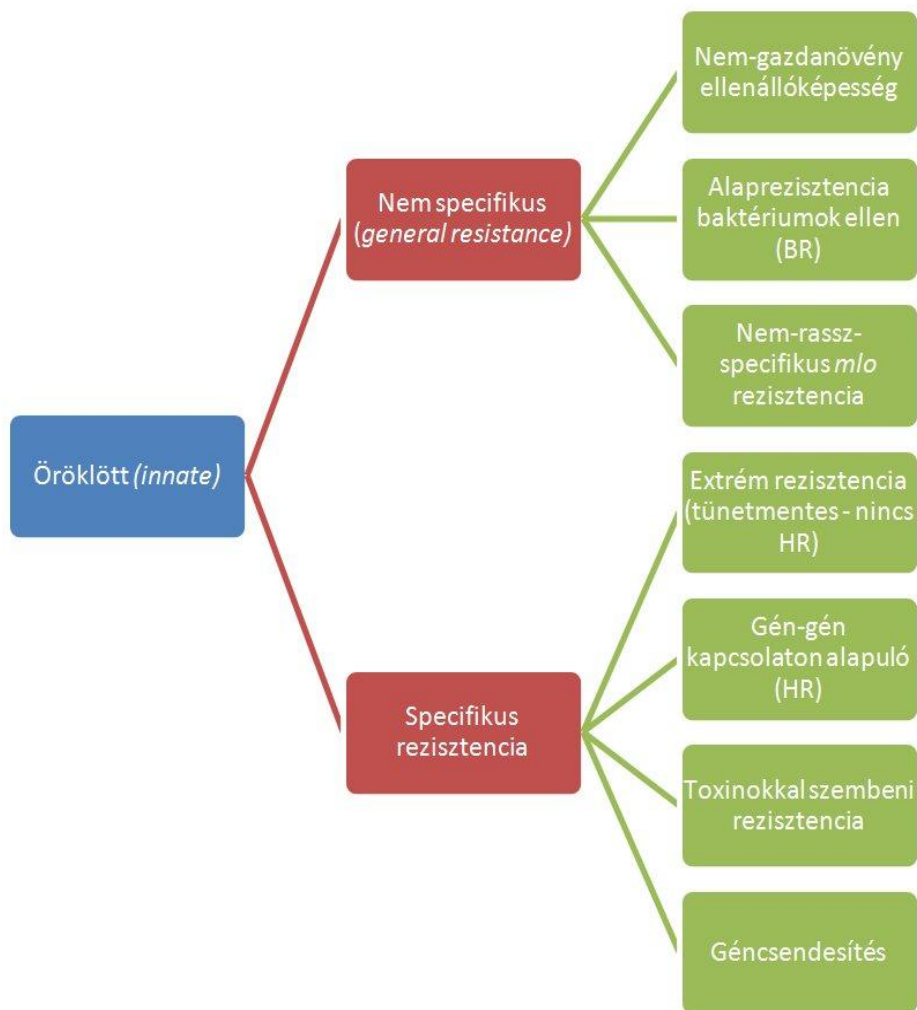
Az öröklött védekezési mechanizmusokat specificitás szempontjából további két csoportba osztják: nem specifikus, ún. általános védekezésre (*non-specific, general resistance*) és specifikus védekezési módokra (mint például a hiperszenzitív reakcióval járó gén a génnel szembeni rezisztencia stb.). Ebben a felosztásban a nem-specifikus csoportban kap helyet a dolgozatomban szempontjából kiemelkedően fontos általános védekezés (BR - *basal resistance*), vagy a szerzők egy más művében (Király és Barna, 2007) fellelhető szóhasználattal: alaprezisztencia.

Fontos megjegyezni, hogy az irodalomban a magyarra talán legegyszerűbben *általános védekezés*ként fordítható kifejezés alatt többféle jelenséget is érthetnek a különböző szerzők (Király és Barna 2007; Szarka és mtsai, 2006; de Torres és mtsai. 2003; stb). A továbbiakban *általános védekezés* alatt a külföldi szakirodalomban *basal resistance* (BR) néven meghonosodott kifejezést fogom érteni. A következetesség kedvéért ezt a rezisztenciaformát rendre így tüntetem fel, annak ellenére, hogy ezt a jelenségkört is többféle névvel illetik a különböző források. Két tudománytörténeti végletet említve: kezdetben a mai BR-t egyszerűen *az* indukált rezisztenciának nevezték (Lovrekovich és Farkas, 1965). Aztán egyre árnyaltabbá vált a különféle védekezési rendszerekről alkotott ismeretanyag. Így bő negyven évvel később Boller és Felix (2009) már a PTI-vel (*PAMP-triggered Immunity*)<sup>2</sup> feleltetik meg a BR-t, egyben utalva arra, hogy az irodalomból kiszorulóban van a *basal resistance* elnevezés.

---

1 Ezen molekuláris mintázatokról (ún. MAMPokról – *microbe-associated molecular patterns*) a 2.2.2.1. pontban lesz szó.

2 Bár a PTI elnevezés némi közvetetlenséget takar, tekintve, - ahogy erre az idézett cikk is kitér - hogy nem csak a kórokozókra jellemző PAMP-ok (Pathogen-Associated Molecular Patterns), hanem olyan ún. általános elicitorok is, mint a növényi sejtek sérüléseiből köthető mintázatok (DAMP – *damage-associated molecular patterns*).



**2.1. ábra.** Az öröklött *aktív* (a szerzőknél szinonimaként használt “*indukált*”) rezisztenciaformák vázlatos áttekintése Király és mtsai (2007), valamint Király és Barna (2007) alapján.

A következőkben a specifikus védekezési mechanizmusok közé sorolt túlérzékenységi választ, vagyis hiperszenzitív reakciót (HR – *hypersensitive response*) és a nem specifikus BR-t fogom alaposabban összevetni.

A BR-re jellemző, hogy számos mikroorganizmus, patogének és szaprofiták egyaránt képesek indukálni (Burgyán és Klement, 1979). A hiperszenzitív reakciót viszont kizárólag élő, aktív anyagcserét folytató kórokozók képesek előidézni. Az általános rezisztencia a HR-rel ellentétben tünetmentes, ezért a jelenlétét csak közvetve lehet érzékelni, például azáltal, hogy egy második, ún. „*challenge*” fertőzés során a HR nekrozis elmarad (Klement és mtsai., 1999). Az általános és a hiperszenzitív rezisztenciát az 2.1. táblázat hasonlítja össze.

**2.1. táblázat.** Az általános és a specifikus (hiperszenzitív) rezisztencia összehasonlítására (Klement, 2004 nyomán)

<i>Rezisztencia típusa</i>	<i>Általános</i>	<i>Hiperszenzitív</i>
Kapcsolat	Nem specifikus	Specifikus
Kiváltó baktérium	Szaprofitonok, patogének, elölt baktériumok, stb.	Patogének
Tünet	Tünetmentes	Sejtnekrózis
Kifejlődés	2-6 óra	4-24 óra
SAR-indukció	Nem indukálja a SAR-t	Indukálja a SAR-t

Mind az általános, mind a specifikus védekezési mechanizmus a fertőzött szövetrészen, lokálisan jelenik meg. A HR-nek van azonban a növény többi részére kiterjedő következménye is, a szisztémikusan szerzett rezisztencia (SAR) (Sticher és mtsai. 1997). Ennek kialakulása a hiperszenzitív nekrosisokat körbevevő sejtekben beinduló szalicilsav-képződéssel hozható kapcsolatba.

A fentiek alapján belátható, hogy egy HR-t kiváltó baktérium szükségszerűen beindítja a BR-t is. Bár ez utalhat arra, hogy a BR evolúciósan egy ősből védekezési forma, a feltűnő fenotípusa miatt mégis a HR a legrégebben ismert növényi rezisztencia típus (Ward, 1902; Stakman, 1915). A következőkben ezt a tudománytörténeti sorrendet alapul véve veszem előre a HR tárgyalását.

### **2.2.1. A hiperszenzitív reakció (HR)**

Eddig már szinte valamennyi vírus, pro- és eukarióta növénykórokozó esetében megfigyelték, hogy képesek a növényben hiperszenzitív reakció kialakítására. HR akkor játszódik le, amikor inkompatibilis a kapcsolat a gazda és a kórokozó között, tehát amikor egy kórokozó a nem-gazdanövényét (pl. bab-kórokozó dohányt) vagy a gazdanövénye egy rezisztens fajtáját támadja meg. Ilyenkor a fertőzött növényi szövet elhal. A növény ellenállóságát és a kórokozó patogenitását és fajtaspecifitását is gének határozzák meg, ezért a HR-t a kórokozó és a növény génjeinek (pontosabban azok géntermékeinek) kölcsönös kapcsolatrendszer határozza meg (Klement, 1982).

### 2.2.1.1. A baktériumok által kiváltott HR kialakulása

A hiperszenzitív reakció kialakulása három, egymást követő fő fázisra osztható:

- I. az indukció
- II. a latencia
- III. a sejt-kollapszus szakaszaira (Klement, 1982).

I. A HR indukciójához nem elég a kórokozóknak a sejt-közötti térbe bejutni, a növény és a baktérium sejt-falának közvetlen kapcsolatba is kell lépnie (Stall és Cook, 1979). A HR csak akkor fejlődik ki, ha a baktérium érzékelt a növényi környezetet, és ennek hatására olyan effektor fehérjéket termel, és juttat be a növénysejtbe, amelyeket az képes felismerni (Klement, 1982)<sup>2</sup>. A HR indukcióért a baktériumban az ún. *hrp/hrc* (*hypersensitive response and pathogenicity/hypersensitive response and conserved*) és *avr* (avirulencia) gének felelősek. A *hrp/hrc* gének által létrehozott transzport rendszer segítségével tudja ugyanis a baktérium az *Avr* fehérjéit a növénysejtbe injektálni (Baker és mtsai., 1997). A baktérium HR-t indukáló elicitorait az R (rezisztencia) gének termékeivel érzékeli, amelyek többnyire a növényi sejten belül találhatók. Ezek az R géntermékek hasonló szerepet töltenek be, mint az állatvilágban ismert Toll-domént tartalmazó, patogének elleni védekezésben részt vevő receptorok. Ezek a fehérjék leucingazdag ismétlődést (LRR, *leucine-rich repeat*) tartalmazó régiókat hordoznak (Dinesh-Kumar és mtsai., 2000; Klement, 2004). Az ilyen, nukleotidkötő hellyel rendelkező leucingazdag ismétlődést tartalmazó fehérjék (NBS-LRR, *nucleotide binding site leucine-rich repeat*) közvetlenül és közvetve – a gazdasejt saját fehérjéinek változásán keresztül – is képesek a virulenciafehérjéket érzéklni (De Young és Innes, 2006). Egyelőre kevés irodalmi adat áll rendelkezésre azzal kapcsolatban, hogy a sikeres felismerést követően hogyan is indul el az a jelátviteli folyamat, amely aztán végső soron a hiperszenzitív reakcióhoz vezet. Ugyanakkor valószínűsíthető, hogy a nukleotidkötő doménon bekövetkező konformációváltozás teszi lehetővé, hogy a receptorfehérje N-terminális vége felől aktiválódhasson a védekezési folyamat (Bernoux és mtsai., 2011).

Klement és Goodman (1967) azt az időtartamot nevezi HR-indukciós időnek, amely alatt a baktérium annyi és olyan elicitor tud kiválasztani, amely már visszafordíthatatlanul elindítja a nekrozist. Az indukciós idő hossza általában 0,5-3 óra, mely főként a baktériumtörzstől és a baktérium fiziológiai állapotától függ, de kisebb mértékben befolyásolja a levélszövet kora is. Az indukciós idő például hosszabb akkor, ha veszteglő (stacioner) fázisban lévő baktériumokat használunk fiatal, exponenciális szaporodási fázisban lévő kultúra helyett (Süle, 1974). Az

---

<sup>2</sup> Erről bővebben lásd a 2.2.2.1. szakaszt.

indukciós idő hossza azáltal is csökkenthető, ha a levélbe injektált baktériumszuszpenzió töménységét növeljük.

II. A latencia fázisban a baktérium aktivitásának már nincs szerepe; a HR akkor is létrejön, ha a baktériumot már elöltük (pl. antibiotikummal). Ebben a szakaszban azok a folyamatok játszódnak le, amelyek a sejtek nekrozisához vezetnek. Ez a szakasz általában 3-10 órát vesz igénybe (Klement, 1982). A latencia fázisban a HR kifejlődésének sebessége elsősorban a növénytől függ. Így szerepe van például annak, hogy melyik rezisztenciagén által jelzett védekezési reakciókat aktiválja a baktérium (Reuber és Ausubel, 1996).

III. A HR a harmadik (sejtkollapszus) szakaszban manifesztálódik. A növényi sejt vagy szövet kollapszusa részben annak köszönhető, hogy a védekezés során nagy mennyiségű toxikus szabadgyök keletkezik, amelyek nemcsak a baktérium károsításában vesznek részt, hanem a növényi sejtmembránok lipid peroxidációjában is. Ennek a folyamatnak az eredményeképpen a membránok áteresztőképessége hirtelen, visszafordíthatatlan módon megnő. Ennek a folyamatnak az egyik következménye például, hogy a vakuólumban lévő, sokszor toxikus fenolvegyületek a sejtplazmába ömlenek (Klement, 1982).

A sejt halálához vezető folyamatok a HR során szabályozottan mennek végbe. Az ilyen előre meghatározott módon végbemenő sejtpusztulást programozott sejthalálnak (PCD – *programmed cell death*) nevezzük. Szemben a passzívan elszenvedett sérülésből eredő nekrozissal, a PCD kialakulásához a sejt aktív közreműködésére (pl. fehérjeszintézis) van szükség. (Gilchrist, 1998). Az elhalás mértéke a baktérium-növény kapcsolattól függően a sejtnekrozistól a szöveti nekrozisig terjedhet. Ha egy kórokozó a nem-gazdanövényét vagy egy rá nézve rezisztens fajtát fertőz, akkor természetes körülmények között a nekrozis csak a baktériummal érintkező egy-két növénysejtre terjed ki (Goodman és Novacky, 1994). A HR mérete attól is függ, hogy hány patogén baktériumsejt jut a növényi szövetbe. Összefüggő, látható HR akkor alakul ki, ha a baktériumot elég nagy számban, kb.  $5 \cdot 10^6$  sejt·ml<sup>-1</sup>-nél nagyobb koncentrációban juttatjuk be a szövetbe. (Turner és Novacky, 1974) Ha ennél alacsonyabb sejtkoncentrációt használunk, akkor csak mikroszkopikusan lehet megfigyelni az egyes növényi sejtek elhalását (Essenberg és mtsai., 1979).

A baktériumfertőzésre adott HR kialakulása általában a fertőzéstől számított négy-huszonnégy óra alatt bekövetkezik a növénytől, a baktériumtól, azok fiziológiai állapotától és genetikai hátterétől függően. A fiatal szövetekben általában gyorsabb a HR kialakulása (Klement, 1982).

### 2.2.2. Általános rezisztencia (BR – basal resistance)

Amíg a hiperszenzitív reakció egy kizárólag kórokozókval szembeni rezisztencia mechanizmus, addig az általános védekezési válaszok nem-patogénekkel szemben is kialakulnak a növényben. Ez a képesség a növények „veleszületett” (*innate*) tulajdonsága, ami segít nekik a sejtközötti térbe bejutó mikroorganizmusok leküzdésében. Ez az adott baktérium egyes életfolyamatainak (pl. szaporodás, kórokozásban részt vevő gének átírása stb.) blokkolásán keresztül történhet. A BR nem csak a kórokozó szaporodását képes gátolni, hanem – inkompatibilis kapcsolatokban – a HR kialakulását is. (Bozsó és mtsai., 1999; Klement és mtsai., 1999; Klement és mtsai. 2003)

Éppen a jól megfigyelhető HR gátlás az, amivel a BR megléte igazolható. Ha egy HR kiváltására alkalmas baktériummal fertőzzük felül a növényt, a nekrotikus léziók elmaradása jelzi a BR működését. Az általános rezisztencia gyors kifejlődését és hatásosságát a növény fiziológiai állapota – elsősorban a levél kora – és a környezeti feltételek egyaránt befolyásolják (Klement és mtsai., 1999, Klement és mtsai., 2003). Ez pedig a BR-nek is természetes korlátokat szab: Besenyei és mtsai. (2005) például kimutatták, hogy alacsony hőmérsékleten csak késleltetve, illetve egyáltalán nem képes kifejteni a hatását.

#### 2.2.2.1. A BR kiváltása

Mivel az általános rezisztenciát kórokozó és nem kórokozó baktériumok egyaránt képesek előidézni, a BR-t olyan bakteriális eredetű molekuláris mintázatok váltják ki, amely általánosan előfordulnak a prokariótákban. Ilyen molekulának bizonyult például a Gram-negatív baktériumok felületét borító lipopoliszacharid (LPS). Sikerült kimutatni, hogy tisztított LPS (Newman és mtsai., 1995), illetve LPS-fehérje-komplex (Mazzuchi és Pupillo, 1976) képes BR-t előidézni. De erre más baktérium eredetű molekulák is alkalmasak, mint pl. az ostorokat felépítő fehérje, a flagellin (Felix és mtsai., 1999). Ez a törzsfajlás már egy igen korai szakaszában megjelenhetett, és így ma egyetemesen előfordul szinte minden baktériumtörzsnél (Liu és Ochman, 2007).

A baktériumok sejtközötti térbe jutását (patogénekét és nem-patogénekét egyaránt) a növény a megfelelő ún. mintázat felismerő receptoraival (PRR – *pattern recognition receptor*) érzékeli. Egyes PRR-ek, igen ősinek mutatkoznak, tekintve, hogy szinte minden magasabb rendű növényben megtalálhatóak. A fent említett flagellin egy erősen konzervált szakaszának (*flg22*) felismerésében egy leucing-gazdag ismétlődéseket (LRR – *leucine rich repeat*) tartalmazó receptor kináz, az FLS2 (*flagellin sensing 2*)<sup>3</sup> játszik szerepet (Gómez-Gómez és Boller 2000; Boller és Felix, 2009).

---

3 A korábban FLS1-ként leírt receptor kinázról kiderült, hogy az FLS2-vel azonos. (Zipfel és mtsai. 2004 – hivatkozzák Boller és Felix, 2009)

A flagellinen kívül a baktériumokban előforduló egyik leggyakoribb, és igen erősen konzervált fehérje, az EF-Tu (*elongation factor thermo unstable*). Úgy tűnik azonban, hogy az ezt érzékelő mechanizmus evolúciósan csak viszonylag későn jelent meg a növényvilágban. Egyelőre a keresztesvirágúakban (*Brassicaceae*; így pl. a modellnövényként gyakran használt *Arabidopsis*-ban) sikerült egyértelműen kimutatni a BR-t kiváltó hatását (Kunze és mtsai., 2004)

Ezekon az ún. *elicitor* molekulákon kívül a mechanikai és ozmotikus stressz is kiválthatja a BR-t (Novacky és Hanchey, 1976). Ez aligha lehet véletlen, tekintve, hogy a mikrobákhoz köthető molekuláris mintázatok (MAMP – *microbe associated molecular pattern*, pl. flagellin, LPS, EF-Tu) a növényi sejt hasonló módon észleli, mint a DAMP-okat (*damage associated molecular patterns*), vagyis azokat, amelyek a sejtek károsodása során szabadulnak fel (Boller és Felix, 2009).

#### **2.2.2.2. A baktériumok felismerésében szerepet játszó fehérjék**

A betolakodók felismerésénél tehát fontos szerepet kapnak a különböző receptorok. Ahogy a HR indukciójánál<sup>3</sup> utaltunk rá, ilyen szerepet játszanak például a Toll-szerű receptorok (TLR – *toll-like receptors*). Ezekkel együtt a sejtplazmában elhelyezkedő, nagyon gyakran leucingazdag ismétlődéseket (LRR) tartalmazó NOD-ok (*nucleotide-binding oligomerization domain*; nukleotidkötő oligomerizációs domének) – és a szekvenciában hozzájuk igen hasonló növényi NBS-ok – is a védekezési folyamatok felismerési szakaszának kulcselemei (Inohara és mtsai., 2005). Az LRR motívumok igen elterjedtek az élővilágban, szerepük többnyire a fehérje-fehérje kapcsolatokban jelenik meg (McHale és mtsai., 2006). A növényekben persze nem számolhatunk az állati és humán kísérletekben igazolt gyulladási tünetek kialakításában betöltött funkciójukkal (Inohara és mtsai., 2005), ugyanakkor a mikrobiális fertőzések elleni védekezéshez kapcsolódóan már mutatható ki nagyfokú hasonlóság.

Az NBS-LRR-ek működésével kapcsolatban alapvetően két elmélet uralkodik: az egyik szerint az NBS-LRR-t tartalmazó R fehérjék receptorként magukat a kórokozó effektor fehérjéket kötik meg. Mivel azonban viszonylag kevés bizonyíték van a közvetlen R-*avr* kapcsolatra, olyan elgondolás is létezik, amely szerint az NBS-LRR fehérjék olyan gazdasejt-fehérjéket ellenőriznek, amelyek szerkezetében változás áll be az effektorok hatására. Ilyen „*testőr*” szerepben pedig az érzékeny pontok ellenőrzésével akár kevés NBS-LRR fehérjével is többféle patogén-effektor támadását is fel lehet ismerni (McHale és mtsai., 2006).

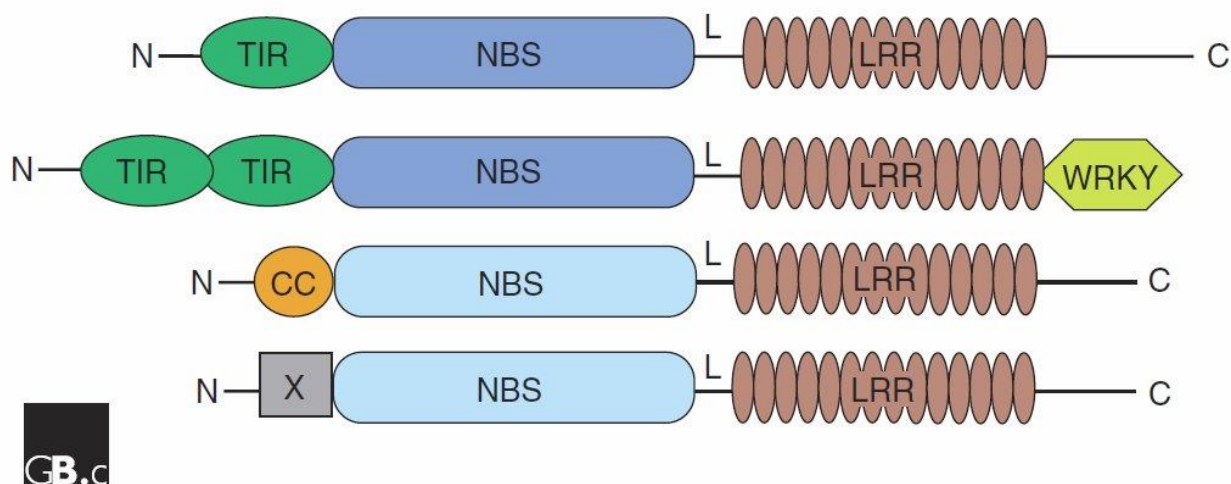
---

<sup>3</sup> Lásd 2.2.1.1. szakasz.



Az NBS-LRR fehérjéket két nagyobb alcsoportba lehet sorolni az alapján, hogy az amino-terminális doménükön Toll/interleukin-1 receptor (TIR) vagy ún. coiled-coil<sup>4</sup> (CC) motívumot tartalmaznak. Az NBS-LRR fehérjék fő doménjeit a 2.2. ábra szemlélteti (McHale és mtsai., 2006).

Legyen szó tehát akár egy biotikus stressz felismeréséről (pl. baktériumsejt MAMP-jainak érzékelése) vagy akár sejtthártya-károsodás során kalcium-ion beáramlásról, a külvilágból érkező jel (az „információ”), jelátviteli útvonalakon keresztül jut el akár az azonnali válaszig, akár a transzkripció faktorokig, amelyek aztán – ahogy a nevük is mutatja – a kívánt DNS-szakasz mRNS-sé átírását irányítják.



**2.2. ábra.** Az NBS-LRR fehérjék fő doménjei. N: amino terminális régió, TIR: Toll/interleukin1 receptorszerű domén, NBS: nukleotidkötő hely, L: *linker* (összekötő) régió, LRR: leucingazdag ismétlődést tartalmazó motívum, C: C-terminális régió, WRKY: a *zinc-finger* transzkripció faktorhoz köthető domén, CC: coiled coil motívum, X: olyan domén, amelyre nem jellemző a CC motívum. Forrás: McHale és mtsai., 2006

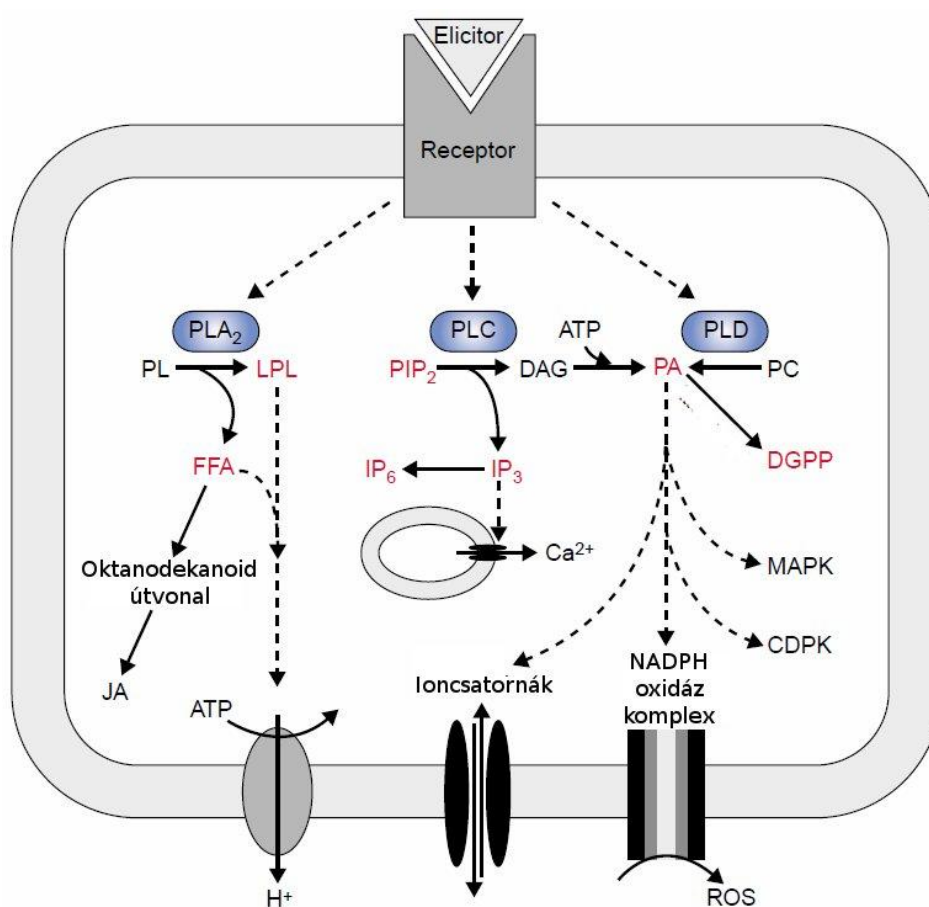
Az egyik fontos sejten belüli (másodlagos) hírvivő a kalcium-ion. Ennek sejt plazmába áramlása a kalcium-ioncsatornákon kívül történhet sebzésen vagy a plazmodezmákon keresztül. De a foszfátid-sav is végezheti ionofórként a membránon keresztüli transzportját.

A kalciumon kívül szerep juthat a mitogén-aktivált kináz kaszkádoknak (MAPKKK (vagy MEKK) → MAPKK → MAPK → transzkripció faktor). Ezeket általában egy GTP-kötő fehérje indítja a jelenleg ismert PAMP-ok nagy részének hatására De a folyamatban fontos szerepe lehet a különböző foszfolipázoknak [foszfolipáz-A1 (PLA1), a foszfolipáz-A2 (PLA2), a

<sup>4</sup> A motívum struktúrája a makroszkopikus világban leginkább a kötelekre emlékeztet, ahol vékony sodort szálakból áll össze a szintén sodort végtermék. Innen a *coiled coil* (magyarul talán tekercselt vagy feltekert tekerésre fordítható) elnevezés.

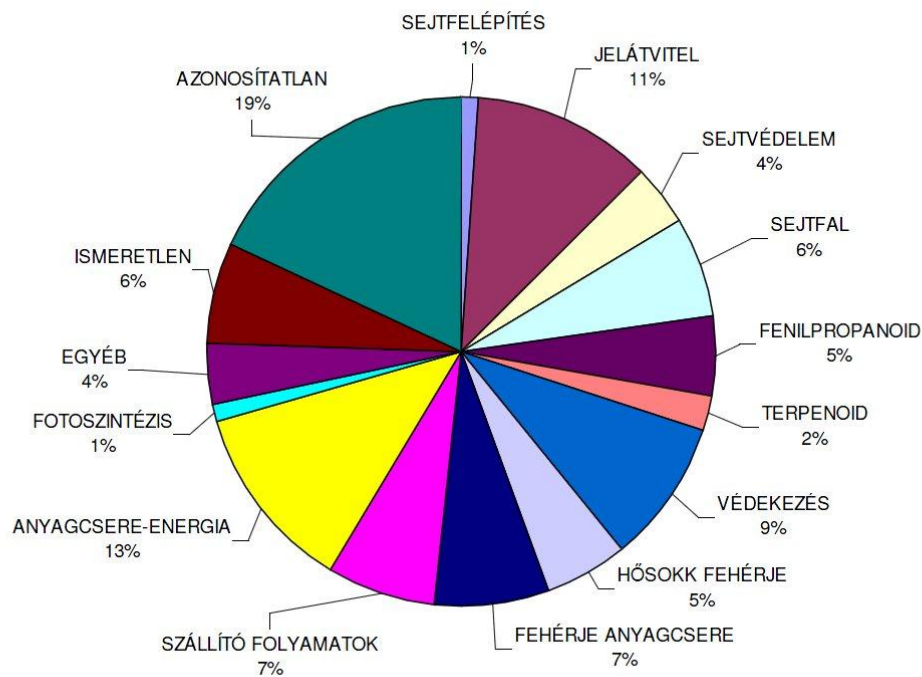
foszfolipáz-C (PLC) és a foszfolipáz-D (PLD)] is. (Trewavas, 2000; Pitzschke és mtsai., 2009). Ez utóbbiak jelátvitelben betöltött feltételezett szerepét a 2.3. ábra szemlélteti.

A precíz szabályozásra már csak azért is szükség van, mert az általános védekezés alatt – mint sok más stresszre adott válasz során – a növényi gének egy jelentős részének átíródása megváltozik. Az utóbbi évek transzkripciós vizsgálatai igazolták, hogy ezek egy része illetve géntermékei közvetlenül részt vehetnek a védekezés kialakításában (pl. sejtfalerősítéshez járulnak hozzá vagy antimikrobiális hatással bírnak) mások a stressz leküzdésében, a növényi homeosztázis fenntartásában játszhatnak szerepet (Hauck és mtsai., 2003; de Torres és mtsai., 2003; Szatmári és mtsai., 2006)



**2.3. ábra.** A növényi védekezési folyamatokban részt vevő foszfolipid jelátviteli útvonalak sematikus vázlata. A PLA2 hatására lizo-foszfolipid (LPL) és szabad zsírsavak (FFA; *free fatty acids*) keletkeznek, amelyek a sejtthártya protontranszlokáló ATP-ázára hatnak. Ugyanakkor a szabad zsírsavak jászmonsavvá (JA; *jasmonic acid*) is alakulhatnak az oktadekanoid útvonalon keresztül. A PLC a foszfátidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP<sub>2</sub>) inozitol-1,4,5-triszfoszfáttá (IP<sub>3</sub>) és diacilglicerollá (DAG) hidrolizálja. Az IP<sub>3</sub> aztán vagy inozitol-hexafoszfáttá (IP<sub>6</sub>) alakul tovább, vagy pedig a sejtben belüli kalcium-ionokat szabadít fel a sejt raktáraiból. A DAG-t a sejtthártyán belül a DAG kináz foszforilálja foszfátsavvá (PA). PA viszont strukturális foszfolipidek (pl. foszfátidil-kolin, PC) közvetlen hidrolizációjából is származhat. Ezt a folyamatot az aktivált PLD segítségével történik. A PA különböző védekezésben szerepet játszó folyamatokat aktiválhat, így például a kalcium-függő protein kináz (CDPK) vagy mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalakat, de hathat az ioncsatornákra és a reaktív oxigénformák felszabadulását (ROS) eredményező NADPH oxidázra is. A PA jelszint csökkenéséhez vezet a diacil-glicerol-pirofoszfáttá (DGPP) alakulása. Forrás: Laxalt és Munnik, 2002.

Az ebben a dolgozatban ismertetett munkák közvetlen előzményeként kutatócsoportunkban is folytak ilyen irányú kutatások. Több mint 160 olyan dohány gént sikerült elkülöníteni szubtrakciós módszerrel, amelyek a BR alatt megváltozott aktivitást mutatnak (2.4. ábra). Ezek több mint tizede a jelátviteli folyamatokhoz köthető. Ugyanilyen arányban szerepelnek a közvetlenül vagy közvetve (fenilpropanoid) a sejtfalerősítésben szerepet játszó gének, de nagy arányban mutattak aktivitást azok is, amelyek a védekezéshez kapcsolhatóak (Szatmári és mtsai., 2006).



**2.4. ábra.** A BR során megváltozott aktivitást mutató gének funkció szerinti aránya (Forrás: Szatmári, 2008)

A baktériumok is igyekeznek persze kivédeni a növényi BR-t. Az evolúció során kimunkált számtalan lehetőség közül ilyen például az, amikor bizonyos a Gram-negatív baktériumok egy III-as típusú szekréciós rendszeren keresztül a BR kialakulását gátló, ún. *effektor fehérjéket* juttatnak a gazdasejtbe (Hauck és mtsai, 2003; Alfano és Collmer, 2004). Zhang és mtsai (2007) egy ilyen mechanizmusra hoztak példát, amikor kimutatták, hogy a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* baktériumok HopA11 effektor fehérjéi a mitogén-aktivált fehérjekinázok (MAPK – *mitogen activated protein kinase*) elnyomásán keresztül képesek megakadályozni mind a reaktív oxigénformák felszabadulást, mind pedig a kallóz beépülést (lásd a következő szakaszt). Ha a növény képes felismerni ezeket az effektorokat, az a HR kialakulásához vezet.

### **2.2.2.3. A BR alatt bekövetkező sejtfiziológiai és ultrastrukturális változások**

A BR során a növényi sejtekben különböző fiziológiai változások figyelhetők meg. Ezek közé az átmeneti változások közé tartozik pl. a sejten kívüli és ezzel egyidejűleg a sejten belüli pH változása (Baker és mtsai., 1990), a  $\text{Ca}^{2+}$  (Grant és Mansfield, 1999) be- és a  $\text{Cl}^-$  ionok kiáramlása (Nürnbergler és mtsai., 1994), valamint az aktív oxigénformák (pl. hidrogén-peroxid) átmeneti felszaporodása (Baker és Orlandi, 1995). Ezek a folyamatok a BR során általában a fertőzést követő fél órán belül elindulnak, és az első óra végére lecsengenek.

E változások valószínűleg a BR jelátviteli folyamatainak részét képezik. Így pl. a  $\text{Ca}^{2+}$ , mint másodlagos hírvivő, a jelátviteli mechanizmus fontos eleme. Ezek szintjének emelkedése többek között foszfatázok és kinázok aktiválásával jár együtt (Ádám és mtsai., 1997).

A fertőzést követő 4-7 órában megfigyelhető továbbá, hogy a baktériumot egy, a növényi sejtfalhoz kapcsolódó hártya veszi körül. Valószínű, hogy a beburkoló anyag a növény aktív közreműködésével jön létre (Ott és mtsai., 1997). A beburkolás szerepéről megoszlanak a vélemények. Sequeira és mtsai. (1977) a rezisztencia részének tulajdonítják, Mazzucchi és Bazzi (1982) viszont úgy gondolják, hogy a baktérium használja fel saját védelmére.

A baktériumok tapadásának helyén a sejtfalak megerősödését, és a fertőzést követő 6-12 órában a sejtfal és a sejtmembrán között egy elektronmikroszkóppal látható képlet, ún. papilla létrejöttét lehet megfigyelni (Politis és Goodman, 1978; Ott és mtsai., 1997). Ezeken a helyeken többek között hidroxiprolinban gazdag glikoproteinek (HRGP), valamint kallóz beépülése történik, de a lignifikációs folyamatok is megerősödnek (Brown és mtsai., 1998). A papillákhoz különböző védelmi anyagok, pl. fenolvegyületek tudnak kötődni. A papillák mellett lokálisan hidrogén-peroxid felhalmozódást is megfigyeltek.

Ugyanez a jelenség a HR esetében is megvan, csak ott sokkal erősebb (Bestwick és mtsai., 1997; Brown és mtsai., 1998). Ezen kívül peroxidázok felhalmozódása is megfigyelhető – akárcsak a HR-nél –, amely közvetve (pl. lignifikáció útján) szintén részt vehet a sejtfalak megerősítésében. (Bestwick és mtsai., 1997).

A sejtfalmegerősítésnek több szerepe is lehet. Egyrészt lassítja a patogének támadását, mivel gátolja azok sejtfalbontó enzimeinek hatékonyságát. Így a növényi sejt időt nyer arra, hogy átírja a védekezési reakcióban részt vevő újonnan megtermelődő fehérjék génjeit (Lamb és Dixon, 1997). Másrészt a sejtfalak megerősítése gátolhatja a patogének esetében a sejtfalon keresztüli fehérjetranszportot, az effektorok növényi sejtbe juttatását, valamint csökkentheti a növénysejtekben a tápanyagok kiáramlását is, így gyengítve a baktériumok tápanyagellátását (Hammond-Kosack és Jones, 1996).

Meg kell említeni, hogy ezeknek a jelenségeknek egy része nem csak biotikus stresszre következik be. A kallózlerakódás például kísérőjelensége lehet a mechanikus stressznek is (Jaffe és mtsai., 1985). Sőt, a plazmodezmákba történő kallózbeépülés akár a vírusok plazmodezmákon keresztüli (sejtről sejtre történő mozgását) is megakadályozhatja (Radford és mtsai., 1998; Scholthof, 2004; Dong X., 2005).

Ezek a sejtszintű változások lehetőséget teremtenek arra is, hogy a kutatók olyan módszereket dolgozzanak ki, amelyek hatékonyan jelzik a BR folyamatok jelenlétét, ugyanakkor gyorsabbnak és egyszerűbbnek bizonyulnak, mint az inkompatibilis baktériummal való felülfertőzés majd a HR nekrozisok elmaradásának figyelemmel kísérése. Bozsó és mtsai. (2005) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétén alapuló vizsgálattal kvantitatív módszerekkel is képesek voltak jelezni a BR meglétét. Az eljárás során diamino-benzidint (DAB), illetve dikloro-fluoreszcein-diacetátot (DCFH-DA) használtak. A növény természetes peroxidázainak jelenlétében a hidrogén-peroxiddal reakcióba lépő DAB barna (Frederick, 1987), a DCFH-DA pedig ultraibolya tartományban fluoreszkáló vegyületet eredményezett (Lu és Higgins, 1998). Ezek a változások pedig már műszeresen is mérhetőek voltak.

#### **2.2.2.4. A fehérjék bontásának szerepe a védekezési folyamatokban**

Az általános védekezés során megváltozott aktivitást mutató gének közül mintegy 7%-ot tesz ki azoknak az aránya, amelyek beazonosíthatóan a fehérje anyagcseréhez kapcsolhatók (Szatmári és mtsai, 2006). Ezeknek a géneknek egy része a fehérje anyagcsere-folyamatok kódolásért felel. Ide tartoznak a fehérje-szintézisért (pl. riboszomális fehérjék) és a lebontásért (pl. proteínázok) felelős gének. A védekezés során létrejövő különböző géntermékek egyensúlyban tartása fontos szabályozó elem (Trewavas, 2000).

A fehérjék lebontása az *ubikvitin úton*, *proteoszóma komplexekben* vagy pedig *proteázok* segítségével is történhet (lásd pl. Kim és Delaney, 2002; Vierstra, 2003; van der Hoorn és Jones, 2004). A Szatmári és mtsai. (2006) által azonosított gének között mindkét rendszer elemei megtalálhatóak.

A sejtplazmában és a sejtmagban található fehérjék jó részének lebontásában szerepel ubikvitin, illetve a 26S-proteoszóma. Egy ATP-függő folyamat során a bontandó fehérjékhez egy többlépcsős folyamatban ubikvitin kapcsolódik. Az így létrejövő fehérje-poliubikvitin komplexek bontását végzi aztán a 26S-proteoszóma komplex (Baek és Choi, 2008, Dielen és mtsai., 2010).

A proteázok, más néven peptidázok, a fehérjék peptidkötéseit hasítják. A különös vágási hellyel rendelkező endopeptidázokat *proteínázoknak* is nevezik (Barrett és McDonald, 1986). A hasítási specificitásuk szerint öt különböző csoportba sorolják őket (szerin-, treonin-, cisztein-,

aszparaginsav-, glutaminsav-proteinázok). Külön csoportba tartoznak a metalloproteinázok. Szerepük – a humán és állati sejtfolyamatok vizsgálata után – a növényi védekezésben is egyre inkább bizonyítást nyer. A proteázok szerepe nem merül ki a „főlösgessé vált” fehérjék lebontásában. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy részt vehetnek a baktériumok felismerési folyamatában, a sejten belüli jelátviteli- (Xia és mtsai., 2004), illetve a baktériumok ellen adott védekezési válaszreakciók szabályozásában (Abramovitch és mtsai., 2006; Hao és mtsai., 2006).

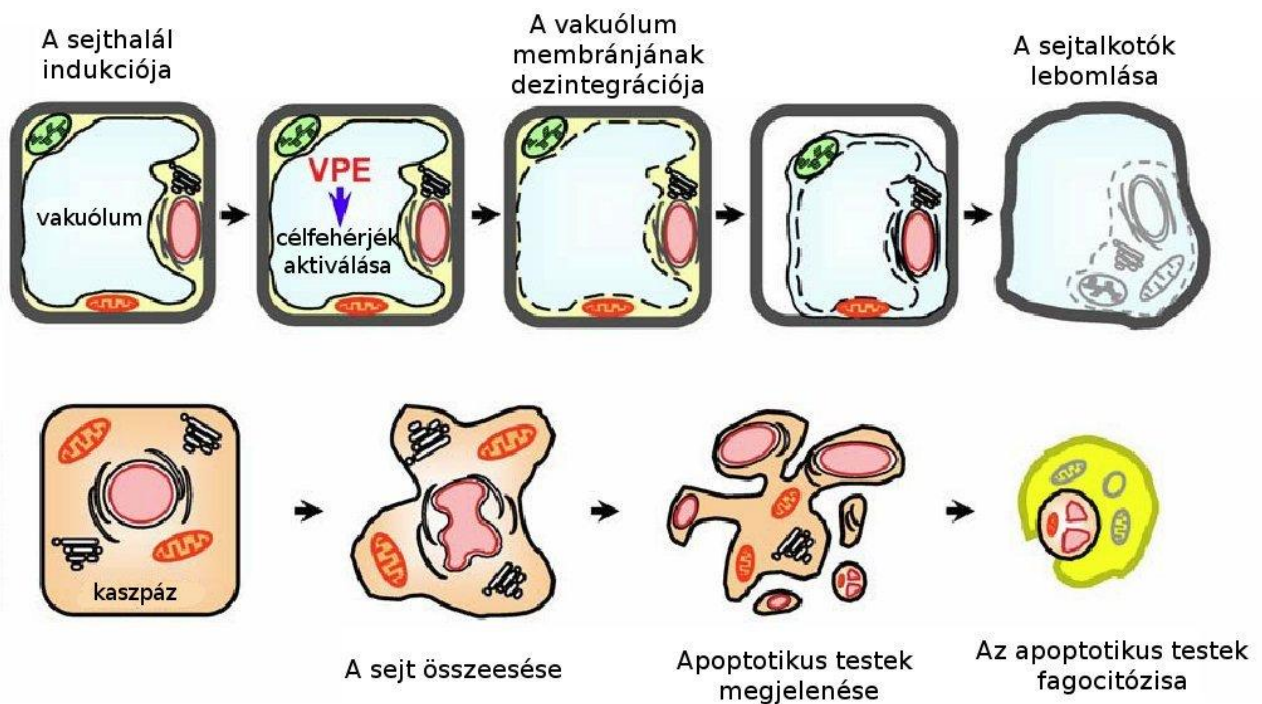
A védekezési folyamatokban elsősorban a cisztein-proteázoknak van fontos szerepük. A mintegy 140 növényi cisztein-proteáz közül soknak azonosították már a patogének támadására adott válaszként kialakuló programozott sejthalálban (PCD – *programmed cell death*) betöltött funkcióját. Ebbe a körbe tartoznak a kaszpáz<sup>5</sup>-1-szerű fehérjék, amelyekhez hasonló kaszpáz az állati sejtekben is az apoptózis szabályozó folyamataival hozták összefüggésbe. Szintén a PCD-vel hozhatók összefüggésbe az állati kaszpáz-1 enzimmel sok strukturális hasonlóságot mutató növényi metakaspázok (MCA) és az ún. VPE-k (*vacuolar processing enzymes*), amelyek a vakuólum hártyájának irányított bontási folyamatában játszanak szerepet (van der Hoorn, 2008; Zhang és mtsai., 2010). Az állati kaszpáz és a növényi VPE által indított folyamatok lefolyásának összehasonlítása a Hatsugai és munkatársaitól (2006) kölcsönzött ábrán (2.5. ábra) látható.

A szerin-proteázok a növényi proteázok legnépesebb családját alkotják, mintegy 200 taggal. A katalitikus mechanizmusuk hasonlít a cisztein-proteázokéra, ami nem véletlen, hiszen az előbbi csoport számos tagja mutat evolúciós rokonságot az utóbbival (van der Hoorn, 2008). Szerin-proteázok között is fellelhetők kaszpáz-szerű funkcióval rendelkező enzimek. Ilyen például a szaspáz, amelynek vélhetően szintén a védekezési folyamatokban van szerepe (Baek és Choi, 2008).

A fent vázoltakon túl a fehérjék bontásának lehet még egy olyan szerepe is, amely közvetve segítheti a növényi sejtet a védekezési folyamatokban. Amikor a sejtnek nem áll rendelkezésére elegendő szénhidrát, a fehérjék (és lipidek) bontása útján is energiához juthat (Araújo és mtsai., 2011).

---

<sup>5</sup> A dolgozatban a kaszpáz elnevezést használom mint az angol caspase (*cystein dependent aspartate-directed protease*; cisztein-függő, aszpartát által irányított proteáz) magyar nyelvű irodalmakban általánosan elterjedt, angol kiejtéshez közeli magyar átíratát.



**2.5. ábra.** Növényi sejtekben (felső sor) a VPE egyfajta sejtszintű „öngyilkosság” lefolyásához vezet. Ezzel szemben állati sejtek (alsó sor) fragmentálódnak, és belőlük ún. apoptotikus testek jönnek létre, amelyeket aztán fagociták kebeleznek be. Mivel a növényekben nem találhatóak falósejtek, és a sejtfal is akadályt jelentene, ezért a növényi sejteknek önmaguknak kell saját anyagaikat lebontani. A kaspáz-1-szerű aktivitással rendelkező VPE a sejthalál inicializációja (pl. egy patogén baktérium fertőzése) után halmozódik fel. A VPE szerepe a vakuólum membránjainak dezintegrációját elindító célfehérjék aktivációjában nyilvánul meg. Ezt követően a vakuólumban található hidrolitikus enzimek a plazmába ürülve bontani kezdik a sejtalkotókat. Forrás: Hatsugai és mtsai. (2006)

### 2.3. A dohány TMV-vel szembeni rezisztenciája

A vírusok, így a dohány mozaik vírus (TMV) is, a baktériumokétól egy merőben eltérő fertőzési stratégiát alkalmaznak. Ezzel párhuzamosan természetesen a növényi védekezés eszköztára is más lesz.

A kísérleteinkben is használt dohány mozaik vírus a legrégebben kutatott, és növénykórtani vizsgálatok során a legtöbbet használt növényi modell vírus. A vele kapcsolatos kutatások elterjedéséhez nagyban hozzájárul, hogy könnyen lehet vele fertőzni mechanikai úton, ugyanakkor a rovarok, gombák és nematódák nem vektorai. A fertőzést követően a TMV gyorsan replikálódik a növényben, tünetei pedig szabad szemmel is jól felismerhetők. Ezen kedvező gyakorlati tulajdonságai miatt alkalmaztuk mi is a BR vizsgálataink során.

Az első stabil, TMV-rezisztens hibridet Holmes (1938) hozta létre *Nicotiana tabacum* és *N. glutinosa* keresztezésével. A *N. glutinosa*-ból származó gént N-nek nevezte el, jelezve, hogy az ezt tartalmazó növények szövetei nekrotizálódnak a fertőzési hely környékén. Ennek a hiperszenzitív nekrozisnak a hatékonyságára jellemző, hogy a víruspartikulumokat legfeljebb a kifejlett léziót

közvetlenül körülvevő sejtekből lehet kimutatni (da Graca és Martin, 1976). Éppen ezért a kialakuló lézió mérete a vírusterjedés pontos mércéjének tekinthető, de jelzi a gazdasejkollapszus intenzitását és sebességét is (van Loon, 1987). Az *N* gén TMV-re adott válasza a hőmérsékletre érzékeny: 28 °C fölött inaktívulódik. Ilyenkor a fertőzés szisztemizálódni képes és kialakulhat a jellegzetes mozaikos levéltünet. 22 °C-on a vírus terjedése a fertőzés korai szakaszában azonos sebességgel történik kompatibilis és inkompatibilis növénykapcsolatban is. Ebből az látszik, hogy az *N*-génnek nincs közvetlen hatása a vírus rövid távú mozgására (*cell-to-cell movement*) (Padgett és Beachy, 1993), ugyanakkor a nekروزis kialakulásakor a mozgás és a replikáció mértéke is lelassul. Ebből következik, hogy a vírus-replikáció és –terjedés gátlását el kell választani azoktól a jelenségektől, amelyek a sejt-kollapszust és a nekروزist indukálják. Az is látható, hogy sem a replikáció, sem pedig a terjedés nem korlátozódik azokra a korai – a fertőzést legfeljebb egy nappal követő – eseményekre, amelyek a gazdasejt nekروزisát eredményezik (Goodman és Novacky, 1994).

Padgett és mtsai. (1997) kimutatták, hogy a HR indukciójához a TMV replikáz régiójának helikáz doménjére van szükség. A 183 kDa-os fehérje, a mozgási fehérje és a köpenyfehérje nem indukáltak nekروزist. Az *N* fehérjének több olyan tulajdonsága is ismert, amely – az avirulens faktor felismerését követően – a védekezés aktiválásához szükséges. Az *N* fehérjének három olyan doménje van, amely több más növényi *R* génnel is közös. Az *R* géneknek ezt a csoportját (TIR-NBS-LRR) egy Toll/interleukin-1 receptor-szerű domén (TIR), egy nukleotid-kötő hely (NBS) és egy leucingazdag ismétlődés (LRR – *leucine-rich repeat*) határozza meg (Dinesh-Kumar és mtsai., 2000). A LRR domén az *R* fehérje azon szakasza, amely kölcsönhatásba kerül a 126 kDa TMV replikáz fehérje avirulenciáért felelős C-terminális felével (Liu és mtsai., 2004).

Weintraub és Ragetli (1964) TMV-fertőzött *N. glutinosa* sejtek ultrastrukturális változásait vizsgálták a fertőzés időpontjától a sejt-kollapszus beálltáig. Megfigyeléseik szerint nyolc órával az inokuláció után (hpi – *hours post inoculation*) a kloroplasztiszok mátrixában keményítőszemcsék jelennek meg, amelyek még 15 hpi-nél is folyamatosan növekednek. 24 hpi-nél a mitokondriumok száma észrevehetően megemelkedik és membránszakadások is bekövetkeznek. A kloroplasztiszok és mitokondriumok degenerációja 40 hpi-nél válik nyilvánvalóvá, amikor a sejthártya visszahúzódik a sejtfaltól. Ez a folyamat egészen 78 hpi-ig erősödik, amikor is bekövetkezik a sejt-kollapszus.



## 2.4. Vírussal kiváltott géncsendesítés (VIGS – Virus Induced Gene Silencing)

A víruskutatás fejlődésének egy növényi vírus – nevezetesen a munkáinkban is fontos szerepet betöltő dohány mozaik vírus – tudományos leírása adta a kezdő lökést bő száz évvel ezelőtt (Scholthof, 2004). Ennek ellenére a vírusokkal szembeni növényi védekezési stratégiák jó része sokáig feltáratlan maradt. Ez talán nem is csoda, hiszen azok a kifinomult molekuláris biológiai módszerek, amelyek segítségével a vírus-növény kapcsolat feltérképezhető, csak az utóbbi néhány évtizedben jelentek meg. A vírusok fertőzésmechanizmusának megismerése eszközt adott a molekuláris növénynemesítők kezébe, olykor viszont épp a molekuláris biológia eszköztárába frissen felvett módszerek „hibái” utaltak arra, hogy vajon hogyan védekezhet a növény az őt megtámadó vírusokkal szemben.

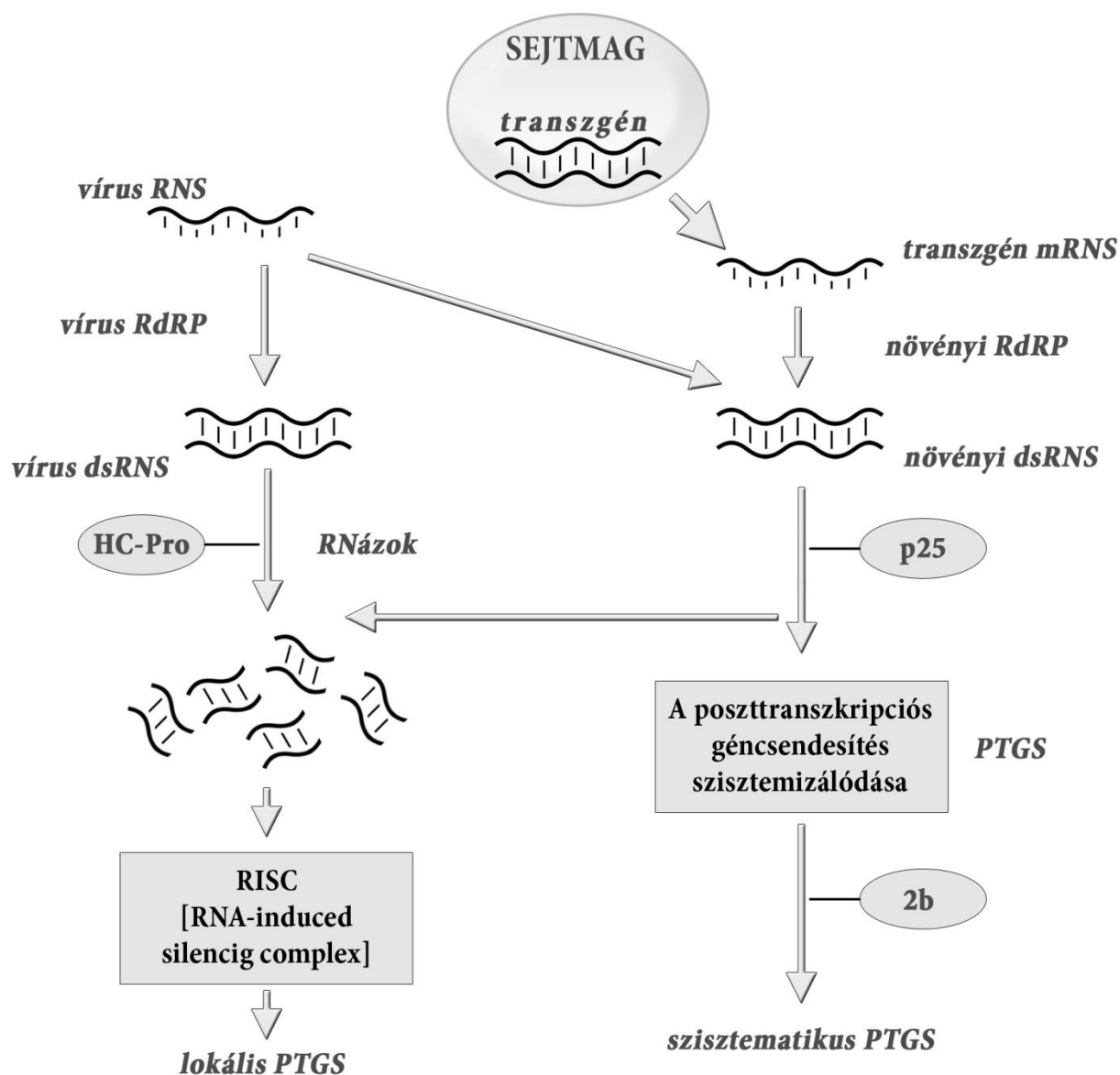
Bár nem az első ilyen, de közismert és igen látványos példa Napoli és mtsai. (1990) esete, akik salkon-szintáz gén túltermeltetésével szerettek volna mélyösötét szirmú petúniát előállítani. A növény azonban nemhogy a bevitt salkon-szintáz gén termékét nem állította elő, de gátlás volt megfigyelhető a növényben természetesen is jelen lévő salkon-szintáz gén termékeinek megjelenésében is. Eredményként az így kezelt növények közel fele részben vagy egészben fehér virágot hajtott. A kutatócsoport vizsgálatai megállapították, hogy a fehér virágokban a salkon-szintáz génről készült mRNS mennyisége volt az, ami jelentősen csökkent (vö. *poszttranszkripció*s géncsendesítés).<sup>6</sup>

Annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy hogyan, és miért hatástalanítják a növények a homológ (transz)géneket,<sup>7</sup> a kettős választ adott a témával foglalkozó kutatóknak: egyrészt sikerült feltárni a géncsendesítés vírusok elleni védekezésben betöltött szerepét (pl. Ratcliff és mtsai., 1997), másrészt a géncsendesítés folyamatának egyre pontosabb megértése az ezen az elven alapuló molekuláris biológiai vizsgálati módszereket is egyre tökéletesítették. Ez utóbbiakat veszi sorra a géncsendesítés molekuláris mechanizmusának fényében Király (2002) szemleciikke. A cikk kiemeli, hogy ahhoz, hogy a poszttranszkripció s géncsendesítés végbemehessen, két feltételnek kell teljesülnie akár transzgénekről átirat mRNS-ről, akár vírus RNS-ről van szó. Az ún. *kvantitatív* modell egy olyan küszöbértéket feltételez, amelyet meg kell haladnia az említett RNS-eknek a folyamat beindulásához. Másik – *kvalitatív* – követelmény, hogy az adott RNS a növény saját mRNS-eitől eltérő, aberráns legyen, és ezt a növény képes legyen felismerni. A géncsendesítés folyamatát az 2.6. ábra szemlélteti.

---

<sup>6</sup> Hasonló folyamatok más élőlényekben is megfigyelhetők. A Fiziológiai és Orvosi Nobel-díjat 2006-ban Fire és Mello a *Caenorhabditis elegans*ban duplaszálú RNS bevitelével végrehajtott géncsendesítésért, és a folyamat leírásáért kapta (Fire és mtsai., 1997; [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2006/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/))

<sup>7</sup> Matzke és Matzke 1995-ös cikkének címe: *How and why do plants inactivate homologous (trans)genes?*



**2.6. ábra.** A géncsenedesítés mechanizmusának sémája növényekben. A a transzgén mRNS-ről vagy a vírus RNS-ről kettős szálú RNS-ek (dsRNS) jönnek létre vírus vagy növényi eredetű RNS-függő RNS polimerázok (RdRP) segítségével. Ezeket a dsRNS-eket aztán növényi RNázok 21-25 nukleotid hosszúságú szakaszokra darabolják. Ezeket használja fel aztán az ún. RISC a velük komplementer mRNS szakaszok felismerésére. Ha ez a felismerés megtörtént, RNázok segítségével degradálja az adott RNS-t (PTGS – poszt transzkripciósi géncsenedesítés). A folyamatábrán szereplő HC-Pro, p25 és 2b a géncsenedesítést hatását elnyomó ún. *silencing suppressorok*. Király (2004) és Király (2002) nyomán.

A funkcionális genomikai vizsgálatokban a VIGS rendszer előnye a transzgenikus növényekkel szemben, hogy lényegében bármilyen gén csenedesítésére alkalmas. A rendszernek ez a nagyfokú rugalmassága akkor válik igazán hasznossá, amikor olyan géneket vizsgálatára van szükség, melyek fenotipikus megnyilvánulása csak a megfelelő környezeti állapotok elérése esetén válna nyilvánvalóvá. Emellett a segítségével megspórolhatóak a transzgén növények előállítás

során elkerülhetetlen idő- és munkaigényes folyamatok (növénynevelés, magfogatás) is. (Robertson 2004).

A VIGS egy változatának tekinthető a Gosselé és mtsai. (2002) által kifejlesztett kétkomponensű rendszer, amelyben a csendesítéshez felhasznált szekvenciát egy szatellitvírus tartalmazza, amelyet a segédvírus (*helper virus*) együtt juttatnak a növénybe. Az utóbbi segíti a szatellitvírus mozgását a növényen belül. Az ún. SVISS (*satellite virus induced silencing system* – szatellit vírussal kiváltott csendesítés rendszere) előnye, hogy ily módon szétválhatnak egymástól a vírusreplikációhoz, illetve a csendesítéshez szükséges komponensek. Ezáltal pedig nagyban javítja a csendesítés hatékonyságát.

Másik előnyként jelentkezhet, hogy többnyire a szatellitvírusok replikációjával a segédvírusok saját genomjának replikációja csökken. Ez pedig általában a segédvírus hatására kialakuló tünetek mérséklődésében jelentkezik. Jóllehet, olykor – bizonyos gazdákon – megfigyelhető a tünetek súlyosodása is (Roossinck és mtsai. 1992).

Gosselé és mtsai. (2002) egy jól ismert szatellitvírust, az STMV-t használják. Érdekesség, hogy bár a név a dohány mozaik vírussal való kapcsolatra utal (*satellite tobacco mosaic virus*), először mégis egy másik dohányvírus, a TMGMV-vel (*tobacco mild green mosaic virus*, dohány enyhe zöld mozaik vírus) való kapcsolatát figyelték meg (Dodds, 1998).

### 3. A megoldandó feladatok ismertetése

Ebben a dolgozatban olyan munkák eredményeit foglalom össze, amelyek a növényi általános védekezés különböző vetületeit vizsgálják.

#### 3.1. A baktériumok által kiváltott BR vírushatásra gyakorolt hatása

A kutatási munkák közül legkorábban azokba a kísérletekbe kapcsolódtam be, amelyek a baktériumok által kiváltott BR más kórokozókra gyakorolt hatását vizsgálták. Ezek keretében abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a dohányban egy adott baktérium által kiváltott BR hatást gyakorol egy későbbi dohány mozaik vírus (TMV) fertőzés lefolyására. Ennek megállapítására vizsgáltuk, hogy

- ez az állítás kompatibilis és nem kompatibilis dohány-vírus kapcsolat esetében is megállja-e a helyét.
- ha van hatás, akkor az csak a tünetek (HR) mérséklésében jelentkezik, vagy a vírus növényen belüli replikációja is változik-e.
- ha a vírus tünetei és a replikációja is változik, akkor ezekkel párhuzamosan hogyan módosul egyes, a védekezésben szerepet játszó, növényi gének átíródása.

#### 3.2. Jelátvitelben és fehérjebontásban szerepet játszó BR markergének transzkripció vizsgálatai

Az utolsó pont elővetített egy olyan kutatási irányt, amely bizonyos, a BR során megváltozott aktivitású gének funkcionális genomikai vizsgálatai irányába mutat. Jelen munka vonatkozásában különös jelentőséggel bírt a BR-rel összefüggésbe hozható gének átíródása és

- a védekezési folyamatokban szerepet játszó jelátviteli utak, illetve a
- szintén a növényi védekezésben részt vevő proteínázok

közi kapcsolat feltérképezése. Így kíváncsiak voltunk arra, hogy

- a BR hatására milyen jelátvitelben, illetve fehérjeanyagcserében szerepet játszó gének aktivitásában következik be változás,
- egyes jelátviteli útvonalak, illetve proteínázok gátlása hogyan befolyásolja egyéb – BR-hez köthető – gének kifejeződését,
- van-e kapcsolat egyes proteínáz-gének kifejeződésének BR alatti megváltozása és a sejten működő aktív proteínáz mennyisége között, illetve
- hatással van-e a bizonyos proteínázok gátlása olyan BR markernek tekinthető folyamatokra mint a sejtfaali kallózberakódás.

### **3.3. Egyes gének funkcionális vizsgálataihoz szükséges módszerek kidolgozása**

Ezen munkák elvégzéséhez elengedhetetlenül szükséges volt új módszerek kidolgozása, illetve elterjedtebb eljárások megfelelő adaptálása. Ilyennek tekinthető egy

- olyan marker keresése, amelynek segítségével felülfertőzés nélkül is kideríthető, hogy a vizsgált növény a BR állapotában van-e.
- olyan eljárás kísérleti körülményeinkhez adaptálása, mellyel mérhetők bizonyos aktív növényi proteinázok szintjei,
- olyan vektor kidolgozása, amellyel gyorsabbá és hatékonyabbá tehető a dohánynövényekben bizonyos, vizsgálni kívánt gének poszttranszkripció gécnsendesítése. Mindezt lehetőleg úgy, hogy fenotípusosan is megjelenő változással a csendesítés hatékonysága is könnyen ellenőrizhető legyen.

Ezen új eljárások kidolgozásának ismertetésére – a könnyebb áttekinthetőség érdekében, valamint az ide kapcsolódó munkák módszertani jellegéből adódóan – egységesen az Eredmények fejezetben kerül sor.

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. Felhasznált növények

A különböző kísérletekhez modell növényként *Arabidopsis thaliana*t és dohányt használtunk a vizsgálatok tárgyától függően.

A *Nicotiana tabacum* L. dohányokat üvegházban, 12 cm átmérőjű cserépben neveltük. A kísérletekhez általában a 1,5-2 hónapos növények voltak alkalmasak. A kezelések megkezdése előtt egy nappal a növényeket szabályozható hőmérsékletű és megvilágítású kamrákba helyeztük, ahol 20 °C-on, 16 óra világos, 8 óra sötét megvilágítási viszonyok között tartottuk. Az esetleges eltéréseket külön jelzem a későbbiekben.

Ugyan a dohányok szinte minden vizsgálatnál szerepet kaptak, a fajta megválasztásának különösen a TMV-fertőzéses vizsgálatoknál volt nagy jelentősége. A növényházunkban megtalálható *N. tabacum* L. 'Samsun' nn nem, míg a *N. tabacum* L. 'Xanthi' NN fajta hordozza a TMV rezisztenciáért felelős N-gént. Az előbbit a kompatibilis, az utóbbit az inkompatibilis vírus-növény kapcsolatok vizsgálatánál használtuk.<sup>8</sup>

*Arabidopsis thaliana* növények közül egyaránt használtunk Col-0 ökotípust és ennek olyan mutánsait, amelyekből az általunk vizsgálni kívánt tulajdonságokért felelős gének hiányoznak. A T-DNS vonalakat a Salk Intézetben állította elő Joseph R. Ecker pROK2 *Agrobacterium tumefaciens* vektor felhasználásával, vákuum infiltrációval.<sup>9</sup>

Ezek olyan egyedek voltak, amelyekből az általunk vizsgálni kívánt tulajdonságokért felelős géneket kiütötték. A mutánsok magvait a Nottingham Arabidopsis Stock Centre-ből (NASC) rendeltük.

### 4.2. Felhasznált baktériumok

A BR kiváltásához *Pseudomonas syringae* pv. *syringae hrcC* mutáns HR-t nem indukáló baktériumot használtunk. A baktériumokat 50 µg /ml kanamycinnel kiegészített King's B táptalajon (King és mtsai, 1954) tenyésztettük 27 °C-on egy éjszakán át. A táptalajról vett baktériumokat vízben szuszpendáltuk. A baktériumszám 0,19-0,21-es OD értékre (kb. 10<sup>8</sup>/ml) való beállítását denzitométerrel végeztük.

---

<sup>8</sup> 5.1. fejezet: A baktériumok által kiváltott általános rezisztencia vírusfertőzés lefolyására gyakorolt hatása

<sup>9</sup> Joseph R. Ecker, Salk Institute for Biological Studies, San Diego, USA; <http://arabidopsis.info/CollectionInfo?id=19>

A proteinázok hatásának vizsgálatához a dohánynövényeket kompatibilis kapcsolat kialakítására képes *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* baktériumszuszpenziót is használtunk a fent meghatározott koncentrációban.

A géncsendesítéshez a vírusvektort kompetens *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  baktériumok felhasználásával állítottuk elő. Ebben az esetben a transzformáláshoz a 70  $\mu$ l-nyi már korábban kompetensé tett és lefagyasztott baktériumszuszpenziót jégen kiolvastottuk, majd a kívánt plazmidból 5  $\mu$ l-t hozzáadtunk. A keveréket 20 percig jégen, majd 1 percig 42 °C-on, majd újabb 10 percig ismét jégen inkubáltuk. Végül folyékony LB táptalajjal 1 ml végtérfogatra egészítettük ki és 37 °C-on folyamatos forgatás mellett egy órán át inkubáltuk. A sejteket kíméletes centrifugálással (200 percenkénti fordulat) a reakciócsövek aljába gyűjtöttük, majd a folyékony táptalaj mennyiségét pipettával 300  $\mu$ l-re csökkentettük. Ezt követően a *vortex* készülékkel újrahomogenizált szuszpenzióból 100-100  $\mu$ l-t megfelelő antibiotikumot tartalmazó szilárd LB táptalajra szélesztettünk. A petricsészéket aztán egész éjszaka 37 °C-on inkubáltuk. A kinőtt telepeken a plazmid, illetve a plazmidban hordozott termék jelenlétét PCR segítségével, a termék agaróz-gélen történő megfuttatásával ellenőriztük.

Egyes géncsendesítési kísérleteknél a géncsendesítést gátló ún. *HC-Pro silencing suppressor* hordozó *Agrobacterium tumefaciens*t használtunk (Wydro és mtsai.; 2006). Az *Agrobacterium*okat fertőzés előtt 28°C-on kanamicinnel (50  $\mu$ g/ml) kiegészített LB táptalajon tenyésztettük egy éjszakán át. A fertőzés napján acetosziringonnal (150  $\mu$ M) és magnézium-kloriddal kiegészített MES pufferben (10 mM, pH 5,7) szuszpendáltuk a baktériumokat, majd a fertőzést megelőző három órában ebben az elegyben tartottuk őket.

Lumineszcenciát mutató lux-gént kifejező *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Fan és mtsai., 2008) baktériumokat használtunk *Arabidopsis* mutánsokkal végzett kísérletekben, ahol a cél a baktériumszaporodás mértékének meghatározása volt.

#### **4.2.1. A baktériumok hővel előlése**

Azoknál a kísérleteknél, ahol hővel előlt baktériumokra (proteináz aktivitás mérése) volt szükségünk, *P. syringae* pv. *tabaci* vad típusából 1 ml tömény szuszpenziót készítettünk, majd 15 percen hátt 75 °C-on inkubáltuk. Ezt követően az elegy koncentrációját 0,19-0,21-es OD értékre (kb. 10<sup>8</sup>/ml) hígítottuk.

### **4.3. Felhasznált vírusok**

A BR vírusfertőzés lefolyására gyakorolt hatásának vizsgálata során dohány mozaik vírust fertőztük a növényeket. A géncsendesítéshez TMV-U2 törzset, ennek módosított szatellitvírusát, STMV-t használtunk.

A vírusokat e célra elkülönített kompatibilis növényeken tartottuk fenn. Az inokulumot a betegség tüneteit jól mutató levelekből frissen állítottuk elő 1 g levél 10 ml vízben való homogenizálásával, vagy -70 °C-on tároltuk későbbi felhasználásig.

#### **4.4. A növények kezelésénél felhasznált kémiai anyagok**

A proteinázok a BR során betöltött szerepének vizsgálatához az adott proteináz bontó hatását gátló szert használtunk. Hasonlóan – más kísérletsorozatok esetében – olyan anyagokat is használtunk, amelyek bizonyos jelátviteli folyamatok kulcsmolekuláit gátolják. Ezeket 4.1. táblázat foglalja össze.

Hogy meggyőződhessünk arról, hogy a vizsgálataink eredményei milyen mértékben tudhatók be a baktériumfertőzésnek, illetve a fecskendezésből adódó ozmotikus, illetve mechanikai stressznek, ezekben a kísérletekben kontrollként a baktériumszuszpenzió helyett vizet használtunk. Azokban az esetekben, amikor az adott anyag törzsoldatát annak oldhatósága miatt nem vízben, hanem más oldószerben (pl. etanol, dimetil-szulfoxid) oldottuk fel akkor kontrollként az adott oldószer megfelelő hígítását használtuk.



**4.1. táblázat.** A kísérletek során felhasznált proteínásgátló, illetve jelátvitel-gátló szerek listája. A szereket a gyártó (Sigma-Aldrich, Saint Louise, USA) által mellékelt technológiai ismertető alapján alkalmaztuk.

<b>Gátlószer neve</b>	<b>Gátolt jelátviteli folyamat/molekula</b>	<b>Koncentráció</b>
fenantrolin	metalloproteinázok	1 %
pepstatin A	aszparaginsav-proteinázok	1 %
leupeptin-hemisulfát	cisztein- és szerin-proteinázok	2 %
bestatin	aminopeptidázok	1 %
E64d	cisztein-proteinázok	1 %
cink-klorid	cisztein-proteinázok	2 %
AEBSF	szerin-proteinázok	1 %
TPCK	cisztein-proteinázok	1 %
E64	cisztein-proteinázok	0,1 %
jodo-acetamid	cisztein-proteinázok	1 %
N-etil-maleimid	cisztein-proteinázok	1 %
Aprotinin	szerin-proteinázok	1 %
PMSF	szerin-proteinázok	1 %
n-butanol	foszfolipáz-D	1%
cikloheximid	fehérjésintézis	1 %
neomicin-szulfát	foszfolipáz-C	1 %
K252a	kinázok	1 %
MG115	proteoszóma	1 %
lantán-klorid	kalcium-beáramlás	1 %

## 4.5. Kezelések és mintavétel

A vizsgálatokhoz teljesen kifejlett leveleket használtunk. Törekedtünk arra, hogy az egyes kísérletekben a levelek nagyjából azonos korúak legyenek, azonos levélemeletről (dohány) vagy a tölevélrózsa hasonló fejlettségű leveleiből (*Arabidopsis*) származzanak. A mintákat két vagy több azonos módon kezelt növény(i szövetrész)ből keverve vettük.

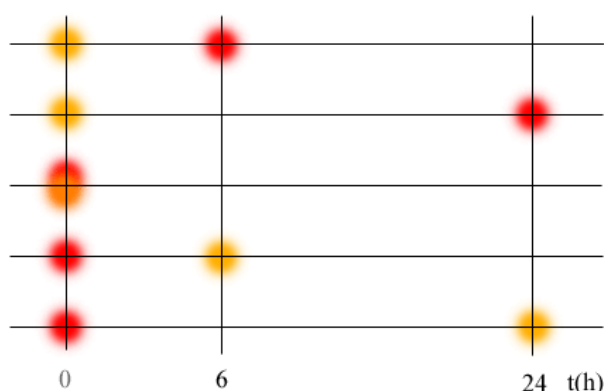
Amennyiben a kísérlet lehetővé tette (illetve megkövetelte), hogy egyazon levélen, a másodlagos levélerek által határolt levéllemez-részekben különböző kezeléseket is végrehajtsunk, ügyeltünk arra, hogy a különböző kezeléseket különböző fejlettségű levéllemez-területeken végezzük, majd az ezekből vett mintákat még a feldolgozás előtt keverjük.

RNS-kivonáshoz a mintavétel után a növényi részeket folyékony nitrogénben villámfagyasztottuk, majd -70 °C-on tároltuk további feldolgozásig.

A klorofillkivonással járó szövetfestési eljáráshoz a növényi részeket levétel után azonnal 70-96 %-os etanolba helyeztük.

### 4.5.1. Kombinált baktérium- és vírusfertőzés

A baktériumok által kiváltott általános védekezés vírusfertőzésre gyakorolt hatását vizsgálva *P. syringae* pv. *hrcC* (HR-negatív mutáns) baktériumot és TMV-t használtunk. Az egyes kezeléseket egymáshoz viszonyított időpontját a 4.1. ábra mutatja. Az előkezelések során a levelek egyik felét baktériumszuszpenzióval, a másikat desztillált vízzel injektáltuk. A vizes kezelésre ebben az esetben is azért volt szükség, hogy kiszűrjük a baktériumszuszpenzió injektálásával járó abiotikus (mechanikai és ozmotikus) stressznek a védekezési mechanizmusokra gyakorolt esetleges hatását.



**4.1. ábra.** A kísérleti rendszer a baktérium által kiváltott általános védekezés TMV okozta tüneteinek vizsgálatára inkompatibilis vírus-növény kapcsolatban. Piros: vírusfertőzés. Narancssárga: baktériumos kezelés (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae hrcC* HR-negatív mutáns).

#### 4.5.2. A növény befecskendezése (infiltrációja)

A növény sejtközötti járataiba a baktériumszuszpenziót, vizet és egyéb folyadékot tűvel (26 gauge) ellátott fecskendővel injektáltuk (Klement, 1990). *Arabidopsis*oknál hatékonyabbnak bizonyult, ha a levelet – az epidermiszén ejtett parányi seben keresztül – tű nélküli fecskendővel infiltráltuk.

#### 4.5.3. Baktériumos fertőzés nedvesítőszerrel használatával

Hasonlóan a Clough és Bent (1998) által az *Arabidopsis* transzformációhoz javasolt protokollhoz, a teljes növényeket fejjel lefelé 0,02% Silwet L-77 (Chemtura Agrosolutions, USA), illetve 0,02% Nonit (Agrokémia Sellye, Magyarország) nedvesítőszerrel kiegészített  $10^8$  sejt/ml koncentrációjú *P. syringae* pv. *syringae* hrcC baktériumszuszpenzióba mártottunk 10 másodpercig. Ezt követően meggyőződünk arról, hogy a leveleket egyenletes filmréteg vonja be. Az így kezelt növényeket 24 órán keresztül (a szövetfestésig) átlátszó polietilén zacskóban tartottuk a magas páratartalom biztosítása érdekében.

#### 4.5.4. Vírusfertőzések kivitelezése

A BR vírusfertőzés lefolyására gyakorolt hatásának vizsgálatokor a fertőzéshez *Nicotiana tabacum* L. 'Samsun' nn növényekről vett fiatal mozaikos leveleket használtunk. A leveleket mozsárban csapvízzel homogenizáltuk (1 ml víz / 100 mg levél), majd az így nyert szuszpenziót egyszerűhasználatos vinil-kesztyűben kézzel vittük fel a fertőzendő levelek felszínére. A finom dörzsölés hatására letöredező növényi szőrök után maradó seb elegendőnek bizonyult a vírus növénybe jutásához.

Mivel a kompatibilis dohány-TMV kapcsolat esetén számolni kell a vírus növényen belüli mozgásával, szisztemizálódásával is, ezeknél a vizsgálatoknál külön-külön növényeket (*N. tabacum* L. 'Samsun' nn) fecskendeztünk vízzel, illetve baktériumszuszpenzióval. A vizsgálatokba olyan növényeket is bevontunk pozitív kontrollként, amelyek csak vírussal fertőztünk. Az egyes tesztnövényeken látható tüneteket akkor hasonlítottuk össze, amikor a pozitív kontrollként használt növényeken már jól láthatóak voltak a mozaikos elváltozások. A jellegzetes mozaikos tünetek a fertőzést követő kb. tíz napon belül jelentkeznek az újonnan kifejlődő csúcsi leveleken.

A HR gátlás vizsgálatánál (inkompatibilis növény-kórokozó kapcsolat) a levelek egyik felét vízzel, a másikat baktériumszuszpenzióval kezeltük elő, majd a teljes levélfelületet fertőztük vírussal.

## **4.6. Növényi minták feldolgozása**

### **4.6.1. Növényi mRNS kivonása, cDNS írása (génkifejeződési vizsgálatokhoz)**

Az mRNS kivonásához kb. 100 mg növényi mintát folyékony nitrogénben, kerámiamozsárban homogenizáltunk, majd kereskedelmi forgalomban kapható RNS-tisztító termékkel (Total RNA Extraction Miniprem System – Viogen) vontuk ki belőle az RNS-t a gyártó utasításait követve. A folyamat során DNáz-kezelést is alkalmaztunk (RNase-Free DNase Set, Quiagen), hogy elkerüljük az esetleges DNS szennyezés zavaró hatását a későbbi valós idejű PCR vizsgálatokban.

A tisztított RNS-t kisebb egységekben külön tároltuk -70 °C-on későbbi felhasználásig.

A tisztított RNS töménységét NanoDrop (Thermo Fischer Scientific Inc., USA) UV spektrofotométer segítségével határoztuk meg. Mintánként 2,5 µg RNS felhasználásával RevertAid H Minus First Strand cDNS Synthesis Kit (Fermentas) segítségével cDNS-t írtunk a gyártó utasításait követve. A vizsgálatok jellegétől függően random hexamer primert, illetve oligo (dT) primert használtunk az átíráshoz.

### **4.6.2. Génkifejeződés vizsgálata valós idejű PCR-rel**

A növényi mRNS-ről készült cDNS-t valós idejű PCR vizsgálatnak (Opticon MJ Real Time PCR, ) vetettük alá. Egy PCR reakcióhoz 15 µl reakcióelegyet használtunk, amely 2,5 µl tízszeresre hígított cDNS-ből, 1,5-1,5 µl indítószekvenciából (3 µM), 2µl vízből és 7,5 µl reakciómixből (iQ SYBR Green 2× Supermix; Biorad) kevertünk.

A különböző PCR reakciók ciklusparaméterei a 4.2. táblázatban láthatóak.

A kapott adatokat a dohányban konstitutívan kifejeződő aktin gén kifejeződési szintjére normalizáltuk. Az így meghatározott génkifejeződési értékeket a kezeletlen növényekből (kontroll) származó eredményekhez viszonyítottuk.

**4.2. táblázat.** az egyes primereknél használt PCR ciklusok összehasonlítása

<i>Indítószekvenciák</i>	<i>TMV, Aktin, egyéb primerek</i>	<i>NtDHAR, NpSOD1, NgCAT1</i>
Kezdeti lépés időtartama és hőmérséklete	6 perc., 95 °C	6 perc., 95 °C
Ciklusok száma	40	40
Egy ciklus lépései	45 mp., 95 °C	30 mp., 95 °C
	1,5 perc., 61 °C	30 mp., 55 °C
	-	30 mp., 72 °C
	Plate olvasás	Plate olvasás
Olvadási görbe	55 °C – 95 °C	55 °C – 95 °C

**4.3. táblázat.** a valós idejű PCR vizsgálatokhoz használt indítószekvenciák bázissorrendje. A \*-gal jelölt primereket Szatmári Ágnes, a \*\*-gal jelölteket pedig Király Lóránt tervezte.

<b>Indítószekvenciák</b>	<b>5' szensz</b>	<b>3' antiszensz</b>
Aktin	CGG AAT CCA CGA GAC TAC ATA C	GGG AAG CCA AGA TAG AGC
TMV (köpenyfehérje)	GGA AAC AAG GGC ATA GAA AGA CCA	TCA ACG AAA CAG CAA CAT CAC AAA
38a (fahéjsav-4-hidroxiláz)*	TAA AAC GCT TTG AAC GAA GTC TA	TTA ATT GGT CTC TTC TTT GCC AT
38b (epoxid-hidroláz)*	CAG ATG ATA GCA GTA GCG GAT	TGA ATG TCG TCT TCT CGG GTT
43a (orto-metil-transzferáz)*	ATG ATT GGA GCG ACG AGC ATT	GCC TCT GGA AGT ATG CAC TC
NtDHAR (dehidroaszorbát-diszmutáz)**	CAA GGC TCA CGG ACC ATA	ACT TCC TGC GAA ACA ACG
NpSOD (szuperoxid-diszmutáz)**	GCC GTC CTT AGC AGC AGT	ACA AGC AAC CCT TCC ACC
NgCAT (kataláz)**	TCC GCT TGA TGT GAC TAA A	TCC ACC CAC CGA CGA ATA
c24*	AGC AGC TTG TTT GCT CTT CCT CAG	TGT GAG CAT CCC AGG CAG TGA AAG
c53*	GAT TGG AGA AAG GCA TCA CGA C	TTT TAA GGA TCC ATC GCT CAT CA
c58*	TTT TCC TGA CAA TCC CAA CAT AAC AGC	GCT CCA CCA CCA TCA CTT TTC TG
c59*	GAC CTC ACT TGG ACT CAA TGC CAA C	GAC TAG AAC AAG CAG CGG AAG TGC
c90*	AAT TAC AAC AAA AAC TTA ACT TGC ACA GGC TC	AAT GTG TTC TGT ATT TCA GTT GTT ACC ATC TC
c94*	TTT GAT GAA TTG CGT TGC GT	GAT TGA ATT TTC GGG CAA ACC
c106*	GCT GGT GAT GTA AAG GCC GTA T	CCA AAG CCT CCA GCA TAG CA
c108*	GGA CGC TGG TGG CAT AAT C	CCT CAA GTT GAT CGC CAA GGT
c125*	ATG CAA GGA CAA TGC GCT ATG	GCC TTC TCA TCG GTT CCC AAT
c135*	AGT CAA CAA AGC GCG TGA ACA G	TTT CCA ACA TCA CTT GGT GTA ACA GC
c139*	GGC CTT CCA ATC ACG AAC AGT	GCG TGG GCA GCA ATG ATA T
c144*	TGT GGC GGA GTT AGA AAG GCA TCA G	CAA TCC CAT TAG GCC CAG CAA CAG
c151*	CGG CTT TCC GAC GGC GTA TTG	CCA GCT TCG TTC GTC AGC TTA ACA C

#### 4.6.3. A növényi minták előkészítése proteínáz-aktivitás méréséhez

40 mg növényi mintát folyékony nitrogénben homogenizáltunk, majd 1,5 ml-nyi, a 4.8. pontban felsorolt puffer valamelyikében alaposan felkevertük. Az elegyet két órán át rázatás közben jégen inkubáltuk, majd két percig 13 000 percenkénti fordulaton centrifugáltuk. 25 µl felülúszóból, 24,75 µl pufferből és 0,25 µl proteáz szubsztrátból egy méréshez szükséges reakciómennyiséget pipettáztunk össze egy 96-os real time PCR lemez egy-egy zsebébe. Negatív kontrollként a reakcióelegyből a növényi mintát kihagytuk, helyette pufferrel egészítettük ki 50 µl-re. Pozitív kontrollként a csomaghoz mellékelt tripszin szolgált.

#### 4.6.4. Microarray vizsgálatok

A microarray vizsgálatokat Brazma és mtsai. (2001) által leírt MIAME (Minimum information about microarray experiment) követelmények alapján végeztük. Dohányleveleket vízzel, *P. syringae hrcC* baktériumszuszpenzióval, inhibitorral (1.5mM LaCl<sub>3</sub>, 50 µM neomicin-szulfát, 100 µM arisztolochiasav, 1.5 µM K252a, 50 µM MG115), illetve baktériumszuszpenzió és inhibitor keverékével infiltráltunk.

A növényi mintákból kinyert RNS (4.6.1.) töménységét Micron-30 (Millipore, USA) szűrőoszlopokon növeltük. A végkoncentrációt spektrofotométerrel ( $\lambda=260$  nm és 280 nm) és 1%-os agarózgélén futtatással ellenőriztük.

A cDNS címkézést, a hibridizációt és az adatok normalizálását a TIGR Potato Functional Genomics Project végezte a mintegy 12 000 burgonya gént tartalmazó TIGR Potato 10K cDNA Array felhasználásával.<sup>10</sup> A burgonya chip felhasználását a dohány és a burgonya közötti nagyfokú genetikai hasonlóság tette lehetővé.

A TIGR által normalizált adatokból az ismétléseknél fellépő eltérő génkifejeződési szintek rangsorának mértani közepén alapuló ún. termék rangsor-analízissel (*rank product analysis*; Breitling és mtsai., 2004) választottuk ki azokat a géneket, amelyek működését a kezelések szignifikánsan serkentették vagy visszavetették. A számításokhoz szükséges számítógépes alkalmazást a Glasgow Microarray Analysis honlapjáról<sup>11</sup> töltöttük le. Azokat a géneket tekintettük megváltozott aktivitásúnak, amelyekben a változás mértéke meghaladt az 5%-os, véletlenszerű permutációból is előálló hibahatárt.

---

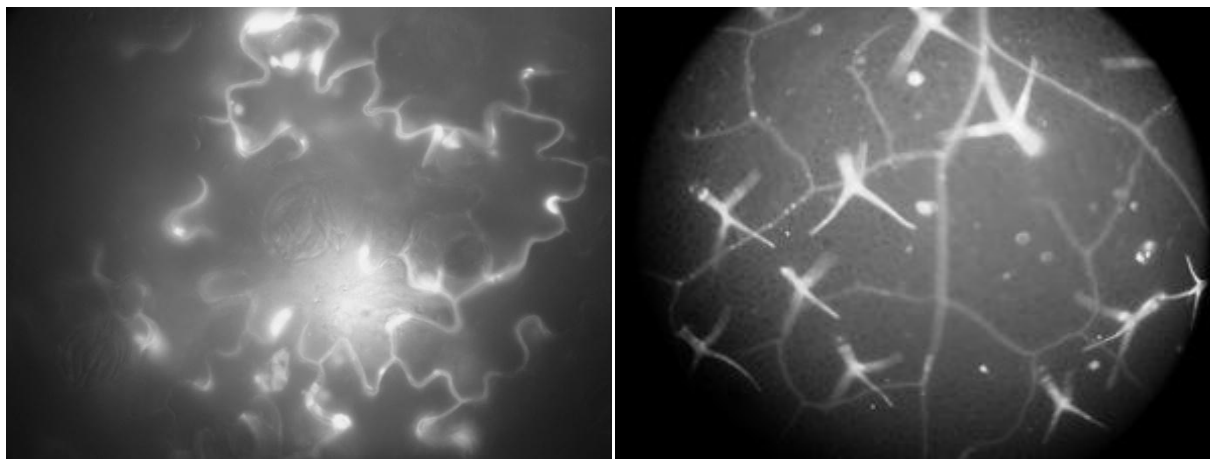
<sup>10</sup> Az alkalmazott protokoll a [http://www.jcvi.org/potato/sol\\_ma\\_protocols.shtml](http://www.jcvi.org/potato/sol_ma_protocols.shtml) oldalon található.

<sup>11</sup> <http://www.brc.dcs.gla.ac.uk/>

## 4.7. Kallózkimutatás

### 4.7.1. Kallózfelhalmozódás meghatározása szövetfestéssel

A sejtfalakba épülő kallóz kimutatásához anilin-kéket használtunk (Currier, 1957), amelyet 150 mM koncentrációjú pH 9,5 kémhatású  $K_2HPO_4$  pufferben vettünk fel 0,1%-os koncentrációban. A forrásban lévő etanollal színtelenített *A. thaliana* leveleket 1,5 ml űrmértékű reakciócsövekben áztattuk a festékes pufferben egy éjszakán keresztül. A szövetmintákról a fölösleges festéket a fent leírt  $K_2HPO_4$  pufferrel mostuk le. A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz ( $\lambda_{ex}=393$  nm és  $\lambda_{em}=479$ ) a mintákat glicerolban fixáltuk tárgylemezen. Figyeltünk arra, hogy a mikroszkópos vizsgálatokat mindenképpen a levél fonáki részén végezzük, hogy a növényi szőrök (*trichomák*) fluoreszcenciája ne befolyásolja a kallóz-anilin-kék komplexek fluoreszcenciájának észlelést (4.2. ábra).



**4.2. ábra.** Fluoreszcens mikroszkópos felvétel *P. syringae* pv. *syringae hrcC* baktériumszuszpenzióval infiltrált *N. tabacum* 'Samsun' levelének fonákáról (balra), illetve kezeletlen *Arabidopsis* levelének felszínéről (jobbra). A festékként használt anilin-kék a sejtfalba épült kallózzal alkotott komplexe világos foltokként jelenik meg. Szintén erős fluoreszcencia figyelhető meg az *Arabidopsis*ok trichómáiban.

A preparált mintákon tiszteres nagyítású objektívvel egy, a levéllemez nagy részére nézve reprezentatív látómezőt fényképeztünk. A képeket a könnyebb láthatóság érdekében színtelítetlenné tettük GIMP grafikai program (GIMP 2.6.7., Spencer Kimball, Peter Mattis) segítségével. A különböző kezelésekben részesített növényekből készített preparátumokon a fluoreszcencia mértékét, a kallózbeépülési gócok számát, méretét, elhelyezkedését az így készült fényképeken szabad szemmel vizsgáltuk.

A megfigyeléseket egy ötfokozatú skálán osztályoztuk (erős csökkenés, enyhe csökkenés, változatlan, enyhe növekedés, erős növekedés). Kontrollnak a vízzel, illetve csak inhibitorral kezelt mintákat tekintettük. Ahol a BR-hez képest legalább felére esett a kallózgócok száma a



látómezőben, ott erős csökkenésről beszéltünk. 25 és 50% között enyhének írtuk le a csökkenést. A kallózgócok 25-50%-os emelkedését enyhének tekintettük. (Megjegyzendő, hogy 50% fölötti növekedést egy mintánkban sem tapasztaltunk.)

#### 4.7.2. Kallóztartalom kvantitatív meghatározása

Elsősorban Kohler és mtsai. (2000) cikkét vettük kiindulópontként. A kezelt levelekből vett mintákat 1,5 ml-es reakciócsövekben egy éjszakán át 96%-os alkoholban áztattunk folyamatos forgatás közben. Másnap a folyamatot teljes színtelenedésig folytattuk forró alkoholban. A leveleket abrazívum porral homogenizáltuk, majd centrifugáltuk. A fölösleges alkoholt pipettával eltávolítottuk, a visszamaradó pogácsát 350 µl dimetil-szulfoxidban vettük fel újra és fél órán keresztül főztük nagy nyomáson kuktafazékban. Pipettázás után a 100 µl felülúszót, 200 µl 1M NaOH-val és 1200 µl pufferrel [400 µl 0,1%-os anilin-kék + 590 µl 1M glicin/NaOH, pH 9,5 + 210 µl 1M HCl] mértünk össze. Az autofluoreszcencia-mérésre szolgáló negatív kontrollból kihagytuk az anilin-kéket. Fél-fél óra 50, illetve 25 °C-on való inkubálás után  $\lambda_{\text{ex}}=393$  nm és  $\lambda_{\text{em}}=479$  nm hullámhosszokon spektrométerrel mértük a fluoreszcencia mértékét. A kapott adatokat az anilin-kék autofluoreszcenciájára normalizáltuk, friss levéltömeg alapján milligrammra vonatkoztattuk, illetve 1 µg/ml laminarin<sup>12</sup> fluoreszcenciájához viszonyítottuk.

#### 4.8. Proteináz-aktivitás mérése dohányban

A proteináz-aktivitás méréséhez a SensoLyte<sup>TM</sup> Red Protease Assay gyári készletet (AnaSpec Co., San Jose, CA, USA) használtuk. Pufferként a gyártó által biztosítotton kívül (Assay buffer) a csomagban található receptek alapján elkészített pufferekkel is végeztünk vizsgálatokat. Ezek a következők voltak:

1 Kálium-foszfát – 20 mM; NaCl – 150 mM – pH 7,6

2 HCl – 10 mM – pH 2

3 Nátrium-foszfát – 20 mM – pH 8

4 Nátrium-acetát – 20 mM; cisztein – 20 mM; etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) 2 mM – pH 6,5

5 Tris-HCl – 10 mM – pH 8,2

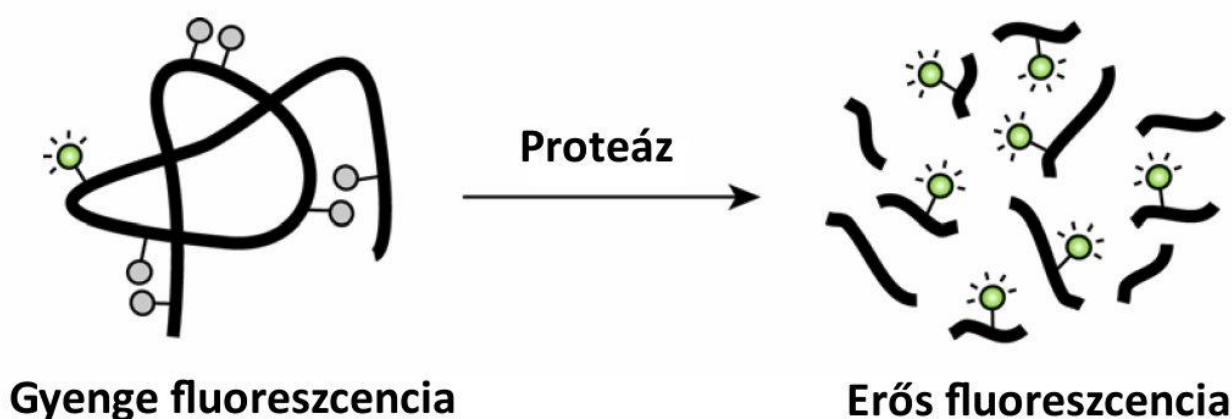
6 Nátrium-citrát – 20 mM – pH 3

---

<sup>12</sup> Kohler és mtsai. (2000) referenciaként pachymant javasolnak. Wood és Fulcher (1983) munkája alapján mi ezt a könnyebben elérhető laminarinnal helyettesítettük.

A 4.6.3. pontban ismertetett módon előkészített mintákon a valós idejű PCR vizsgálatoknál is használt berendezéssel végeztünk méréseket, ötpercenkénti leolvasással,  $\lambda_{\text{excitációs}} = 546 \text{ nm}$  és  $\lambda_{\text{emissziós}} = 575 \text{ nm}$  egy órán keresztül.

A proteáz aktivitás mérését a kazeinhez kapcsolt 5(6)-TAMRA pH-függő fluoreszcens festék teszi lehetővé. A fluoreszcencia mindaddig nem jelentkezik, amíg a különböző proteázok a kazeint bontani nem kezdik (lásd 4.4. ábra). A proteázaktivitás és a fluoreszcencia mértéke egyenes arányosságban állnak egymással.<sup>13</sup>



**4.4. ábra.** A proteáz aktivitás mérését lehetővé tevő jelenség vázlatos folyamata. A kazeinhez kötött fluoreszcens molekulák mindaddig nem képesek világítani, amíg valamely proteáz a kazeint bontani nem kezd. (Az ábra a gyártó – AnaSpec Co., San Jose, CA, USA – általt mellékelt tájékoztató alapján készült.)

#### 4.9. A géncsendesítéshez kapcsolódó anyagok és módszerek

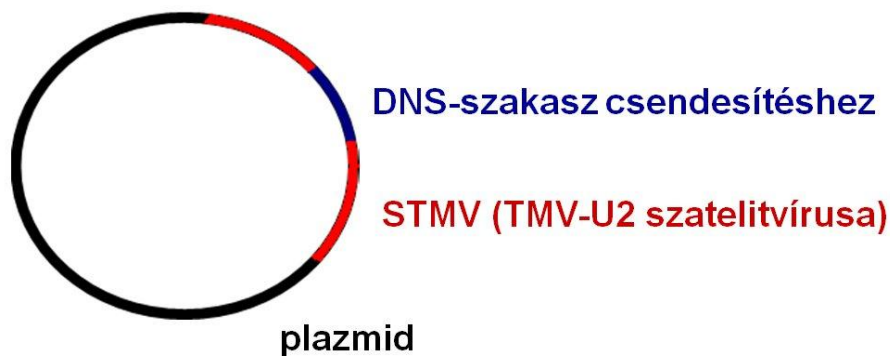
Szatellitvírussal kiváltott géncsendesítési rendszert (SVISS – *satellite virus-induced silencing system*; Gosselé és mtsai., 2002) használtunk. A felhasznált szatellitvírus (STMV) a dohánymozaik vírus U2 törzse (TMV-U2) volt.

Az STMV-t tartalmazó pVE349 plazmidba olyan szekvenciákat tudunk elhelyezni PstI és NotI hasító enzimek segítségével, amelyek az általunk vizsgálni kívánt gének csendesítését eredményezik (a konstrukció elvi felépítését a 4.5. ábra szemlélteti.)

A restrikciós emésztést az endonukleázokat és a hozzájuk tartozó puffereket gyártó cég (Fermentas) utasításainak megfelelően végeztük. Ezt követően a ligálás T4 DNS ligázzal történt egész éjszaka 4 °C hőmérsékleten.

<sup>13</sup> A gyártó tájékoztatója alapján. SensoLyte™ Red Protease Assay Kit, Fluorimetric, Catalog# 71140

Hasonló módon alkalmaztuk a konstrukciót eGFP fehérje növényvel való kifejeztetésére is. Ebben az esetben a “silencing szakasz” helyett a teljes eGFP szekvenciát építettük be. Az *in vitro* transzkripcióhoz *TranscriptAid™ T7 High Yield Transcription Kit*et (Fermentas) használtunk.



**4.5. ábra.** Az általunk géncsendesítéshez használni tervezett plazmid sematikus vázlata. Magyarázatot lásd a szövegben.

A vektorok készítéséhez felhasznált indítószekvenciák bázissorendjei a GFP csendesítéséhez

eGFPsilenceU 5' ACT AAT GCA TGC ATC GGC GTG GCT GCT GTG 3'

eGFPsilenceL 5' ATG TCC TGC AGG GCA AAC TAT ATG GGC TTC 3';

a teljes GFP kifejezéséhez pedig

EgfpER:U 5' CAA GGC CAT GCC ACC ATG GTG AAG ACT AAT CTT TT 3'

EgfpER:L 5' ATG TCC TGC AGG TTA CAG CTC GTC CTT CTT GTA C 3'

voltak.

#### 4.9.1. Plazmidtisztítás

Egy éjszakán át folyamatosan forgatott, 37 °C-on folyékony LB táptalajon felszaporított *E. coli* baktériumokból a kívánt plazmidot Miniprep Express™ (Bio101, Vista, CA, USA) készlet segítségével tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően.

A tisztított plazmidokat felhasználásig -20 °C-on fagyasztva tároltuk.

## 4.10. *In silico* módszerek

### 4.10.1. Primertervezés

A Real Time PCR vizsgálatok elvégzéséhez szükséges primereket az Oligo nevű programmal terveztük (Wojciech & Piotr Rychlik. Molecular Biology Insights, Inc. 8685 U.S. Highway 24 West, Cascade, CO 80809, USA)

A primertervezésnél az olvadási hőmérsékletet ( $T_M$ ) az MWG-Biotech AG (Anzingerstr. 7a 85560 Ebersberg, Németország) által javasolt számítási módszert alkalmaztuk. 15 bp hossz alatti primerek esetében az olvadási hőmérsékletet a

$$T_M = 2(n_A + n_T) + 4(n_C + n_G)$$

15 bázisnál hosszabb primerek esetében pedig a

$$T_M = 69,3 + 41(n_C + n_G)/s - 650/s$$

tapasztalati képletek alapján határoztuk meg, ahol

- $T_M$  – az olvadási hőmérséklet °C-ban;
- $n_A$  – a primerben található adenin bázisok száma;
- $n_C$  – a primerben található citozin bázisok száma;
- $n_G$  – a primerben található guanin bázisok száma;
- $n_T$  – a primerben található timin bázisok száma;
- $s$  – a primer hossza bázisokban mérve.

#### **4.10.2. Dohányban a BR során aktivitást mutató gének ortológjainak keresése *Arabidopsis*ban**

Dohányban aktivitást mutató – fehérjebontásért és jelátvitelért felelős – géneket *Arabidopsis*ban is kerestük. A munka során a SeqMan (LaserGene) programot, a Genevestigator (Zimmermann és mtsai., 2004) adatbázist és a SALK intézet honlapján elérhető (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) géntérképező alkalmazást használtuk fel.

A nagyfokú hasonlóságot mutató szakaszokra mutáns *Arabidopsis* növények magjait a European Arabidopsis Stock Centre-től (korábban NASC, Egyesült Királyság) rendeltük.

#### **4.10.3. A pVE349 plazmid bázissorrendjének meghatározása**

A pVE349 kódjelű plazmid bázissorrendjét a plazmid vektor szabadalmi leírása (Metzlaff és mtsai., 2003) és Gosselé és mtsai. (2002) cikke alapján rekonstruáltuk *in silico* a SeqBuilder 7.0.0 program segítségével (DNASTAR, Madison, USA).

#### **4.10.4. Statisztikai módszerek**

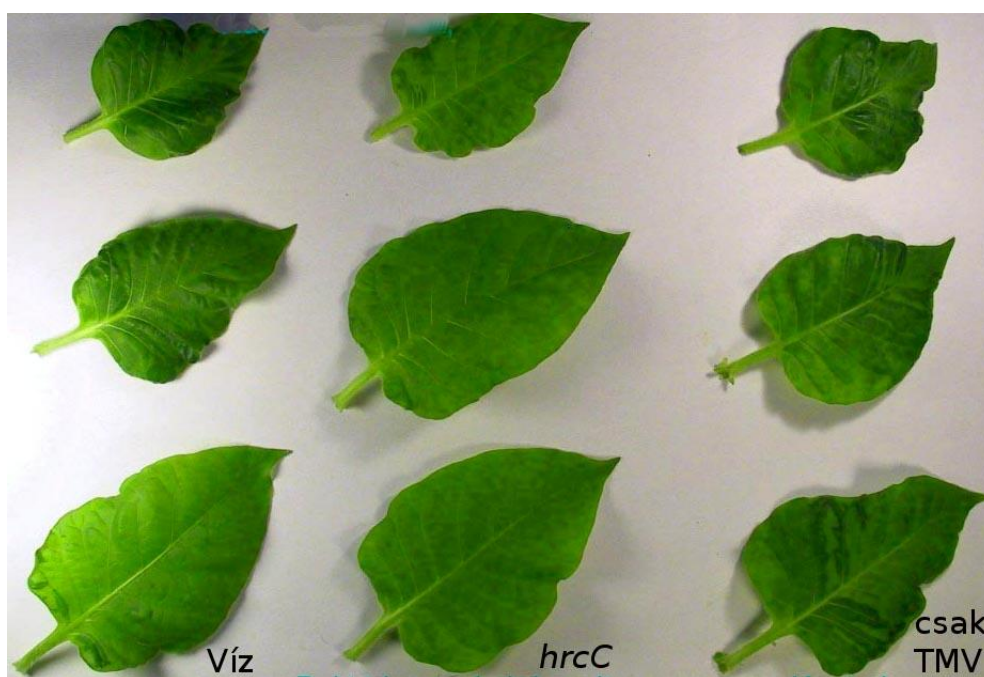
Az ismételt kvantitatív vizsgálatok eredményeit különböző verziójú MS Excel programokban átlagoltuk és ezeket független mintás (heteroscedasztikus) t-próbával összehasonlítottuk. A konfidencia intervallumot  $p > 90\%$ -ban határoztuk meg. Az adatokat – a szórások feltüntetésével – a hatékony megjelenítés szempontjából legalkalmasabb diagramtípusokon ábrázoltuk.

## 5. Eredmények

### 5.1. A baktériumok által kiváltott általános rezisztencia vírusfertőzés lefolyására gyakorolt hatása

#### 5.1.1. A tünetek gátlásának vizsgálata (kompatibilis dohány-TMV kapcsolat)

A baktériumfertőzés után mind a hat, mind a huszonnégy órával dohány mozaik vírussal (TMV) felülfertőzött növényeken csak kisebb mértékű mozaikosodás volt megfigyelhető a vízzel előkezelt, illetve a kezeletlenül hagyott kontrollnövényekhez képest. Ebből arra következtethetünk, hogy a vízzel való injektálásnak is van hatása a tünetek kialakulására, még ha az kisebb mértékű is a baktériumfertőzés esetén tapasztalnál. Mind a hat órás (5.1. ábra), mind pedig a huszonnégy órás felülfertőzés esetén hasonló tünetgátlást tapasztaltunk.

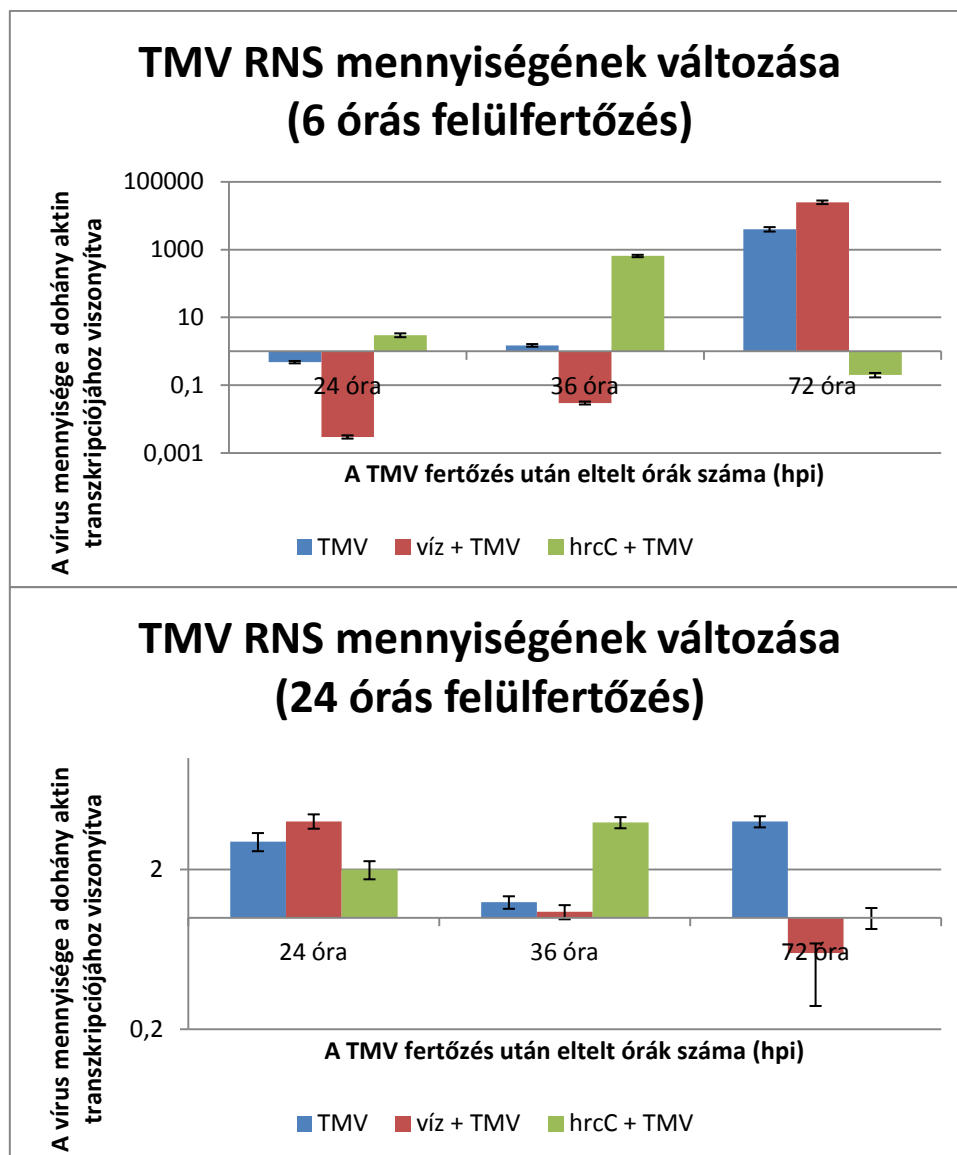


**5.1. ábra.** *N. tabacum* 'Samsun' nn növények csúcsközeli levelei a vírusfertőzést követő tizedik napon. Az egyes sorokban bemutatott levelek egymásnak megfelelő levélemeletről származtak. Kezelések oszloponként balról jobbra: vizes infiltráció + TMV, *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* + TMV, csak TMV. Az előkezelést hat órával követte a vírusfertőzés. Az ábrán ismételt kísérletek reprezentatív eredményei láthatóak.

#### 5.1.2. A vírusreplikáció gátlásának vizsgálata (kompatibilis dohány-TMV kapcsolat)

A vírusreplikáció gátlásának vizsgálatához a TMV-vel való inokulálást követő 24., 36. és 72. órában meghatároztuk a vírus RNS mennyiségét a növények lokálisan fertőzött és a fertőzött fölötti leveleiben (szisztemikus fertőzés). Ebben a kísérletben ugyanolyan kezeléskombinációkat alkalmaztunk, mint a tünetgátlás vizsgálatánál. Mind a 6, mind pedig a 24 órával az előkezeléseket követő vírusfertőzést elszenvedő növényekben a TMV RNS kifejeződési szintje a második napon jelentős emelkedést mutatott, majd a harmadik napon erőteljesen csökkent a baktériummal kiváltott BR hatására (5.2. ábra). Fontos megjegyezni, hogy a két levélemelet vírusexpresszió-alakulást

szemléltető grafikonjain az expressziót jelző tengely nagyságrendileg eltér egymástól. Az inokulált levél esetében a maximális értékek csaknem  $10^6$  nagyságrendűek, míg a nem fertőzött levélnél még a  $10^1$  értéket sem érték el, a tendencia azonban hasonló volt (ábrán nem jelölve).



**5.2. ábra.** A TMV mennyiségének változása Samsun nn növény inokulált leveleiben az idő függvényében kontroll (csak TMV kezelés), vízzel előkezelt [Víz + TMV] és *P. syringae hrcC* HR-negatív baktériummal előkezelt [hrcC + TMV] növényben. A vírusos felülfertőzések hat órával (fent), illetve 24 órával (lent) követték a baktériumos előfertőzést. Az ordináta a vírusfertőzéstől eltelt időt jelöli, az abszcissa pedig a vírus, valós idejű PCR módszerrel meghatározott RNS kifejeződési szintjét, logaritmus skálán.

### 5.1.3. A vírus okozta HR gátlásának vizsgálata (inkompatibilis dohány-TMV kapcsolat)

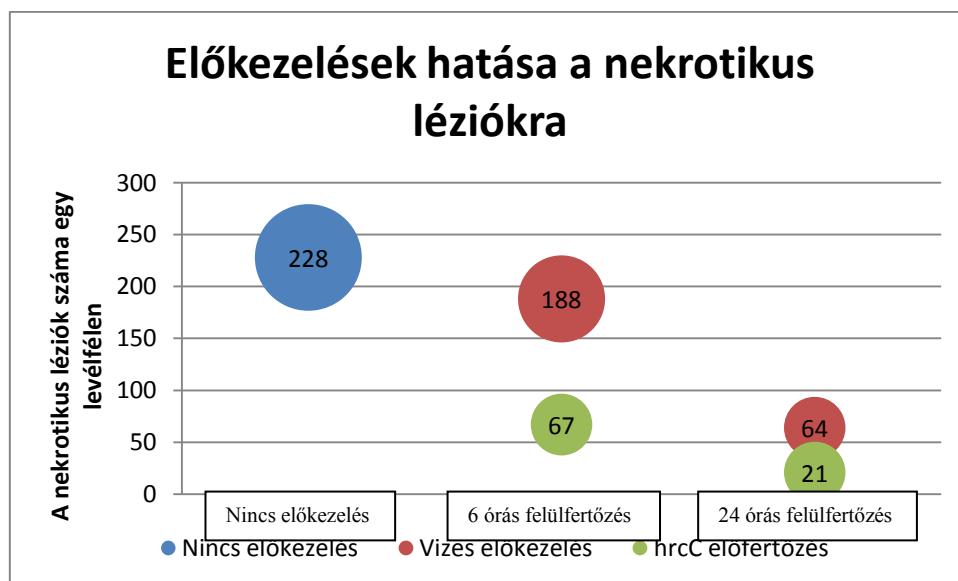
Azoknál a növényeknél, ahol az előkezelésektől hat óra telt el a vírussal való felülfertőzésig, a baktériummal előkezelt levélfeleken a HR gátlás mind a kontrollhoz, mind pedig a vizes kontroll levélfélhez képest szembeötlő volt (5.3. ábra). Nem csak a léziók száma, de azok mérete és elhelyezkedése is jelentősen eltért az egyes kezeléseknél. Míg a kontroll leveleken 2-3 milliméter átmérőjű, különálló nekrotikus foltok jelentek meg, addig a vízzel előkezelt levélfeleken valamivel kisebb méretű, olykor egymásba folyó nektrózisok voltak. A baktériummal előfertőzött leveleken

apró, 1 mm körüli különálló HR nektrózisokat figyeltünk meg (5.4. ábra). Megfigyeltük továbbá azt is, hogy az előkezelésben nem részesült levelek minden esetben enyhe klorózisos tünetet is mutattak. Hasonló jelenség az előkezelt leveleken nem, vagy csak jóval kisebb mértékben volt megfigyelhető.

Az előkezelések után egy nappal felülfertőzött növények esetében szintén erőteljes HR-gátlás mutatkozott, amely azonban nem csak a baktériummal, hanem a vízzel előkezelt levélfeleken is markánsan megmutatkozott. A nektrózisok mindkét előkezelés hatására 1 mm körüliek és különállók voltak (5.4. ábra).



**5.3. ábra.** A baktériumok által kiváltott BR HR-gátló hatásának vizsgálatához használt *N. tabacum* L. 'Xanthi' NN levelei a TMV okozta HR sejtkollapszus bekövetkezése után. Az X-szel jelölt levél kezeletlen kontroll volt, míg a V jelűt vízzel, a C jelűt pedig *P. syringae* pv. *syringae* hrcC baktériumszuspenzióval fecskendezték be hat órával a TMV fertőzés előtt. Az ábrán bemutatott levelekhez hasonló megjelenés volt megfigyelhető a kísérletbe vont többi növényen is.

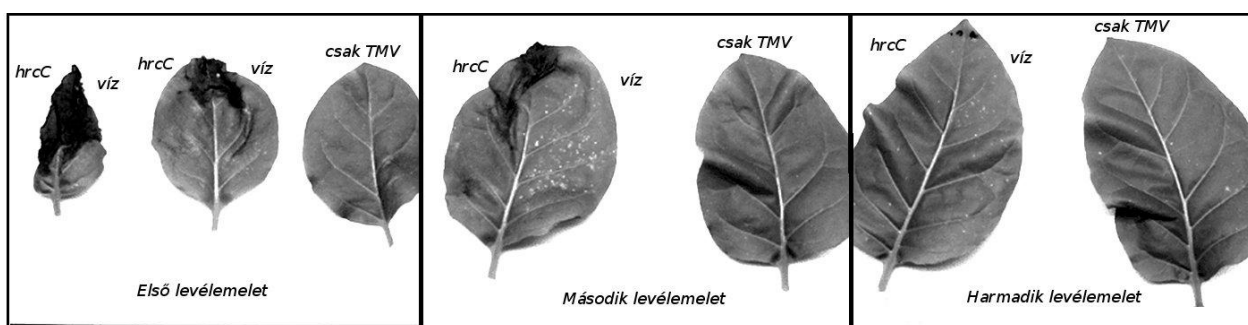


**5.4. ábra.** *P. syringae* pv. *syringae* hrcC baktériumszuspenzióval, vízzel előkezelt, illetve csak TMV-vel fertőzött *N. tabacum* L. 'Xanthi' NN levelein megfigyelt HR-es léziók száma egy-egy levélfélen. Kezeléstípusonként 8-8 levél adatainak középértéke (a szórás 8-15% között mozgott). A buborékok mérete a léziók méretkülönbségeire utal (magyarázatot lásd a szövegben).

A fent leírt kísérletbeállítások biztató eredményei után olyan növényeket is vizsgáltunk, amelyeknél a vírus- és baktériumfertőzés egy időben történt, illetve a vírusfertőzés hat vagy huszonnégy órával megelőzte a baktériumos kezelést. A kísérlet során fiatal, 6-7 leveles növények három egymás fölötti levélemeleit kezeltük.

Az azonos levélemeleteken hasonló arányokban voltak megfigyelhetők a változások, mint a fent bemutatott eredményeinknél mind a hat órás, mind pedig az egynapos felülfertőzések esetében.

A baktériumos és a TMV fertőzést egyidőben elszenvedő növényeknél összefüggést figyeltünk meg a levelek kora és a kialakuló nekrozisok mérete között: megállapítottuk, hogy amíg a legidősebb kezelt leveleken akár a levéllemez nagy részére is kiterjedő elhalás minden esetben (vizes és baktériumos injektálás mellett is) bekövetkezett, addig a legfiatalabb kezelt levelek mindössze elszórt, 1-2 mm-es foltokban haltak el. Az átmenetet képviselő középső leveleken nagy kiterjedésű nekrozis leginkább a baktériummal előfertőzött levélfélen. A vízzel kezelt levélfeleken csupán 3-4 mm-es egymásba olvadó léziók jelentek meg (5.5. ábra).



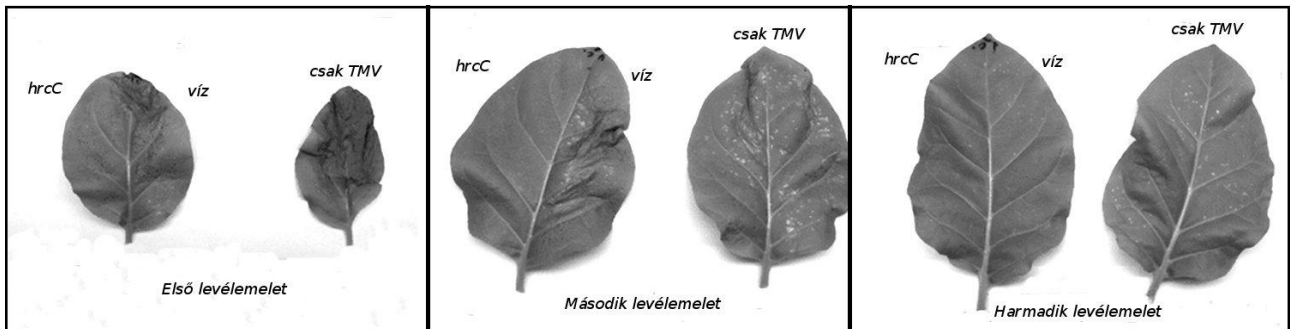
**5.5. ábra.** *N. tabacum* L. 'Xanthi' NN leveleket vízzel, illetve a *P. syringae* pv. *syringae hrcC* baktériumszuszpenzióval történő befecskendezés után azonnal TMV-vel fertőztünk felül. Kontrollként azonos korú, csak TMV fertőzésben részesült leveleket használtunk. Balra a legelső (legidősebb) levélemelet, középen és jobbra rendre a közvetlenül e fölött elhelyezkedő levélemeletek láthatóak. Az ábrán a kísérleti ismétlések jellemző eredményei láthatóak, kivéve a legelső levélemeletet: itt azonos kísérletsorozatban szereplő legsúlyosabban és legenyhébben károsodott levelek szerepelnek egymás mellett. (A jobb szemléltethetőség érdekében a levelekről készült fényképek fényerejét, kontrasztját és telítettségét digitális technikával torzítottuk.)

Azoknál a növényeknél, ahol hat órával hamarabb fertőztünk TMV-vel, mint baktériummal (illetve kontrollként vízzel), az alsó fertőzött levélemeleteken a teljes levéllemez apró, összefolyó léziók borították. A vízzel kezelt levélfeleken ezeken kívül a levélcúcsok közelében nagy méretű elhalás is kialakult. A levéllemez kondíciója azonban általánosságban jobbnak bizonyult, mint az ezekkel egy időben vírussal fertőzött kontrollnövények levelei, amelyek ekkorra a becsléseink szerint a levéllemez 75%-án nekrotizálódtak.

A második legidősebb levélemeletről származó vizsgálati mintáinkon éles különbség volt a baktériummal és a vízzel kezelt levélfelek között. Az előbbin tűszúrásnyi nekrotikus foltok, míg az utóbbin nagy kiterjedésű léziók alakultak ki. Összességében elmondható, hogy a kontroll levélhez képest a baktériummal kezelt oldal jobb, a vízzel kezelt viszont rosszabb kondíciót mutatott.



Szembeötlő volt a HR-gátlás a kontrollhoz képest a legfelső fertőzött levélemeleten. A vízzel és a baktériummal infiltrált levélfélen is hasonló méretű, 1-2 mm-es léziók alakultak ki, ám az utóbbin azonban 70-80%-kal kevesebb (5.6. ábra).

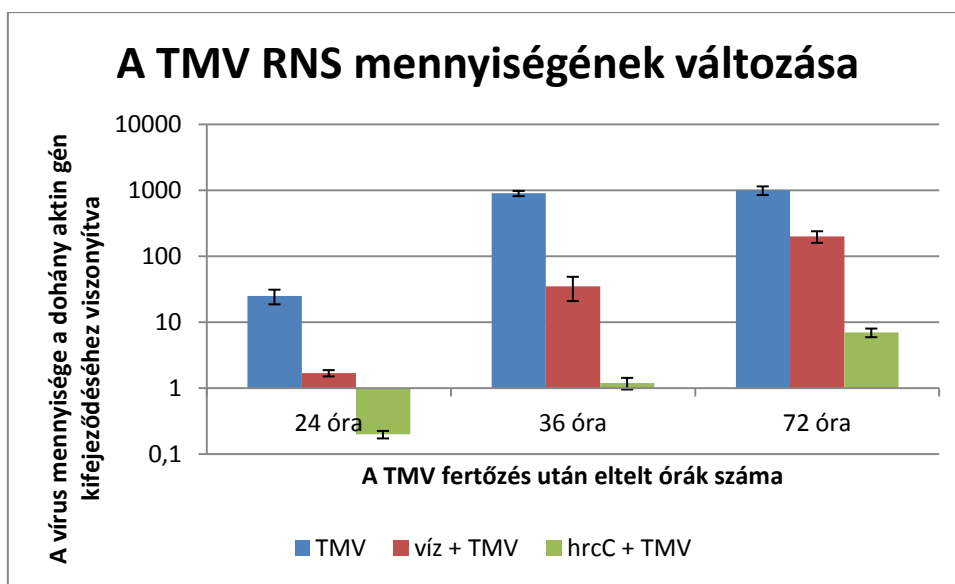


**5.6. ábra.** *N. tabacum* L. 'Xanthi' NN leveleket vízzel, illetve a *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* baktériumszuszpenzióval történő befecskendezés előtt hat órával TMV-vel fertőztünk. Kontrollként azonos korú, csak TMV fertőzésben részesült leveleket használtunk. Balra a legelső (legidősebb) levélemeletet, jobbra haladva a rendre közvetlenül e fölött elhelyezkedő levélemeletek láthatók. Az ábrán a kísérleti ismétlések jellemző eredményei láthatóak. (A jobb szemléltethetőség érdekében a levelekről készült fényképek fényerejét, kontrasztját és telítettségét digitális technikával torzítottuk.)

Azoknál a növényeknél, ahol a baktériumos, illetve a vizes kezelések egy nappal a TMV fertőzés után következtek, szignifikáns különbséget egyik levélemeleten sem tapasztaltunk a kontrollnövények leveleihez képest (ábrán nem jelölve).

#### 5.1.4. A vírusreplikáció gátlásának vizsgálata (inkompatibilis dohány-TMV kapcsolat)

A vírusreplikáció gátlásának vizsgálatához az előkezelés után hat órával fertőztük felül a növényeket TMV-vel. A vírusfertőzéstől számított 24., 48. és 72. órában vizsgáltuk a TMV RNS-ének kifejeződési szintjét valós idejű PCR segítségével. Az eredményeket bemutató 5.7. ábrán megfigyelhető, hogy a vírus RNS mennyisége a növényben mindhárom kezeléstípus esetén folyamatosan emelkedik, azonban az emelkedés mértéke eltérő. A kontroll növényhez képest a baktériummal előkezelt növényekben kisebb mértékű a vírusszint növekedése. A vízzel előkezelt mintákban is megfigyelhető ugyanakkor a vírusreplikáció kisebb mértékű gátlása.

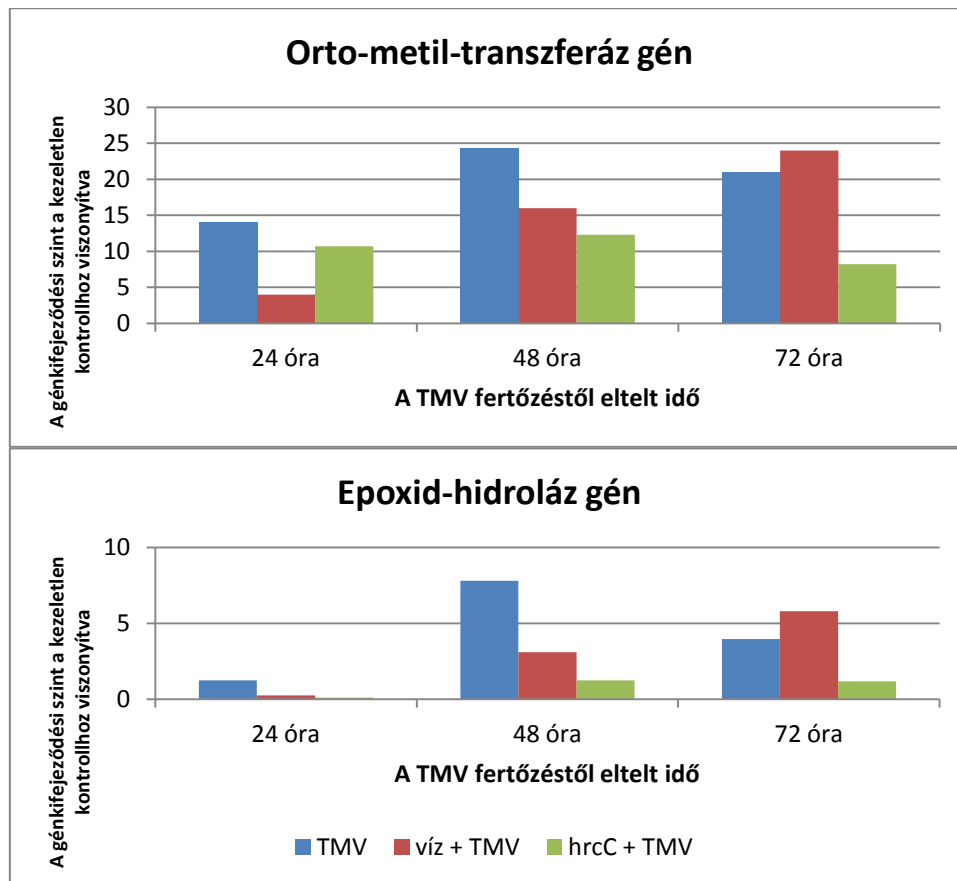


**5.7. ábra.** A TMV mennyiségének változása Xanthi NN növényben az idő függvényében kontroll (csak TMV kezelés) [TMV], vízzel előkezelt [víz + TMV] és *P. syringae hrcC* HR-negatív baktériummal előkezelt [hrcC + TMV] növényben. Az ordináta a vírusfertőzéstől eltelt időt jelöli, az abszcissa pedig a vírus RNS expresszióját, logaritmus skálán.

#### 5.1.5. A növényi védekezési reakciókkal kapcsolatba hozható gének aktivitásának vizsgálata (inkompatibilis dohány-TMV kapcsolat)

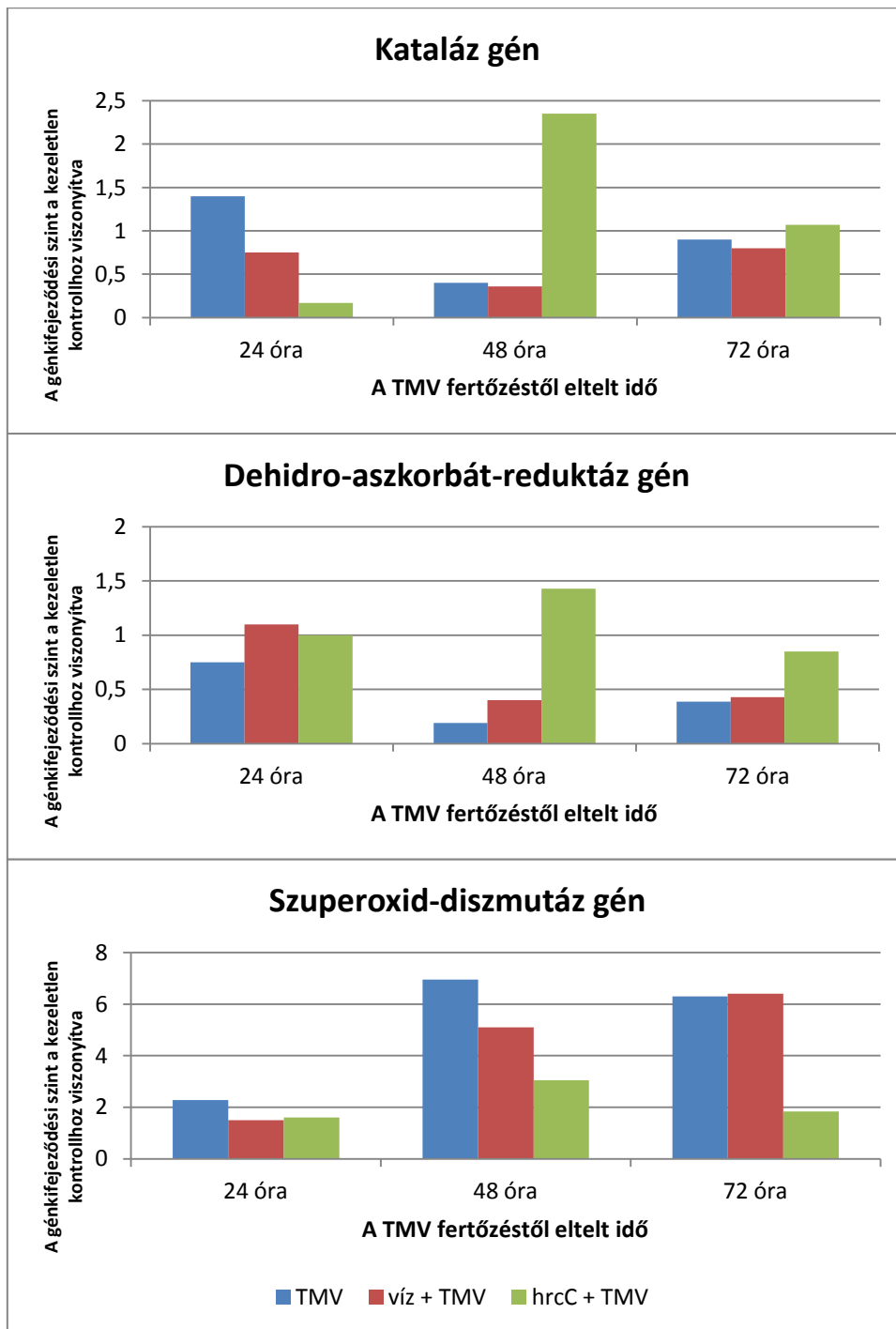
A vírusreplikációval kapcsolatos vizsgálatainkhoz használt mintákból bizonyos növényi védekezésben szerepet játszó gének aktivitásának változását is vizsgáltuk. Az eredményeink azt mutatták, hogy a vírus által kiváltott nekrotikus tünetekhez és a vírus replikációjához hasonlóan a vírus indukálta növényi génaktivitások is gátlódtak azokban a mintákban, ahol az általános rezisztenciát előzőleg a HR-negatív *P. syringae hrcC* baktériummal aktiváltuk. A vízzel infiltrált levelekben a tünetekhez és a vírusreplikációnál tapasztaltakhoz hasonlóan megfigyelhető volt a génaktivitások növekedésének gyengébb mértékű késleltetése (5.8. ábra).

Némiképp hasonló dinamikát figyeltünk meg a TMV-vel szembeni rezisztenciaválasszal összefüggésbe hozható (Guo és mtsai., 1998) epoxid-hidroláz esetében is.



**5.8. ábra.** Az orto-metil-transzferáz (felül) és epoxid-hidroláz (alul) dohánygén transzkripciójának változása Xanthi NN növényben az idő függvényében a kontroll (csak TMV kezelés [TMV]; vízzel előkezelt [víz+TMV] és *P. syringae hrcC* baktériummal előkezelt [hrcC+TMV] növényben. Az ordináta a vírusfertőzéstől eltelt időt jelöli, az abszcissa pedig a génkifejeződés mértékét a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Az ábra két független, hasonló eredményt mutató kísérlet reprezentatív eredményét mutatja be.

A hidrogén-peroxid lebontásában részt vevő két enzim a *P. syringae hrcC* mutánsal előkezelt majd a vírussal felülfertőzött szövetekben enyhén aktiválódott, míg a csak vírussal kezelt, illetve vízzel előkezelt levelekben csökkent – legalábbis a fertőzést követő 48. órában. Azaz a szabályozása ellentétes irányú volt. Ez az ellentétes irányú változás már jelentősebb különbséget eredményezhet a fertőzés második napján, ami a tünetek kialakulásának kezdetével egyezik meg. A szuperoxid-diszmutáz mindhárom kezelés során aktiválódott, de a baktériummal előkezelt mintákban az indukció mérsékeltebb volt a másik két mintasorhoz képest (5.9. ábra).



**5.9. ábra.** Kataláz (NtCAT), dehidroaszkorbát-reduktáz (NtDHAR) és a szuperoxid-diszmutáz (NtSOD) dohánygén transzkripciójának változása Xanthi NN növényben az idő függvényében a kontroll (csak TMV kezelés [TMV]; vízzel előkezelt [víz+TMV] és *P. syringae hrcC* HR-negatív baktériummal előkezelt [hrcC+TMV] növényben. Az ordináta a vírusfertőzéstől eltelt időt jelöli, az abszcissa pedig a gén transzkripciójának mértékét jelöli a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Az ábra két független, hasonló eredményt mutató kísérlet reprezentatív eredményét mutatja be.

## 5.2. A BR során a jelátviteli folyamatokban és protein lebontásban részt vevő, megváltozott aktivitást mutató gének vizsgálatai

### 5.2.1. Jelátvitellel kapcsolatba hozható gének aktivitásának változásai a BR alatt

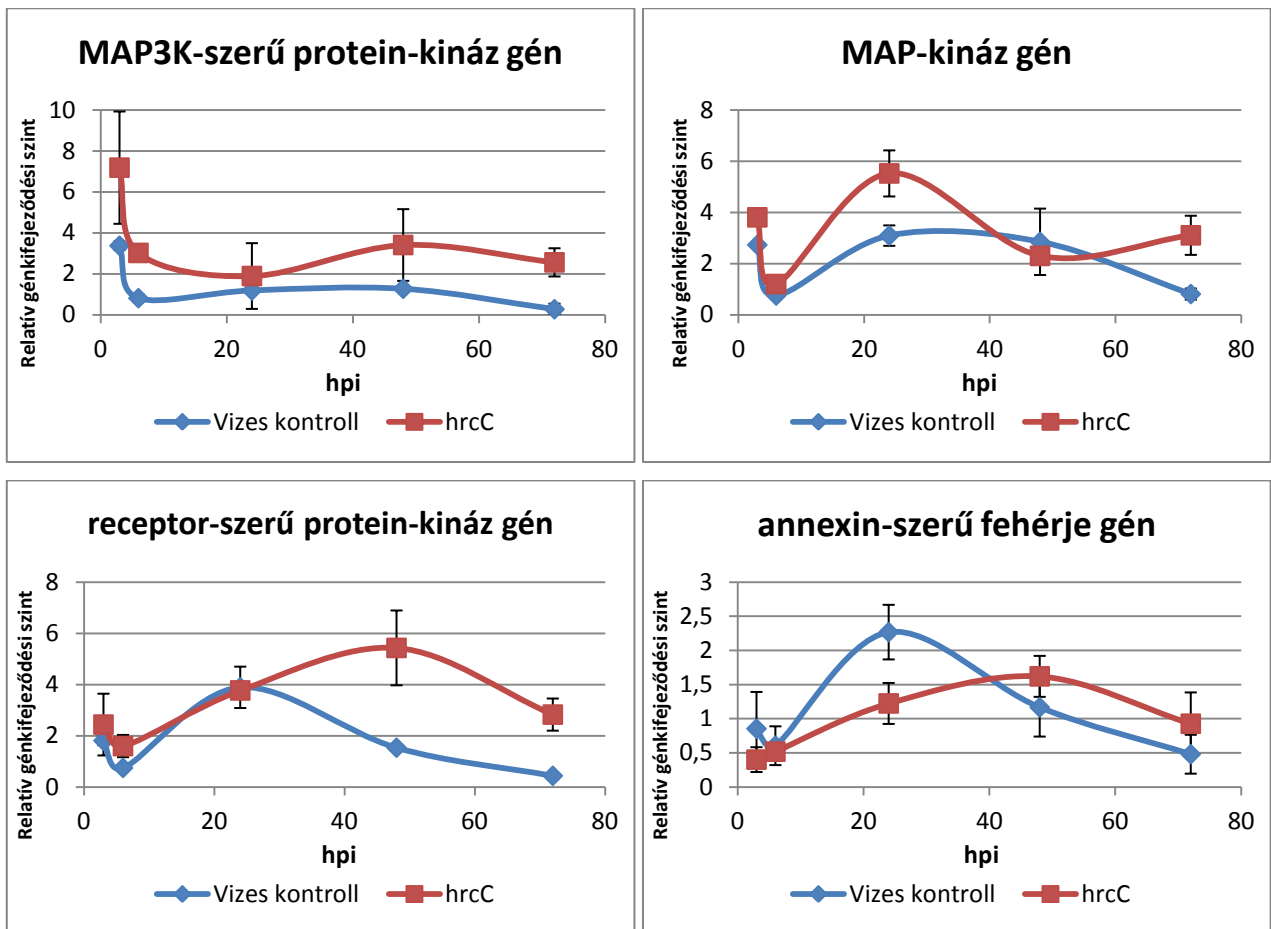
Kutatócsoportunk korábbi munkáiban nagy számban azonosított olyan géneket, amelyek a BR során aktiválódnak dohánynövényben. Ezek között számos olyan szerepelt, amelyek a sejten belüli jelátviteli folyamatokban vesznek részt (pl. MAP-kinázok, foszfatázok, receptor-jellegű kinázok,  $Ca^{2+}$ -jelátvitelben szerepet játszó fehérjék, hormonszintézis-gének).

Tizenhárom ilyen gén aktivitásának változását követtük nyomon a fertőzést (kezelést) követő időszakban. Ehhez meghatározott időpontokban mintát vettünk a BR állapotába hozott, a kontrollként vízzel infiltrált, illetve a kezeletlen dohánynövényekből. A génaktivitások szintjét valós idejű PCR-rel vizsgáltuk. Az 5.10 ábrán néhány jellemző génaktivitás változást mutatunk be. A növényben konstitutívan kifejeződő aktin génjére normalizált, illetve a kezeletlen növényekben mért génkifejeződési szintekhez viszonyított *relatív génkifejeződést* az idő függvényében grafikonokon ábrázoltuk (5.10. ábra).

Az egyes gének aktivitásának időbeli lefutása különböző volt, valószínűleg annak megfelelően, hogy a védekezés melyik fázisában játszik szerepet a génterméke. A MAP3K kináz jellemzően a korai időpontban (6hpi) mutatott nagyobb aktivitást a kontrollhoz képest. Valószínűleg a védekezés beindításában játszhat szerepet.

Más gének – így a MAP-kináz vagy a receptor-szerű protein kináz génjei – a későbbi időpontokban (pl. MAP-kináz: 24 és 72 hpi; receptor-szerű protein kináz: 48 hpi) mutattak a kontroll vízzel kezelt levélszövethez képest nagyobb aktivitást a BR alatt. Ezek a gének vélhetően a védekezési folyamatok késői szakaszában aktiválódnak és feltehetőleg a védekezés fenntartásában és/vagy újabb védekezési folyamatok elindításában játszhatnak szerepet.

Olyan géneket is találtunk, amelyekben épp a baktériumos fertőzés hatására csökkent a transzkripció a vizes kezelésen átesett mintában mérthez képest (pl. annexin-szerű fehérje: 24 hpi).



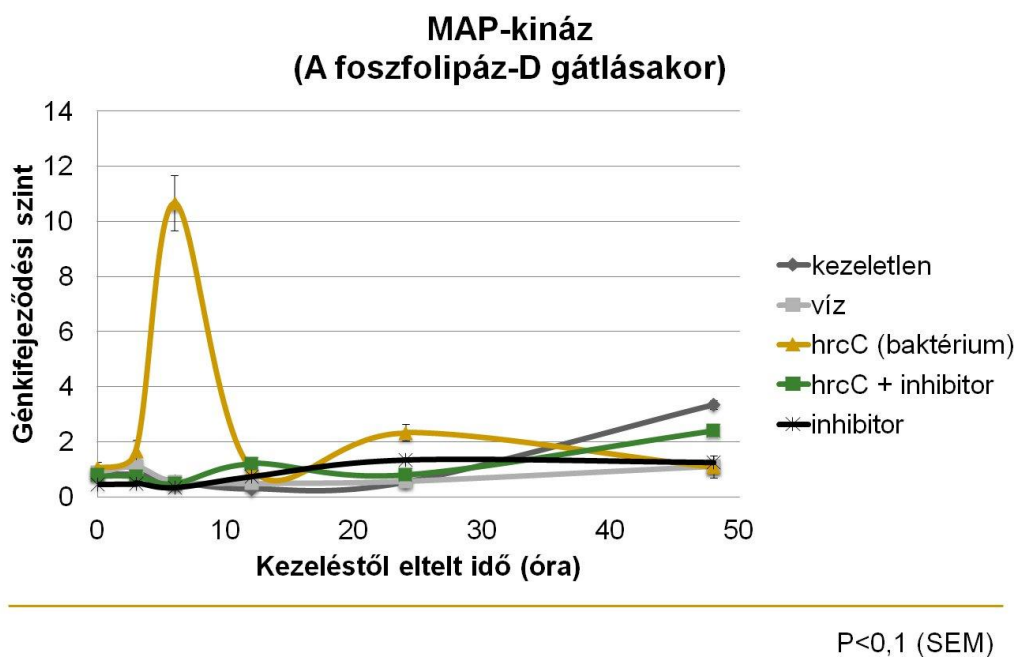
**5.10. ábra.** Különböző, BR-hez köthető jelátvitelben részt vevő gén kifejeződési szintjei *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* (piros vonal), illetve vízzel (kék vonal) infiltrált növényekben mérve a fertőzéstől eltelt órák (*hpi* – *hours post inoculation*) függvényében. A függőleges tengelyen relatív génkifejeződési szinteket mutatnak: a viszonyítási alapot egyrészt a növényi aktin gén, másrészt pedig a kezeletlen kontrollnövényekben mért génkifejeződési szint adja.

### 5.2.2. Jelátvitel-gátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt

A BR során megváltozott aktivitást mutató gének több mint tíz százaléka a jelátviteli folyamatokban játszik szerepet (Szatmári és mtsai, 2006). Vizsgálataink során a dohánynövények kezelését a fentiekben leírt baktériumszuspenzió és a vizes injektálás mellett olyan gátlószerekkel is kombináltuk, amelyek a vizsgálataink szempontjából fontosabb jelátviteli útvonalak egyes elemeit képesek blokkolni, így a kalcium-beáramlást (lantán-klorid), a foszfolipáz-A2 (arisztolochiasav), foszfolipáz-C (neomicin-szulfát) és foszfolipáz-D (n-butanol) aktivitását, a fehérjék szintézisének (cikloheximid) és azok proteoszóma-bontásának (MG115) folyamatát. A kezelések után ½, 3, 6, 12, 24 és 48 órával vettünk mintát, majd készítettük elő ezeket valós idejű PCR vizsgálathoz. A génaktivitás méréseknél nyomon követtünk egyrészt jelátvitelben részt vevő géneket: MAP-kinázt (c24), MAP3K-t (c58), receptor-szerű-kinázt (c90), PTS-fehérjét (c106), annexin-szerű fehérjét (c125), SPL-t (szfingozin-1-foszfát-liáz; c139) és hősokk transzkripciós faktort (c151).

Másrészt az alapvetően jelátviteli folyamatokhoz köthető géneken kívül néhány olyan gén időbeli aktivitásváltozását is vizsgáltuk, amelyek a fehérje-anyagcserében és egyéb, a BR során fontos folyamatokban játszanak szerepet. Így többek között fahéjsav-4-hidroxiláz, epoxid-hidroláz, orto-metiltranszferáz, glicin-gazdag fehérje, glutation-S-transzferáz, peroxidáz és cisztein-proteináz, ubikvitin-kötő fehérje és proteozóma  $\delta$ -alegység génjeit.

A különböző kezelések hatására az egyes génkifejeződési szintek időbeni változását grafikonokon ábrázoltuk. Az 5.11. ábrán bemutatott MAP-kináz gén kifejeződési szintje nagyfokú aktivitást mutat a fertőzés utáni hatodik órában, ha a növényt *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* baktériumokkal kezeltük, ám ilyen kiugró értéket nem tapasztaltunk akkor, amikor a baktériumszuszpenziót a foszfolipáz-D inhibitorával egészítettük ki. Tehát a foszfolipáz-D útvonal gátlása blokkolni tudta ennek a génnek az átíródását.



**5.11. ábra.** MAP-kináz (c24) gén kifejeződési szintjeinek változása különböző kezelések hatására és a kezelésektől eltelt különböző időpontokban. Hasonló vizsgálatoknál az adott gén kifejeződési szintjét a dohányban konstitutívan kifejeződő aktinéra normalizáltuk. A *hrcC* a *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* baktériumot, míg az inhibitor a foszfolipáz D gátlószerét (n-butanol) jelöli. Az ábrán három ismétlés eredményeinek számtani középértékei láthatók.

Hasonló grafikonok alapján azokat a fertőzés utáni időpontokat, amelyekben az adott gén aktivitása eltérést mutatott a tiszta, illetve az inhibitorral is kiegészített baktériumszuszpenzióval való kezelés között egy mátrixba rendeztük (5.1. táblázat). Megállapítható volt, hogy egyes folyamatok kifejezetten a fertőzést követő korai időpontokban befolyásolták az egyes gének

aktivitását (pl. a foszfolipáz-A2 a MAP-kináz, a MAP3K, az annexin-szerű és a PTS-fehérjét), míg mások inkább a későbbi mérési időpontokban (pl. foszfolipáz-C gátlásának hatása a MAP-kinázra és a receptor-szerű kinázra). Volt azonban olyan kapcsolat is, amely a vizsgált időpontokban mindenütt eltérést mutatott (foszfolipáz-A2 gátlásának hatása a hősokk transzkripció faktor génkifejeződési szintjére).

**5.1. táblázat.** A bal szélső oszlopban található gének aktivitására a táblázatban jelzett időpontokban hatással volt a fejlécben felsorolt jelátviteli folyamatok gátlása. Az üresen hagyott mezőkben az adott génnél az adott kezelés hatására egyik kezelés utáni vizsgált időpontban sem volt eltérés a csak baktériummal, illetve a baktérium és a gátlószer kombinációjával végzett kezelés hatása között. (A fertőzéstől eltelt idő órában értendő, a n.a. jelölésű mintáknál nincs adat.)

	Kalcium-beáramlás	Foszfolipáz-A2	Foszfolipáz-C	Foszfolipáz-D	Fehérjeszintézis	Proteoszóma
MAP-kináz		3	24-48	6	6	12
MAP3K	12-48	3	12	6	6	6
Receptor-szerű kináz	6		24		6-24	
PTS-fehérje		3-6				
Annexin-szerű fehérje	6	3	6-12	½-6	6	3-12
SPL						12
Hősok-fehérje	n.a.	½-48			n.a.	
Fahéjsav-4-hidroxiáz	n.a.	3-6		6	n.a.	
Epoxid-hidroláz	n.a.	3-6	48	12	n.a.	3-12; 48
Orto-metil-transzferáz	n.a.	3-6		3-6	n.a.	
Glicin-gazdag-fehérje	n.a.	6-48	24		n.a.	12-48
Glutathion-S-transzferáz	n.a.	6	6	3	n.a.	3-6
Peroxidáz	n.a.	3-6	48	12	n.a.	3-6; 48
Cisztein-proteináz	n.a.	n.a.	n.a.	12	n.a.	n.a.
Ubikvitin-kötő fehérje	n.a.	n.a.	n.a.	3	n.a.	n.a.
Proteoszóma $\delta$ -alegység	n.a.	n.a.	n.a.	12	n.a.	n.a.

A foszfolipáz-A2 és -D gátlásának az ebbe a vizsgálatba bevont BR gének aktivitásváltozására konzekvensen a korai időpontokban (12 óráig) volt hatása. Kivétel ez alól a glicin-gazdag fehérje génje, mely még a fertőzést követő 48. órában is aktivitásbeli eltérést mutatott a gátlószerrel kiegészített mintákban a BR-hez képest. Ezzel szemben a foszfolipáz-C gátlása, úgy tűnik, a különböző BR-génekre különböző időpontokban volt hatással: a fertőzést követő 6. órában gátolta a glutathion-S-transzferáz, a 24. órában a glicin-gazdag fehérje, és a 48. órában a peroxidáz és az epoxid-hidroláz géneket. Hasonlóan szórtak a fehérjelebontás gátlása mellett vizsgált BR-gének aktivitásváltozásbeli eltérések időpontjai. Ez utóbbi kezelésnél érdekes ingadozás volt



megfigyelhető mind az epoxid-hidroláz, mind pedig a peroxidáz esetében: a BR korai és késői szakaszaiban is nagyfokú eltérés mutatkozott a gátlószerekkel kezelt és nem kezelt minták között. Ugyanakkor az infiltrációt követő 24. órában a génaktivitás szintje mindkét minta esetében közel azonos volt.

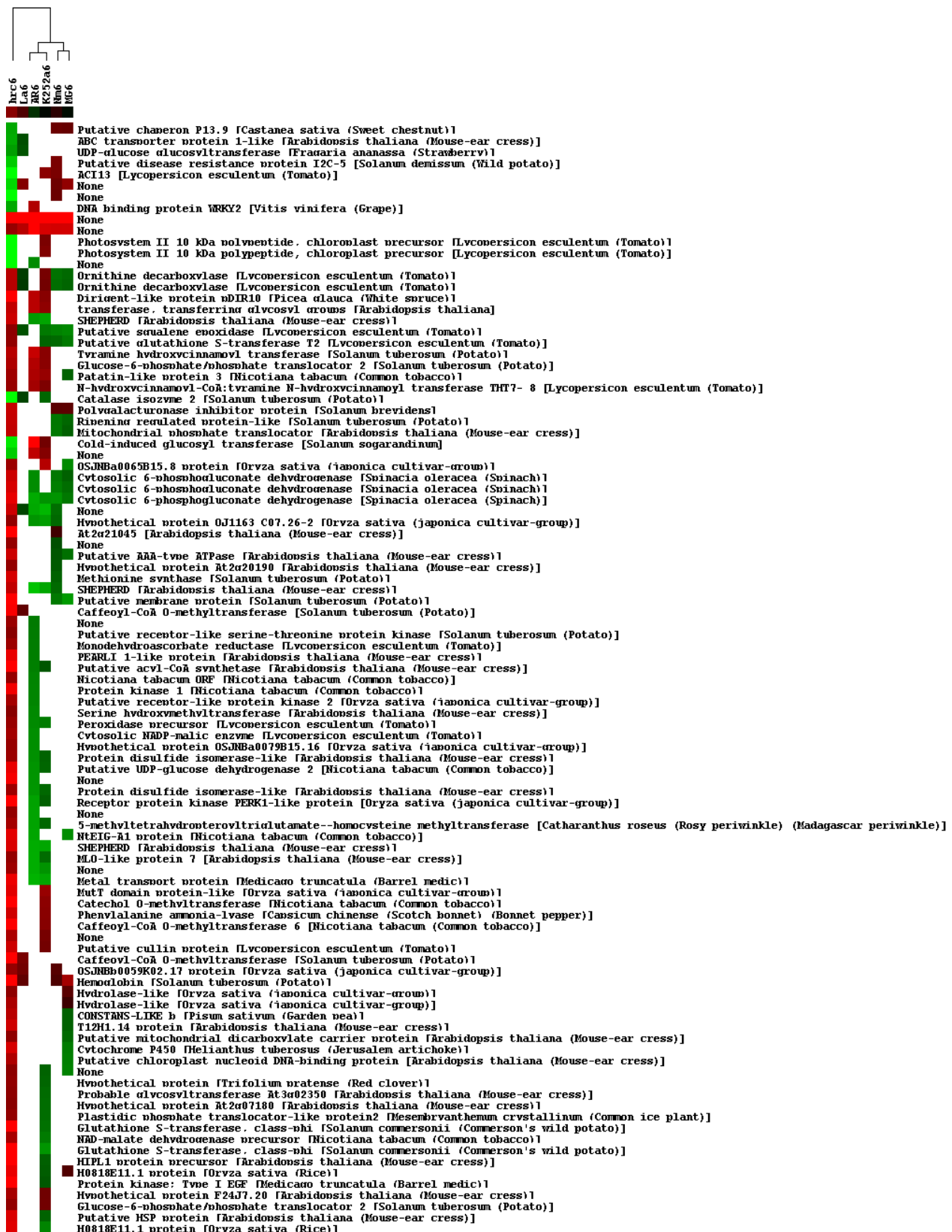
### **5.2.3. Jelátvitelgátlók génkifejeződésre gyakorolt hatásának vizsgálatai microarray módszerrel**

A fertőzést követő néhány órában jelentős változások mennek végbe a védekezéshez köthető gének aktivitásában. Korábbi vizsgálataink alapján célszerűnek bizonyult a növényi sejtről a génátíródás szintjén a fertőzést követő hatodik órában egyfajta „pillanatfelvételt” készíteni. Ehhez cDNS microarray módszert hívtunk segítségül. A chip-vizsgálat előnye a valós idejű PCR-rel szemben, hogy rendkívül sok gént lehet vele vizsgálni egy időben.

A vizsgálatokban négy különböző jelátviteli-, illetve egy fehérjelebontást és közvetve a szignál folyamatokat gátló vegyületet használtunk (LaCl<sub>3</sub> – kalcium-ion beáramlás; arisztolochiasav – foszfolipáz-A; neomicin-szulfát – foszfolipáz-C; K252a – kinázok; MG115 – proteoszóma).

A fertőzést követő 6. órában vett mintákon végzett chip-vizsgálat megerősítette, hogy az általunk használt inhibitor molekulák nagyszámú gén aktivitását érintették. Ezen gének közül azokat választottuk ki, amelyek aktivitásbeli eltérést mutattak azon gének esetében, amelyek ugyanezen vizsgálatok részeként a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutánsával injektált levelekben a BR során szignifikánsan változtatták kifejeződési szintjüket (Szatmári Á. és Bozsó Z. nem publikált adatai).

Az 547 BR-hez köthető gén 18%-áról (99) állapítottuk meg, hogy a fertőzést követő hatodik órában a jelátvitel-gátlók befolyásolják a működését. Az 5.12. ábra első oszlopa a *hrcC* baktériummal indukált BR alatti génaktivitásváltozások irányát mutatja: piros szín jelzi a fokozott, zöld a csökkent génaktivitást a kontrollhoz képest. A további oszlopokban a BR-ben mért értékekhez képest történő aktivitásváltozások irányok láthatóak különböző gátlószerek hatására: a piros szín a BR-hez képest fokozott, a zöld csökkenő ütemű génkifejeződést jelez. Ahol nem volt változás a BR-beli génaktivitáshoz képest, fehérén maradtak a mezők.



5.12. ábra *P. syringae* pv. *syringae* hrcC mutáns baktériummal, illetve ezzel egy időben különböző gátlószerekkel kezelt dohánynövényből a kezelést követő hatodik órában vett mintákból készült microarray vizsgálat (TIGR Potato 10K cDNA Array) eredményének grafikus megjelenítése. Kezelések rövidítései (és az általuk gátolt folyamatok): hrc6 = *P. syringae* pv. *syringae* hrcC; La6 = lantán-klorid (kalcium-ion beáramlás); AR6 = arisztolochiasav (foszfolipáz-A); K252a6 (kinázok); NM6 = neomicin-szulfát (PLD); MG6 = MG115 (proteoszóma). Az egyes kezelésekhez tartozó kockák színe az egyes gének (homológok) regulációjának irányát (zöld = csökkenő; piros = fokozódó) jelöli. A szín mélysége a reguláció mértékével arányos. Az ábra a Cluster 3,0 és a Treeview programok segítségével készült.

A gátlószeres kezelések hatására, a BR-hez képest megváltozott aktivitást mutató gének aktivitásváltozásának irányát az 5.3. táblázat szemlélteti.

A jelátvitel inhibitorok közül legmarkánsabb hatása a kinázokat gátló K252a készítménynek volt: a 99 génből 53 aktivitásváltozására volt hatással (53,5%). A foszfolipáz-A-t gátló arisztolochiasav az adott gének 43%-át érintette, míg legalacsonyabb befolyása (14%) a calcium-ionok beáramlását akadályozó lantán-kloridnak volt.

Ugyanakkor megállapítható volt az is, hogy a bizonyos jelátvitel-gátlók meghatározott funkciójú géncsoportokra is hatást gyakoroltak. Így például a kinázok működését gátló K252a csökkentette minden redox, antioxidáns, illetve méregtelenítéssel kapcsolatba hozható gén működését, míg a lignin szintézishez kapcsolható fenilpropanoid útvonal génjeinek működését serkentette. Ezen kívül a kináz és a foszfolipáz-A inhibitorok egyaránt csökkentették a receptor-kinázok transzkripciójának mértékét.

**5.3. táblázat.** A BR során megváltozott aktivitást mutató gének átíródásának mértékét befolyásoló szignál inhibitorok a chip eredmények alapján. Az egyes sorokban a különböző folyamatok gátlásának hatására aktivitásváltozást mutató gének száma látható. Az első és a második oszloppár elkülönítésének alapja az, hogy a gátlószeres kezelés nélküli *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutáns baktériummal való fertőzés (BR) hatására a vizsgált gének fokozott vagy csökkent aktivitást mutattak-e.

	A BR során a gén aktivitása fokozódott		A BR során a gén aktivitása csökken		A gén aktivitásváltozásának iránya a BR alatt tapasztalttal...	
	... a gén aktivitása nő	... a gén aktivitása csökken	... a gén aktivitása nő	... a gén aktivitása csökken	...megegyező	...ellentétes
<b>A gátlószer együttes alkalmazása mellett...</b>						
<b>Kalcium-beáramlás</b>	3	1	4	6	9	5
<b>Foszfolipáz-A2</b>	1	3	31	8	9	34
<b>Kinázok</b>	1	5	28	19	20	33
<b>Foszfolipáz-C</b>	0	5	17	6	6	22
<b>Proteoszóma</b>	0	2	19	7	7	21

Az 5.4. táblázatban vetettük össze két-két kezelés hatását különböző gének aktivitásaváltozásának irányára. Az aktivitásváltozások iránya többnyire azonos volt a különböző kezelések hatására. A legtöbb azonos irányba aktiválódó gént a protein kinázok, illetve a foszfolipáz-A2 gátlásának összevetésekor találtunk (28 gén). A foszfolipáz-C és a proteoszómák gátlásakor szintén nagy számú (17) gén változtatta meg aktivitásának irányát ugyanolyan irányban.

Ellentétes irányú génaktivitásváltozást egyáltalán nem figyeltünk meg a kalcium-beáramlás valamint a foszfolipázok és a proteoszóma gátlásakor. Szintén nem találtunk ellentétes irányban aktiválódó géneket a két általunk vizsgált foszfolipáz gátlásának hatására. A legtöbb ellentétes irányba aktiválódó gént (5 db) a protein-kinázok és a proteoszóma inhibitorok hatásainak összehasonlításakor fedeztünk fel.

**5.4. táblázat.** A BR során megváltozott aktivitást mutató gének átíródás-változásainak iránya jelátvitelgátlók hatására a microarray eredmények alapján. Két-két különböző folyamat gátlásának hatására azonos irányba változó aktivitást mutató gének számai pirossal, az ellentétes irányúak zölddel vannak jelölve.

	<b>Kalcium-beáramlás</b>	<b>Foszfolipáz-C</b>	<b>Foszfolipáz-A2</b>	<b>Protein kináz</b>	<b>Proteoszóma</b>	
<b>Kalcium-beáramlás</b>		9	3	5	7	<b>Azonos irány</b>
<b>Foszfolipáz-C</b>	0		8	10	17	
<b>Foszfolipáz-A2</b>	0	0		28	6	
<b>Protein kináz</b>	2	2	0		6	
<b>Proteoszóma</b>	0	0	1	5		
	<b>Ellentétes irány</b>					

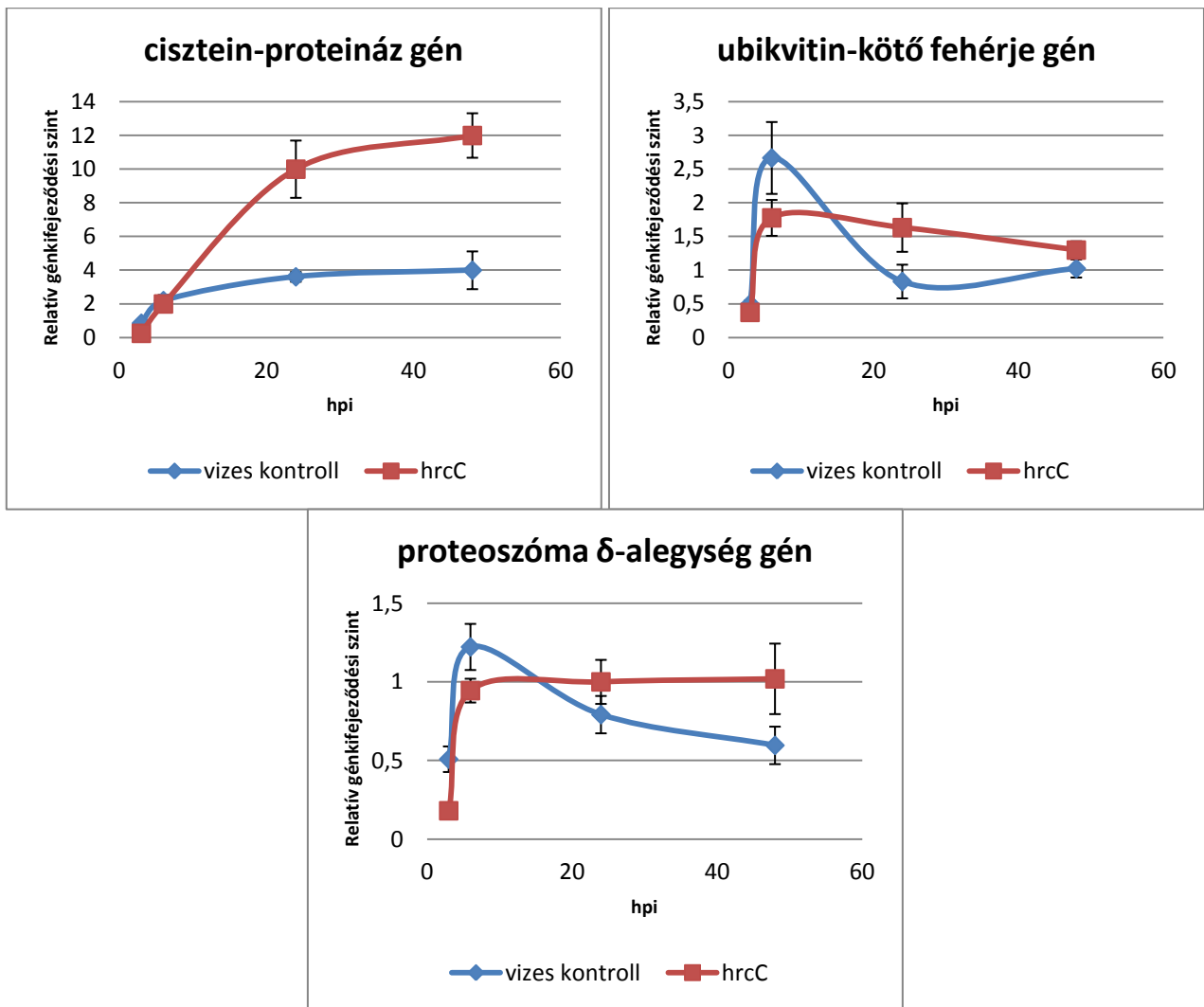
#### 5.2.4. Proteináz-gének aktivitásának változása a BR alatt

A jelátvitelben szerepet játszó gének mellett a protein lebontásban részt vevő gének BR-ben betöltött funkcióját is részletesebben tanulmányoztuk. Így vizsgáltuk egyes proteinázgének kifejeződési szintjét a BR alatt. Ehhez meghatározott időpontokban mintát vettünk a *P. syringae* pv. *syringae hrcC* mutáns segítségével a BR állapotába hozott, a kontrollként vízzel infiltrált, illetve a kezeletlen dohánynövényekből. A génaktivitások szintjét valós idejű PCR-rel vizsgáltuk. A növényben konstitutívan kifejeződő aktin génjére normalizált, illetve a kezeletlen növényekben mért génkifejeződési szintekhez viszonyított *relatív génkifejeződést* az idő függvényében grafikonokon ábrázoltuk.

Az itt bemutatott három kiválasztott gén közül egy cisztein-proteináz, valamint egy proteoszóma  $\delta$ -alegység génje a fertőzést követő 12., míg egy ubikvitin-kötő fehérje génje a kezeléseket követő 3. órában mutatott eltérést a BR-t kiváltó baktériumszuszpenzióval, illetve a vízzel előkezelt minták között.

Legmarkánsabb különbséget a vizes kontroll és a baktériummal infiltrált növényi mintákban mért értékek között a cisztein-proteináz esetében kaptunk. Bár a fertőzés korai szakaszában a kontroll és a baktérium kezelt minta értékei szinte megegyeznek, a 24., illetve a 48. fertőzést követő órában már jelentősen magasabb szintű a baktériumos mintákban a gén transzkripciója (5.13. ábra). Ez a cisztein proteináz késői szerepét jelzi a BR alatt.

Olyan géneket is sikerült azonosítani, amelyek – legalábbis bizonyos korai időpontokban – csökkent aktivitást mutattak a BR alatt a vizes kontrollhoz viszonyítva. Ilyen volt például egy ugyanazon lebontási mechanizmus különböző pontjaiban szereplő ubikvitin-kötő fehérje, valamint egy proteoszóma alegység-gén is. Ezen géneknek a kifejeződési szintje a fertőzést követő 24. órában a vízzel kezelt mintákéban mért szint fölé emelkedett. Míg a proteoszóma  $\delta$ -alegység génjének szintje megőrizte ezt a BR alatti magasabb aktivitást, addig az ubikvitin-kötő fehérje csaknem a vizes kontrollal azonos kifejeződési szintre esett vissza (5.13. ábra).



**5.13. ábra.** Néhány gén kifejeződési szintjei *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* (piros vonal), illetve vízzel (kék vonal) infiltrált növényekben mérve a fertőzéstől eltelt órák (*hpi* – hours post inoculation) függvényében. A függőleges tengelyen relatív génkifejeződési szinteket mutatnak: a viszonyítási alapot egyrészt a növényi aktin gén, másrészt pedig a kezeletlen kontrollnövényekben mért génkifejeződési szint adja.

### 5.2.5. Proteinázgátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt

A proteináz-gátlók hatásának vizsgálatához *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutánsának vizes szuszpenziójával együtt valamely proteináz gátlószerét is a növénybe fecskendeztük. Ezután valós idejű PCR segítségével különböző, a BR során fontos szerepet játszó gén aktivitásváltozását vizsgáltuk.

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, milyen hatással vannak ezek a proteinázok a BR során aktiválódó génekre a fertőzéshez használt *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutáns baktériumok vizes szuszpenzióját a vizsgálni kívánt proteináz gátlószerével egészítettük ki. A cisztein-proteázok hatását E-64-d-vel és cink-kloriddal, a szerin-proteázokat pedig AEBSF-fel blokkoltuk. Mindkét proteáz-típusra gátló hatást fejt ki a leupeptin. Ezeken kívül fenantrolinnal a metalloproteázok, pepsatinnal az aszparaginsav-proteázok, bestatinnal az aminoszteinidázok aktivitásukat mérsékeljük.

Kontrollként inhibitor nélküli baktériumszuszpenziót ugyanúgy használtunk, mint vizes álfertőzést, illetve – abszolút kontroll gyanánt – bizonyos leveleket kezeletlenül hagytunk. A kezeléseket követő hatodik órában vett feldolgozott mintákban valós idejű PCR segítségével mértük a génkifejeződés változását. Az 5.14./a és 5.14/b ábra egyes grafikonjain rendre megjelenítettük a különböző gének dohány aktinhoz viszonyított génkifejeződési szintjeit a kezeletlen, a vízzel, illetve *hrcC* baktériumszuszpenzióval infiltrált levelekben. A vizes előkezelést a csak inhibitorral kezelt, a *hrcC* előfertőzést pedig a *hrcC* + inhibitor kombinált kezeléshez tekintettük viszonyítási alapnak. A kezeléseket és a kontrollok közötti különbség szignifikanciáját t-próbával igazoltuk.

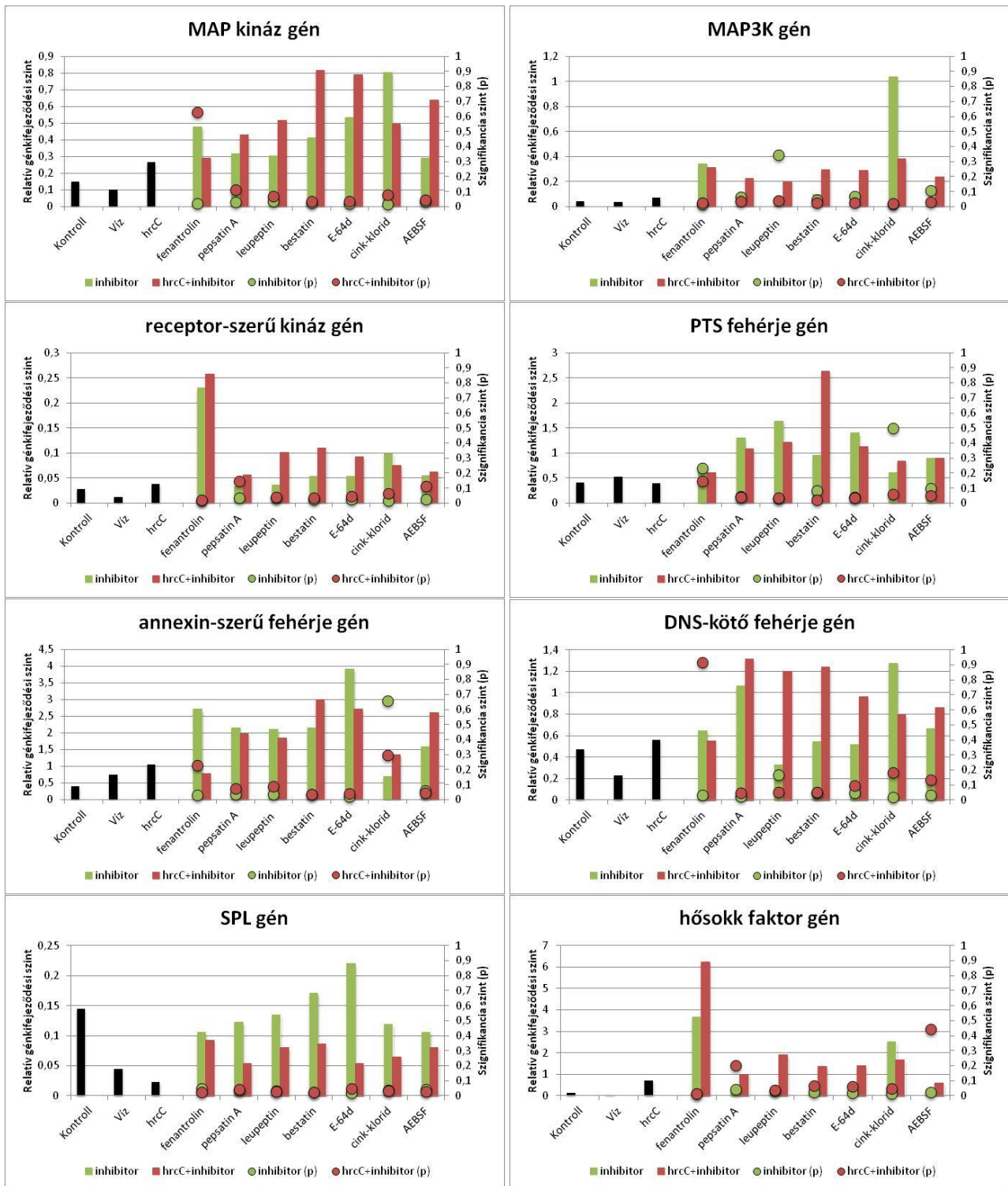
A vizsgálatba bevont legtöbb gén esetében azt tapasztaltuk, hogy kifejeződési szintjeik rendre magasabbak voltak a BR korai szakaszában a legtöbb gátlószerrel való kezelés hatására, mint azok alkalmazása nélkül. Különösen igaz volt ez az összefüggés a cisztein- és szerin-proteázgátlók használata esetén.

A metalloproteinázokat gátló fenantrolin több gén aktivitását is serkentette önmagában adagolva a vizes kontrollhoz képest, ugyanakkor a baktérium által kiváltott BR-re nem gyakorolt számottevő hatást (MAP-kináz, annexin-szerű fehérje, DNS kötő fehérje). Hasonló jelenséget más esetben is tapasztaltunk. Így például az általunk vizsgált hősokk-faktor és orto-metil-transzferáz génjeinél az aszparaginsav-proteinázokat gátló pepstatin és a szerin-proteinázokat gátló AEBSF készítmények használatakor, vagy a cisztein-proteinázokat gátló cink-klorid esetén a vizsgált glicin-gazdag fehérje és a peroxidáz gének kifejeződésének vizsgálatokor.

Érdemes megfigyelni, hogy a kontrollként csak inhibitorral kezelt mintákban a génkifejeződési szintek többnyire a baktérium-inhibitor kombinációval kezelt mintákban mért alatt maradtak. A szfingozin-1-foszfát-liáz (SPL) génje ezekkel szemben a csak inhibitorral kezelt mintákban fejeződött ki magasabb szinten, mint azokban, amelyeket a baktérium-inhibitor eleggyel infiltráltunk.

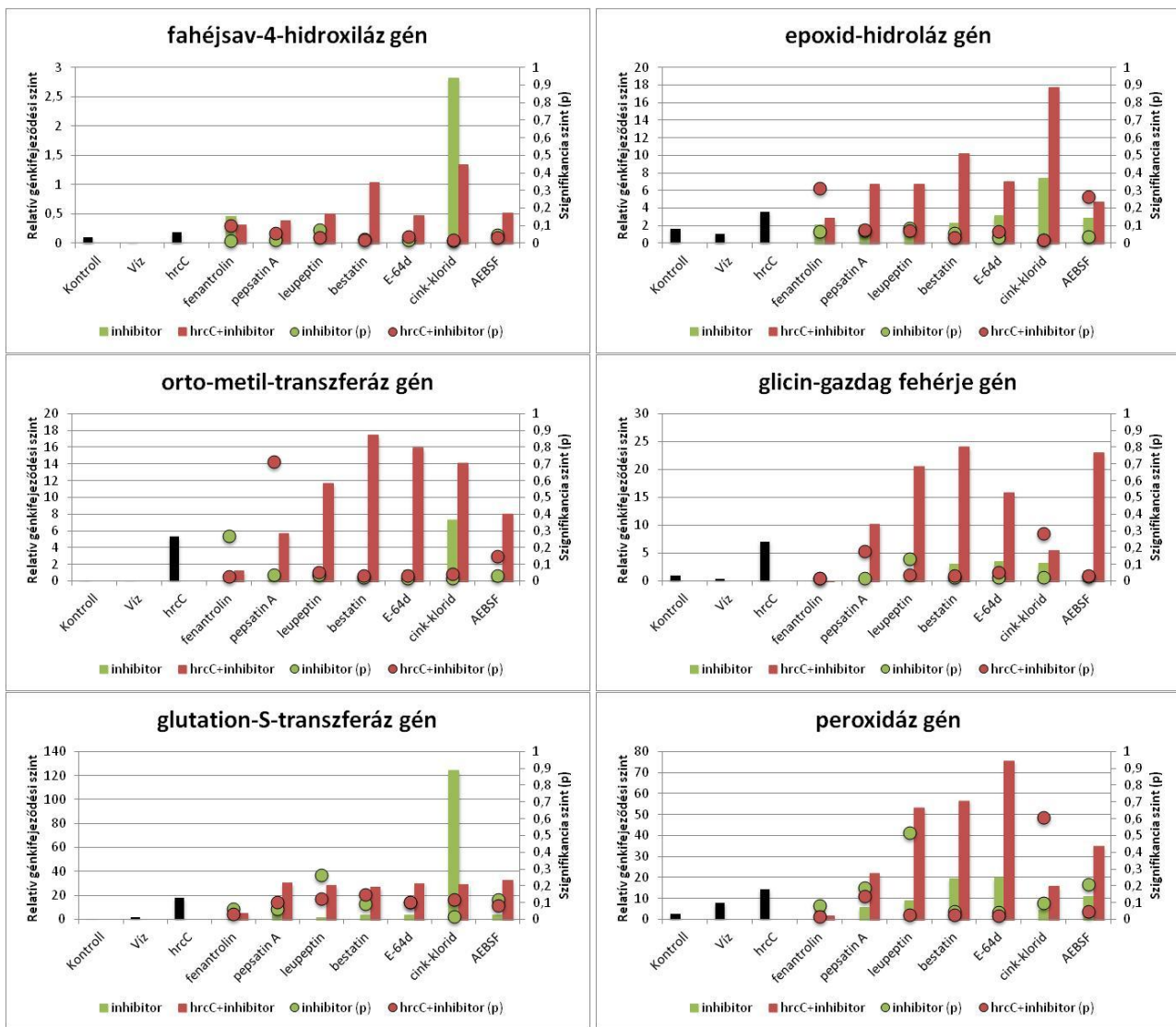
A gátlószeresek közül a cink-klorid nyolc gén esetén is serkentőleg hatott azokban a mintákban mért kifejeződési értékekhez képest, amelyek a BR-t kiváltó baktérium és cink-klorid kombinációját kapták.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a protein lebontásban részt vevő folyamatok számos esetben negatív regulátorai lehetnek a védekezési folyamatoknak (pl. szabályozó fehérjék lebontásával).



**5.14./a ábra.** A BR korai szakaszában (fertőzést követő 6. óra) néhány, a védekezésben kulcsszerepet játszó gén aktivitásának alakulása különböző proteázgátlók hatására. A vizsgált gének kifejeződési szintjét a dohányban konstitutívan kifejeződő aktin génkifejeződési szintjéhez viszonyítva ábrázoltuk (függőleges tengely). Az egyes gátlószereket a vízszintes tengelyen tüntettük fel (fenantrolin: metalloproteináz, pepsatinA: asparaginsav-proteináz, leupeptin: cisztein- és szerin-proteináz, bestatin: aminopeptidáz, E-64d és cink-klorid: cisztein-proteináz, AEBSF: szerin-proteináz). A kontroll minták értékei fekete, a csak inhibitorral kezelték zöld, az inhibitor-hrcC mutáns keverékkel kezelték piros színnel kerültek jelölésre. A másodlagos függőleges tengelyen a t-próbák szignifikancia szintjeinek értékei láthatóak (az inhibitoros kezeléseket a vizes kontrollal, az inhibitor + hrcC kezeléskombinációt a hrcC kontrollal vetették össze). A könnyebb áttekinthetőség érdekében az ábrán a szórások nem szerepelnek. Ezek értéke 8-15% között mozgott.





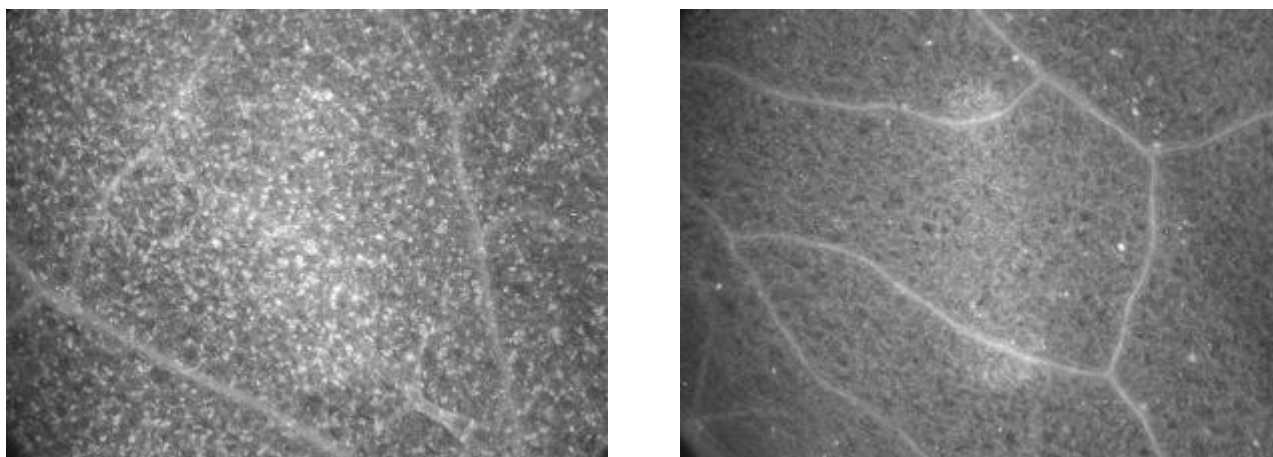
**5.14./b ábra.** A BR korai szakaszában (fertőzést követő 6. óra) néhány, a védekezésben kulcsszerepet játszó gén aktivitásának alakulása különböző proteázgátlók hatására. A vizsgált gének kifejeződési szintjét a dohányban konstitutívan kifejeződő aktin génkifejeződési szintjéhez viszonyítva ábrázoltuk (függőleges tengely). Az egyes gátlószereket a vízszintes tengelyen tüntettük fel (fenantrolin: metalloproteináz, pepsatinA: asparaginsav-proteináz, leupeptin: cisztein- és szerin-proteináz, bestatin: aminopeptidáz, E-64d és cink-klorid: cisztein-proteináz, AEBSF: szerin-proteináz). A kontroll minták értékei fekete, a csak inhibitorral kezelték zöld, az inhibitor-hrcC mutáns keverékkel kezelték piros színnel kerültek jelölésre. A másodlagos függőleges tengelyen a t-próbák szignifikancia szintjeinek értékei láthatóak (az inhibitoros kezeléseket a vizes kontrollal, az inhibitor + *hrcC* kezeléskombinációt a *hrcC* kontrollal vetettük össze). A könnyebb áttekinthetőség érdekében az ábrán a szórások nem szerepelnek. Ezek értéke 8-15% között mozgott.

## 5.2.6. Sejtfali kallózbeépülés változása a proteínázgátlók alkalmazásának hatására

### *Arabidopsis*ban

Az ebben a kísérletbeállításban használt inhibitorok a pepstatin, leupeptin, bestatin, E-64d, cink-klorid, AEBSF, TPCK, E-64, jodoacetamid, N-etil-maleimid, aprotinin és PMSF voltak. Mintákat a kezelést követően 24, illetve 48 órával vettünk.

A kísérletben részt vevő növények leveleit anilin-kékkel festettük, majd fluoreszcens mikroszkóp segítségével kezeléstípusonként, illetve mintavételi időpontonként 4-4 mintát vizsgálva jellemeztük őket. Viszonyítási pontként a csak inhibitorral kezelt növényeknél a vízzel infiltrált minták, a baktérium és inhibitor kombinációjával kezelt növényeknél pedig a csak baktériumszuszpenzióval infiltrált levelek szolgáltak. A fluoreszcens mikroszkópos szemikvantitatív vizsgálatok eredményei (példának lásd 5.15. ábra) az 5.4. táblázatban foglaltuk össze.



**5.15. ábra.** Fluoreszcens mikroszkóppal készített felvételek anilin-kékkel megfestett *Arabidopsis* levelekről. Bal oldalon *P. syringae* pv. *syringae hrcC* mutánsal fertőzött, jobb oldalon pedig ugyanezen baktériumnak jodoacetammiddal kiegészített szuszpenziójával kezelt minta látható. A minták a kezelést követő 24. órában kerültek preparálásra. A sejtfalakba berakódott kallóz a képeken világos, pontszerű foltokként jelenik meg. Az ábrán ismételt kísérletek reprezentatív eredményei láthatók.

A szerin-proteinázgátlók közé tartozó AEBSF és aprotinin, valamint a cisztein-proteinázokat gátló cink-klorid, jodo-acetamid és N-etil-maleimid mind 24, mind 48 órával a fertőzést követően gátolta a kallózbeépülési folyamatot a BR során tapasztalható képest. A cisztein- és szerin-proteináz inhibitorokén is használható leupeptin viszont csak 24 órával a fertőzés után mutatott ilyen hatást. A jodo-acetammiddal és az N-etil-maleimmiddal kombinált baktériumos fertőzés hatására egy nappal később lényegében alig volt megfigyelhető a kallózbeépülés a vizsgált mintákban.

Az aszpartil-proteináz inhibitor pepstatin, az aminopeptidázra ható bestatin, és a szerin-proteinokat gátló PMSF alkalmazása nem járt a kallózbeépülés mértékének látható megváltozásával.

**5.4. táblázat.** A kallózbeépülés alakulása különböző proteínázgátlók hatására 24, illetve 48 órával a kezelést követően. A csak gátlószerrel kezelt növények számára a kontrollt a vízzel infiltrált, a baktérium-gátlószer kombinációjával kezelt növények számára pedig a baktériummal fertőzött növények jelentették. Szürkével azok az esetek vannak feltüntetve, ahol nem mutatkozott jelentős eltérés a kontrollhoz képest. Világoszöld szín jelzi a kontrollhoz viszonyított kevesebb, sárga pedig a több kallózbeépülést. Sötétzöld jelöli azokat az eseteket, ahol jelentősen kevesebb kallóz épült be a sejtfalba. (Magyarázatot lásd a szövegben.)

	Mintavétel a kezelés után		Mintavétel a kezelés után	
	24 órával		48 órával	
	Inhibitor	Baktérium + Inhibitor	Inhibitor	Baktérium + Inhibitor
<b>Pepstatin</b>				
<b>Leupeptin</b>		enyhén csökkent	enyhén nőtt	
<b>Bestatin</b>				
<b>E-64d</b>	enyhén nőtt			
<b>AEBSF</b>	enyhén nőtt	enyhén csökkent	enyhén nőtt	enyhén csökkent
<b>Cink-klorid</b>		enyhén csökkent		enyhén csökkent
<b>TPCK</b>	enyhén nőtt		enyhén nőtt	
<b>E-64</b>	enyhén nőtt			
<b>Jodo-acet-amid</b>		erősen csökkent	enyhén nőtt	enyhén csökkent
<b>NEM</b>		erősen csökkent		enyhén csökkent
<b>Aprotinin</b>		enyhén csökkent		
<b>PMSF</b>				

Az inhibitorok önmagukban is indukálhattak kallóz beépülést, ami a proteínázok negatív szabályozó funkcióját jelzi a korábbi génexpressziós vizsgálatokhoz hasonlóan. A folyamatok összetettségét jelzi, hogy voltak olyan inhibitorok is melyek a baktériummal együtt gátló hatást fejtettek ki viszont önmagukban kallóz beépülést indukáltak. Egy nappal a kezeléseket követően megállapítható volt, hogy a vizes kontrollhoz képest több kallóz képződött azokban a levelekben, amelyeket E-64d (cisztein), AEBSF (szerin), TPCK (cisztein) és E-64 (cisztein) proteínáz-inhibitorral kezeltünk. Két nap elteltével ilyen hatást a leupeptin, az AEBSF, a TPCK és a jodo-acetamid esetében lehetett megfigyelni.

Összességében megállapítható, hogy ahol változás volt a kontrollhoz képest, az inhibitorok önmagukbani használata a kallózbeépülés fokozódását, az inhibitorral kiegészített baktériumsuszpenziós kezelés pedig a kallózcócok számának csökkenését eredményezte.

## 5.3. Az egyes gének funkcionális vizsgálatához szükséges módszerek kidolgozása

### 5.3.1. Proteináz-aktivitás mérése

Céljaink közt szerepelt, hogy a proteinázgátlók BR-génekre gyakorolt hatásainak vizsgálata mellett<sup>14</sup> a növényekben aktívan működő egyes proteinázok aktivitását is mérjük az általános védekezés ideje alatt. Ehhez állati és humán proteináz-aktivitás méréshez alkalmazott készletet<sup>15</sup> szerettünk volna a saját kísérleti körülményeinkhez alkalmazkodva használni.

A különböző proteináz-aktivitások dinamikájának méréséhez *N. tabacum* 'Samsun' növényeket vízzel, kompatibilis gazda-kórokozó kapcsolat kialakítására képes *P. syringae* pv. *tabaci* baktériumszuszpenzióval, ugyanezen baktérium hővel előlt sejtjeiből, illetve *P. syringae* pv. *syringae hrcC*-ből készült szuszpenzióval infiltráltunk. Kontrollként egyes növényeket kezeletlenül hagytunk. Mintákat a kezelés időpontjában, majd ezt követően 3, 6, 12, 24 és 48 órával vettünk, és dolgoztunk fel. (Megjegyzendő, hogy az élő *P. syringae* pv. *tabaci*val fertőzött növényekből a 12. óra után már nem tudtunk mintát venni a levélen megjelenő előrehaladott betegségi tünetek miatt.)

A különböző proteinázok aktivitását különböző, az egyes proteinázok aktivitásainak megfelelő pH értékű pufferekben mértük. A mért fluoreszcencia értékeket a kezeletlen (negatív) kontrollban mért értékekre normalizáltuk és a friss levéltömeg alapján milligrammra vetítettük. Az 5.16. ábra a gyártó által a papain proteináz<sup>16</sup> méréséhez előírt pufferrel kapott értékeket jelöli.

A vizsgált proteináz(ok) aktivitásának dinamikája a kezeléseket követő időszakban hasonló. A fertőzést követő 3., illetve 48. órában igen magas a többi időponthoz viszonyítva. A betegségi tünetek kialakítására alkalmas *P. syringae* pv. *tabaci* fertőzés után 12 órával a proteináz aktivitás mértéke számottevően lecsökken a többi kezelés hatásához képest, holott a leveleken tüneteket csak pár órával később lehet megfigyelni.

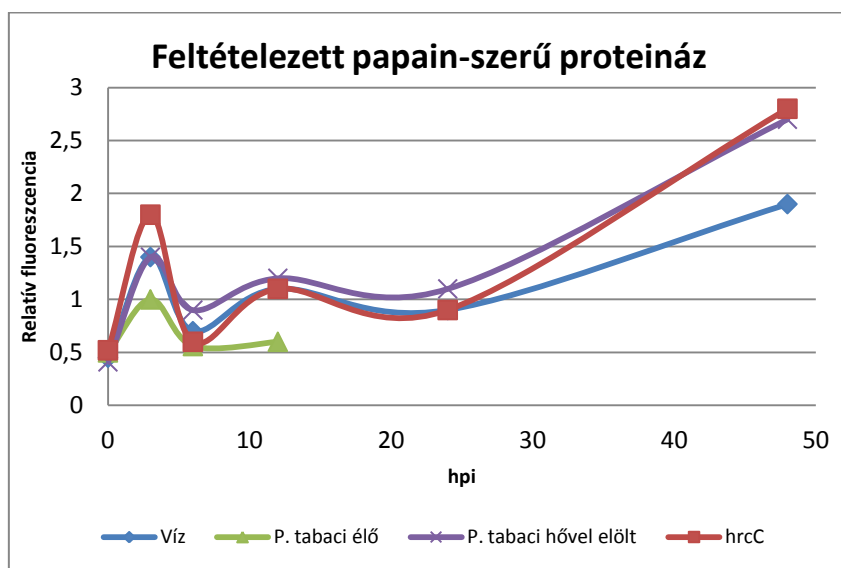
A legnagyobb különbségeket a vízzel kezelt, illetve a baktériumszuszpenziókkal infiltrált levelekben mért proteináz-aktivitás értékei között a második napon mértünk. Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az általunk vizsgálni kívánt proteinázok közül melyeknek lehet szerepe az aktivitások közötti eltérésben, a *hrcC* mutáns baktériummal kezelt növényekből a fertőzés utáni második napon nyert mintát több részre szedtük, és különböző – más kísérleteinkben is alkalmazott – proteináz-gátló szerekkel egészítettük ki (5.17. ábra).

---

<sup>14</sup> Lásd 5.2.3. pont.

<sup>15</sup> SensoLyte™ Red Protease Assay Kitet (AnaSpec Co., San Jose, CA, USA)

<sup>16</sup> A tipikusan állatokban előforduló proteinázok (pl. tripszin) méréséhez javasolt pufferek helyett, először a növényekben is jelen lévő papain mérésére alkalmas puffer használatára összpontosítottunk.



**5.16. ábra.** Papainnal azonos pH optimummal rendelkező proteinázok aktivitási dinamikája dohányban különböző kezelések hatására a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, egységnyi levéltömegre vonatkoztatva. A vízszintes tengelyen a fertőzéstől eltelt órák száma látható, a függőlegesen pedig a proteináz aktivitással arányos relatív fluoreszcencia értékek. A kezelések leírását lásd fentebb a szövegben. Az egyes értékek három minta átlagát jelölik. A könnyebb áttekinthetőség érdekében a szórásból származó hibahatárok nincsenek feltüntetve (0,01 és 0,09 közé tehetők).

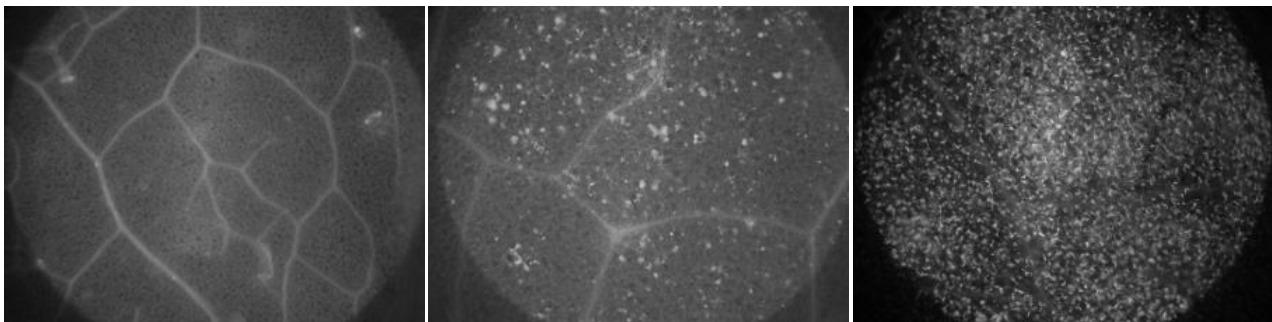


**5.17. ábra.** *P. syringae* pv. *syringae* hrcC baktériumszuszpenzióval infiltrált dohánylevelekből a fertőzést követő 48. órában vett mintákban mért relatív proteinázaktivitás különböző proteináz-gátlószerek hatására. A vízszintes tengelyen a különböző proteinázgátlók nevei vannak feltüntetve. A „kombinált” minta az összes általunk vizsgált proteinázgátlót tartalmazza. A proteinázgátló nélküli mintában (hrcC) mért értéket tekintettük 100-nak. Az egyes kezelések ennek százalékban kifejezett értékeit mutatják. Az 50%-nál kisebb aktivitású kezelések (leupeptin, cink-klorid, e64 és kombinált) értékeit zölddel emeltük ki. A mintát az 5.15. ábrán bemutatott kísérlet egyik reprezentatív mintája adta. Az ábrán három technikai ismétlés átlaga látható.

Az egyes inhibitorok gátló hatását a kezeletlen minta értékéhez viszonyítottuk. A cisztein-proteinázokat gátló leupeptin, cink-klorid és e64 kódjelű készítmény használata mellett a proteinázaktivitás mértéke több mint felére esett vissza (48,44%, 24,22%, 45,96% a felsorolás sorrendjében). Az összes általunk vizsgált proteináz-gátlót tartalmazó „kombinált” gátlószerrel az aktivitás a „tisztá minta” 49,37%-a volt.

### 5.3.2. BR kimutatása anilin-kék szövetfestéssel

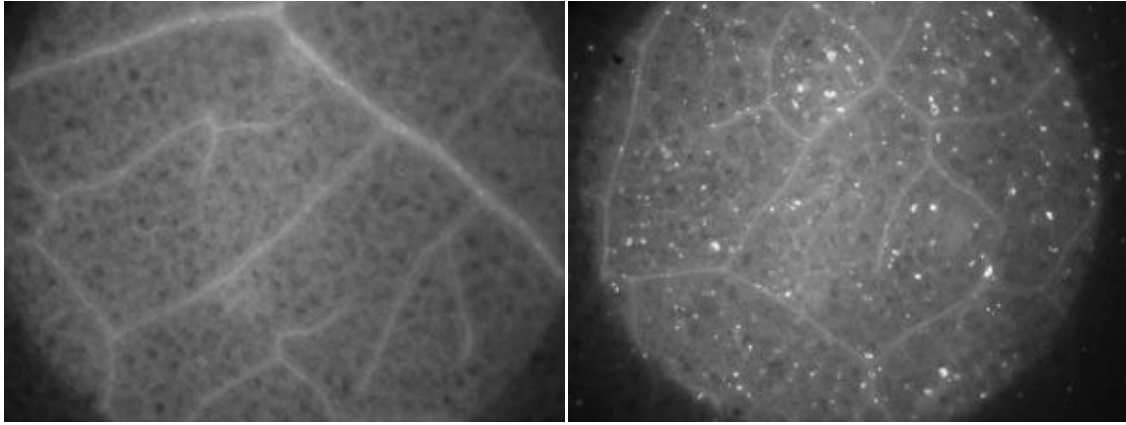
A munkáink során azonban azt tapasztaltuk, hogy az *Arabidopsisok* esetében sikeresen alkalmazott anilin-kék szövetfestés *N. tabacum* 'Samsun' növényeknél kevésbé ad konzekvens eredményt. Gyakran szembesültünk azzal, hogy ugyanazon kísérlet ugyanazon időpontjában végzett biológiai ismétléseiben eltérő mennyiségű és elhelyezkedésű kallózbeépülés volt megfigyelhető (ábrán nem jelölve). *Arabidopsis* növényeknél azonban következetesen nagyszámú kallózbeépülési góc volt megfigyelhető fluoreszcens mikroszkóppal a BR alatt. A vízzel infiltrált leveleknél is megfigyelhető volt – enyhébb mértékű - kallózbeépülés (5.18. ábra).



**5.18. ábra.** Fluoreszcens mikroszkópos felvétel *A. thaliana* anilin-kékkel festett leveleinek fonákáról. A világos foltok jelzik a kallózbeépülési helyeket. A festést a kezelést követő 24. órában végeztük. Kezelések balról jobbra haladva: kezeletlen kontrollnövény levele, vízzel infiltrált levél, *P. syringae* pv. *syringae hrcC* 10<sup>8</sup> sejt/ml koncentrációjú szuszpenzióval infiltrált levél. Az ábrán ismételt kísérletek reprezentatív eredményei láthatók.

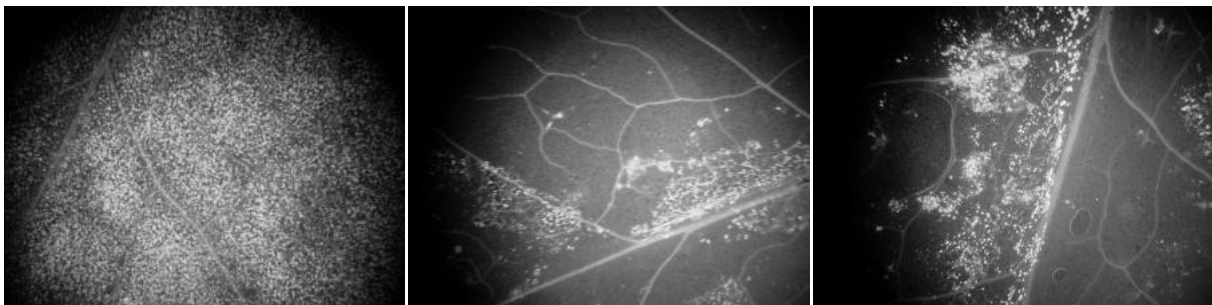
#### 5.3.2.1. Kiváltható-e az infiltrálás a szövetfestési kísérleteknél?

Irodalmi adatok (pl. Jaffe és mtsai., 1985) és előkísérleteink arra is felhívták a figyelmet, hogy a kezelések során elkerülhetetlen fizikai érintés is már számottevően befolyásolja a kallóz megjelenését különböző növényekben. Az 5.19. ábrán bemutatott felvételek *Arabidopsis* növények leveleiről készültek. A fizikai beavatkozásként a levél hasi és háti oldalát két ujjal összefogtuk, és finom, de határozott körkörös mozdulattal néhány másodpercig dörzsöltük.



**5.19. ábra.** Fluoreszcens mikroszkópos felvétel *A. thaliana* anilin-kékkel festett leveleinek fonákáról. A világos foltok a kallózbeépülési helyeket jelölik. Balról jobbra haladva: kezeletlen levél, mechanikus stressznek (ujjal való finom dörzsölésnek) kitett levél. A festés 24 órával a beavatkozás után készült. Az ábrán ismételt kísérletek reprezentatív eredményei láthatók.

Egyenletes filmréteget alakítottunk ki *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutánsból készült  $10^8$  sejt/ml töménységű szuszpenzióból, melyet felületaktív anyagokkal (nedvesítőszerrel) egészítettünk ki: Silwet77, illetve – nagyságrendekkel olcsóbb – Nonit készítményekkel. A kezelés eredményét az általunk hagyományosan alkalmazott – nedvesítőszer nélküli – baktériumszuspenziós infiltráció hatásához hasonlítottuk (5.20. ábra). A kezelés és a szövetfestés között 24 óra telt el.

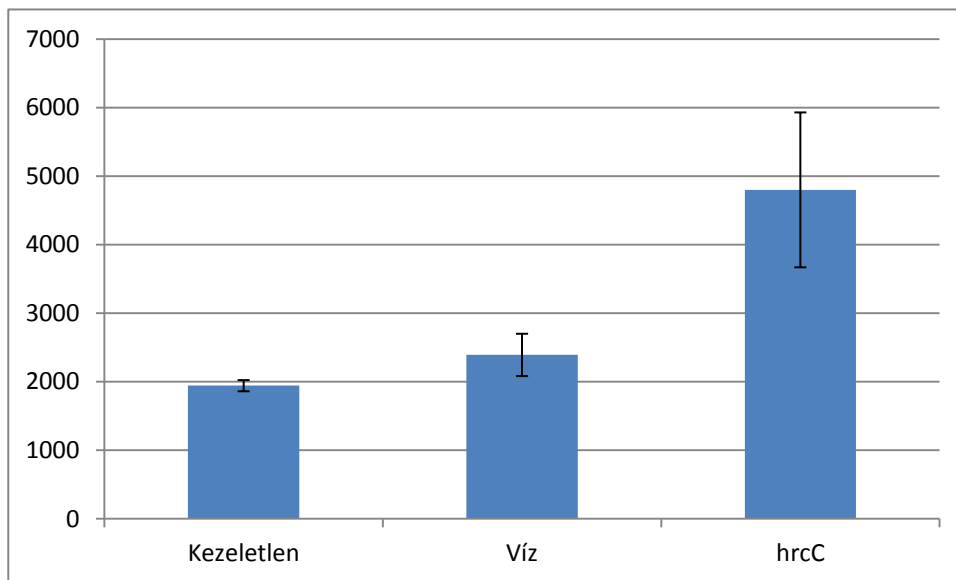


**5.20. ábra.** *Arabidopsis* levelek fonákának fluoreszcens mikroszkópos felvételei. A szöveteket anilin-kékkel festettük a kezelés utáni 24. órában. A világos foltok a kallózbeépülési helyeket jelölik. Kezelések balról jobbra:  $10^8$  sejt/ml *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrcC* baktériumszuspenzióval infiltrált levél, 0,02% Silwet-77, illetve Nonit nedvesítőszerrel kiegészített ugyanezen baktériumszuspenzióba mártott levelek. Az ábrán ismételt kísérletek reprezentatív eredményei láthatók.

Megállapítottuk, hogy míg az infiltráció egyenletes eredményt ad, a nedvesítőszerrel kombinált baktériumszuspenzióba mártás hatására csak lokális foltokban észlelhetők a kallógócok. A két nedvesítőszer hatása között egyébként számottevő különbség nem mutatkozott.

### 5.3.2.2. Számszerűsíthető-e a kallózképződés mértéke?

A pontosabb mérések érdekében igyekeztünk a Kohler és mtsai. (2000) által alkalmazott kvantitatív kallóz-fluoreszcencia mérést a saját vizsgálati igényeinknek és körülményeinknek megfelelően alkalmazni. A baktériumszuspenzióval, illetve vízzel előkezelt, valamint kezeletlenül hagyott növényekben mért fluoreszcencia értékeket szemléltet az 5.20. ábra. Ezek az eredmények megfeleltethetőek a mikroszkópos vizsgálatok eredményeivel (vö. 5.18. ábra).



**5.20. ábra.** *Arabidopsis* növények leveleiből kivont kallóz fluoreszcenciája friss levéltömegre, illetve ismert koncentrációjú laminarin fluoreszcenciájára vonatkoztatva. (Az értékekből az anilin-kék autofluoreszcenciáját levontuk.) Az első oszlop a kezeletlen, a második a vízzel, a harmadik pedig a *P. syringae* pv. *syringae* hrcC  $10^8$  sejt/ml koncentrációjú szuszpenziójával infiltrált levelekből a kezelés után 24 órával készült kallózkivonatnál kapott relatív fluoreszcencia-értéket jelöli. Az ábrákon 3-3 kísérlet eredményeinek átlaga látható.

### 5.3.3. *Arabidopsis* modell alkalmazása funkcionális genomikai vizsgálatokhoz

Vad típusú növényeken végzett transzkripciós vizsgálatokon kívül felmerült a lehetősége annak is, hogy a funkcionális genomikai munkáinkat olyan módszerekkel egészítsük ki, ahol az általunk vizsgálni kívánt génre nézve módosított növényeket használunk. Mivel a Nottinghami *Arabidopsis* Törzsgyűjteményben<sup>17</sup> igen nagyszámú génre nézve mutáns növény magja érhető el készen, ezért kézenfekvőnek tűnt, hogy ezeket bevonjuk vizsgálatainkba. Szignál és proteináz génekben mutáns növényeket kerestünk, mégpedig olyanokat, melyek aktivációja valamilyen irányban jelentősen (legalább 2X-es mértékben megváltozott a baktériumfertőzés – lehetőleg HR-t nem okozó kezelés – hatására).

Szignál mutáns növények kiválasztásához a dohányokban megismert jelátviteli gének ortológjait kellett megkeresnünk *Arabidopsis*-ban, majd egy interneten is elérhető adatbázisban<sup>18</sup> összehasonlítottuk, hogy az adott gének aktivációja hogyan változik különböző stresszek hatására. Az adatbázisban szereplő mintegy kilencven – biotikus és abiotikus – stresszfaktor közül az általunk modellként használni kívánt *P. syringae* baktériumra adott választ ellenőriztük, és azokat a géneket választottuk ki, melyek szignifikánsan nagyobb aktivitást mutattak („*upregulálódtak*”) a fertőzés hatására a kezeletlen kontrollhoz képest (5.21. ábra).

<sup>17</sup> Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC

<sup>18</sup> <https://www.geneinvestigator.ethz.ch>



Biotic: <i>M. persicae</i> (+)	3	190	74		1.43
Biotic: mycorrhiza (+)	2	4757	185	■	0.98
Biotic: nematode (+)	1	6126	0	■	1.04
Biotic: <i>P. infestans</i> (+)	6	1537	250	■	7.39
Biotic: <i>P. rapae</i> (+)	0			n/a	n/a
Biotic: <i>P. syringae</i> (+)	9	4539	690	■	4.16
Biotic: <i>P. syringae</i> (*)	0			n/a	n/a
Chemical: 2,4,6 T (+)	2	667	116		1.22
Chemical: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (+)	2	454	28		1.64
Chemical: 4-thiazolidinone/acetic acid (+)	3	2948	407	■	2.11
Chemical: 6-benzyl adenine (+)	2	279	30		0.38

**5.21. ábra.** Példa a Genevestigator adatbázisának az egyes stresszfaktorokra vonatkozó relatív génexpressziókat bemutató táblázatára. A munkák szempontjából legfontosabb leolvasható adatok egy adott génre: a bal oldali oszlopban a különböző stresszhatások (kiemelten a *P. syringae* fertőzésre adott válasz) szerepelnek, a jobb szélső oszlopban pedig a kezeletlen növényhez viszonyított relatív génkifejeződési szint. Az értékek háttérszínénél a piros a serkentést, a zöld a génaktivitás csökkenését jelzi. Minél mélyebb a szín, annál jelentősebb a különbség a kezeletlen és a fertőzött növényben mért génexpresszió mértéke között.

A jelen dolgozat által átfogott időszakban a kiválasztott génekre nézve mutáns növények magjait megrendeltük, majd – a kísérletek fenntarthatósága érdekében – magfogás céljából termesztésbe vontuk őket. Bár elsősorban a vizsgált gén szempontjából homozigóta növények magjait igyekeztünk rendelni, ahol azonban erre nem volt lehetőség, a homozigóta vonalakat magunk állítottuk elő.

A proteínáz génekre nézve mutáns növények kiválasztásához kétféle megközelítést használtunk. Egyrészt cisztein, és szerin típusú proteázok, illetve cisztein proteínáz inhibítort kódoló géneket kerestünk *Arabidopsis*-ban. Azért éppen ezeket, mert a korábbi kísérleteinkben azt figyeltük meg, hogy ezek a típusú proteáz gének aktiválódtak a legjobban a baktériumfertőzésre, illetve az proteáz inhibitorokkal végzett kísérletek is utaltak e típusú proteázok lehetséges szerepére a BR-ben. Az adatbázisból<sup>19</sup> kikeresett géneknél az *Arabidopsis eFP Browser*<sup>20</sup> segítségével ellenőriztük, hogy válaszolnak-e baktériumfertőzésre vagy valamely BR-t indukáló baktérium alkotórészre (pl. flagellin, LPS). Ezek közül azokat választottuk ki, melyek aktivációja legalább kétszeres mértékben fokozódott vagy mérséklődött lehetőleg többféle kezelés hatására is (18 db).

A másik megközelítés esetében nyilvános microarray adatbázisból<sup>21</sup> olyan adatsorokat töltöttünk le, melyek a fertőzés után különböző időpontokban készült expressziós értékeket tartalmazták a *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 törzs betegségét nem okozó *hrcC* baktérium fertőzése után. Az egyes időpontokhoz tartozó biológiai ismétlések értékeit átlagoltuk,

<sup>19</sup> [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)

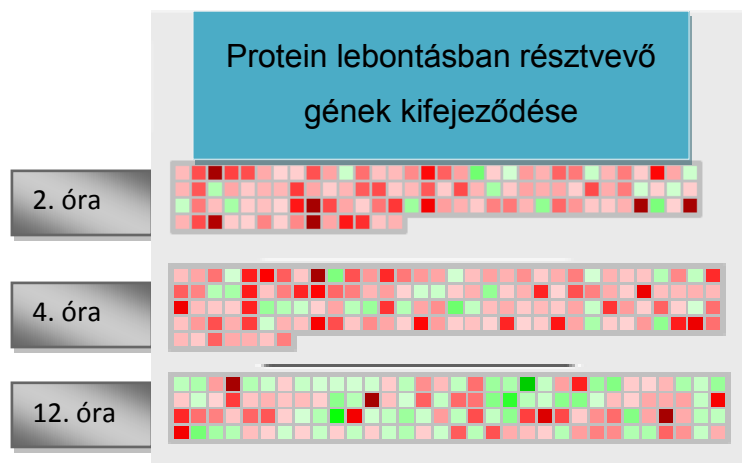
<sup>20</sup> <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>

<sup>21</sup> Pl. NASC's International Affymetrix Service (<http://affymetrix.arabidopsis.info>)

majd a MAPMAN szoftver (Thimm és mtsai., 2004) segítségével jelenítettük meg az egyes időpontokban a fehérjelebontásban részt vevő gének kifejeződését (5.22. ábra).

Az ábrából megállapítható, hogy nagy számban változik meg a protein lebontásban részt vevő gének expressziója a BR alatt. A baktérium bejuttatása utáni korai időszakban (2. és 4. óra) a gének nagy része aktiválódott, míg a későbbi időszakban (12. óra) a csökkent aktivitású gének száma nőtt meg.

Az egyes gének időbeli aktivitásváltozásának elemzése azt mutatta, hogy számos gén esetén az átíródás hullámzott, azaz korai aktivált génből represszált lett vagy fordítva. De olyan gén is volt, mely az aktivitását mindhárom időpontban az ellenkező irányba változtatta.



**5.22. ábra.** *Arabidopsis* protein lebontásban részt vevő gének átíródása *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 *hrcC* betegséget nem okozó mutáns baktériumok infiltrálása után különböző időpontokban. Az adatokat nyilvános adatbázisból töltöttük le, majd MAPMAN programmal osztályoztuk és ábráztuk (részletek a szövegben). Mindegyik négyzet egy-egy gén kifejeződési szintjét jelöli a nem injektált kontrollhoz képest. A piros az aktivációt a zöld repressziót jelöli. A színek intenzitása a változás mértékét jelöli.

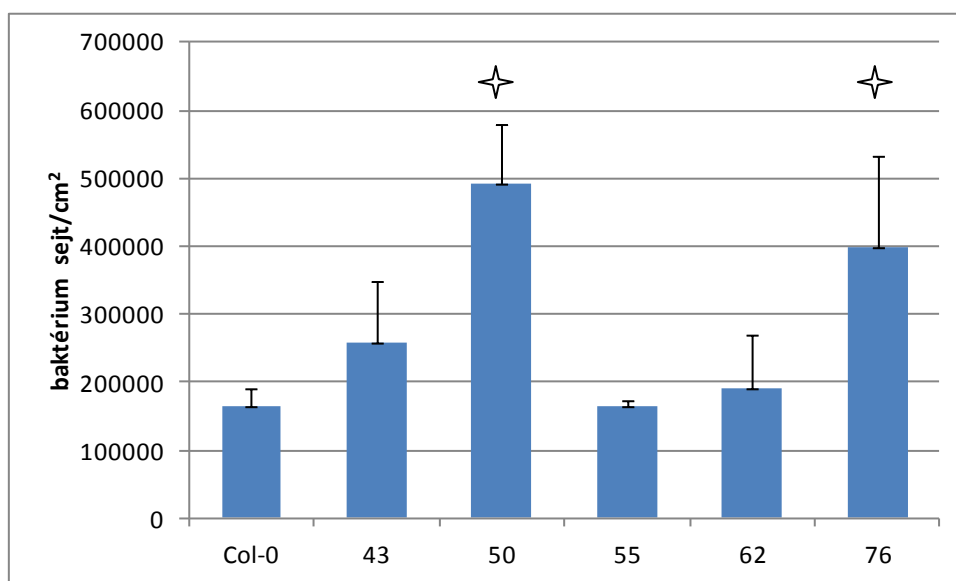
Ezután a Nottinghami *Arabidopsis* Törzsgyűjteményből a megváltozott aktivitású proteináz gének T-DNS mutánsait kerestünk. Elsősorban olyanokat, amelyeknél a T-DNS beépülése az adott gén exonjába vagy a promóter régiójába történt, nagyobb eshetőséget adva a mutáció fenotípusos megjelenésére. Ebben az esetben is olyan mutánsokat választottunk a magbankból mely a mutációra homozigóta volt (60 db).

Közel nyolcvan (78 db) magot rendeltünk majd ezeket elvetve és ebből a növényeket felnevelve baktériumfertőzésre teszteltük őket. A növények egészséges állapotban fenotípusosan nem mutattak jelentős eltérést a vad Col-0 növényekhez képest.

Először olyan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 törzssel fertőztük a növényeket, amely egy lumineszkáló (ún. lux) gént hordoz (Fan és mtsai., 2008). A lumineszcencia változásából így arányosan tudunk a baktériumszám változásának mértékére következtetni. Ez a módszer, mivel nem igényli a baktériumok izolálását a növényből lehetőséget teremt nagyszámú növény egyidejű tesztelésére. Alacsony koncentrációban ( $10^5$  sejt/ml) injektáltuk a növényeket a baktérium szuszpenzióval, majd a 2. és 3. napon korongokat vágunk ki a fertőzött levelekből, melyekből megmértük a lumineszcencia értékét.

Az ismétlések során viszonylag nagy szóródást tapasztaltunk az értékekben (nem mutatott adat), ami a lumineszcenses mérési módszer korlátját jelzi. Azonban ezekből a tájékoztató jellegű adatokból ki tudunk választani néhány olyan mutáns növényt, amelyben a baktérium kiváltotta lumineszcencia az ismétlésekben nagyobb valószínűséggel mutatott magasabb vagy alacsonyabb értéket a kontroll növényekhez képest. Ezeket részletesebb baktériumszaporodási kísérleteknek vetettük alá.

Az 5.23. ábrán 50-es számmal jelölt (karboxipeptidáz, At1g73270) és a 76-os (szubtiláz, AT4G10540) mutáns növényben szignifikáns baktériumszám különbséget tudunk kimutatni a vad típusú növényhez képest a fertőzést követő harmadik napon.



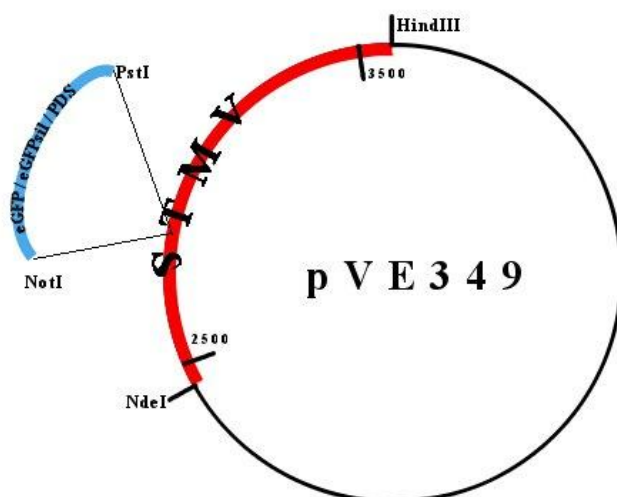
**5.23. ábra.** A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 kompatibilis baktérium sejtszáma vad (Col-0) és protein lebontásban részt vevő mutáns (43, 50, 55, 62, 76) *Arabidopsis* növényekben. A baktériumokat  $10^5$  sejt/ml koncentrációban injektáltuk a levelekbe, majd a 3. napon levélkorongokat vágunk ki majd hígítási és tenyésztési módszerrel meghatároztuk a szövetben lévő baktériumok számát. A csillagok a Col-0 kontrolltól szignifikánsan eltérő ( $P < 0,01$ ) mutáns növényeket jelölik. A hibavonalak a szórást jelölik. A kísérletet kétszer ismételtük meg hasonló eredménnyel.

### 5.3.4. Géncsendesítés dohányban (*N. tabacum*)

#### 5.3.4.1. Szatellitvírus (STMV) által kiváltott géncsendesítési rendszer (SVISS) konstrukciójának létrehozása

Az előző pontban ismeretett, *Arabidopsis*okra alkalmazható módszer mutánsok hiányában, dohány esetében csak nehezen lenne megvalósítható. Éppen ezért itt vírus által kiváltott géncsendesítés (VIGS – *viral induced gene silencing*) módszerét szerettük volna bevezetni. Ehhez a Gosselé és mtsai. (2002) által kidolgozott rendszert illesztettük a saját vizsgálatainkra.

Mivel kizárólag az imént hivatkozott publikációra támaszkodva nem tudtunk hatékony géncsendesítést elérni a dohány növényekben, ezért a géncsendesítés hatékonyságát jelző, illetve annak metódusát megkönnyítő STMV konstrukciókat hoztunk létre. Mivel az eredeti cikkben a konstrukció leírása nem volt pontos a cikk mellett a kutatócsoport által benyújtott szabadalmi leírást (Metzlauff és mtsai., 2003) is felhasználva. Megállapítottuk, hogy több helyen is eltérés mutatkozik a két dokumentum között. Ezért *in silico* rekonstruáltuk a pVE349 vektor szekvenciáját (5.24. ábra).



**5.24. ábra.** A pVE349 rekonstruált térképe. A NotI, illetve a PstI hasítóhelyek közé építhetők be azok a szekvenciák (eGFP: a teljes eGFP-t kódoló szekvencia; eGFPsil: az eGFP; illetve PDS: a fitoén-deszaturáz csendesítéséhez szükséges szakaszok), amelyeket a kísérleteinkben használtunk.

Első kísérleteink során a dohány fitoén-deszaturáz génjének csendesítésével<sup>22</sup> ellenőriztük a módszer hatékonyságát. Megállapítottuk, hogy a közvetlenül a TMV-U2 törzzsel és transzformált STMV szatellitjével való fertőzés nem hoz kielégítő eredményt dohányon: a leveleknek csak kis része fehéredik ki napfény hatására. Azt tapasztaltuk viszont, hogy a kifehéredett részekből vett homogenizált mintát passzáláshoz felhasználva már jelentősebb mértékben jelentkezik a csendesítés hatása (5.25. ábra)

<sup>22</sup> Ennek hiányában napfény hatására a kloroplasztisz gránumok sérülnek, a növény “kifehéredik”. Számos herbicid szintén a fiton-deszaturáz gátlásán keresztül fejt ki hatását. Lásd még: 5.3.3.2. szakasz.



**5.25. ábra.** Dohánynövények fiatal levelei üvegházban, erős napfényugárzás mellett a fitoén-deszaturáz gén csendesítése után. Balra: közvetlen fertőzés hatása az *in vitro* előállított transzformált STMV-vel (illetve TMV-U2 segédvírusával). Jobbra: Az előző növények jól láthatóan kifehérdett részeiből nyert inokulummal való fertőzés hatása.

Természetesen a fotoszintézis hiányát okozó fitoén-deszaturáz nem ideális marker a géncsendesítés ellenőrzéséhez mert a levelek jelentősen megváltoztathatják a viselkedésüket és a kórokozókra adott válaszukat fotoszintézis nélkül. Éppen ezért olyan módszert dolgoztunk ki, amely alkalmas lehet arra, hogy könnyen ellenőrizhetően jelezze a csendesítés létrejöttét, ugyanakkor ne sérüljenek a növényben olyan funkciók, amelyek a vizsgálatainkat (különösen a BR-hez köthető folyamatokat) befolyásolhatják. Éppen ezért markerként a fokozott zöld fluoreszcens fehérjét (eGFP) tervezzük a jövőben alkalmazni.

Az eGFP markerként való felhasználásakor kétféle stratégiát alkalmazhatunk: vagy a teljes eGFP fehérjét kifejeztetjük a növényvel, és ehhez kapcsoljuk az általunk vizsgálni kívánt gént csendesítő szakaszt, vagy pedig magát az eGFP-t is csendesítjük. Ehhez azonban olyan transzgenikus dohánynövényre van szükség, amely eleve eGFP-t fejez ki. A jelen dolgozat anyagát képező munkák lezárásáig ez utóbbi változattal már értünk el sikereket.

Az eGFP csendesítéséhez szükséges szekvenciát tartalmazó STMV és TMV-U2 kombinációjával fertőzött dohányleveleket sötétszobában, ultraibolya fényel megvilágítva vizsgálhatjuk. Kihasználva, hogy UV fényel gerjesztve az eGFP kibocsátási hullámhossza elnyomja a klorofill kibocsátási hullámhosszát, a csendesítésben nem érintett részek zöldes színnel, míg a megfelelően csendesedett részek vöröses színnel „világítanak” (ábrán nem jelölve).

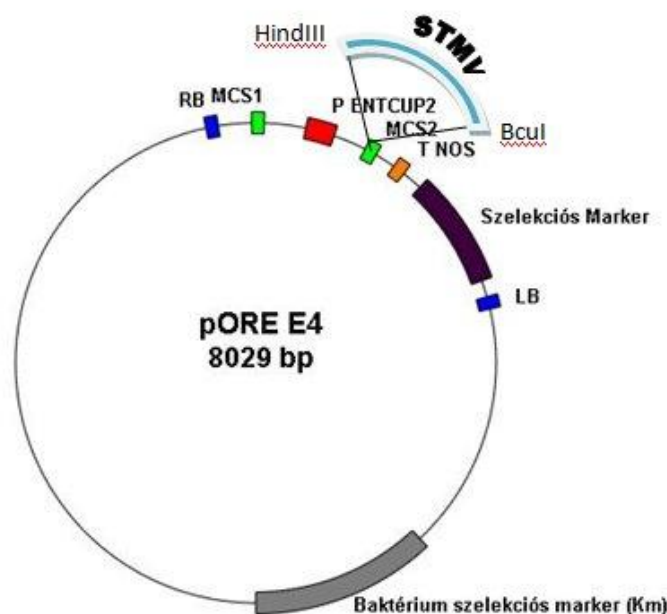
#### **5.3.4.2. *Agrobacterium* vektor konstrukció létrehozása az STMV szatellit vírus átmeneti expressziójához növényi szövetben**

Az eredeti módszer szerint (Gosselé és mtsai., 2002) a fertőzéshez szükséges STMV szatellit vírus RNS-t *in vitro* transzkripcióval állítottuk elő, ami egyrészt költséges, másrészt a termelt RNS sérülékeny és nehezen kezelhető. Ezeket a hátrányokat kiküszöbölendő a szatellit vírust (az üres, és

a fehéredés markert okozó PDS génszakaszt hordozó változatot) egy *Agrobacterium* bináris vektorba építettük a következők szerint (5.26. ábra):

A vírust kódoló részt a vírus két végére tervezett primerek segítségével a plazmidból (pVE311 és pVE349) felszaporítottuk. A PCR terméket a primerek által tartalmazott HindIII és BcuI restrikciós helyeken emésztettük és ligáltuk ugyanezekkel az enzimekkel emésztett a pORE E4 bináris plazmidba a pENTCUP2 magas átíródást biztosító promóter mögé. Az ellenőrzött plazmid konstrukciót *A. tumefaciens*-be transzformáltuk. A vírust kódoló DNS szakaszt így az *Agrobacterium* segítségével a növénybe juttattuk, ahol a bináris vektorról íródott át a vírus RNS-e.

Ehhez az éjszakán át növesztett pORE E4/STMV plazmidot tartalmazó *Agrobacterium*-ot a megfelelő inkubációs pufferbe (a baktérium sűrűséget  $OD_{600} = 1$ -re beállítva) történő inkubálás után fiatalabb (2-3 leveles) és idősebb (4-5 leveles) *N. tabacum* cv. „Samsun” nn növényekbe injektáltuk, majd ugyanezen levelekre a TMV-U2 törzsét tartalmazó 0,2 M foszfát pufferben szédörzsölt levélkivonattal kentünk. A fertőzés után három héttel a fiatalabb Samsun növényeken az ér mentén a PDS géndarab által kiváltott fehéredést tapasztaltuk (5.27. ábra).



**5.26. ábra.** Az STMV-t kódoló génszakasz beépítése pORE E4 bináris *Agrobacterium* plazmidba (részletek a szövegben). RB: a T-DNS jobb oldali határa, LB: a T-DNS bal oldali határa, MCS: sok klónozó hely, pENTCUP2: növényi promóter, T NOS: terminátor, szelekción marker: növényi szelekción marker kanamicin, Baktérium szelekción marker: kanamicin.



**5.27. ábra.** *N. tabacum* cv. „Samsun” nn növény üvegházban, erős napfény sugárzás mellett a fitoén-deszaturáz gén csendesítése után három héttel. A csendesítéshez használt konstrukció leírását lásd a szövegben.

#### 5.4. Új tudományos eredmények

1. A *P. syringae* pv. *syringae* HR-negatív mutánsával kiváltott általános védekezés (BR) képes mérsékelni egy későbbi dohány mozaik vírussal történő felülfertőzés tüneteit késleltetni, illetve mérsékelni kompatibilis vírus-növény kapcsolat esetén, valamint csökkenteni a HR nekrózisos számát inkompatibilis kapcsolatnál. A BR szintén gátló hatással van a TMV replikációjának mértékére.
2. Hidrogén-peroxidot ellensúlyozó antioxidáns gének indukálódnak a BR késői stádiumában (48 hpi) TMV felülfertőzés esetén, ami hozzájárulhat a vírus hatására kialakuló léziók visszaszorításához.
3. Több, kutatócsoportunk által korábban azonosított, elsősorban jelátviteli folyamatokhoz, illetve fehérjeanyagcseréhez kapcsolható BR-gén transzkripció aktivitásának időbeli változását sikerült nyomon kövünk. Így megállapítható, hogy a BR ideje alatt melyik gén termékei mely időszakokhoz köthetők.
4. Hat különböző jelátviteli utat gátolva megállapítottuk, hogy a foszfolipáz-A2 és -D útvonal gátlása jellemzően korai változásokat eredményezett az általunk vizsgált 16 BR markergén transzkripció mintázatában, a foszfolipáz-C gátlása ugyanakkor inkább kései génexpressziós eltérésekhez vezetett.
5. Hét különféle hatású proteinázgátló vegyület segítségével kimutattuk, hogy a fehérjék lebontásában részt vevő faktorok jellemzően negatív regulátorai a BR során dohányban fellépő korai transzkripció változásoknak. Hasonló kísérletben tizenkét proteináz inhibitor felhasználásával megállapítottuk ugyanakkor, hogy a proteinlebontásban érintett faktorok serkentik az *Arabidopsis* levelek BR során bekövetkező későbbi kallózbeépülését.
6. Burgonya cDNS chip felhasználásával jellemeztük öt jelátviteli út gátlásának hatását a BR korai (6 hpi) transzkripció mintázatára, kimutatva 99 BR-ben érintett gén szabályozásának kapcsolatát az említett öt jelátviteli út valamelyikével.
7. Növényi aktív proteináz méréssel alátámasztottuk, hogy egy feltételezett papain-szerű (cisztein-) proteináz feldúsul a dohánylevelekben a BR ideje alatt.
8. *Arabidopsis* mutánsok vizsgálatának segítségével azonosítottunk két szerin-proteináz gént (karboxipeptidáz és szubtiláz), amelyek valószínűleg pozitív regulátor szerepet töltenek be *Arabidopsis*-ban a BR alatt.
9. A SVISS-t (*satellite virus-induced silencing system*; szatellitvírus indukálta géncsendesítés rendszere) alapul véve új TMV szatellit vírus (STMV) expressziós- és csendesítő konstrukciókat fejlesztettünk ki funkcionális genomiakai vizsgálatok céljára.



## 6. Következtetések és javaslatok

### 6.1. A baktériumok által kiváltott általános rezisztencia vírusfertőzés lefolyására gyakorolt hatása

Kísérleteink azt mutatták, hogy az általunk használt általános védekezést kialakító, de HR-t nem okozó baktériummal előkezelt levelekben a vírus által kiváltott tünetek mérséklődtek (kompatibilis kapcsolat), illetve a vírus okozta hiperszenzitív válaszként megjelenő nekrozisok száma is csökkent. Emellett azt is megállapítottuk, hogy a vírus RNS mennyisége, azaz a vírus replikációja is mérsékeltebb volt a baktériummal előkezelt szövetekben.

Ennek háttérében az állhat, hogy a különböző típusú (baktérium, gomba, vírus) kórokozókra adott védekezési reakciók között is sok hasonlóság van – sőt, az abiotikus és biotikus stresszekre adott válaszok is tartalmaznak átfedéseket. Erre jó példa a sebzésre mint mechanikus stresszre adott növényi válasz, amely részben megegyezik a patogénekre adott reakciókkal (Cheong, 2002). Ez magyarázatot ad arra is, hogy kísérleteinkben a kontrollként vízzel történő injektálás miért adott hasonló – bár gyengébb – választ, mint a baktériumos kezelés.

A védekezési reakciók e fajta átfedése miatt lehetséges, hogy a baktérium a vírus elleni védekezési folyamatokat is aktiválja. Ennek lehet az a magyarázata, hogy a növények esetében még nem fejlődött ki az egyes kórokozókra adott speciális válasz képessége. De elképzelhető az is, hogy a növény szempontjából ez a stratégia bizonyult hatásosabbnak, hiszen az egyik stresszfaktor megjelenése lehetőséget adhat más faktorok érvényesülésére (pl. a sebzés a kórokozók megtelepedésére és felszaporodására). Ez a fajta általános válasz azonban nem tartható fenn sokáig, hiszen nagy energiaigénye folytán kimerítené, és más stresszekkel szemben védtelenné tenné a növényt. Az eddigi vizsgálatok is azt mutatják, hogy az általános védekezési folyamatok korai, széleskörű szakasza csak átmeneti; kb. egy napon belül lezajlik.

Azt, hogy a baktérium indukálta BR milyen módon gátolja a vírust és az általa kiváltott tüneteket csak feltételezni tudjuk. Ez történhet a vírusreplikáció vagy a vírusterjedés akadályozásával. A vírusedzés gátlása végbemehet pl. a vírus replikáció akadályozásának vagy a vírus RNS lebontásának segítségével. Ennek eszköze lehet a vírusok elleni védekezésben fontos szerepet játszó géncsendesítés „silencing” jelensége (Waterhouse és mtsai., 1999). Arra azonban tudomásunk szerint nincs irodalmi adat, hogy a baktérium által kiváltott általános védekezés aktiválja-e a silencing mechanizmust vagy annak egyes elemeit. A vírus terjedésének gátlásában nagy szerepe van a plazmodezmák átjárhatóságának szabályozásának. Az átjárhatóságot többek között a kallóz plazmodezmákban történő lerakódása befolyásolja (Roberts és Oparka, 2003; Beffa és mtsai., 1996; Wenlong és mtsai., 2012). Az ismert, hogy a baktérium kiváltotta általános

védekezés során a baktérium tapadásának helyén a sejtfal és a sejtmembrán között különböző sejtfalerősítő anyagok, így kallóz lerakódása figyelhető meg (Brown mtsai. 1998). Azt is megállapították, hogy ha ez a sejtfalarősítő folyamat így a kallóz lerakódása gátolt, akkor az egyébként szaporodásában gátolt baktérium osztódhat (Debroy és mtsai., 2004). Elképzelhető, hogy a baktérium által kiváltott általános védekezés során aktiválódó kallóz-szintetizáló rendszer a plazmodezmák eltömésével a vírus terjedését is gátolja. A vírus replikációgátlásának egy harmadik lehetséges módja, hogy a gazdanövényben gátlódik az olyan fehérjék szintézise, amely a vírusreplikációhoz vagy terjedéséhez szükséges (Lee és mtsai., 2001; Yamanaka és mtsai., 2000). Az is lehetséges, hogy a baktérium indukálta általános védekezés nem aktivál olyan folyamatokat, amelyek a vírus közvetlen gátlásában részt vesznek, hanem csak olyan állapotba hozza a növényt, amely során a későbbi vírusfertőzésre gyorsabban válaszol (gyorsabb, nagyobb mérvű génaktivitás növekedés stb). Ez egy viszonylag jól ismert jelenség melyet „priming”-nak vagy érzékenyítésnek is szoktak nevezni (Conrath és mtsai., 2002).

Az eredményeink azt mutatták, hogy a vírus által kiváltott nekrotikus tünetekhez és a vírus replikációjához hasonlóan a vírus indukálta növényi génaktivitások is több esetben gátlódtak azokban a mintákban, ahol az általános rezisztenciát előzőleg a HR-negatív *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* baktériummal aktiváltuk. Az általunk vizsgált gének közül az orto-metil-transzferázoknak kardinális szerepe van a fenilpropanoid út kumarinokhoz és a ligninek különböző alegységeihez (monolignolok) vezető lépéseiben (Maurey és mtsai., 1999). A vírusok és gombák elicitoraival sikerült kiváltani az orto-metil-transzferázok intenzív termelését. (Pakusch és mtsai., 1989; Schmitt és mtsai., 1991; Pellegrini és mtsai., 1994).

Némiképp hasonló dinamikát figyeltünk meg az epoxid-hidroláz esetében is, amelyre azért is esett a választásunk, mert Guo és mtsai. (1998) kifejezetten a TMV-vel szembeni rezisztenciaválasszal hozták összefüggésbe ennek a génnek az aktivitásváltozását *N. tabacumban*. Persze az epoxid-hidrolázoknak növényi és állati szervezetekben egyaránt fontos szerep jut: az epoxidok egy részének DNS- és fehérjeroncsoló természete van (Murray és mtsai., 1993). Az epoxid-hidrolázok ezt a káros hatást segítenek kivédeni azáltal, hogy az epoxidok diollá alakulását katalizálják (Oesch, 1973).

Ezek a mérséklődő génaktivitások arra utalhatnak, hogy ezeknek a géneknek az átíródása itt a válaszreakciónak inkább következménye, mint oka.

Az antioxidáns enzimek aktivitásváltozása viszont azt sugallja, hogy a hidrogén-peroxid mennyiségének esetleg szerepe lehet a tünet kialakításában. Az aktív oxigénformák különböző fajtái, így a szuperoxid és a hidrogén-peroxid számos fontos szerepet játszanak a rezisztencia

válaszok kialakulásában. Jelenlétükkel és reakcióképességükkel hozzájárulhatnak a növényi sejthalál indukálásához, emellett jeltovábbító szerepük is ismert, sőt közvetlenül is gátolhatják a kórokozók és egyéb mikroorganizmusok aktivitását (Baker és Orlandi, 1995). Túlzott felszaporodásukat, az egyensúlyi helyzet fenntartását számos enzimatikus és nem-enzimatikus antioxidáns szabályozza (Ádám és mtsai., 1995). A vírus okozta nekrotikus tünetek és a vírus replikációjának gátlása egyébként sokszor elválik egymástól. A HR gátlása nem feltétlenül jár együtt a vírusterjedés gátlásával. Az *N* génnel rendelkező növényekben a vírusok akkor is lokalizálódnak, amikor a HR-es nektrózisok elmaradnak (Mittler és mtsai., 1996), illetve a nektrózis kiprovokálása nem feltétlenül akadályozza a vírus replikációját (Hafez, 2005).

Vizsgálatainkban a kataláz és a dehidroaszorbát-reduktáz gének aktivitása a baktériummal és vírussal is fertőzött szövetekben jelentősen emelkedett, míg a csak vírussal, illetve vizes előkezelést követően vírussal fertőzött mintákban csökkent. Ezek a változások azt sugallják, hogy a baktériummal előkezelt szövetekben a vírusfertőzés egy szakaszában a hidrogén-peroxid lebontása jelentősebb lehet, illetve az alacsonyabb szuperoxid-diszmutáz aktivitás folytán termelődése is mérsékeltebb. Ami így együtt (ha az enzimaktivitás szintek is követik a génaktivitás változásokat) a baktériummal előkezelt szövetekben a hidrogén-peroxid szint csökkenéséhez vezet. A hidrogén-peroxid fiziológiás koncentrációban önmagában ugyan nem tud növényi sejthalált kiváltani, de más molekulákkal pl. a nitrogén-monoxiddal együtt igen (Delledonne és mtsai., 1998). Az alacsonyabb hidrogén-peroxid szint így gátolhatja a sejthalál kialakulását (a nektrózisok létrejöttét), de más módon – pl. más védekezési folyamatok szignálmolekulájaként – is megváltoztathatja a védekezési reakció kimenetelét (Hafez, 2005).

Ahol a BR kiváltása után hat órával fertőztük felül a növényeket, erőteljes HR gátlás jelentkezett. Az előkezelések után egy nappal felülfertőzött növények esetében szintén erőteljes volt a HR gátlása, itt azonban több helyen nemcsak a baktériummal, hanem a vízzel előkezelt levélfeleken is megfigyelhető volt a gátlás kialakulása. Ennek a jelenségnek valószínűleg az az oka, hogy az injektálásból származó fizikai stressz erőteljesebben indukál olyan folyamatokat, amelyek a BR egy késői szakaszára jellemzőek.

A szimultán fertőzésben részesülő növények alsó leveleinek erőteljes nektrózálódása arra enged következtetni, hogy a növény nehezen tolerálja az egy időben fellépő különböző biotikus és abiotikus stresszfaktorok hatásait. Mivel a gyökérnyaktól felfelé haladva a szövetek kora csökken, megállapítható, hogy ez a tolerancia a fiatal levelekben nagyobb, mint az idősebbekben. Látható volt, hogy azok a levélfelek, ahol vizes kezelést alkalmaztunk, jobban tolerálták a kombinált fertőzést, hiszen ezek a területek a vírusfertőzés mellett csak ozmotikus és mechanikai stressznek voltak kitéve, míg a másik levélfél ezeken felül a baktériumok okozta stresszel is szembesült.

Ott, ahol a baktériumos fertőzés a TMV fertőzést követte, szintén megfigyeltünk HR-gátlást bizonyos esetekben. Ez vélhetően arra vezethető vissza, hogy az első újonnan szintetizált vírus RNS-ek az inokulálást követően 6-8 órával jönnek létre a növényben (Ishikawa és mtsai., 1991), tehát körülbelül akkor, amikor kísérleteinkben a baktériumos felülfertőzést végeztük. Az eredményeinkből így arra következtethetünk, hogy a baktérium által indukált BR-nek még akkor is van HR-gátló hatása, amikor a vírusreplikáció folyamata már beindult.

A növényben újonnan szintetizált vírus RNS-ek 6-8 órával a fertőzést követő megjelenése (Ishikawa és mtsai., 1991) magyarázatot adhat arra is, hogy a TMV fertőzés után 24 órával kialakított BR már miért nem képes megakadályozni a vírus indukálta HR létrejöttét. Ekkorra ugyanis már beindul a növény vírussal szembeni hiperszenzitív válaszána indukciója.

## **6.2. A BR során megváltozott aktivitást mutató jelátviteli folyamatokban és protein lebontásban részt vevő gének vizsgálatai**

### **6.2.1. Jelátvitellel kapcsolatba hozható gének aktivitásának változásai a BR alatt**

A dolgozat Eredmények fejezetében példaként hozott MAP-kináz génekhez hasonlóan számos gén aktivitása kifejezetten a BR-t kiváltó baktérium hatására emelkedett erőteljesebb mértékben a kezeletlen kontrollhoz képest, mint a vizes álfertőzésben részesített növények ugyanezen génjei.

Tapasztalatunk szerint mind a víz, mind a baktérium hatással volt szinte az összes gén kifejeződési szintjére. Jóllehet, eltérés mutatkozott, hogy ez az eltérő aktivitás a fertőzést követő mely időpontokban volt meghatározó.

A MAP-kinázok esetében – talán meglepő módon – nem a fertőzést követő korai időpontokban haladta meg a „BR-es” mintákban mért érték a „vizesekét”. Ennek oka lehet az, hogy az erős ozmotikus hatásból származó stressz ugyanazokat a jelátviteli útvonalakat indítja el. A fertőzés későbbi szakaszában azonban már előtérbe kerülhetnek olyan folyamatok, amelyek a baktériumra specifikus választ eredményeznek.

Olyan génekkel is találkoztunk – mint például egy receptor-szerű protein kináz, illetve annexin-szerű fehérje génjei – amelyek kifejeződési szintjei (bizonyos időpontokban) magasabbak voltak a csak vízzel kezelt növényekben, mint a baktériumos fertőzést kapókban. Ezek a mérések egyfajta negatív szabályozási mechanizmusra világíthatnak rá. Az általunk vizsgált annexin-szerű fehérje génjének a fertőzés 24. órájában mért (vizes kontrollhoz képesti) alacsony szintje a foszfolipáz-A2 (PLA2) vagy -C (PLC) által szabályozott jelátviteli utak fokozott aktivitására

engedhetnek következtetni,<sup>23</sup> különösen annak fényében, hogy állatoknál igazolt az annexinek foszfolipáz-A2 gátló hatása (Parente és Solito, 2004).

### **6.2.2. Jelátvitel-gátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt**

A növények baktériumokkal szembeni védekezésével kapcsolatba hozható jelátviteli utakban kulcsszerep jut a foszfolipáz-A2, -C és D molekuláknak (Trewavas, 2000; Laxalt és Munnik, 2002). Kísérleteinkben ezeket arisztolochiasavval, neomicin-szulfáttal, illetve n-butanollal gátoltuk. Lantán-kloridot használtunk a kalcium-beáramlás akadályozásához, K252-at a foszforiláció, MG115-öt pedig a proteozómák működésének gátlásához.

Különböző, BR-folyamatokhoz köthető gének kifejeződési szintjének változásait vizsgálva olyan fertőzés utáni időpontokat azonosítottunk, melyekben az adott gátlószerek hatására a vizsgált gének eltérő aktivitást mutattak a BR alatt mért értékekhez képest. Számos gén vizsgálatának egybevetésével bizonyos a gátolt folyamatok időbeli karakterisztikája rajzolódott ki.

Az, hogy a jelátviteli géneknél az arisztolochiasavas és butanos kezelések többnyire a 3 és 6 órás időpontokban okoztak feltűnő eltérést a BR-ben mért értékekhez képest, alátámasztja, hogy a foszfolipáz-A2 és a foszfolipáz-D a fertőzést követő korai időpontokban játszanak szerepet. Megállapítható továbbá, hogy több kináz és az annexin-szerű fehérje a legtöbb BR alatt aktiválódó jelátviteli útban szerepet tölt be. Bizonyos annexinek kulcsszerepet játszanak a sejtplazmában található foszfolipáz-A2 gátlásában (Kim és mtsai., 2001). Így az, hogy az annexin-szerű fehérje génjének aktivitására minden gátlószert hatással volt (nem csak a PLA2-é!), bizonyítékkul szolgálhat a jelátviteli utak közötti szoros kapcsolatra. Az egyik „összekötő kapocs” akár maguk az annexin-szerű fehérjék is lehetnek, figyelembe véve – az egyébként foszfolipáz-C-vel összefüggésbe hozható – foszfatidil-inozitolhoz (Laxalt és Munnik, 2002) való erős kötőképességüket (Hoshino és mtsai., 1995).

A jelátvitelben szerepet játszó molekulák génjeinek aktivitásán kívül olyanokét is vizsgáltuk, amelyeket korábban az általános védekezéssel hoztunk összefüggésbe. Az, hogy az arisztolochiasav a fertőzést követően végig befolyással volt a hősokk fehérje, és a sejtfalak fontos strukturális elemeként szolgáló glicin-gazdag fehérje (Ringli és mtsai., 2001) kifejeződésére, jelzi, hogy a foszfolipáz-A2 a MAP-kináz kaszkádokon túl is meghatározó szerepet játszik a sejtvédelemben.

A PLA2-vel és a PLD-vel szemben a PLC szinte minden vizsgált gén kifejeződésére a fertőzést követő késői időpontokban hatott, ami azt sejteti, hogy a PLC által irányított jelátvitel

---

<sup>23</sup> Vö. 6.2.2. pont!

szerepe a védekezési folyamatok fenntartásában lehet jelentős. Irodalmi adatok alapján több olyan növényi válaszhoz is a foszfolipázok által szabályozott útvonalak vezetnek, amelyeknek szerepük lehet a BR alatt a mikroorganizmusok leküzdésében. Így például a reaktív oxigénformák felszabadítása (vö. 2.3. ábra – Laxalt és Munnik, 2002) vagy az antimikrobiális hatású másodlagos anyagcseretermékek termelése (Zhao és mtsai., 2005).

Az ubikvitin/proteoszóma lebontási mechanizmusra, valamint cisztein-proteinázon alapuló fehérjebontásra a dolgozat munkaanyagának lezárásáig egyelőre a PLD hatását vizsgáltuk. Ez alapján úgy tűnik, a „bontásra ítélt” fehérjék ubikvitinizációja már a fertőzést követő korai időpontban megkezdődik – legalábbis ami a PLD útvonalához kapcsolható. Ugyanakkor a PLD-nek csak valamivel későbbi (12. órában) van szerepe az általunk vizsgált cisztein-proteináz és a proteoszóma egyik alegységének génjére.

A fertőzést követő 6. órában vett mintákból készített microarray módszerrel készült vizsgálat tovább erősítheti az előzőekben ismertetett megállapításainkat. Így, figyelembe véve a génaktivitások változásának iránya szerinti csoportosításunkat, arra a megállapításra juthatunk, hogy több kulcsfontosságú jelátviteli elem vélhetően vagy azonos, vagy szorosan kapcsolódó utakban szerepel. Ilyen például a PLA2 és a protein kinázok. De szorosan kapcsolódik a PLC útvonal is a fehérjebontáshoz.

A teljesebb kép kirajzolódása érdekében érdemes lehet a jövőben a többi jelátvitelgátló szer hatását is vizsgálni legalább a fent említett gének kifejeződésére.

### **6.2.3. Proteináz-gének aktivitásának változása a BR alatt**

A proteináz-gének kifejeződési szintjeinek vizsgálatakor hasonló módszertant követtünk, mint a jelátvitelben szerepet játszókkal kapcsolatos munkák során. Az Eredmények fejezetben egy cisztein-proteináz (a védekezéssel szorosan kapcsolatba hozható proteinázcsoport tagja – van der Hoorn, 2008), egy ubikvitin-kötő fehérje és egy proteoszóma-működéshez kapcsolódó gén aktivitásváltozását hoztam példaként.

Hasonlóan a 6.2.1. pontban ismertetettkez, itt is kétféle szabályozást vélhetünk felfedezni. Míg a szóban forgó cisztein-proteináz a baktérium által kiváltott BR alatt a vizes kontrollhoz képest azonos szinten (3., 6. óra) vagy erősebben (24., 48. óra) expresszálódott, addig a másik két gén aktivitási szintje egyfajta ingadozást mutat. Úgy tűnik, a fertőzést követő 6. órában ezeknek a működése inkább gátolt a BR alatt, míg fokozott működésükkel inkább a BR későbbi szakaszaiban vesznek részt a nem kívánt fehérjék bontásában.

Az ubikvitináció és a proteozómák működése szoros kapcsolatban áll egymással (Dielen és mtsai., 2010), így nem csoda, hogy azonos időpontokban azonos módon tér el az aktivitásuk is a baktériummal és a csak vízzel infiltrált mintákban.

#### **6.2.4. Proteinázgátlók hatása a génkifejeződések változására a BR alatt**

Számos proteinázgátlóval végeztünk vizsgálatokat, melyek jelentős része az egyébként is védelmi szerepet betöltő cisztein-proteinázok, illetve szerin-proteinázok (van der Hoorn, 2008., Baek és Choi, 2008) közül kerültek ki. Ezen irodalmi adatokat vizsgálataink is megerősíteni látszanak: legmarkánsabb különbségeket a génaktivitások változásában (a BR, illetve a megfelelő inhibitorral kiegészített BR-t kiváltó baktériumszuspenzióval elért hatás között) épp e két csoportot gátló szerek adták.

A fertőzést követő hatodik órában végzett mérések ugyanakkor azt is alátámasztják, hogy bizonyos folyamatokban más csoportba tartozó proteinázoknak – pl. metalloproteinázoknak – is fontos szerepük lehet. A metalloproteinázok szerepét már csak azért is érdemes megfigyelni, mert több jelátvitelhez köthető gén esetében (MAP kináz, annexin-szerű fehérje) kifejezetten a baktériumszuspenzió nélkül adott inhibitoruk, a fenantrolin volt az, amely magasabb génkifejeződési szintet eredményezett, mint ahogy BR-t kiváltó *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* is lett volna a fecskendőben. Mindkét példaként hozott gén esetében megfigyelhető volt, hogy az inhibitor-baktérium kombinált kezelésben részesülő növényekben ezen gének aktivitási szintje közel azonos volt a csak baktériummal fertőzött, BR állapotba hozott növényekben mérttel. Ez utalhat esetleg arra, hogy a metalloproteinázok negatív regulációs szerepet töltenek be ezekben a jelátviteli folyamatokban. Érdemes ugyanakkor megjegyezni, hogy a cisztein-proteinázként adagolt cink-klorid is kiváltott hasonló hatásokat több jelátviteli gén kifejeződésére is.

#### **6.2.5. Sejtfali kallózbeépülés változása a proteinázgátlók alkalmazásának hatására**

Azt, hogy a proteinázgátlók adagolása bizonyos folyamatokra gátló-, míg másokra serkentő hatással volt, nem csak génszinten figyeltük meg. A sejtfali kallózbeépülés mértékénél szintén mutatkozott hasonló eltérés. Tapasztalataink alapján ezeknél a vizsgálatoknál csak a cisztein-, és szerin-proteinázok gyakoroltak bármiféle hatást a kallózberakódásokra a kontrollokhoz képest. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a 10-fenantrolinos kezelésben is részesülő növények levelei a vizsgálat legkorábbi idejére (fertőzést követő 24. órára) is teljes egészében nekrotizálódtak.

Az, hogy – kisszámú kivételtől eltekintve – a 24. és 48. órában vett mintákban is hasonló volt a kallózbeépülés mértékének iránya az egyes kezelések hatására jelzi, hogy a sejtfal megerősítése az általános védekezés viszonyain belül hosszabb távú folyamat, és ebben bizonyos proteináz típusok mindvégig fontos szabályozó szerepet játszanak.

A módszer pontatlansága miatt az e pontban ismertetett vizsgálatok nem tették lehetővé az egyes proteinázok kallózbeépülésben való szerepének pontos tisztázását. A módszer finomítására tett törekvéseinket a Módszertani munkák alfejezetben ismertetem.

### **6.3. Az egyes gének funkcionális vizsgálataihoz kidolgozott módszerek értékelése**

#### **6.3.1. Proteináz-aktivitás mérése**

Legfrissebb kutatási irányaink között szerepelt a növényekben a BR alatt aktívan működő proteinázok mérésének lehetősége. Ehhez olyan módszert választottunk, amely nagy mintaszám mellett is kellő hatékonysággal működik és kihasználja a laboratóriumunk meglévő infrastruktúráját (valós idejű PCR berendezés).

Az 5.3.1. pontban ismertetett előkísérleteink alapján a kazeinhez kapcsolt fluoreszcens markeren alapuló technika ígéretes módszernek bizonyult.

Az előkísérletek során a felhasznált Sensolyte™ Red Protease Assay Kitet gyártó cég protokollja alapján – az egyébként cisztein-proteinázok közé tartozó – papain enzim aktivitásának méréséhez használandó puffert használtuk. A dohányt megbetegíteni képes *P. tabacival* fertőzött minták esetében megfigyelhető volt, hogy a proteináz szint elmarad a kontrollok, illetve a legfeljebb BR kiváltására alkalmas hővel előlt *P. tabacival* valamint *P. syringae* pv. *syringae hrcC* baktériummal infiltrált levelekben mértekhez képest. Az erősen nekrotiázlódo levelek miatt az aktív kórokozóval fertőzött levelekből csak a 12. óráig tudtunk mintát venni, de a többi kezelést folytattuk a 48. óráig. Itt azt tapasztaltuk, hogy a vízzel kezelt levelekben a proteináz aktivitásának mértéke alábbhagy a többi kezelésnek alávetett mintákhoz képest.

A feldolgozott mintákat különböző proteinázgátlókkal kiegészítve megállapítottuk, hogy a ciszetin-proteinázokat is gátló hatással<sup>24</sup> rendelkező inhibitorok gátolták a vizsgált proteinázunk működését.

A módszerrel eddig végzett kísérleteink így az mutatják, hogy a BR alatt a génkifejeződések szintjén jelentkező fokozott cisztein-proteináz aktivitás a ténylegesen működő enzimek tekintetében is érvényre jut.

#### **6.3.2. BR kimutatása anilin-kék szövetfestéssel**

Az irodalmi adatok szerint igen régóta (Currier, 1957) és széles körben alkalmazzák az anilin-kék festéket kallóz kimutatásához külfönféle növények külfönféle szöveteiben:

---

<sup>24</sup> A leupeptinnek cisztein- és szerin-gátló hatása is van!



alumíniumterhelésnek kitett gesztenyemagoncok gyökércsúcsától (Hirano és mtsai, 2005) a paradicsom termőtájának pollentömlőjéig (Martin, 1957).

Az, hogy a dohánylevelek anilin-kék szövetfestése nem ad konzekvens eredményt a kallózkimutatáshoz, meghiúsítja, hogy a két növényt ebből a szempontból összevegyük.

Az irodalmi adatokat (pl. Jaffe és mtsai., 1985) sikerült előkísérleteinkkel alátámasztani: a fizikai érintés számottevően serkenti a kallóz megjelenését a levelekben. Ezek a hatások jelentősen befolyásolhatják az érzékszervi vizsgálatokon alapuló, nehezen számszerűsíthető módszerek eredményeit. Eredményeink alapján a nedvesítőszer alkalmazása nem jelent megbízható megoldást erre a problémára.

A pontosabb mérések érdekében a Kohler és mtsai. (2000) által alkalmazott kvantitatív kallóz-fluoreszcencia mérést a saját vizsgálati igényeinknek és körülményeinknek megfelelően alkalmaztuk. Megállapítottuk, hogy bár kisebb számú mintánál a módszer jól használható, hatalmas munkaigénye miatt azonban vizsgálataink pontosítására nem megfelelő.

### **6.3.3. Arabidopsis modell alkalmazása funkcionális genomikai vizsgálatokhoz**

Az *Arabidopsis* mint modell növény hatalmas előnye többek között a gyors vegetációs periódus, a kis méret, a könnyű kezelhetőség, a feltérképezett teljes genom és persze a rendelkezésre álló mutánsok szinte bármely génre nézve.

Vizsgálatainkat már csak azért is célszerű ezekre a növényekre is kiterjeszteni, mert így a különböző dohányfajok (pl. *N. tabacum*, *N. benthamiana* – *Solanaceae*) mellett egy nem rokon növénnyel (*Brassicaceae*) is összevethetők a mért eredmények. Ez pedig hozzájárulhat ahhoz, hogy általánosabb képet kapjunk az általános védekezés működéséről a növényvilágban.

Különböző proteináz géneket nem kifejező *Arabidopsis* vonalakon végzett előzetes vizsgálatok arra világítanak rá, hogy a szerin típusú aktivitással rendelkező szubtiláz és karboxipeptidáz génekre nézve mutáns növények sejtközötti járataiban szaporodtak legnagyobb mértékben a kompatibilis *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 baktériumok. Ez azt sugallja, hogy mindkét gén a védekezés pozitív regulációjában játszhat szerepet. Védekezésben betöltött funkciójuk vizsgálata a későbbi kísérletek feladata.

További eredmények fényében remélhetőleg pontosabb kép rajzolódik majd ki mind az *Arabidopsis*ban lejátszódó BR-ről, mind pedig a dohánynövényekben megismert jelenségekkel való viszonyról.

#### **6.3.4. Géncsendesítés dohányban (*N. tabacum*)**

A Gosselé és mtsai. (2002) által kidolgozott SVISS (Satellite virus induced silencing system) a kutatási igényeinknek megfelelően átalakított konstrukciójának alkalmazásakor számos nehézségbe ütköztünk. Legnagyobb problémát az *in vitro* transzkripcióval előállított szatellitvírussal való körülményes munka jelentette. Általában elmondható volt, hogy a közvetlenül ezzel az RNS-sel való fertőzés csak szerény eredményeket hozott. A hatékonyság viszont nagyban javítható volt a csendesítés fenotipikus megjelenését mutató (*PDS* gén esetén kifehéredő levél) növényi mintából nyert inokulummal való további passzálással.

A hatékonyság növelésére az általunk előállított (a megfelelő hasítóhelyekkel rendelkező) STMV-t tartalmazó *Agrobacterium* pORE4 plazmid felhasználásával készített vektor konstrukció bizonyult a legjobb megoldásnak.

## 7. Összefoglalás

A növények természetes körülmények között folyamatosan ki vannak téve a különböző mikroorganizmusok jelenlétéből származó stressz-hatásoknak. Az ellenük való egyik hatékony növényi védekezési forma, az ún. általános védekezés (BR – *basal resistance*), amely nem jár látható tünetekkel, szemben pl. a látványos nekrotikus léziókat előidéző hiperszenzitív válasszal (HR – *hypersensitive response*). Hiperszenzitív választ csak az adott kórokozó (és csak *kórokozó!*) baktériumra nézve rezisztens növények képesek adni, míg a BR kiváltására patogén, szaprofita vagy akár hővel elölt baktérium is képes – eddigi irodalmi adatok alapján – bármilyen növényben.

Munkáink során megállapítottuk, hogy a dohánynövényekben baktérium segítségével kiváltott BR hatással van egy későbbi dohány mozaik vírus fertőzés lefolyására: kompatibilis dohány-vírus kapcsolat esetén mérsékli és késlelteti is a megjelenő tüneteket, míg inkompatibilis kapcsolatnál a hiperszenzitív reakcióval járó nekrotikus léziók száma és mérete csökken. Mindkét esetben csökken a vírus replikációjának mértéke is.

A BR során megváltozott aktivitást mutató gének funkcionális vizsgálata során elsősorban a jelátvitellel, illetve fehérjeanyagcserével kapcsolatos génekre koncentráltunk. Módszereink között szerepelt különböző gének kifejeződésének vizsgálata a BR kiváltását követő különböző időpontokban (Real-Time PCR). Ezen kívül vizsgáltunk különböző jelátviteli folyamatokat, valamint a fehérjeanyagcsere különböző folyamatait gátló szerek hatását a BR-hez köthető gének expressziójára (Real-Time PCR, microarray).

Ezek során megállapítottuk, hogy olyan jelátviteli kulcsmolekulák, mint a foszfolipáz-A2 és a foszfolipáz-D a legtöbb általunk vizsgált BR-hez köthető gén aktivitását a fertőzést követő korai időpontokon túl (6-12 óra) már nem befolyásolják, míg a foszfolipáz-C-nek a későbbi, 24., 48. órai időpontokban (is) jut szerep.

Vizsgálati eredményeinket irodalmi adatokkal is egybevetve feltételezhetjük, hogy a jelátviteli útvonalak között szoros kapcsolat figyelhető meg. Így vélhetően szoros kapcsolat áll fenn a MAP-kináz kaskád és a foszfolipáz-A2 között. De szorosan kapcsolódhatnak egymáshoz a PLC útvonal elemei a fehérjelebontáshoz is. Az annexin-szerű fehérje expressziós szintjének különböző gátlószeres kezelésekre adott érzékeny reakciója szintén az útvonalak közti kapcsolatok meglétét sejteti.

Mind a jelátviteli, mind pedig a fehérjelebontáshoz köthető enzimek génjei között egyaránt találtunk olyanokat, amelyek az általuk érintett BR folyamatokat adott időpontban vélhetően pozitívan (pl. annexin-szerű fehérje, cisztein-proteináz), illetve negatívan (pl. szfingozin-1-foszfát-

liáz) szabályozzák. Ez a regulációs szerep akár időben változhat is. Legalábbis ezt sejteti pl. az ubiquitin/proteoszóma lebontó mechanizmusban szereplő gének időbeli aktivitásváltozásának nyomon követése.

A proteinázok genomikai vizsgálatait kiegészítettük olyan eljárással is, amely a sejtfalba beépülő kallóz kimutatásán alapszik. Az ebből származó eredmények szintén alátámasztották az irodalmi, illetve egyéb kísérleteinkből levezethető következtetéseket, miszerint a cisztein- és szerin-proteinázok fontos szerepet töltenek be a növényi sejtek baktériumokkal szemben folytatott harcában.

Hasonló megerősítést kaptunk a növényi aktív proteináz-szint méréstől, melyet egyelőre egy – vélhetően papain-szerű – cisztein-proteinázon teszteltünk. További kísérletek más proteinázok feldúsulására – vagy éppen apadására – is rávilágíthatnak.

Munkáinkban új irányként vezettük be a bizonyos proteináz génekre nézve mutáns *Arabidopsis* növények használatát. Mely már az eddigi vizsgálatok alapján is biztató eredményekkel kecsegtet.

A készen vásárolt *Arabidopsis*okkal szemben a dohánynövényekre adaptált *Agrobacterium* vektor konstrukció egy TMV szatellitvírus (STMV) felhasználásával adhat a jövőben hatékony átmeneti expressziós eszközt a kezünkbe.

## 8. Summary

Under natural circumstances plants are constantly exposed to stress factors coming from different sources of microbes. One of the most potent form of defense against them is the so called *basal resistance* (BR). Unlike *hypersensitive response*, BR fails to produce visible symptoms, such as necrotic lesions. As widely known, HR can be triggered by pathogens – and pathogens only! – in plants that are resistant to that certain pathogen. However, BR can be induced either by pathogens, saprofitas or even heat-killed bacteria in any plant – according to the current stance of Science.

From our research conclusion was drawn that a bacterium-induced BR can affect a TMV (tobacco mosaic virus) superinfection. In compatible host-TMV interactions symptoms are remitted and even delayed, while in incompatible relationships HR lesions decrease both in number and size. Virus replication is also suppressed in both cases.

Functional studies of genes of altered activity during BR were carried out focusing mainly on genes related to signal transduction and protein metabolism. Expression levels of various genes were measured using Real-Time PCR at different times after BR-inducing infection. Both Real-Time PCR and microarray techniques were deployed to investigate the effects of inhibitors of different signal transduction pathways and processes of protein metabolism on known BR-related genes.

Our results suggested that key signal molecules, such as phospholipase-A2 (PLA2) and phospholipase-D (PLD) do affect most of studied BR-genes only up to 6-12 hpi (hours post infection). However, phospholipase-C (PLC) may (also) have a regulatory role even at later times (even at 24 or 48 hpi).

Results of our studies – in accordance with literature – suggest that signal transduction pathways are tightly linked. Presumably, a strong connection may occur between MAP kinase cascades and PLA2. Similar connection is possible between a PLC regulated pathway and protein degradation. Sensitive response to various inhibitor treatments of an annexin-like protein may imply a link between pathways.

Genes of both signalling and protein degradation enzymes showed positive (*eg.* annexin-like protein, cysteine-proteinase) or negative (*eg.* sphingosin-1-phosphate lyase) regulatory roles at given times in BR processes they are involved in. This regulatory role may shift from time to time. Changes in the direction of expression levels of the ubiquitin/proteasome mechanism may suggest this conclusion, at least.

Genomic assays of proteinases were also complemented with a method based on the indication of cell wall callose deposition. These findings have also supported the idea of cysteine- and serine-proteinases serving a useful weapon in the plants' armory against bacteria.

Further support was drawn from measurement of active plant proteinase levels. So far a putative papain-like enzyme (cysteine-proteinase) was studied. Further investigation using this method may reveal increase (or decrease) in other types of proteinases.

A new direction was pointed out when *Arabidopsis* plants mutant to certain proteinases were introduced to our works. Our first trials hold out a promise to further results.

Our newly constructed *Agrobacterium* vector containing a TMV satellite (STMV) may also prove to be a useful transient expression tool for tobacco.

## Köszönetnyilvánítás

Ez a dolgozat soha nem készült volna el,

ha nincs tanszékvezetőm, Palkovics László, aki még az egyetemi éveim alatt a téma felé terelt;

ha nincs témavezetőm, Bozsó Zoltán, aki igyekezett a téma mellett tartani a kezdetektől az utolsó percekig;

ha nincsenek kutatócsoportunk tagjai, akikkel a PhD képzésem alatt együtt dolgoztam, és ezalatt rengeteget segítettek – különösen Szatmári Ágnes, Szabó Erika, Besenyei Eszter, Ott Péter;

ha nincsenek az (akkoriban még) MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének segítőkész munkatársai;

ha nincsenek a tanszékről azok, akik néha levették a vállamról a terhet;

ha nincsenek azok a barátaim, akik olykor be- és kisegítettek – különösen Albert Zsolti, Balogh András, Kása Richárd, Kődöböcz László és Szada Andris;

ha nincs Juhászné Boncsér Erzsébet, aki segített eligazodni az adminisztratív labirintusban;

ha nincs a családom.

Köszönöm nekik.

## 1. melléklet: Publikációk listája

### IF-es folyóiratcikkek

Szabó E, Szatmári Á, Hunyadi-Gulyás É, Besenyei E, Zsiros LR, Bozsó Z, Ott PG. 2012. Changes in apoplast protein pattern suggest an early role of cell wall structure remodelling in flagellin-triggered basal immunity *Biologia Plantarum* 56:551-559 [IF: 1,974]

Bozsó Z, Maunoury N, Szatmári Á, Mergaert P, Ott PG, Zsiros LR, Szabó E, Kondorosi É, Klement Z. 2009. Transcriptome analysis of a bacterially induced basal and hypersensitive response of *Medicago truncatula* *Plant Molecular Biology* 70:627-646 [IF: 3,978]

Zsiros L, Szatmári Á, Palkovics L, Klement Z, Bozsó Z. 2007. Bacterium induced basal resistance inhibits viral infection in tobacco plants *Cereal Research Communications* 35(2):1345-1348 [IF: 1,19]

### Nem IF-es folyóiratcikkek

Czelleng A, Bozsó Z, Ott PG, Besenyei E, Varga GJ, Szatmári Á, Szabó E, Zsiros LR, Klement Z. 2009. Efficient transposon mutagenesis in a wide range of phytopathogenic Gram-negative bacteria *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 44(1):19-24

### Konferenciakiadványok

Zsiros LR, Szatmári Á, Szabó Erika, Ott PG, Bozsó Z. 2008. A baktériumok által kiváltott általános védekezés és hatása más fertőzési mechanizmusú kórokozókra *Pro Scientia Aranyérmesek VIII. Konferenciája* 87-92

Zsiros LR, Szatmári Á, Szabó E, Ott PG, Bozsó Z. 2008. Baktériumok indukálta általános védekezés (BR) jelátviteli folyamatai dohány levélben *54. Növényvédelmi tudományos napok. Összefoglaló* 33

Szabó E, Zsiros LR, Szatmári Á, Szamos J, Bozsó Z, Ott PG. 2008. Isolation and characterization of EBR specific induced chitinases from tobacco (*Nicotiana tabacum*) *Acta Biologica Szegediensis* 52(1):251-252

Zsiros LR, Szatmári Á, Szabó E, Ott PG, Bozsó Z. 2008. Plant protein degradation affects transcription of genes associated with bacterium-induced basal resistance *Acta Biologica Szegediensis* 52(1):253-255

Szatmári Á, Szabó E, Ott PG, Mergaert P, Kondorosi E, Zsiros L, Bozsó Z. 2007. Characterisation of proteins and novel types of peptides with putative antimicrobial activities in plant-microbe interactions *XIII. International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions Abstracts* 168

### Nem a doktori értekezés témájában megjelent publikációk

Ködöböcz L, Zsiros LR, Murányi A. 2011. A szójaoltás hatása csernozjom talajon *Agrokémia és talajtan* 60(1):233-244

Ködöböcz L, Zsiros LR, Murányi A. 2008. Symbiotic effectiveness of inoculation on soybean plant (*Glycine max* L.) *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése és XI. Fermentációs Kollokvium. Összefoglaló* 44-45



## 2. melléklet: Irodalom

- Abramovitch RB., Janjusevic R., Stebbins CE., Martin GB.** 2006. Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proceedings of National Academy of Sciences* 8:2851-2856
- Ádám AL , Bestwick CS, Barna B, Mansfield JW** 1995. Enzymes regulating of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Planta* **197**: 240-249.
- Ádám AL, Pike S, Hoyos EM, Stone MJ, Walker JC, Novacky A.** 1997. Rapid and transient activation of a myelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology* 115: 853-861
- Alfano JR., Collmer A.** 2004. Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology* 42: 385–414.
- Baker CJ, Mock N, Atkinson MM, Hutcheson S.** 1990. Inhibition of the hypersensitive response in tobacco by pectate lyase digest of cell wall and of polygalacturonic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37: 155-167
- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR.** 2011. Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants *Trends in Plant Science* 16(9):489-499
- Baek KH, Choi D.** 2008. Roles of plant proteases in pathogen defense *The Plant Pathology Journal* 24(4):367-374
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP.** 1997. Signaling in Plant-Microbe Interactions. *Science* 276: 726-733
- Baker CJ, Mock N, Atkinson MM, Hutcheson S.** 1990. Inhibition of the hypersensitive response in tobacco by pectate lyase digest of cell wall and of polygalacturonic acid *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37:155.167
- Baker CJ, Orlandi EW.** 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299-321
- Barrett AJ., McDonald JK.** 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal.* 237:935
- Beffa RS, Hofer R-M, Thomas M, Meins F Jr.** 1996. Decreased susceptibility to virus disease of  $\beta$ -1,3-glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. *Plant Cell* 8:1001-1011
- Bernoux M, Ellis JG, Dodds PN.** 2011. New insights in plant immunity signaling activation *Current Opinion in Plant Biology* 14:512-518
- Besenyi, E., Ott, P.G., Bozsó, Z., Czelleng, A., Szatmári, Á., Varga, G.J., Klement, Z.** 2005. Low temperature delay and inhibition of a plant defence mechanism: early basal resistance in tobacco. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 40 (3-4) 323-332. p.
- Bestwick CS, Brown IR, Bennet MH, Mansfield JW.** 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Cell* 9: 209-221
- Boller T., Felix G.** 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379-406
- Bozsó Z, Ott PG, Kecskés ML, Klement Z.** 1999. Effect of heat and cycloheximide treatment of tobacco on the ability of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp/hrmA* mutants to cause HR. *Physiological Molecular Plant Pathology* 55: 215-223
- Bozsó Z., Ott PG., Szatmári A., Czelleng A., Varga G., Besenyi E., Sárdi É., Bányai É., Klement Z.** 2005. Early detection of bacterium-induced basal resistance in tobacco leaves with diaminobenzidine and dichlorofluorescein diacetate. *Journal of Phytopathology* 153:596-607
- Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball CA., Causton HC., Gaasterland T., Glenisson P., Holstege FC., Kim IF., Markowitz V., Matese JC., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J., Vingron M.** 2001. Minimum information about microarray experiment (MIAME) – toward standards for microarray data. *Nature Genetics* 29(4):365-371

- Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A., and Herzyk, P.** 2004. Rank Products: A simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments, *FEBS Letters*, 573:83–92
- Brown IR, Trethowan J, Kerry M, Mansfield J, Bolwell GP.** 1998. Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose in papillae formed during the interactions between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant Journal* 15: 333-343
- Burgyán J, Klement Z.** 1979. Early induced selective inhibition of incompatible bacteria in tobacco plants. *Phytopathologia Mediterranea* 18: 153-161
- Cheong YH, Chang H-S, Gupta R, Wang X, Zhu, T, Luan S.** 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 661-667
- Clough SJ, Bent AF.** 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* *Plant Journal* 16:735-743
- Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B.** 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7:210-216
- Currier HB.** 1957. Callose substance in plant cells *American Journal of Botany* 44(6):478-488
- da Graca JV, Martin MM.** 1976. An electron microscope study of hypersensitive tobacco infected with tobacco mosaic virus at 32 °C. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 8: 215-219
- Debroy S, Thilmony R, Kwak YB, Nomura K, He SY.** 2004. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:9927-9932
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C.** 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394:585-588
- DeYoung BJ, Innes RW.** 2006. Plant NBS-LRR protein in pathogen sensing and host defense *Nature Immunology* 7:1243-1249
- de Torres M, Sanchez P, Fernandez-Delmond I, Grant M.** 2003. Expression profiling of the host response to bacterial infection: the transition from basal to induced defence responses in RPM1-mediated resistance. *Plant Journal* 33: 665-676
- Dielen AS, Badaoui S, Candresse T, German-Retana S.** 2010. The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hidden-and-peek game *Molecular Plant Pathology* 11(2):293-308
- Dinesh-Kumar SP, Tham W-H, Baker BJ.** 2000. Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 14789-14794
- Dodds AJ.** 1998. Satellite Tobacco Mosaic Virus *Annual Review of Phytopathology* 36:295-310
- Dong X.** 2005. Functional investigation of *Arabidopsis* callose synthases and the signal transduction pathway. *Doktori értekezés*. The Ohio State University, USA
- Essenberg M, Cason JR, Hamilton B, Brinkenhoff LA, Gholson RK, Richardson PE.** 1979. Single cell colonies of *Xanthomonas malvacearum* in susceptible and immune cotton leaves and the local resistant response to colonies in immune leaves. *Physiological Plant Pathology* 15: 53-68
- Fan J, Crooks C, Lamb C.** 2007. High-throughput quantitative luminescence assay of the growth in planta of *Pseudomonas syringae* chromosomally tagged with *Photobacterium luminescens* luxCDABE. *Plant Journal* 53(2):393-399
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T.** 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* 18: 256-276

- Fire A., Xu SQ., Montgomery MK., Kostas SA., Driver SE., Mello CC.** 1997. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811
- Frederick SE.** 1987. The cytochemistry of diaminobenzidine *IN: Kevin CV (ed) CRC Handbook of Plant Cytochemistry*, Boca Raton, USA, (1):3-23
- Gilchrist DG.** 1998. Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology* 36: 393-414
- Gómez-Gómez L., Boller T.** 2000. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 5:1003-1011
- Goodman RN, Novacky AJ.** 1994. The Virus Induced Hypersensitive Reaction. In: *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 75-115
- Gosselé V., Faché I., Meulewaeter F., Cornelissen M., Metzlauff M.** 2002. SVISS – a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants *The Plant Journal* 32: 859-866
- Grant M, Mansfield J.** 1999. Early events in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 312-319
- Guo A, Durner J, Klessig DF.** 1998. Characterization of a tobacco epoxide hydrolase gene induced during the resistance response to TMV. *Plant Journal* 15:647-656
- Hafez YM.** 2005. Biochemical and molecular studies on the role of reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance. *PhD Thesis. Szent István Egyetem, Gödöllő*
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG.** 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791
- Hao L., Hsiang T., Goodwin PH.** 2006. Role of two cysteine proteinases in the susceptible response of *Nicotiana benthamiana* to *Colletotrichum destructivum* and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant Science* 170:1001-1009
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Nishimura M, Hara-Nishimura I.** 2006. A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death *Apoptosis* 11(6):905-911
- Hauck P, Thilmony R, He SY.** 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 8577-8582
- Hirano Y, Walthert L, Brunner I.** 2006. Callose in root apices of European chestnut seedlings: a physiological indicator of aluminum stress *Tree Physiology* 26: 431-440
- Holmes FO.** 1938. Inheritance of resistance to tobacco mosaic disease in tobacco. *Phytopathology* 28: 553-561
- Hoshino T, Mizutani A, Chida M, Hidaka H, Mizutani J.** 1995. Plant annexin form homodimer during  $Ca^{2+}$ -dependent liposome aggregation *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35(4):749-755
- Jaffe MJ, Huberman M, Johnson J, Telewski FW.** 1985. Thigmomorphogenesis: The induction of callose formation and ethylene evolution by mechanical perturbation in bean stems *Physiologia Plantarum* 64 (2):271-279
- Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G.** 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory diseases *Annual Review of Biochemistry* 74:355-383
- Ishikawa M, Meshi T, Ohno T, Okada Y.** 1991. Specific cessation of minus-strand RNA accumulation at an early stage of tobacco mosaic virus infection. *Journal of Virology* 65: 861-868
- Kim SW, Rhee HJ, Ko J, Kim YJ, Kim HG, Yang JM, Choi EC, Na DS.** 2001. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site *Journal of Biological Chemistry* 276(19):15712-15719

- Kim HS., Delaney TP.** 2002. *Arabidopsis* SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic resistance. *The Plant Cell* 14:1469-1482
- King EO, Ward MK, Raney DE.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanine and fluorescein *Journal of Laboratory Medicine* 22:301-307
- Király L.** 2002. (Transz)gének csendesítése – a vírusrezisztencia egyik formája növényekben: II. Molekuláris mechanizmus és gyakorlati alkalmazások. *Növénytermelés* (51)3:331-343
- Király Z.** 2004. A növényi rezisztencia típusai és mechanizmusai. *Magyar Tudomány.* 10:1090
- Király Z., Barna B.** 2007. Alapfogalmak. In: *Gáborjányi R., Király Z. Molekuláris növénykörtan* Agroinform Kiadó, Budapest, 12. o
- Király Z, Barna B, Király L.** 2007. Plant resistance to pathogen infections: forms and mechanisms of innate and acquired resistance *Journal of Phytopathology* 155:385-396
- Klement Z.** 1982. Hypersensitivity. In: Mount MS, Lacy GH, eds. *Phytopathogenic Prokaryotes Vol. 2.* New York: Academic Press, 149-177.
- Klement Z.** 1990. Infiltration of plant tissues. In: Klement Z, Rudolph K, Sands DC, eds. *Methods in Phytobacteriology.* Budapest: Akadémiai Kiadó, 389
- Klement Z.** 2004. Baktériummal fertőzött növény védekezési mechanizmusai. *Magyar Tudomány* 10: 1108-1118
- Klement Z, Bozsó Z, Kecskés ML, Besenyi E, Czalleng A, Ott PG.** 2003. Local early induced resistance of plants as the first line of defence against bacteria. *Pest Management Science* 59: 465-474
- Klement Z, Bozsó Z, Ott PG, Kecskés ML, Rudolph K.** 1999. Symptomless resistant response instead of the hypersensitive reaction in tobacco leaves after infiltration of heterologous pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Phytopathology* 147: 467-475
- Klement Z, Goodman RN.** 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 5: 17-44
- Kohler A, Schwindling S, Conrath U.** 2000. Extraction and quantitative determination of callose from *Arabidopsis* leaves. *Biotechniques.* 28: 1084-1086
- Kunze G., Zipfel C., Robatzek S, Niehaus K, Boller T., Felix G.** 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16:3496-3507
- Lamb C, Dixon RA.** 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 48: 251-275
- Laxalt AM, Munnik T.** 2002. Phospholipid signalling in plant defence *Current Opinion in Plant Biology* 5(4):332-338
- Lee WM, Ishikawa M, Ahlquist P.** 2001. Mutation of host 9 fatty acid desaturase inhibits brome mosaic virus RNA replication between template recognition and RNA synthesis. *Journal of Virology* 75:2097-2106
- Liu R., Ochman H.** 2007. Stepwise formation of the bacterial flagellar system *PNAS* 104 (17) 7116–7121
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP.** 2004. Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *Journal of Biological Chemistry* 279: 101-108
- Lovrekovich L., Farkas G. L.** (1965): Induced protection against wildfire disease in tobacco leaves treated with heat-killed bacteria. *Nature,* 205: 823–824.
- Lu H, Higgins VJ.** 1998. Measurement of active oxygen species generated in planta in response to elicitor AVR9 of *Cladosporium fulvum* *Physiological Molecular Plant Pathology* 52: 35-51

- Martin FW.** 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence *Biotechnic and Histochemistry* 34(3): 125-128
- Matzke MA., Matzke AJM.** 1995. How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiology* 107:679-685
- Maury S, Geoffroy P, Legrand M.** 1999. Tobacco O-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism. The different caffeoyl-coenzyme A/5-hydroxyferuloyl-coenzyme A 3/5-O-methyltransferase and caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase classes have distinct substrate specificities and expression patterns *Plant Physiology* 121: 215-224
- Mazzucchi U, Pupillo P.** 1976. Prevention of confluent hypersensitive necroses in tobacco leaves by a bacterial protein lipopolysaccharide complex. *Physiological Plant Pathology* 9: 101-112
- Mazzucchi U, Bazzi C.** 1982. Encapsulation of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in relation to its growth in tobacco leaves both pretreated and non pretreated with protein-lipopolysaccharide complexes. *Physiological Plant Pathology* 21: 105-112
- McHale L, Tan X, Koehl P, Michelmore RW.** 2006. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards *Genome Biology* 7:212.1-212.11
- Mehiar FF, Hevesi M, Klement Z.** 1981. Components of *Pseudomonas fluorescens* causing the early and the late induced resistance of tobacco to challenge infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 16: 365-369
- Metzlaff MH., Gossele VML., Meulewaeter F., Fache CA.** – Methods and means for delivering inhibitory RNA to plants and applications thereof – Pub. No.: US 2003/0135882 A1
- Mittler R, Shualey V, Seskar M, Lam E.** 1996. Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. *Plant Cell* 8:1991-2001
- Murray GI, Paterson PJ, Weaver RJ, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD.** 1993. The expression of cytochrome P-450. epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 71:36-43
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R.** 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* 2:279-289
- Newman M-A, Daniels MJ, Dow JW.** 1995. Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defence-related gene expression in *Brassica campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 778-780
- Novacky A, Hanchey P.** 1976. Effect of internal injury on bacterial hypersensitivity. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 11: 217-222
- Nürnberg T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K, Scheel D.** 1994. High-affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78: 449-460
- Oesch F.** 1973. Mammalian epoxide hydrolases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefine compounds. *Review of Xenobiotica* 3:305-340
- Ott PG, Szabó L, Balázs E, Klement Z.** 1997. Submicroscopic evidence of bacterially induced resistance in tobacco leaves. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 32:265-280
- Padgett HS, Watanabe Y, Beachy RN.** 1997. Identification of the TMV replicase sequence that activates the *N*-gene mediated hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:709-715
- Padgett HS, Beachy RN.** 1993. Analysis of a tobacco mosaic virus strain capable of overcoming *N* gene-mediated resistance. *Plant Cell* 5: 577-586
- Pakusch AE, Kneusel RE, Matern U.** 1989. S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 271: 488-494

- Parente L, Solito E.** 2004. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein *Inflammation Research* 53(4):125-132
- Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B, Legrand M.** 1994. Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiology* 106:877-886
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H.** 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence *Current Opinion in Plant Biology* 12:421-426
- Politis DJ, Goodman RN.** 1978. Localized cell wall appositions: Incompatibility response of tobacco leaf cells to *Pseudomonas pisi*. *Phytopathology* 68: 309-316
- Ratcliff FG., Harrison BD., Baulcombe DC.** 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276:1558-1560
- Ratcliff FG., MacFarlane SA., Baulcombe DC.** 1999. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses *The Plant Cell* 11:1207-1215
- Radford JE., Vesk M., Overall RL.** 1998. Callose deposition at plasmodesmata *Protoplasma* 201:30-37
- Reuber TL, Ausubel FM.** 1996. Isolation of *Arabidopsis* genes that differentiate between resistance responses mediated by the RPS2 and RPM1 disease resistance genes. *Plant Cell* 8: 241-249
- Ringli C, Keller B, Ryser U.** 2001. Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:1430-1441
- Roberts AG, Oparka KJ.** 2003. Plasmodesmata and the control of symplasmic transport. *Plant, Cell and Environment* 26: 103-124
- Robertson D.** 2004. VIGS Vectors for Gene Silencing: Many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology* 55:495-519
- Roossinck MJ, Sleat D, Palukaitis P.** 1992. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56(2):265-279
- Schmitt D, Pakusch AE, Matern U.** 1991. Molecular cloning, induction and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. *Journal of Biological Chemistry* 266:17416-17423
- Scholl R, Rivero-Lepinckas L, Crist D.** 1998. Growth of Plants and Preservation of Seeds IN *Arabidopsis* Protocols. Ed. Martinez-Zapter JM, Salinas J. *Humana Press Inc.* 1-12
- Scholthof KBG.** 2004. Tobacco Mosaic Virus: A model system for plant biology. *Annual Review of Phytopathology.* 42:13-34
- Sequeira L.** 1976. Induction and suppression of the hypersensitive reaction caused by phytopathogenic bacteria: specific and non-specific components. In: Wood RKS, Graniti A, eds. *Specificity in plant diseases*. Plenum Press, New York and London. 289-306
- Sequeira L, Gaard G, de Zoeten GA.** 1977. Interaction of bacteria and host cell walls: its relation to mechanisms of induced resistance. *Physiological Plant Pathology* 10: 43-50
- Stakman EC.** 1915. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *Journal of Agricultural Research* 4: 193-200
- Stall RE, Cook AA.** 1979. Evidence that bacterial contact with the plant cell is necessary for the hypersensitive reaction but not the susceptible reaction. *Physiological Plant Pathology* 14: 77-78
- Sticher L, Mauch-Mani B, Mettraux JP.** 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35: 235-270
- Süle S.** 1973. Növénykórokozó baktériumok patogénitási faktorai és a gazdanövény hiperszenzitiv reakciója. Kandidátusi értekezés

- Szatmári Á.** 2008. A baktériumok által indukált általános rezisztenciával kapcsolatba hozható növényi gének azonosítása és kifejeződésük vizsgálata. *Doktori értekezés* Szent István Tudományegyetem
- Szatmári Á, Ott PG, Varga GJ, Besenyei E, Czellig A, Klement Z, Bozsó Z.** 2006. Characterisation of basal resistance (BR) by expression patterns of newly isolated representative genes in tobacco. *Plant Cell Rep* 25:728-740.
- Szarka J., Toldi O., Szarka E., Remenyik J., Csilléry G.** 2006. General Defense Reaction in the Plant Kingdom *Acta Agronomica Hungarica* 54:221-232
- Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M.** 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal* 37(6):914-939.
- Trewavas A.** 2000. Signal perception and transduction. In: *Buchanan B., Gruissem R., Jones R. eds – Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. 930-987
- Turner JG, Novacky A.** 1974. The quantitative relation between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction. *Phytopathology* 64: 885-890
- Underwood W., Melotto M., He SY.** 2007. Role of plant stomata in bacterial invasion *Cellular Microbiology* vol (9) 7:1621-1692
- van der Hoorn RA., Jones JD.** 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinions in Plant Biology* 7: 400-407.
- van der Hoorn RA.** 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms *Annual Review of Plant Biology* 59:191-223
- van Loon LC.** 1987. Disease induction by plant viruses. *Advances in Virus Research*. 33:205-255
- Vierstra RD.** 2003. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many proteins *Trends in Plant Science* (8)3:135-142
- Ward HM.** 1902. On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust, *Puccinia dispersa* Erikss. *Annals of Botany* 16: 233-315
- Waterhouse PM, Smith NA, Wang M-B.** 1999. Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends in Plant Science* 4: 452-457
- Weintraub M, Ragetli HWJ.** 1964. An electron microscope study of tobacco mosaic virus lesions in *Nicotiana glutinosa* L. *Journal of Cell Biology* 23: 499-509
- Wenlong L, Yongshan Z, Chunji L, Guibin Y, Sisi W, Chunyan H, Mengchen Z, Dongmei W.** 2012. Callose deposition at plasmodesmata is a critical factor in restricting the cell-to-cell movement of Soybean mosaic virus *Plant Cell Reports* 31(5):905-916
- Wood PJ, Fulcher RG.** 1983. Specific interaction of aniline blue with (1→3)-β-D-glucan *Carbohydrate Polimers* 4(1):49-72
- Wydro M, Kozubek E, Lehmann P.** 2006. Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana* *Acta Biochimica Polonica* 53(2): 289-298
- Xia Y., Suzuki H., Blount J., Guo Z., Patel K., Dixon RA., Lamb C.** 2004. An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *The EMBO Journal* 23:980-988
- Yamanaka T, Ohta T, Takahashi M, Meshi T, Schmidt R, Dean C, Naito S, Ishikawa M.** 2000. TOM1, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proceedings of National Academy of Sciences* 97: 10107-10112
- Zhang H, Zheng X, Zhang Z.** 2010. The role of vacuolar processing enzymes in plant immunity *Plant Signaling and Behavior* 5(12):1565-1567

**Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, Chen S, Tang X, Zhou JM.** 2007. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host & Microbe* 1(3):175-185

**Zhao J, Davis LC, Verpoorte R.** 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites *Biotechnology Advances* 23(4):283-333

**Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakley EJ, Jones JDG.** 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428:764-767

**Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W.** 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiology* 136: 2621-2632.