

A pályázat címe:

## **A növényi gén-indukció szerepe a nekrotizis-gátlással együtt járó rezisztenciaformákban**

### **A kutatási téma - elméleti háttér és megvalósítandó célok**

Nekrotikus tünetekkel együtt járó fertőzéseknel a növények védetségét nyernek egy későbbi, ún. kihívó fertőzéssel szemben. A lokális, ill. szisztémikus szerzett rezisztencia néven ismert jelenség mechanizmusa még nem teljesen tisztázott (Maleck és Dietrich, 1999; Mou et al., 2003), azonban a folyamat együtt jár néhány tipikus biokémiai/molekuláris változással. Egyrészt, a nekrotikus tüneteket mutató fertőzött szövetekben a nekrotizis kialakulásában alapvető szerepet játszó reaktív oxigénformák felhalmozódása figyelhető meg (Lamb és Dixon, 1997; Grant és Loake, 2000; Hafez és Király, 2003). Emellett mind a fertőzött, mind a fertőzetlen, egészséges növényi részekben megnő az endogén szalicilsav-szint és megemelkedik több stressz-gén - ún. patogenezissel kapcsolatos gének, ill. antioxidánsok - expressziója (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990; Ward et al., 1991; Fodor et al., 1997; Király et al., 2002).

Korábbi kutatásaink szerint egy általunk előállított interspecifikus dohány hibrid (*Nicotiana edwardsonii* var. Columbia) (Cole et al., 2001) fokozottan rezisztens két növényi vírus (dohány mozaik- és dohány nekrotizis vírus, TMV és TNV) által okozott nekrotikus tünetekkel szemben, és fertőzetlenül is lényegesen nagyobb szalicilsav-szintet és antioxidáns enzim aktivitást/génexpressziót (glutathion-S-transzferáz és aszkorbát peroxidáz) mutat, mint az ugyanazon szülőkből előállított kontroll (*N. edwardsonii*) növények. Feltételezhető, hogy a vírus indukálta nekrotizissal szemben rezisztens 'Columbia' növényekben egy genetikailag meghatározott, állandóan aktivált állapotú "szerzett" rezisztencia működik. Az említett kutatási előzmények alapján a pályázat során a következő kérdésekre kerestünk választ:

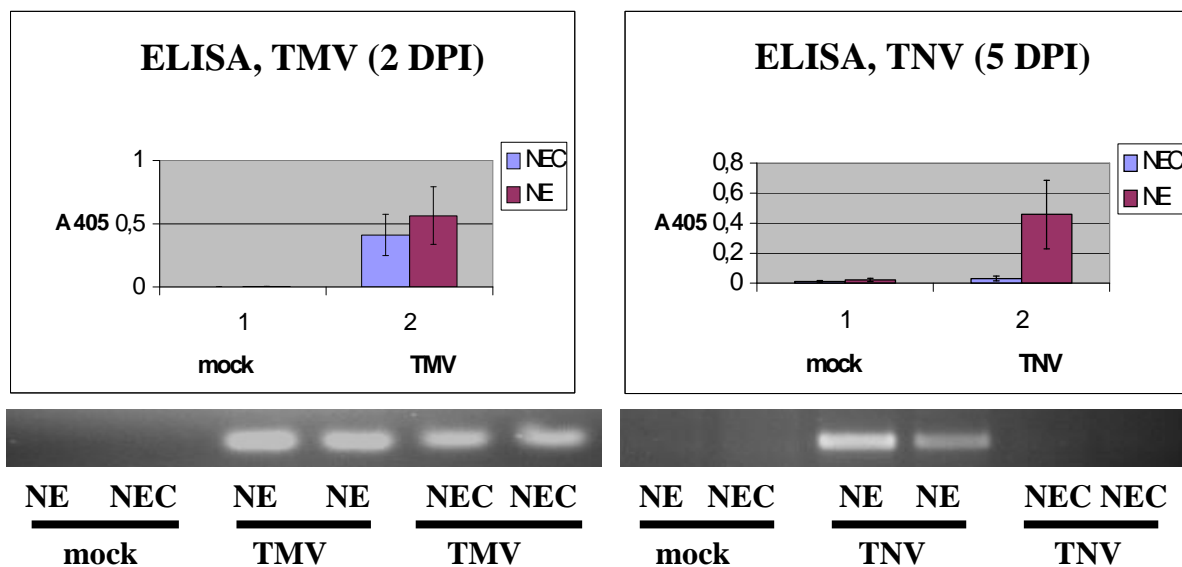
- 1) A *N. edwardsonii* var. Columbia interspecifikus hibridben vírusfertőzéseknel megfigyelt tüneti (nekrotizis) rezisztencia együtt jár-e a kórokozó replikációjának gátlásával?
- 2) A *N. edwardsonii* var. Columbia nekrotizis-rezisztenciájában valóban szerepet játszik-e a szalicilsav felhalmozódása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

### **A *N. edwardsonii* var. Columbia vírusfertőzésekkel szembeni rezisztenciája nemcsak a nekrotikus tüneteket, hanem a vírus replikációt is gátolhatja**

Az általunk korábban előállított interspecifikus dohány hibrid (*N. edwardsonii* var. Columbia, lásd Cole et al., 2001) fokozottan rezisztens két növényi vírus (dohány mozaik- és dohány nekrotizis vírus, TMV és TNV) által okozott lokális nekrotikus tünetekkel szemben a kontroll (*N. edwardsonii*) növényekhez képest. A 'Columbia' növények fokozott rezisztenciája

elsősorban a lokális léziók számának és méretének jelentős (legalább 50 %-os) csökkenésében nyilvánul meg. Felmerül a kérdés, hogy ez a nekrotizis-rezisztencia együtt jár-e a vírus replikáció gátlásával, azaz a *N. edwardsonii* var. Columbia teljes vagy csak korlátozott (tüneti) rezisztenciát mutat az említett két vírus kórokozóval szemben? A kérdés tisztázásához a két *Nicotiana*-hibridben TMV-, ill. TNV-fertőzés során a vírus replikációt kétféle módszer segítségével követtük nyomon: a virion-koncentrációt köpenyfehérjére specifikus antitestek felhasználásával mértük, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel, míg a vírus RNS-ek felhalmozódását kétlépéses szemikvantitatív RT-PCR-rel (reverz transzkripcióval egybekötött polimeráz láncreakció) detektáltuk, a TMV és TNV genom köpenyfehérjét kódoló régiójának felszaporításával.

TMV-fertőzésnél a vírus replikáció gyakorlatilag ugyanolyan mértékű volt mindkét növényfajban (*N. edwardsonii* és *N. edwardsonii* var. Columbia). Érdekes viszont, hogy TNV-fertőzésnél a 'Columbia' növényekben szinte alig detektáltunk vírus replikációt (**1. ábra**). Ezek szerint TNV fertőzésnél a 'Columbia' növények rezisztenciája nemcsak a lokális nekrotikus tünetekkel (léziók), hanem a vírus replikációval szemben is megnyilvánul. Mindez feltehetően annak a következménye, hogy TNV-fertőzés esetén a tüneti rezisztencia hatékonyabb (akár 80 %-os léziószám- és méret csökkenés), mint TMV-fertőzésnél (csak kb. 50 %-os léziószám- és méret csökkenés) (Cole et al., 2004). A *N. edwardsonii* var. Columbia vírusfertőzésekkel szembeni rezisztenciája tehát TNV-fertőzés esetén nemcsak a lokális nekrotikus tüneteket, hanem a vírus replikációt is gátolja.



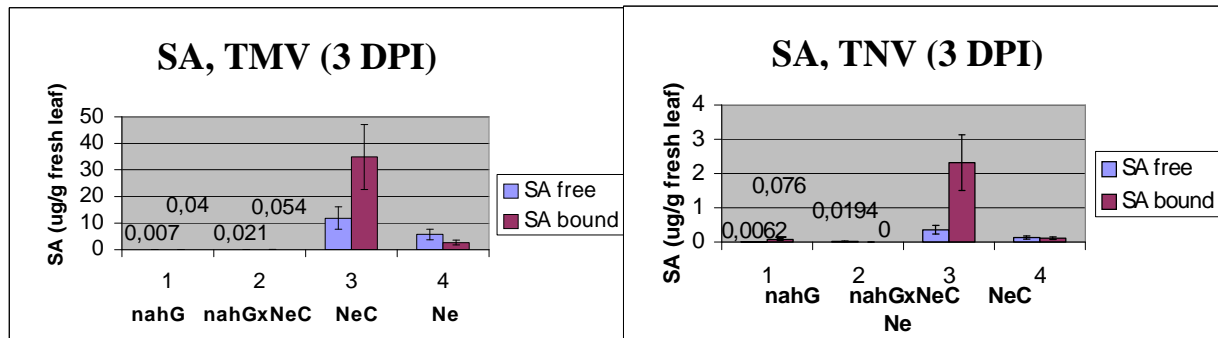
**1. ábra:** Dohány mozaik- és dohány nekrotizis vírus (TMV és TNV) replikációja *N. edwardsonii* (NE) és *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) növények inokulált leveleiben, a fertőzés után 2, ill. 5 nappal. A felső ábrákon az ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel, az alsó ábrákon az RT-PCR (kétlépéses szemikvantitatív reverz transzkripció/polimeráz láncreakció) módszerrel kapott eredmények láthatók. Mock = kontroll inokulált (mechanikai stressz). Az RT-PCR-nél (TMV, ill. TNV köpenyfehérje gén expressziója) valamennyi minta azonos mennyiségű (1,5 ug) teljes RNS-t reprezentál.

### A szalicilsav és az antioxidáns kapacitás szerepe a *N. edwardsonii* var. Columbia vírusfertőzésekénél mutatott rezisztenciájában

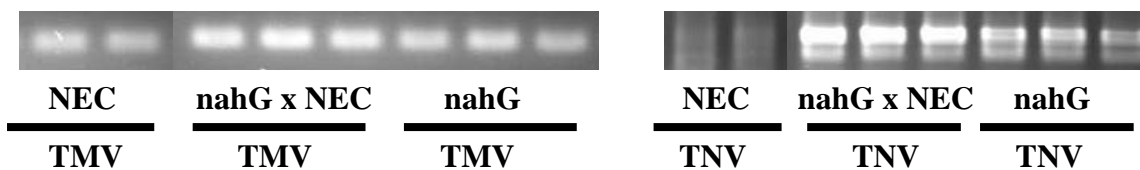
I/ A szalicilsav kulcsszerepet játszik a *N. edwardsonii* var. Columbia vírusfertőzésekénél mutatott rezisztenciájában

Korábbi vizsgálataink szerint a *N. edwardsonii* var. Columbia lokális vírusfertőzéseknél (TMV és TNV) megfigyelt fokozott mértékű rezisztenciája egy genetikailag aktivált "szerzett" rezisztenciának fogható fel, amely együtt jár egyes védekezési folyamatok állandó megnyilvánulásával: pl. a fertőzés nélkül is rendkívül magas szabad és kötött szalicilsav szint és egy patogenezisszel kapcsolatos fehérje (PR-1) túltermelése (Cole et al., 2004).

A magas szalicilsav-szint és a lokális vírusfertőzéseknél tapasztalt fokozott rezisztencia közötti kapcsolat egyértelmű tisztázásához az *N. edwardsonii* var. Columbia-t kereszteztük egy szalicilsav-felhalmozásra képtelen transzgenikus (*nahG*) dohánnyal (*N. tabacum* cv. Xanthi). Az F1 fajhibridekben nyomon követhető, hogy a szalicilsav hiánya mennyiben befolyásolja a vírus-rezisztenciát a tüneti (nekrózis) rezisztencia, ill. a vírusreplikáció szintjén. Megemlítenéd, hogy a *nahG* dohány a vad típushoz képest fokozottan fogékony a sejt- és szöveti nekrotizisra és az ilyen tünetekkel járó kórokozó-fertőzésekre (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994). Kimutattuk, hogy a Columbia x *nahG* F1 hibridekben a szabad és kötött szalicilsav a *nahG* dohánynál mérhető nullához közeli szintre csökken (**2. ábra**) és a fokozott vírus rezisztencia megszűnik, a TMV és TNV által okozott lokális tünetek és a vírus replikáció mértéke egyaránt a *nahG* dohánynál mérhető szintre emelkedik (**3. ábra**).



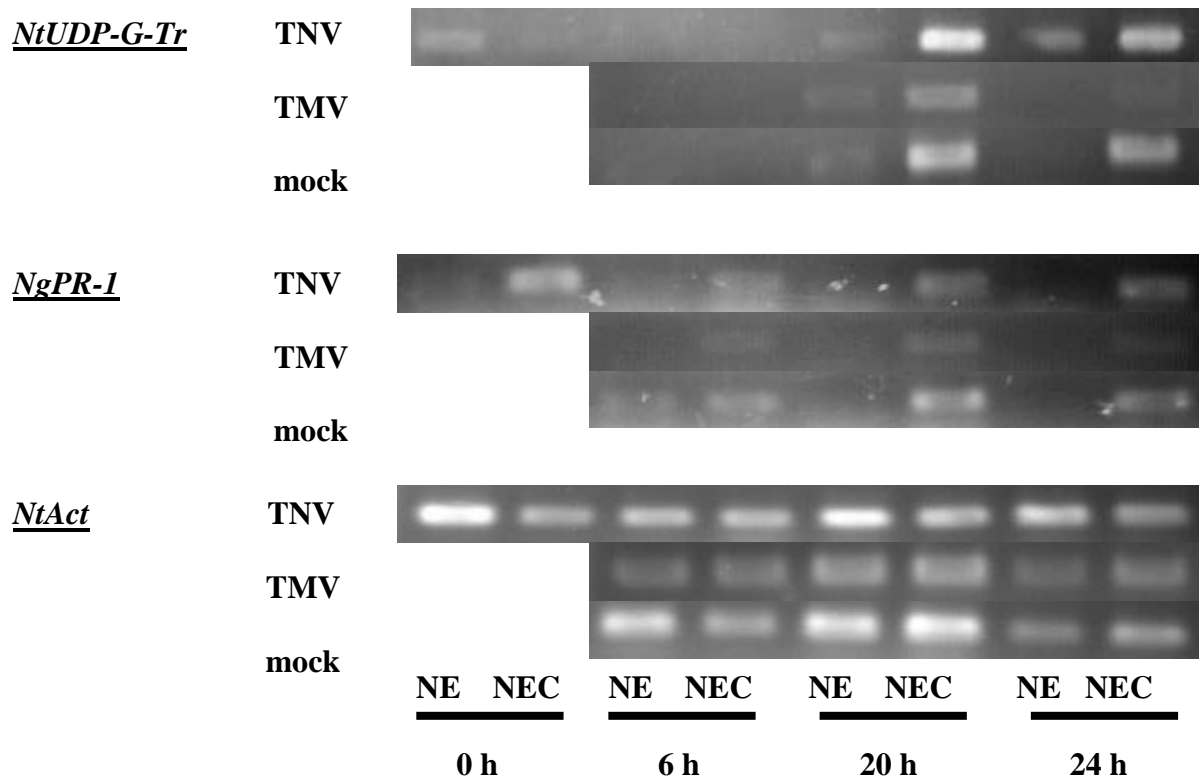
**2. ábra:** Dohány mozaik- és dohány nekrotizis vírussal (TMV és TNV) fertőzött *N. edwardsonii* (NE), *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC), *nahG* dohány valamint Columbia x *nahG* F1 hibrid növények szabad- és kötött szalicilsav tartalma a fertőzés után 3 nappal, nagyteljesítményű folyadékkromatográfias módszerrel (HPLC) mérve (Meuwly and Métraux, 1993). SA free = szabad szalicilsav. SA bound = kötött szalicilsav.



**3. ábra:** A szalicilsav felhalmozás hiánya megszünteti a fokozott vírus rezisztenciát: dohány mozaik- és dohány nekrotizis vírus (TMV és TNV) replikációja (TMV, ill. TNV köpenyfehérje gén expressziója kétlépéses szemikvantitatív RT-PCR-rel mérve) *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC), *nahG* dohány valamint Columbia x *nahG* F1 hibrid növényekben, a fertőzés után 2, ill. 5 nappal. Valamennyi minta azonos mennyiségű (1,5 ug) teljes RNS-t reprezentál.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a szalicilsav ténylegesen szerepet játszik a *N. edwardsonii* var. Columbia fokozott vírusrezisztenciájában. Feltűnő, hogy a 'Columbia' növényekben elsősorban a kötött szalicilsav halmozódik fel (**2. ábra**), amelynek nagy része valószínűleg szalicilsav-glikozid (SAG). Annak ellenére, hogy a SAG biológiailag inaktív,

szalicilsavvá történő hidrolíziséhez mindössze kb. 2 óra szükséges, ezért a növény így képes talán a leggyorsabban mobilizálni szalicilsav készleteit, és beindítani a védekezési reakciókat (Hennig et al., 1993; Malamy et al., 1992). Ha a kötött (glikozidos) szalicilsav kulcsszerepet játszik a növényi vírus rezisztenciában, várható, hogy a SAG bioszintézis kulcsenzimjét kódoló gén(ek) expressziója is fokozottabb a 'Columbia' növényekben. Egy szalicilsav-glikozilálásért felelős gén (UDP-glükóz:szalicilsav glükozil-transzferáz, *NtUDP-G-Tr*) expressziója TMV és TNV fertőzés után valóban igen erősen indukálódott a *N. edwardsonii* var. Columbia-ban, míg a *N. edwardsonii*-ban jóval kevésbé volt detektálható a gén expressziója (4. ábra).



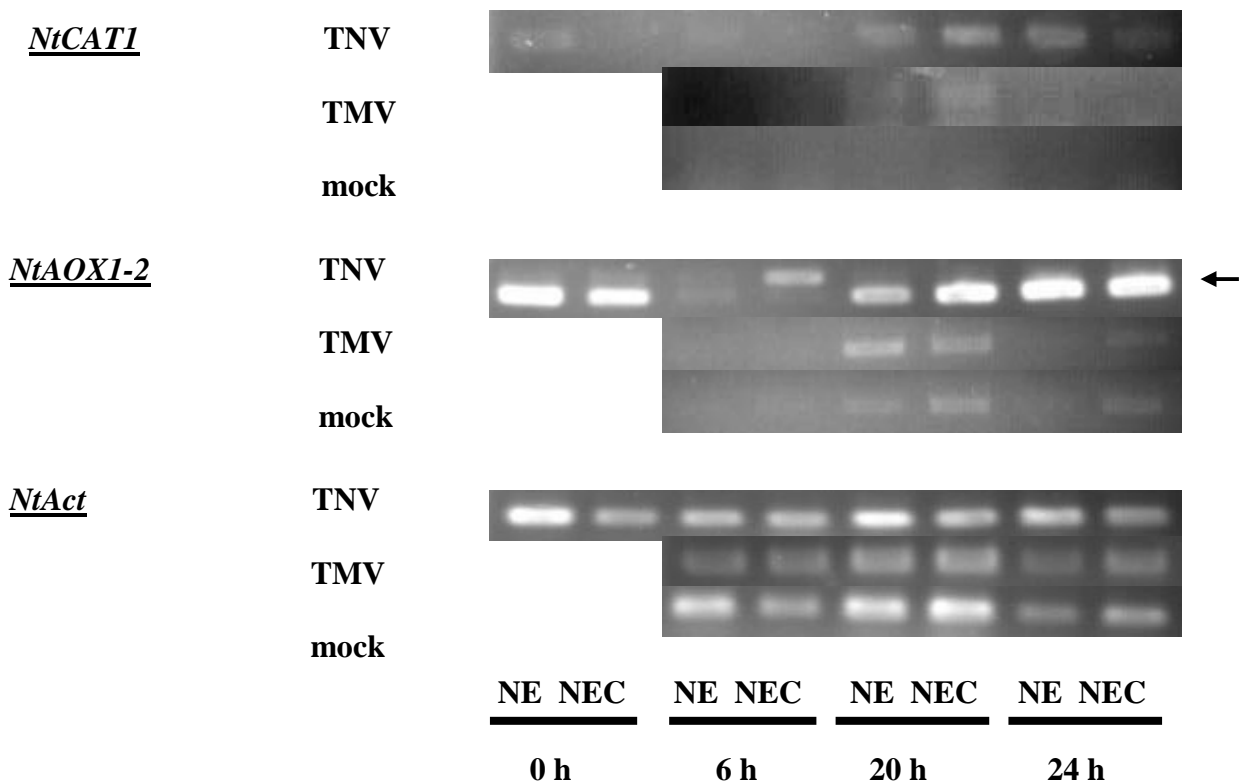
**4. ábra:** Egy szalicilsav-glikozilálásért felelős gén (*NtUDP-G-Tr*) és egy patogenezissel kapcsolatos gén (*NgPR-1*) expresszió változásai dohány mozaik- és dohány nekrotízis vírussal (TMV és TNV) fertőzött *N. edwardsonii* (NE), *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) növényekben, a vírusfertőzés után különböző időpontokban. Mock = kontroll inokulált (mechanikai stressz). A génexpressziót egy kétlépéses szemikvantitatív reverz transzkripció/polimeráz láncrakció módszerrel (RT-PCR) mértük, referenciának egy dohány aktin gén (*NtAct*) expresszióját tekintettük.

A nekrotízis-gátlással együtt járó növényi rezisztenciaformák (pl. szerzett rezisztencia, hiperszenzitív reakció) egyik legfontosabb kísérőjelensége a szalicilsav és az ún. patogenezissel kapcsolatos (PR) gének indukciója. Hangsúlyozandó viszont, hogy míg a szalicilsavnak ténylegesen igazolt szerepe van az említett rezisztencia-formákban (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994), addig a PR-gének indukciója vírusfertőzéseknél csupán egy megbízható molekuláris marker (Dumas és Gianinazzi, 1986; Cutt et al., 1989; Linthorst et al., 1989). A *N. edwardsonii* var. Columbia-ban megfigyelt fokozott vírus rezisztencia csak kb. 50 napos kor után jelentkezik, amikor a növények fertőzés nélkül is nagy mennyiségben kezdenek el termelni egy patogenezissel kapcsolatos fehérjét (PR-1). A PR-1 fehérje termelésének beindulása egygénés, dominánsan öröklődő tulajdonság, amelyet a *TPR1*

(Temporal expression of PR-proteins<sub>1</sub>) lókuszt határoz meg (Cole et al., 2004). Vizsgálataink azt is kimutatták, hogy az mRNS-szintű *PR-1* génexpresszió szintén rendkívül erős már a fertőzetlen 'Columbia' növényekben is, míg a *N. edwardsonii*-ban még 24 órával a vírushatások után is alig detektálható a gén expressziója (**4. ábra**).

2/ Az antioxidáns kapacitás szerepe a *N. edwardsonii* var. *Columbia* vírushatásoknál mutatott rezisztenciájában

Részben saját, részben mások kutatásai alapján ismert, hogy a nekrotizáció-gátlással együtt járó növényi rezisztenciaformáknál (pl. szerzett rezisztencia, hiperszenzitív reakció) kulcsszerepet játszik a fokozott antioxidáns kapacitás (pl. Gullner et al., 1995; Fodor et al., 1997; Király et al., 2002; Levine et al., 1994; Mittler et al., 1998, 1999; Delledonne et al., 2001; Mou et al., 2003). A fokozottan vírus rezisztens *N. edwardsonii* var. 'Columbia' növények fertőzetenül is lényegesen nagyobb antioxidáns enzimaktivitást/génexpressziót (glutathion-S-transzferáz és aszkorbát peroxidáz) mutatnak, mint a fogékonyabb *N. edwardsonii* (Király et al., 2003, 2004). Bizonyos antioxidánsok viszont feltehetően nem járulnak hozzá a 'Columbia' növények fokozott vírus (nekrotizáció) rezisztenciájához: két másik antioxidáns gén (egy kataláz, *NgCAT1* és alternatív oxidáz, *NtAOX1-2*) expressziója hasonló módon változott mindkét növényben (**5. ábra**). Ezek szerint az említett gének, ill. az általuk kódolt izoenzimek nem játszanak döntő szerepet a fokozott vírus (nekrotizáció) rezisztencia kialakításában és fenntartásában. Érdekes viszont, hogy az említett gének expressziója mindkét növényben TMV és TNV fertőzéskor is átmenetileg lecsökken (a fertőzés után kb. 6 órával) majd később (a fertőzés után kb. 20 órával) visszaáll az eredeti szintre. Mindez a hiperszenzitív vírus rezisztenciára (lokális léziók) jellemző szöveti nekrotizációval, pontosabban az azt előidéző programozott sejthalál kialakulásával lehet összefüggésben, amint arra korábban már több munka is rámutatott (Mittler et al., 1998; Yi et al., 1999, 2003). A hipotézis teszteléséhez tervezzük egyes programozott sejthalálban szerepet játszó gének expressziójának vizsgálatát a TMV- és TNV fertőzött növényekben.

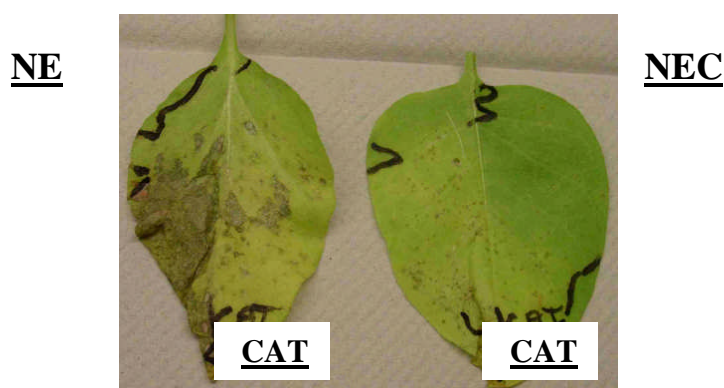


**5. ábra:** Két antioxidáns gén (kataláz, *NgCAT1* és alternatív oxidáz, *NtAOX1-2*) expresszió változásai dohány mozaik- és dohány nektrózis vírussal (TMV és TNV) fertőzött *N. edwardsonii* (NE), *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) növényekben, a vírusfertőzés után különböző időpontokban. Mock = kontroll inokulált (mechanikai stressz). A génextpressziót egy kétlépéses szemikvantitatív reverz transzkripció/polimeráz láncrakció módszerrel (RT-PCR) mértük, referenciának egy dohány aktin gén (*NtAct*) expresszióját tekintettük. Az *NtAOX1-2* gén expresszió változásait a nyílal jelölt alsó fragment (méret: 520 bp) jelzi.

Annak egyértelmű tisztázásához, hogy egyes antioxidánsok aktivitása szerepet játszik-e a *N. edwardsonii* var. Columbia vírus (nektrózis) rezisztenciájában, megkíséreltük megnövelni a kontroll (*N. edwardsonii*) növények antioxidáns kapacitását. Amennyiben az antioxidáns kapacitás valóban fontos tényezője ennek a rezisztencia-típusnak, úgy várható, hogy ezzel a beavatkozással kialakítható a 'Columbia' növényekéhez hasonló mértékű vírus (nektrózis) rezisztencia.

Egy paradicsom szuperoxid-dizmutáz (*SOD*) és kukorica kataláz (*CAT*) gént hordozó plazmid vektorokat tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens* tenyésztettel infiltráltuk a leveleket, így ugyanis az infiltrált szövetekben a vizsgálandó antioxidáns gén túltermelhető (tranzien génextpresszió, Kapila et al., 1997; Yang et al., 2000). Az infiltrálás után 2 nappal a leveleket TMV-vel fertőztük. A *SOD* gén infiltrálása lényegében nem változtatta meg a TMV fertőzés által okozott tünetek mértékét. A *CAT* gén infiltrálása azonban jelentős mértékben csökkentette a nekrotikus léziók számát és méretét mindkét növénytípusban (**6. ábra**). *N. edwardsonii*-ban a *CAT* infiltrálás közel olyan szintre csökkentette a TMV-fertőzés tüneteit, mint a 'Columbia' növényekben a kontroll (csak *A. tumefaciens*) infiltrálás (lásd a 6. ábrán a két levél egymással szomszédos felét). Ezek szerint egy kataláz fehérje tranzien túltermeltetése képes a 'Columbia' növényekéhez hasonló mértékű vírus (nektrózis) rezisztenciát előidézni a *N. edwardsonii*-ban. Egyes antioxidánsok tehát valóban hozzájárulhatnak a 'Columbia' fajhibrid fokozott vírus rezisztenciájához, legalábbis a tünetek (nekrotikus léziók) szintjén.

Az antioxidáns kapacitás megnövelésére egy másik kísérleti megközelítést is terveztünk: ennek lényege, hogy az említett *SOD* és *CAT* génekkel stabilan transzformált dohányokkal keresztezzük a *N. edwardsonii*-t és az F1 utódnövényekben vizsgáljuk a lokális vírusfertőzésekkel szembeni rezisztencia változását. Sajnos az említett transzgenikus növények csak a pályázati idő végére készültek el, így ezeket a vizsgálatokat eddig nem állt módunkban elvégezni, de a közeljövőben tervezzük a kísérletek folytatását, nemcsak *SOD* és *CAT* transzformánsokkal, de egy lucerna ferritin gént túltermelő dohánnyal is. A ferritin jelenléte úgy biztosít - közvetett módon - fokozott antioxidáns kapacitást és nektrózis-rezisztenciát, hogy a szabad vas hatékony megkötésével gátolja a nektrózisért végső soron felelős reaktív oxigénszármazékok felhalmozódását (Deák et al., 1999).



**6. ábra:** Egy kukorica kataláz gén (*ZmCAT2*) tranzien túltermeltetése *Agrobacterium tumefaciens* fertőzés segítségével, *Nicotiana edwardsonii* (NE), ill. *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) növényekben; hatás a TMV-

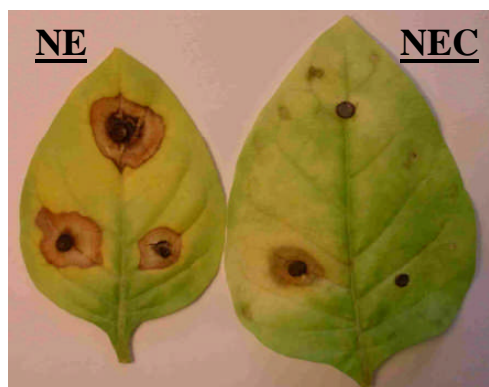


fertőzés által okozott lokális nekrotikus tünetekre. Baloldali levélfél: kontroll-infiltrált (csak *A. tumefaciens*, kataláz gén nélkül). Jobboldali levélfél: kataláz-konstrukciót (pBB30CAT) tartalmazó *A. tumefaciens* infiltrálása. A baktérium infiltrálás után két nappal a növények TMV-vel lettek inokulálva. A kép a TMV-fertőzés után 6 nappal készült.

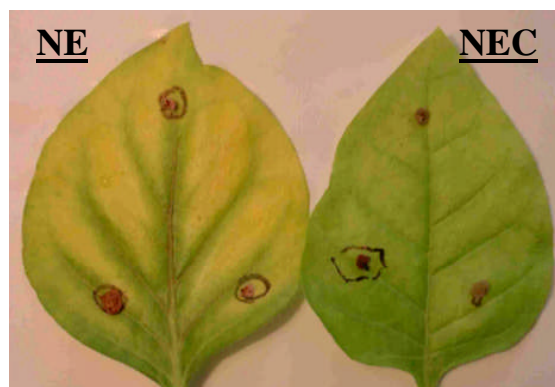
**A *N. edwardsonii* var. Columbia vírus rezisztenciája egy genetikailag állandóan aktivált állapotú "szerzett" rezisztencia, amely nektrózist előidéző nem-vírus kórokozók és abiotikus stresszek ellen is hatásos**

A növények szerzett rezisztenciája hosszan tartó védelmet biztosít vírus-, baktérium- és gomba kórokozókkal szemben egyaránt (Gaffney et al., 1993; Vernooij, 1995; Friedrich et al., 1996). A szerzett rezisztencia megjelenésével párhuzamosan megnő az endogén szalicilsav-szint mind a fertőzött, mind az egészséges növényi szövetekben (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a *N. edwardsonii* var. Columbia vírusfertőzéseknél mutatott fokozott rezisztenciája – feltehetően az állandóan magas szalicilsav-szinttel összefüggésben – érvényesül más, nekrotikus tüneteket okozó baktérium- és gombakórokozók, ill. abiotikus stresszek ellen is.

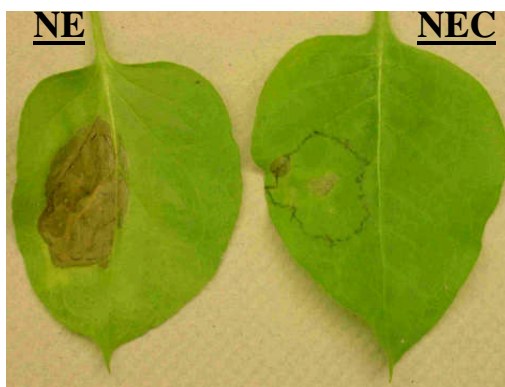
Kísérleteink szerint a 'Columbia' növények nektrózis rezisztenciája tüneti szinten érvényesül olyan, nektrózist okozó, gazdaságilag jelentős gomba patogénekkal szemben is, mint a *Botrytis cinerea* és *Phytophthora nicotianae*. A gombatenyészeteket hordozó kb. 0,5 cm átmérőjű agartáptalaj kockákat a növények leveleire helyeztük, a fertőzést követően 5-6 nappal megjelentek a szabad szemmel is látható nekrotikus tünetek, amelyek a *N. edwardsonii* var. Columbia levelein jóval enyhébbek voltak. Hasonló eredményt kaptunk baktériumos fertőzéseknél is (*Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola és *Pseudomonas syringae* pv. tabaci) (7. ábra).



*Botrytis cinerea*



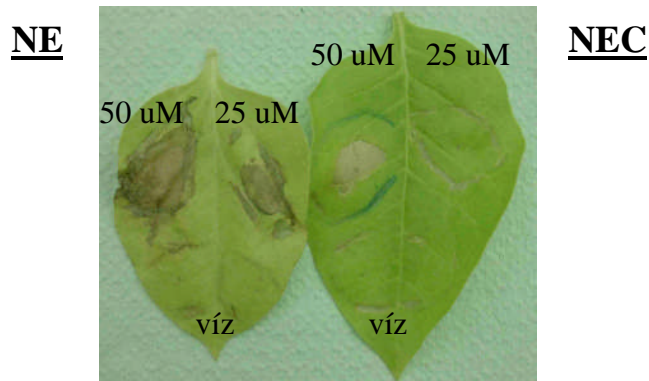
*Phytophthora nicotianae*



*Pseudomonas syringae* pv. tabaci

**7. ábra:** A *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) fokozottan ellenáll gomba- és baktérium kórokozók által okozott nekrotikus tüneteknek. A baktériumos fertőzéseknél a levelekbe infiltrált baktérium szuszpenzió töménysége  $10^4$  sejt/ml volt (az infiltrált terület tollal körberajzolva). NE = *N. edwardsonii*. A felvételek 6 nappal a fertőzések után készültek.

Ismeretes, hogy a szerzett rezisztencia nemcsak kórokozók, hanem a növényekben nektrózist előidéző, reaktív oxigénszármazékokat generáló herbicidekkel szemben is érvényesül (Strobel és Kuć, 1995). A kórokozók mellett ezért megvizsgáltuk, hogy a 'Columbia' növények tüneti (nekrózis) rezisztenciája érvényesül-e egy nekrotikus tüneteket (oxidatív stresszt) előidéző herbiciddel szemben is? A növények leveleit paraquat 25 és 50  $\mu$ M-os vizes oldatával infiltráltuk. A *Columbia* növényekben a paraquat által okozott nekrotikus tünetek jóval enyhébbek voltak és lassabban terjedtek (tünetek csak az infiltrált területen belül), mint a *N. edwardsonii* -ban (**8. ábra**). A kapott eredmények szerint tehát a *N. edwardsonii* var. Columbia fokozott rezisztenciája nemcsak kórokozó fertőzések, hanem abiotikus stresszek által okozott nekrotikus tünetekkel szemben is érvényesül. Ebből a szempontból a 'Columbia' növények hasonlítanak egy paraquat toleráns dohány (cv. Samsun) vonalra, amely szintén "multirezisztens" többféle kórokozó és abiotikus stressz által indukált nektrózissal szemben (Barna et al., 1993).



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

### A kutatási eredmények hasznosításának lehetőségei, a kutatási téma további lehetséges irányai

Összefoglalva a pályázat keretében végzett kísérleteink eredményeit megállapítható, hogy a *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia növényekben egy genetikailag meghatározott, állandóan aktivált állapotú "szerzett" rezisztencia működik, amelyben

- nemcsak a nekrotikus tünetek, de a fertőző kórokozó replikációja is gátlódhat (dohány nektrózis vírus /TNV/ fertőzésénél)
- kulcsszerepet játszik a magas szalicilsav-szint és egyes antioxidánsok
- hatásos nemcsak vírus-, hanem gomba- és baktérium kórokozók, valamint abiotikus stresszek által indukált nekrotikus tünetek ellen is.

A gyakorlat számára fontos lehet a 'Columbia' növényekhez hasonló tulajdonságokat mutató természetesen növényvonalak előállításának, amelyek fokozottan ellenállnak különféle nektrózissal együtt járó betegségeknek és stresszeknek, de emellett agronómiai tulajdonságaik (pl. zöldtömeg és/vagy termésmennyiség, stb.) nem romlanak le. Ehhez azonban először



alaposabban meg kell ismerni a rezisztencia mechanizmusát, amihez kiindulópontot jelenthet, hogy a *N. edwardsonii* var. Columbia-ban az egyik legmegbízhatóbb rezisztencia-marker (PR-1 fehérje túltermelése) egygénes, dominánsan öröklődő tulajdonság (Cole et al., 2004).

A két interspecifikus hibrid (*N. edwardsonii* var. Columbia és *N. edwardsonii*) további összehasonlító vizsgálata során tervezzük, hogy egyes antioxidáns, prooxidáns, programozott sejthalállal kapcsolatos és szalicilsav metabolizmus géneknek a 'Columbia' növények rezisztenciájában játszott szerepét alaposabban megismerjük. Kísérleti megközelítésként a vírusindukált géncsendesítés (VIGS) módszerét szeretnénk alkalmazni. A tervezett kutatás támogatását a 2006-ban az ehhez kapcsolódó témában elnyert OTKA pályázatunkból (szerződés-kötés folyamatban) kívánjuk biztosítani.

## Idézett irodalom

- Barna, B., Ádám, A., Király, Z. 1993. Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* 80, 420-422.
- Cole, A.B., Király, L., Lane, L.C., Wiggins, E.B., Ross, K., Schoelz, J.E. 2004. Temporal expression of PR-1 and enhanced mature plant resistance to virus infection is controlled by a single dominant gene in a new *Nicotiana* hybrid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 976-985.
- Cole, A.B., Király, L., Ross, K., Schoelz, J.E. 2001. Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of *Nicotiana* species to *Cauliflower mosaic virus* infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 31-41.
- Cutt, J.R., Harpster, M.H., Dixon, D.C., Carr, J.P., Dunsmuir, P., and Klessig, D.F. 1989. Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR1b gene. *Virology* 173, 89-97.
- Deák, M., Horváth, G.V., Davletova, S., Török, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Király Z., Dudits, D. 1999. Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotechnology* 17, 192-196.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Wyman, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessman, H., Ward, E., Ryals, J.A. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 226, 1247-1250.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13454-13459.
- Dumas, E., Gianinazzi, S. 1986. Pathogenesis-related (b) proteins do not play a central role in TMV localization in *Nicotiana rustica*. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 11, 69-76.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Gut Rella, M., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Métraux, J.-P., Kessman, H. and Ryals, J. 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10, 61-70.
- Fodor, J., Gullner, G., Ádám, A.L., Barna, B., Kőmives, T., Király, Z. 1997. Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid. *Plant Physiol.* 114, 1443-1451.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessman, H., Ryals, J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261, 754-756.
- Grant, J.J., Loake, G.J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124, 21-29.

Gullner, G., Fodor, J., Király, L. 1995. Induction of glutathione-S-transferase activity in tobacco by tobacco necrosis virus infection and by salicylic acid. *Pesticide Sci.* 45, 290-291.

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

Hennig, J., Malamy, J., Gryniewicz, G., Indulski, J., Klessig, D.F. 1993. Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant J.* 4, 593-600.

Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., Angenon, G. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122, 101-108.

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

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

Király, Z., Barna, B., Kecskés, A., Fodor, J. 2002. Down-regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by tobacco mosaic virus. *Free Rad. Res.* 36, 981-991.

Lamb, C., Dixon, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.

Linthorst, H.J.M., Meuwissen, R.L.J., Kauffmann, S., Bol, J.F. 1989. Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PRS in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell* 1, 285-291.

Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. and Raskin, I. 1990. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250, 1002-1004.

Malamy, J., Hennig, J., Klessig, D.F. 1992. Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *Plant Cell* 4, 359-366.

Maleck, K., Dietrich, R.A. 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4, 215-219.

Métraux, J.-P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmidt, E., Blum, W., Inverardi, B. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250, 1004-1006.

Mittler, R., Feng, X., Cohen, M. 1998. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* 10, 461-473.

Mittler, R., Herr, E.H., Orvar, B.L., van Camp, W., Willekens, H., Inzé, D., Ellis, B.E. 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14165-14170.

Mou, Z., Fan, W., Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935-944.

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

Vernooij, B., Friedrich, L., Ahl Goy, P., Staub, T. Kessman, H. and Ryals, J.A. 1995. 2,6-dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 228-234.

Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P., Ryals, J.A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.

Yang, Y., Li, R., Qi, M. 2000. *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J.* 22, 543-551.

Yi, S.Y., Yu, S.H., Choi, D. 1999. Molecular cloning of a catalase cDNA from *Nicotiana glutinosa* L. and its repression by tobacco mosaic virus infection. *Mol. Cells* 9, 320-325.

Yi, S.Y., Yu, S.H., Choi, D. 2003. Involvement of hydrogen peroxide in repression of catalase in TMV-infected resistant tobacco. *Mol. Cells* 15, 364-369.