

# **AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**Életben maradni – sejthalál és reaktív  
oxigénszármazékok a növényi vírus- és lisztharmat  
rezisztenciában**

**Király Lóránt**

**ATK Növényvédelmi Intézet  
Budapest**

**2023**

## **BEVEZETÉS ÉS KUTATÁSI CÉL**

A növények képesek ugyan sikeresen védekezni az őket támadó kórokozók fertőzésével szemben, de ez sokszor valamilyen nyilvánvaló, makroszkopikusan is észlelhető mellékhatással jár, pl. a megtámadott növényi szövetek elhalásával, lassabb növekedéssel, stb. A betegségek elleni védekezés akkor hatékony, ha gyors lefolyású, a kórokozót hamar hatástalanítja és így a növényi szervezet erőforrásait minél kevésbé köti le. Ilyenkor a gazdanövény általában tünetmentesen képes ellenállni az adott kórokozó fertőzésének. A növénynevelés, ill. a mezőgazdasági gyakorlat számára ezért fontos lehet az olyan természetű növényfajták előállítása, amelyek tünetmentesen képesek védekezni és rezisztenciát kialakítani lehetőleg minél több kórokozóval szemben.

A növények kórokozó (pl. vírusok, baktériumok, gombák) fertőzésekkel szembeni rezisztenciájának legismertebb formája az ún. hiperszenzitív reakció (HR), amikor a kórokozó ágens lokalizálását a gazdában sejt-, ill. szövethalál (nekrotikus léziók) kíséri. Gombás és baktériumos fertőzések esetén már évtizedekkel ezelőtt tisztázódott, hogy a HR két fő komponense – a rezisztencia és a sejt/szövethalál – sok esetben eltérő élettani és genetikai folyamatok eredménye lehet. Növényi vírusfertőzéseknél viszont a HR-t alkotó rezisztencia és sejt/szövethalál független öröklődését és az ehhez kapcsolódó legalapvetőbb élettani folyamatokat kutatásaink kezdetéig (kb. 1998-2000) még nem, ill. csak részben bizonyították.

A növényi betegség ellenállóság folyamatában fontos szerepet játszanak az ún. reaktív oxigénszármazékok (ROS), amelyek minden élő szervezetben megtalálhatók. Növényekben a ROS (pl. szuperoxid  $/O_2^-/$ , hidrogén-peroxid  $/H_2O_2/$ ) kis

koncentrációban többek között a fertőzések elleni védekezés irányítói – a rezisztencia jelátvivői – míg ha nagy koncentrációban és hosszú ideig termelődnek, nemcsak a kórokozót, de a gazdanövényt is károsíthatják.

A betegségekkel szembeni rezisztencia a növényekben sok esetben a HR-re jellemző sejt/szövethalál (vagy más makroszkopikus tünet, pl. klorózis) nélkül is hatékony lehet. A vírusfertőzések ellen megnyilvánuló ún. extrém rezisztencia (ER) nemcsak tünetmentes, hanem a kórokozó replikációját/terjedését is szinte teljes mértékben gátolja. Ilyen típusú ellenállóság pl. a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) által kiváltott ER, amelyet az *Rx* rezisztencia gének (*Rx1* és *Rx2*) biztosítanak burgonyában és dohányban (Bendahmane et al., 1999). Feltételezhető, hogy ER során a vírus replikáció gátlása olyan korán következik be, hogy nincs idő a HR-típusú tünetek (sejt/szövethalál) kialakítására és Bendahmane et al. (1999) szerint ennek egyik fő oka a ROS, elsősorban a szuperoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) korai felhalmozódása lehet. Kutatócsoportunk egyik fő célja volt az elmúlt években ennek a hipotézisnek a bizonyítása, azaz tisztázni, hogy vírussal fertőzött gazdanövényben a ROS felhalmozódás időzítése (korai vagy késői) valóban meghatározza-e, hogy a rezisztencia tünetmentesen vagy sejt/szövethalállal (HR) nyilvánul meg?

Kérdés, hogy a fertőzött növényben a ROS (szuperoxid) felhalmozódás megfelelő időzítése szerepet játszhat-e más kórokozókkal szemben kialakuló tünetmentes rezisztenciákban is? Az ún. nemgazda rezisztencia (a kórokozó által kiváltott rezisztencia azokon a növényfajokon, amelyeket nem tud megfertőzni) általában tünetmentes, de a hatékony kórokozó gátlás pontos oka a mai napig nem teljesen tisztázott. Ilyen típusú rezisztenciát vált ki pl. árpában a búza lisztharmat kórokozója (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*).

Növényvédelmi szempontból fontosnak tartottuk tisztázni a cseresznyepaprika (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme* cv. Szentesi) oltással átvihető, tünetmentes lisztharmat (*Leveillula taurica*) rezisztenciájának élettani hátterét is – mennyiben járul hozzá ehhez a hatékony ellenálló képességhez (és annak oltással történő átviteléhez) a ROS (szuperoxid) felhalmozódás és az ezzel összefüggő védekezési folyamatok?

Ha a növények tünetmentes kórokozó rezisztenciájának legalább néhány típusában valóban szerepet játszik a korai ROS felhalmozódás, akkor a jövőben a rezisztencia nemesítés egyik prioritása lehet olyan növényfajták létrehozása, amelyek képesek a célzott, fertőzés specifikus, korai ROS felhalmozódásra úgy, hogy a rezisztencia nem jár tüneti mellékhatásokkal.

### **A fentiek alapján a doktori értekezésben bemutatott kutatásaink fő céljai az alábbiak voltak:**

1/ Egyes növényi vírusfertőzéseknel a hiperszenzitív reakciót (HR) alkotó rezisztencia és sejt/szövethalál lehet-e genetikai és élettani szempontból független folyamatok eredménye?

- A növényi vírusfertőzésekkel szembeni HR-ben a rezisztencia és a nekrosis (sejt/szövethalál) lehet-e egymástól függetlenül öröklődő tulajdonság?

(karfiol mozaik vírussal /*Cauliflower mosaic virus*, CaMV/ fertőzött *Nicotiana edwardsonii* fajhibridekben)

- A növényi védekező rendszer egyes elemeinek (szalicilsav-tartalom, szulfát ellátottság, patogenezissel kapcsolatos, *PR* gének) indukciója eltérően hat-e a vírusfertőzés által kiváltott HR-t alkotó rezisztenciára és nekrosisra?

(dohány mozaik vírussal /*Tobacco mosaic virus*, TMV/ és dohány nekrozis vírussal /*Tobacco necrosis virus*, TNV/ fertőzött *N. edwardsonii*-ban és *N. tabacum*-ban).

- A HR-rel járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – milyen különbségek vannak a védekezési gének és antioxidánsok aktiválódásában?

(TMV-vel és PVX-szel fertőzött dohányban /*N. tabacum*/).

- A HR-rel járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – milyen szerepe van a reaktív oxigénszármazékok (ROS) korai/késői termelődésének a rezisztencia, ill. sejthalál kialakításában?

(TMV-vel és PVX-szel fertőzött dohányban /*N. tabacum*/).

2/ A fertőzött növényben a ROS (szuperoxid) felhalmozódás megfelelő időzítése szerepet játszhat-e a vírusokon kívül más kórokozókkal szembeni tünetmentes rezisztenciákban is?

- A szuperoxid korai felhalmozódásának milyen szerepe van a biotróf gombakórokozók (pl. lisztharmat) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciában, árpában?

- A szuperoxid felhalmozódásnak meghatározó szerepe van-e a paprika lisztharmattal (*Leveillula taurica*) szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciájában?

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Felhasznált növények, növénynevelés és kezelések, kórokozók és kimutatásuk

Az *N. clevelandii*, *N. glutinosa* és *N. bigelovii* növényeket amerikai kutatási partnerünktől (James Schoelz, University of Missouri, USA) kaptuk.

Az *N. edwardsonii* (n = 34) egy amfidiploid (allotetraploid) fajhibrid, a *N. glutinosa* (n = 12) és *N. clevelandii* (n = 24) keresztezéséből hoztak létre (Christie,

1969; Christie és Hall 1979). Az *N. edwardsonii* fajhibridet – ugyanazokból a szülőkből – újraszintetizáltuk, az új hibrid az *N. edwardsonii* var. Columbia ( $n = 36$ ), melynek kromoszóma garnitúrája teljes (Cole et al., 2001). A *N. glutinosa* (♀) és *N. clevelandii* (♂) keresztezéséből kapott F<sub>1</sub> növények virágait a termékenység helyreállítása (kromoszómaszám megduplázása) érdekében kolhicinnel kezeltük, Gland (1981) szerint. Az egyik kolhicinnel kezelt F<sub>1</sub> növényen 2 virág lett termékeny, az ezekből származó magokból 5 db F<sub>2</sub> egyed neveltünk fel, amelyek habitusa egységes volt. Az F<sub>2</sub> növényeket öntermékenyítve a kapott F<sub>3</sub> generációt, és a többi nemzedékek termékenyek voltak, az F<sub>2</sub> generációéhoz hasonló habitussal. Az *N. edwardsonii* var. Columbia (♀) növényeket kereszteztük az *N. clevelandii*-vel (♂) is, a reciprok keresztezés hasonló habitusú F<sub>1</sub> és F<sub>2</sub> generációt eredményezett. A fent említett *Nicotiana* gazdanövények és hibridjeik magját vetés előtt, a dormancia megtörése (jobb kelés) érdekében 2 %-os nátrium-hipoklorittal kezeltük (Burk, 1957).

A dohány (*Nicotiana tabacum*) több fajtáját, ill. vonalát is használtuk kísérleteinkhez. Az *N. tabacum* cv. Samsun három vonalával dolgoztunk: az *nn* genotípus (cv. Samsun nn) a dohány mozaik vírusra (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fogékony, míg az *NN* genotípus (cv. Samsun NN) a TMV-re rezisztens, mivel tartalmazza az *N* rezisztencia gént. (cv. Samsun NN: Bernd Zechmann-tól /University of Graz, Ausztria/). A burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) ellen ható *Rx1* rezisztencia gént kifejező transzgenikus dohányt (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) (Bendahmane et al., 1999) Peter Moffett-től (University of Sherbrooke, Kanada) kaptuk.

Az *N. tabacum* cv. Xanthi NN is tartalmazza az *N* rezisztencia gént – ez egy másik, TMV-re rezisztens vonal, amellyel dolgoztunk.

Az *N. tabacum* cv. SR1 vad típusú és két transzgenikus vonalát (C8 és F9) is használtuk: az utóbbiak egy lucerna ferritin gént (*MsFer*) fejeznek ki (SR1 dohány vonalak: Dudits Dénestől /SzBK, Szeged/) (Deák et al., 1999). A cv. Samsun NN Rx1 dohányokat (ld. fent) (♀) kereszteztük a két ferritin túltermelő dohánnyal (cv. SR1 C8 és F9) valamint a vad típusú SR1 vonalal (♂), a reciprok keresztezések hasonló habitusú F<sub>1</sub> generációkat adtak. A kapott F<sub>1</sub> növényekben a transzgenek (*StRx1*, *MsFer*) meglétét és működését szemikvantitatív RT-PCR-rel ellenőriztük (Király et al., 2021).

A tarlórépát (*Brassica rapa* var. *rapa*) amerikai kutatási partnerunktől (James Schoelz, University of Missouri, USA) kaptuk. A burgonya (*Solanum*

*tuberosum*) két, kereskedelmi forgalmazású fajtáját használtuk (cv. Hópehely, cv. White Lady). A szőlő (*Vitis vinifera*) két fajtájával (cv. Nimrang, cv. Kishmish vatkana) dolgoztunk (Kozma Páltól /Pécsi Tudományegyetem/).

Az általunk használt étkezési paprika (*Capsicum annuum* cv. Totál) és cseresznyepaprika fajta (*C. annuum* var. *cerasiforme* cv. Szentesi) Magyarországon kereskedelmi forgalmazású. A paprikák egymásra oltása 8 hetes korban történt, az egyszerű párosítás elvével, a cv. Szentesi cseresznyepaprika gyökér részére (sziklevéllal) oltva a cv. Totál növény sziklevel fölötti részét (Albert et al., 2017).

Az árpa (*Hordeum vulgare*) Ingrid fajtájának vad típusát (*Mlo* genotípus) és két, közel izogén vonalát (*Mla12* és *mlo5* genotípus) (ld. Harrach et al., 2008) Ralph Hückelhoven-től (Technical University of Munich, Németország) kaptuk. Az általunk használt cv. Botond árpa valamint két búzafajta (*Triticum aestivum* cv. Buzogány és cv. MV-Emma) Magyarországon kereskedelmi forgalmazású.

A felhasznált kétszikű növényeket üvegházi körülmények között neveltük (18-23 °C, 16 órás fotoperiódus, 160  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kiegészítő világítás, 75-80% relatív páratartalom), 60-70 napig, a paprikát 95-100 napig. Az egyszikű növényeket (búza, árpa) a nyári félévben az üvegházban spontán megjelenő lisztharmat és rozsdá miatt elsősorban növénynevelő kamrákban neveltük 20-25 napig (23 °C/20 °C nappali/éjszakai hőmérséklet, 16 órás fotoperiódus, 110  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitás és 50-70% relatív páratartalom).

Az *N. tabacum* cv. Xanthi NN dohány szulfát-kezeléséhez (optimális szulfát ellátottságú, [+S] és szulfát-hiányos [-S] növények) a magokat 3 hétig kvarchomokban csíráztattuk, majd a kikelt dohányokat kvarchomok és vermikulit keverékébe (1:3) ültettük át (növénynevelő kamrában tartottuk, ld. fent). Az egyik csoport szulfátos (+S), a másik szulfát mentes (-S) Hoagland tápoldatot kapott (5 ml/nap). A -S Hoagland tápoldat a kalcium-szulfát és magnézium-szulfát (2,5 mM  $\text{CaSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  és 1 mM  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ) helyett kalcium-kloridot (0,86 mM  $\text{CaCl}_2$ ) tartalmazott (Höller et al., 2010; Király et al., 2012).

Az *N. tabacum* cv. Xanthi NN dohány tartós hőkezeléséhez a vírus (TMV) inokuláció előtt legalább 1 héttel a növényeket 30 °C-on tartottuk, növénynevelő kamrákban (16 órás fotoperiódus, 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitás, 50-70% relatív páratartalom). Az árpa (*H. vulgare*) cv. Ingrid közel izogén vonalait (*Mlo* /vad típus/, *Mla12*, *mlo5*) egy rövid hő-előkezelésnek (hő-sokk)

vetettük alá (Barna et al., 2014): 7 napos intakt árpanövények leveleit 45 mp-re 49 °C-os vízbe mártottuk, a búzalisztharmat inokuláció előtt 30 perccel.

Az *N. tabacum* cv. Xanthi NN dohány hidrogén-peroxiddal (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) történő „immunizálásához” a növényeket a vírus (TMV) inokuláció előtt 1 nappal csapvízzel, ill. 5, 7, 10 és 12,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-al permeteztük (Hafez et al., 2012).

A 30 °C-on tartott *N. tabacum* cv. Xanthi NN és a normál hőmérsékleten tartott *N. tabacum* cv. Samsun nn dohánynál a vírus (TMV) fertőzés után 3 nappal, ill. 2 órával az inokulált leveleket szűrőpapírral kibélelt Petri csészébe tettük, 6 ml ROS-képző ágenseket tartalmazó oldatok egyikébe: 1/ 266 µM riboflavin, 10 mM L-metionin, 2/ 200 U/ml glükóz-oxidáz, 2 mM glükóz, 3/ 25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Király et al., 2008). A PVX fertőzésre használt fogékony dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun NN) az inokulált levelek egyik felét a vírusfertőzés után 2 órával szuperoxidot (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) képző ágenssel (66 µM riboflavin, 10 mM L-metionin), a másik levélfelet pufferrel (10 mM kálium-foszfát, pH=7,8) infiltráltuk, injekciós tűvel és fecskendővel (Király et al., 2021).

Az *N. tabacum* cv. Xanthi NN dohány antioxidáns kezelésekkal történő „immunizálásához” a növények inokulált leveleit a vírus (TMV) fertőzés után közvetlenül szuperoxid-dizmutázzal (SOD, 3000 U/ml) és katalázzal (CAT, 5000 U/ml) infiltráltuk (csapvizetes kontroll), injekciós tűvel és fecskendővel (Hafez et al., 2012). A PVX fertőzésre használt extrém rezisztens dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) az inokulált levelek egyik felét a vírusfertőzés után közvetlenül SOD-al (3000 U/ml) és CAT-al (5000 U/ml), a másik levélfelet pufferrel (10 mM kálium-foszfát, pH=7,8) infiltráltuk, injekciós tű és fecskendő segítségével (Király et al., 2021). Az árpa (*H. vulgare*) cv. Ingrid közel izogén vonalaiban (Mlo /vadtípus/, Mla12 és mlo5) a hő-sokknak kitett (ld. fent), ill. normál hőmérsékleten tartott növények leveleinek infiltrálása antioxidáns enzimekkel (SOD, 2500 U/ml és CAT, 5000 U/ml) közvetlenül a búzalisztharmat inokuláció után történt, injekciós tűvel és fecskendővel, Hafez és Király (2003) leírása szerint.

A karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 és D4 törzsét amerikai kutatási partnerunktől (James Schoelz, University of Missouri, USA) kaptuk. A CaMV-t tarlórépában (*Brassica rapa* var. *rapa*) tartottuk fenn. A kísérletekhez használt *Nicotiana* gazdanövényeket (*N. clevelandii*, *N. bigelovii*, *N. glutinosa*, *N. edwardsonii*, *N. edwardsonii* var. Columbia) 50-55 napos korban fertőztük mechanikai úton CaMV-vel (Schoelz et al., 1986; Király et al., 1999). Az



*N. edwardsonii*-t és *N. edwardsonii* var. Columbia-t szintén 50-55 napos korban fertőztük két másik vírussal, TMV-vel és TNV-vel (dohány nekrosis vírus, *Tobacco necrosis virus*) is. TNV-vel történő inokulációhoz az *N. tabacum* cv. Samsun nn inokulált leveleit használtuk (ld. lent).

A TMV U1 törzsét valamint a TNV DEH törzsét használtuk (Bacsó et al., 2016). A burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) Ny izolátumát (Ahmadvand et al., 2012) Polgár Zsolttól (MATE Georgikon Campus, Keszthely) kaptuk. A vírusokat fogékony dohány növényeken tartottuk fenn (TMV és TNV: *N. tabacum* cv. Samsun nn, PVX: *N. tabacum* cv. Xanthi NN). A kísérletekhez használt *N. tabacum* gazdanövényeket (cv. Xanthi NN, cv. Samsun nn, cv. Samsun NN, cv. Samsun NN Rx1) 60-70 napos korban mechanikai úton fertőztük TMV-vel, ill. PVX-szel. A vírus inokulációhoz mechanikai úton (levelek bedörzsölése) fertőztünk (fertőzött fogékony növények felső levelei, kb. 1 g levél/10 ml csapvíz + karborundum abrazívum). A kontroll („mock”) inokulálást karborundumos csapvízzel végeztük.

A kísérleteinkben használt árpa lisztharmat (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) rasszt (A6) Ralph Hückelhoven-től (Technical University of Munich, Németország) kaptuk. A búzarozsda (*Puccinia triticina*, syn. *P. recondita* f. sp. *tritici*) 77-es rassza (El-Zahaby et al., 2004) és a burgonyavész kórokozójának (*Phytophthora infestans*) K-39 izolátuma az ATK NÖVI törzsgyűjteményéből származott. A búza lisztharmat (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), árparozsda (*Puccinia hordei*) és szőlő lisztharmat (*Erysiphe necator*) általunk használt izolátumait az ATK NÖVI üvegházaiból gyűjtöttük. Az árpa- és búza lisztharmatot valamint az árpa- és búzarozsdát fogékony gazdanövényeiken (cv. Ingrid Mlo árpa, ill. cv. Buzogány búza) tartottuk fenn, növénynevelő kamrában. A szőlő lisztharmat fenntartását üvegházi körülmények között történt, a fogékony Nimrang szőlőfajtán. A *P. infestans*-t szelektív borsótáptalajon (PBA, ld. Küntler et al., 2018) tartottuk fenn, 20 °C-on.

A paprika lisztharmatot (*Leveillula taurica*) egy dél-alföldi (Szentes) fóliasátorból izoláltuk és fogékony paprika gazdanövényen (cv. Totál) tartottuk fenn, növénynevelő kamrában. Az inokulációt Zheng és munkatársai (2013a, b) szerint végeztük, kivéve, hogy a levelekre a lisztharmat-szuszpenziót (25.000 konídium/ml) ecsettel vittük fel.

A CaMV virionokat, ill. a vírus koncentrációját ELISA-val (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Clark és Adams 1977) mutattuk ki a CaMV W260

törzsre generált antitestekkel (Anderson et al., 1991). A TMV és TNV ELISA-val történő kimutatásához Clark és Adams (1977) és Tóbiás et al. (1982) módszerét alkalmaztuk. A TMV detektálásához Bioreba (Reinach, Svájc), míg a TNV kimutatásához Loewe (Sauerlach, Németország) gyártmányú egységcsomagot (kitet) használtunk.

A vírusfertőzések (TNV, TMV, PVX) szemikvantitatív, ill. kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) módszerrel történő kimutatása a „Növényi génexpressziós vizsgálatok” részben (ld. alább) leírtak szerint történt, mindegyik vírus esetén a köpenyfehérjét (*coat protein*, CP) kódoló gén szekvenciájára tervezett oligonukleotid primerek (indító szekvenciák) segítségével.

A paprika liszthamat kórokozó (*Leveillula taurica*) kimutatásához a fertőzött és egészséges (kontroll) növényekből teljes növényi DNS-t vontunk ki, szilikagél membrán oszlopos módszerrel (REDEExtract-N-Amp<sup>TM</sup> Plant PCR Kit, Sigma Aldrich, Németország). A DNS-ből valós idejű (*real time*) kvantitatív PCR módszerrel felszaporítottuk a gomba egyik specifikus ITS szekvenciájának (*LtLV*) egy szakaszát. Növényi referenciagénként a paprika aktin génjét (*CaAct*) használtuk (Silvar et al., 2008; Zheng et al., 2013b; Albert et al., 2017). A kvantitatív PCR-t a gyártó (KAPA 2x SYBR FAST Universal qPCR Kit, KAPA Biosystems, USA) útmutatása szerint végeztük, a paprika lisztharmat DNS kvantifikálásához a komparatív  $C_T$  ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) módszert alkalmaztuk (Livak és Schmittgen, 2001; Schmittgen és Livak, 2008) (ld. alább a „Növényi génexpressziós vizsgálatok” részt).

### **Növényi génexpressziós vizsgálatok**

A növényi védekezési gének kifejeződésének vizsgálatához, ill. a vírusfertőzések (TNV, TMV, PVX) kimutatásához dohányból (*Nicotiana* spp.), árpából és paprikából (egészséges /fertőzetlen/, vírus-, ill. kontroll-inokulált /„mock”/ vagy lisztharmattal fertőzött levelek) először teljes növényi RNS-t vontunk ki, szilikagél membrán oszlopos módszerrel (Plant Total RNA Extraction Miniprep System, Viogene BioTek, Tajvan, ill. paprikánál SV Total kit, Promega, USA). A kapott RNS oldatot először DNázissal (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, USA) kezeltük majd mennyiségét és tisztaságát formaldehid-agaróz gél elektroforézissel és spektrofotométeren (260 és 280 nm-en) ellenőriztük.

A génkifejeződés vizsgálatához, ill. vírus kimutatáshoz ezután valamennyi növényi RNS mintában reverz transzkripciót (RT, cDNS szintézis) végeztünk (1 µg RNS/minta) a gyártó útmutatása szerint, egy oligo-dT primer, ill. – vírus kimutatásnál – oligo-dT és a vírus köpenyfehérje génekre (*TNV-CP*, *TMV-CP* és *PVX-CP*) specifikus reverz primer felhasználásával (RevertAid™ H<sup>-</sup> cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, USA). Az RT negatív kontrollja egy növényi RNS-t tartalmazó, de reverz transzkriptázt nem tartalmazó minta volt.

A génkifejeződés vizsgálatához, ill. vírus kimutatáshoz a szemikvantitatív PCR-t (*Nicotiana* spp.) a gyártó (KAPA Biosystems, USA) utasításai szerint végeztük, mintánként (25 µl reakció végtérfogat) 2 µl templát cDNS-t használva. A PCR reakciót a folyamat exponenciális fázisában állítottuk le. A génexpressziós különbségek kimutatásához a mintákat 1%-os agaróz gélen választottuk el, referenciának (konstitutív kontroll) egy dohány aktin gén (*NtAct*) expresszióját tekintettük (ld. Höller et al., 2010).

A génkifejeződés vizsgálatához, ill. vírus kimutatáshoz a valós idejű (*real time*) kvantitatív PCR-t (qPCR) (*N. tabacum*, árpa és paprika) a 2x SYBR FAST qPCR Master Mix reagenssel (KAPA Biosystems, USA) végeztük, mintánként 15 µl reakció végtérfogatban, 2,5 µl higított (20x) templát cDNS-t használva (ld. Künstler et al., 2019). A qPCR-hez a következő amplifikációs programot használtuk: 95 °C 2 min, 40 ciklusban: 95 °C 10 s, 60 °C 10 s és 72 °C 10s. A PCR-hez felhasznált primerpárok, ill. a kapott termékek (amplikonok) specificitását olvadási görbe analízissel (65 és 95 °C között, 0,5 °C-os lépésekben) és 1%-os agaróz gélen történő elválasztással ellenőriztük. A génexpressziót dohányban (*Nicotiana* spp.) és paprikában aktin referencia génekhez (*NtAct*, *CaAct*), árpában egy ubiquitin (*HvUbi*) referencia génhez normalizáltuk. A PVX-szel és TMV-vel fertőzött dohányban a védekezési génműködés vizsgálatoknál a génexpressziót a kontroll („mock”) inokulált mintákhoz is normalizáltuk. A relatív génexpresszió meghatározásához a komparatív C<sub>T</sub> (2<sup>-ΔΔCT</sup>) módszert alkalmaztuk (Livak és Schmittgen, 2001; Schmittgen és Livak, 2008), mivel az általunk használt primerek hatékonysága 97-100 % volt. A primer szekvenciákat a Primer Premier 5 számítógépes program segítségével terveztük, kivéve az alábbi géneket: *NtAOX1-2* (Chivasa et al., 1997), *NtGSTPhi* (Juhász és Gullner, 2014), *StRxl* (Ahmadvand et al., 2012), *HvUbi* (Proels et al., 2010), *CaPR-1*, *CaPR-2* (Silvar et al., 2008), *CaMlo1* és *CaMlo2* (Zheng et al., 2013a).

## **Növényi biokémiai vizsgálatok**

A *N. edwardsonii* és *N. edwardsonii* var. Columbia szabad és kötött szalicilsav (SA) tartalmát nagyteljesítményű folyadék kromatográfiás (HPLC) módszerrel határoztuk meg. Az 55-60 napos növények TMV-vel, TNV-vel, ill. „mock” inokulált leveleit használtuk, 3 nappal az inokuláció után. A szabad és kötött SA mérését Meuwly és Métraux (1993) módszere alapján végeztük, mintánként 1 g levélszövet felhasználásával. A kötött SA-t 4 M sósavban (HCl) hidrolizáltuk. Az extrakció további lépései a korábban leírtak szerint végeztük (Cole et al., 2004; Pál et al., 2005).

A NADPH-oxidáz enzim aktivitásának mérését (dohány, paprika, árpa) a korábban leírtak alapján (Ádám et al., 1997; Xia et al., 2009) végeztük. Az eldörzsölt levélmintákat először tisztítottuk (centrifugálás 20 percig, 12 000 rpm-en, 4 °C-on) majd az így kapott felülúszót ultracentrifugában 30 percig, 120 000 g-n (50 000 rpm), 4 °C-on centrifugáltuk (sejtmembrán frakció izolálása). A NADPH-oxidáz aktivitás specifikus méréséhez a reakcióelegyhez 40 unit/ml SOD-ot (szuperoxid-dizmutáz) adtunk, és az adott mintát lemértük SOD nélkül és SOD-dal is, a két érték különbsége adja a tényleges NADPH-oxidáz enzimaktivitást (Ádám et al., 1997).

Az antioxidáns enzimaktivitások (kataláz, gvajakol-peroxidáz, aszkorbát-peroxidáz) detektálásához (Hafez et al., 2012) 0,5 g dohány mintát (TMV- és „mock”-inokulált levelekből) 4°C-on homogenizáltunk. Az aszkorbát-peroxidáz (APX) méréseknél az extrakciós puffer 2 mM aszkorbinsavat is tartalmazott. A kapott homogenizátumot centrifugáltuk (20 perc, 12 000 rpm, 4 °C) és a felülúszóban a teljes oldható enzimaktivitást fotometriásan határoztuk meg: 1/ a kataláz (CAT) méréshez a hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bomlását detektáltuk, 240 nm-en, 2/ a gvajakol-peroxidáz (POX) aktivitás méréséhez a gvajakol konjugációs termékének (tetragvajakol) megjelenését követtük nyomon, 436 nm-en, 3/ az APX aktivitást az aszkorbinsav bomlása alapján határoztuk meg, 290 nm-en.

Az oxidált és redukált glutation (GSSG és GSH) mennyiségét fertőzetlen és inokulált (PVX-, TMV- és „mock”-inokulált) dohánylevelekből fotometriásan határoztuk meg, hozzáadott glutation-reduktáz segítségével, a korábban leírtak szerint (Griffith, 1980; Smith, 1985; Király et al., 2021). A GSSG méréséhez a redukált glutationt (GSH) 2-vinilpiridin hozzáadásával kötöttük meg. A redukált glutation (GSH) mennyiségét a teljes glutation (GSSG+GSH) és a GSSG szint különbségéből határoztuk meg.

A glutation-reduktáz (GR) és glutation-S-transzferáz (GST) enzimaktivitás méréséhez (fertőzetlen és inokulált dohánylevelekből, ld. fent) 0,5 g növényi mintát homogenizáltunk, 4°C-on. A felülúszóban a teljes oldható enzimaktivitást fotometriásan határoztuk meg: 1/ a GR aktivitás méréséhez a NADPH bomlását (oxidációját) detektáltuk 340 nm-en, Klapheck et al. (1990) módszere szerint, 2/ a GST aktivitáshoz a GSH és a szubsztrát (1-klór-2,4-dinitrobenzol, CDNB) konjugációs termékének megjelenését követtük nyomon, 340 nm-en (Mauch és Dudler, 1993).

A szuperoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) szövetfestéssel történő kimutatását vírussal (TMV, PVX) fertőzött dohány-, ill. lizstarmattal fertőzött árpa- és paprika levelekben végeztük, 0,1% nitroblue-tetrazolium-klorid (NBT), vákuum-infiltrálásával, Ádám et al. (1989) szerint. A színreakció után a mintákat 2 napra színtelenítő oldatba (0,15% triklórecetsav, etanol és kloroform 4:1 arányú elegyében) helyeztük, 50% glicerinben tároltuk, majd fóliára kiterítve beszkeneltük (Hückelhoven és Kogel, 1998). A mennyiségi értékelést (NBT-vel festett levélfelület %) az ImageJ számítógépes programmal (<https://imagej.nih.gov/ij>) végeztük. A hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) szövetfestéssel történő kimutatása vírussal (TMV) fertőzött dohánylevelekben történt, 0,1% 3,3-diaminobenzidinnel (DAB), Thordal-Christensen et al. (1997) szerint. A DAB-bal vákuum-infiltrált minták színtelenítése és vizuális, ill. mennyiségi értékelése a  $O_2^{\cdot-}$ -kimutatásnál leírtak szerint (ld. fent) történt.

Paprika levelek szövetében az elhalt sejteket laktofenolos Tripán kék-festés segítségével detektáltuk, Pogány et al. (2009) szerint.

Minden esetben legalább 3 független biológiai kísérletet végeztünk, kezelésként 3-5 ismétléssel. Egy biológiai minta (3-6 levél vagy levélfél) 3-5 különböző növényből származott. A grafikus adatok az átlagot és annak szórását ( $\pm$ SD) reprezentálják. Az adatok páronkénti összehasonlítása az adott ábránál jelzett módon történt, a szignifikáns különbségeket Student-féle *t*-próba segítségével határoztuk meg (\*, \*\* és \*\*\* = szignifikáns különbség  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ , ill.  $p \leq 0,001$  esetén).

## EREDMÉNYEK

A növényi betegség rezisztencia legismertebb formája az ún. hiperszenzitív reakció (HR), amikor a kórokozó lokalizálását a gazdában sejt-, ill. szövethalál (nekrotikus léziók) kíséri. Gombás és baktériumos fertőzéseknel már több évtizede tisztázódott, hogy a HR két fő komponense – a rezisztencia és a sejt/szövethalál – sok esetben eltérő élettani és genetikai folyamatok eredménye. Növényi vírusfertőzéseknel viszont a HR-t alkotó rezisztencia és sejt/szövethalál független öröklődését és az ehhez kapcsolódó alapvető élettani folyamatokat kutatásaink kezdetéig még nem, ill. csak részben tisztázták, ezért ez volt az egyik fő kutatási célunk.

A rezisztencia sokszor a HR-re jellemző sejt/szövethalál (vagy más makroszkopikus tünet, pl. klorózis) nélkül is hatékony. A növényi rezisztencia meghatározó faktorai az ún. reaktív oxigénszármazékok (ROS, pl. szuperoxid  $/O_2^-/$ , hidrogén-peroxid  $/H_2O_2/$ ). Munkánk során tisztázni kívántuk, hogy a fertőzött növényben a ROS felhalmozódás megfelelő időzítése szerepet játszhat-e a vírusokkal és más biotróf kórokozókkal (pl. lisztharmatok) szemben kialakuló tünetmentes rezisztenciákban?

### A növényi vírusfertőzésekkel szembeni HR-ben a rezisztencia és a sejt/szövethalál egymástól függetlenül öröklődhet

Kutatásaink elsőként bizonyították, hogy a növényi vírusfertőzések által indukált HR-nél a rezisztencia és sejthalál eltérő gének által meghatározott, egymástól függetlenül öröklődő tulajdonságok is lehetnek. Kétféle kísérleti megközelítéssel igazoltuk, hogy a karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által a *Nicotiana edwardsonii* fajhibridben kiváltott HR esetében a rezisztencia és sejt/szövethalál (nekrózis) genetikailag szétválasztható.

Egyrészt a CaMV W260 által a *N. edwardsonii* egyik szülőjében, a *N. glutinosa*-ban kiváltott rezisztenciát (lokális klorotikus léziók) a másik, fogékony szülővel (*N. clevelandii*, amely szisztemikus nekrozist ad)

történő keresztezés után az általunk kapott fajhibridben (*N. edwardsonii* var. Columbia) egy HR-típusú rezisztenciává tudtuk konvertálni, hasonlóan az eredeti *N. edwardsonii*-hoz.

Egy másik kísérleti megközelítés alapján kimutattuk, hogy a CaMV-rezisztens *N. edwardsonii* var. Columbia és a fogékony *N. clevelandii* keresztezéséből származó F<sub>2</sub> populációban a rezisztencia és a sejt/szövethalál egymástól függetlenül szegregálódnak. Az F<sub>2</sub> növények négy különböző fenotípust mutattak: 1/ rezisztens, HR-típusú nekrotikus léziók, 2/ rezisztens, lokális klorotikus léziók, 3/ fogékony, szisztemikus nekrosis és 4/ fogékony, szisztemikus mozaik. Erre a jelenségre leginkább az adhat magyarázatot, ha a rezisztenciát, ill. sejt/szövethalált meghatározó gének egymástól függetlenek.

A CaMV W260 által kiváltott HR-t alkotó rezisztencia és sejt/szövethalál (nekrosis) genetikai függetlenségét bizonyítja az is, hogy eredményeink szerint a CaMV W260 okozta lokális (HR-típusú) és szisztemikus nekrosis (sejt/szövethalál) nem befolyásolja a vírus rezisztenciát *Nicotiana* gazdanövényekben. Kimutattuk, hogy a vírusra fogékony *N. clevelandii*-ben és *N. bigelovii*-ben is a CaMV W260 titer – az inokulált és felső, szisztemikus levelekben egyaránt – sokkal kisebb, mint egy másik CaMV törzs (D4) fertőzésekor, függetlenül attól, hogy a CaMV W260 az egyik gazdában (*N. clevelandii*) lokális és szisztemikus nekrosist, míg a másikban (*N. bigelovii*) lokális klorózist és szisztemikus mozaikot okoz.

### **A növényi védekezés fokozása – eltérő hatások a vírusfertőzésekkel szembeni HR-t alkotó rezisztenciára és sejt/szövethalálra**

Kimutattuk, hogy a növényi védekező rendszer egyes elemeinek fokozott indukciója eltérően hat a vírusfertőzés által kiváltott HR-t alkotó rezisztenciára és lokális sejt/szövethalálra (nekrosusra), mivel a HR-típusú nekrosis visszaszorulása nem feltétlenül jelzi megbízhatóan a fokozott rezisztenciát.

Eredményeink szerint a *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia az eredeti *N. edwardsonii* fajhibridhez képest fokozottan rezisztens kétféle vírus fertőzésére is (dohány nekrosis vírus, *Tobacco necrosis virus*, TNV; dohány mozaik vírus, *Tobacco mosaic virus*, TMV), amely együtt jár az emelt szintű szalicilsav tartalommal és a *NgPR-1* gén fokozott expressziójával. Ugyanakkor, míg TNV fertőzésnél a vírusszint a HR-típusú nekrosis visszaszorulásával összhangban csökken (az eredeti *N. edwardsonii*-hoz képest), addig TMV fertőzésnél a HR-típusú nekrosis visszaszorulásához képest a vírusszint kisebb (kb. feleakkora) mértékben csökken.

Kimutattuk továbbá, hogy a *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN-ben az optimális szulfát (glutation) ellátottság által a TMV ellen biztosított emelt szintű hiperszenzitív vírusrezisztencia jellemzője, hogy (egyes védekezési gének indukciója mellett) a HR-típusú nekrosis visszaszorulásánál a TMV szint nagyobb (kb. kétszeres) mértékben csökken.

Eredmények igazolták azt is, hogy TMV-vel fertőzött, rezisztens dohányban (*N. tabacum* cv. Xanthi NN) a hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) vagy szuperoxid-dizmutáz és kataláz (SOD + CAT) kezeléssel megnövelt antioxidáns kapacitás hatására a HR-nekrozist mutató levélfelület csökken, de a vírus titer (és rezisztencia) nem változik.

Ezek szerint a növényi védekező rendszer egyes elemeinek (szalicilsav, glutation, *PR* gének, antioxidáns kapacitás) fokozott indukciója a HR-típusú nekrosis visszaszorulásával járhat, de ez nem mindig jelzi megbízhatóan a fokozott rezisztenciát.

### **A HR-rel (sejt/szövethalál) járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – különbségek a védekezési gének és antioxidánsok aktiválódásában**

Kimutattuk, hogy ugyanabban a dohány genotípusban (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) a HR-rel járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus



rezisztenciánál markáns különbségek vannak egyes védekezési gének és antioxidánsok aktiválódásában.

Az általunk vizsgált védekezési gének (*NtPR-1a*, *NtPRB-1b*, *NtGSTphi1*, *NtBI-1*, *NtAOX1-2* és *NtCat1*) expressziója a tünetmentes ER-nél (PVX /burgonya X vírus, *Potato virus X*/ fertőzés) csak alig feleakkora vagy kb. egy nagyságrenddel kisebb mértékben indukálódott, mint a HR-rel járó TMV fertőzésnél.

A PVX-szel (ER) és TMV-vel (HR) fertőzött dohányokban két, a glutation (GSH) működésében szerepet játszó és a növényi vírusfertőzések elleni védekezésében részt vevő, antioxidáns hatású enzim (glutacion redukáz, GR és glutacion-S-transzferáz, GST) aktivitása és a GSH szintje a tünetmentes ER (PVX fertőzés) során nem változott szignifikánsan a fertőzetlen növényekhez képest. Ezzel ellentétben HR (TMV fertőzés) esetén a GR és GST aktivitás és a GSH szintje a PVX-fertőzött és egészséges kontroll növényekhez képest a többszörösére nőtt.

Eredményeink szerint dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) a védekezési gének és antioxidánsok (ROS-szabályozók) fokozott expressziója, ill. aktivitása elsősorban a TMV által kiváltott rezisztencia későbbi szakaszában (a 2. naptól) kialakuló HR-típusú lokális nekrotikus léziók megjelenéséhez köthető. Ugyanakkor a PVX fertőzés által kiváltott tünetmentes extrém rezisztenciánál (ER) ezek a védekezési folyamatok korán, ill. átmenetileg indukálódnak vagy alig detektálhatók, összhangban az ER rendkívül korai (a vírusfertőzés utáni 6. órától) kialakulásával.

### **A HR-rel (sejt/szövethalál) járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – a ROS szerepe a rezisztencia, ill. sejthalál kialakításában**

Igazoltuk, hogy a tünetmentes (extrém), ill. HR-rel (lokális sejt/szövethalál) járó növényi vírus rezisztenciánál a reaktív oxigénszármazékok (ROS) korai termelődésének meghatározó szerepe van a rezisztencia kialakításában, míg a késői ROS termelés elsősorban a sejthalálért felelős.

Eredményeink szerint dohányban (*N. tabacum* cv. Xanthi NN) a HR-típusú TMV-rezisztencia magas hőmérsékleten (30 °C) történő visszاسzorulásának egyik oka a ROS – elsősorban a szuperoxid ( $O_2^-$ ) – felhalmozódásának csökkenése lehet. Ugyanakkor, ha a 30 °C-on tartott növények TMV-inokulált leveleit az inokuláció után 3 nappal szuperoxidot ( $O_2^-$ ) és  $H_2O_2$ -t képző ágensekkel (riboflavin/metionin, glükóz/glükóz-oxidáz,  $H_2O_2$ ) kezeltük, további 3 nap elteltével a HR-típusú léziók újra kialakultak, de a vírusrezisztencia nem: a 30 °C-on tartott növényekben a TMV titer egyformán magas volt, függetlenül a HR-nekrózis meglététől vagy hiányától. Fogékony dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun nn) viszont a TMV-vel szemben hatékony, tünetmentes rezisztencia alakítható ki, ha a ROS ( $O_2^-$ , ill.  $H_2O_2$ ) felhalmozódás előidézése a vírusfertőzés utáni korai időpontokban (pl. 2 órával) történik.

Elsőként mutattuk ki, hogy az *Rx1* gént kifejező transzgenikus dohánynak (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) a PVX-fertőzésre adott tünetmentes, extrém rezisztenciájában tényleges szerepe van a ROS – elsősorban a szuperoxid és a hidroxilgyök ( $OH^\cdot$ ) – korai (a fertőzés után pár órán belüli) felhalmozódásának. A szuperoxid szint csökkentése antioxidáns (SOD és CAT) kezelésekkel valamint a  $OH^\cdot$  képződés ferritin túltermelés miatti gátlása az ER részleges visszاسzorulásához és egy kevésbé hatékony, HR-típusú (lokális nekrotikus léziókkal járó) rezisztenciához (kb. kétszeresére nőtt PVX szint) vezetett. Ugyanakkor a PVX-re fogékony dohányban az *in planta* szuperoxid (ROS) szint mesterséges növelése nem idézett elő extrém rezisztenciát, de részben visszاسzorította a PVX replikációját, és egy HR-típusú rezisztenciához vezetett.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy a növényi vírus rezisztencia kialakításához többek között a megfelelően időzített, korai (a fertőzés után pár órával) ROS-felhalmozódás szükséges – a későn időzített ROS-felhalmozódás hatására kialakuló HR-típusú, lokális nekrotikus tünetek nem feltétlenül jelzik a vírus rezisztencia meglétét.

## **Tünetmentes nemgazda rezisztencia biotróf gombakórokozókkal (pl. lisztharmat) szemben – a szuperoxid ( $O_2^-$ ) korai felhalmozódásának szerepe**

Kimutattuk, hogy árpában a szuperoxid ( $O_2^-$ ) korai felhalmozódásának meghatározó szerepe van a biotróf gombakórokozókkal (pl. lisztharmatok, rozsdák) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciában is.

A  $O_2^-$  felhalmozódása mindkét vizsgált rezisztencia típusnál (tünetmentes nemgazda- és HR-típusú gazda rezisztencia) észlelhető volt, míg a tipikus betegség tünetekkel járó fogékony növény-patogén kapcsolatokban nem. Ugyanakkor a  $O_2^-$ -felhalmozódás a tünetmentes nemgazda rezisztenciánál mindig kb. 24 órával korábban jelentkezett (a fertőzés utáni 1. naptól), mint a HR-típusú gazda rezisztenciánál. Az árpának a búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciája és a korai szuperoxid-felhalmozódás közötti kapcsolatot a cv. Ingrid árpa három, ún. közel izogén vonalában (Mla12, Mlo és mlo5) is sikerült kimutatnunk. Eredményeink szerint a lisztharmat-fertőzések után 1 nappal a cv. Ingrid Mla12 árpa Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciájánál a szuperoxid egyértelműen a mezofill sejtek kloroplasztisaiban akkumulálódott.

A  $O_2^-$  korai felhalmozódása a búzalisztharmattal szemben tünetmentes nemgazda rezisztenciát mutató árpában fokozott NADPH-oxidáz enzimaktivitással és jellegzetes génexpressziós változásokkal járt együtt: egy  $O_2^-$ -szintet, ill. a növényi sejthalált szabályozó gén esetében (szuperoxid-dizmutáz, *HvSOD1* és BAX inhibitor-1, *HvBI-1*) a Bgt-inokuláció után 24 órával a génexpresszió átmenetileg megemelkedett – ugyanabban az időpontban, amikor a fokozott  $O_2^-$ -felhalmozódás és NADPH-oxidáz aktivitás is észlelhető volt.

A cv. Ingrid árpa három, közel izogén vonalában (Mlo, Mla12 és mlo5) egy hő-sokk kezelés (49 °C, 45 mp) hatására a Bgt micéliumainak növekedése kismértékben fokozódott, a kezeletlen (nemgazda rezisztens)

kontrollokhoz képest. A hő-sokkal előkezelt növények infiltrálása antioxidánsokkal (SOD + CAT) viszont tovább fokozta a micélium-növekedést, és a kezelt és inokulált leveleken gyenge lisztharmatos tünetek és HR-típusú, lokális nekrotikus léziók jelentek meg. A Bgt-vel fertőzött árpa nemgazda rezisztenciáját tehát a kombinált hő-sokk és antioxidáns (SOD + CAT) kezelés részben visszaszorította, ami a korai ROS ( $O_2^-$ ) felhalmozódásnak a tünetmentes nemgazda rezisztenciában játszott meghatározó szerepét jelzi.

### **A paprika lisztharmattal (*Leveillula taurica*) szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciája – a szuperoxid ( $O_2^-$ ) felhalmozódásának meghatározó szerepe**

Kísérleteink elsőként mutattak rá, hogy a szuperoxid ( $O_2^-$ ) felhalmozódásnak meghatározó szerepe van a paprika lisztharmattal (*Leveillula taurica*) szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciájában is.

A cseresznyepaprikának (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme* cv. Szentesi) a saját lisztharmatával (*L. taurica*) szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciáját kontrollált laboratóriumi körülmények között is igazoltuk. 45 nappal az inokuláció után a *L. taurica* genomi DNS szintje (gomba biomassza) kb. 50 %-al alacsonyabb volt a tünetekkel szemben ellenálló paprikákban (saját gyökerű cv. Szentesi és Szentesi+Totál oltványok), mint a lisztharmat-fogékony cv. Totál étkezési paprikában. A cv. Szentesi cseresznyepaprika tehát valóban rezisztens a lisztharmat (*L. taurica*) fertőzésre és ez a rezisztencia kertészeti oltással átvihető egy étkezési paprika fajtára (cv. Totál).

Eredményeink alapján a  $O_2^-$ -felhalmozódás a cseresznyepaprika (cv. Szentesi) oltással átvihető tünetmentes lisztharmat rezisztenciájának markere és feltehetően meghatározó komponense, amely jól korrelál a  $O_2^-$ -termelésért felelős NADPH-oxidáz enzimaktivitással. A fertőzetlen, ill. inokulált növényeknél a lisztharmat-fogékony cv. Totál levelekben elhanyagolható mennyiségű szuperoxid termelődött (csekély NADPH-

oxidáz aktivitás), míg a liztharmat-rezisztens paprikákban (saját gyökerű cv. Szentesi és Szentesi+Totál oltványok) több mint kétszer akkora  $O_2^-$ -felhalmozódást és NADPH-oxidáz aktivitást detektáltunk.

A cv. Szentesi cseresznyepaprika liztharmattal szembeni, oltással átvihető rezisztenciájának további markere – a NADPH-oxidáz enzimaktivitással összefüggő fokozott  $O_2^-$ -felhalmozódás mellett – a *CaPR-1* és *CaPR-2* gén indukciója, de csak a fertőzetlen növényekben, ahol a szokásosnál jóval intenzívebb a spontán sejtelhalás mértéke is. A sejtelhalást szabályozó *Mlo* gének (*CaMlo1*, *CaMlo2*) expressziója (fertőzetlen, ill. inokulált növényeknél is) a liztharmat rezisztenciával fordítottan arányos.

---

Eredményeink szerint a növényi vírusfertőzéseknel a hiperszenzitív reakciót (HR) alkotó rezisztencia és sejt/szövetelhalál sok esetben genetikai és élettani szempontból független folyamatok eredménye.

Kimutattuk továbbá, hogy a növények tünetmentes kórokozó rezisztenciájának több típusában is meghatározó szerepet játszik a korai ROS felhalmozódás, míg a késői ROS termelés elsősorban a növényi sejtelhalálért felelős.

Mindezek alapján saját kutatási eredményeink is hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a jövőben a rezisztencia nemesítés egyik prioritása legyen olyan szántóföldi/kertészeti növényfajták létrehozása, amelyek képesek a célzott, fertőzés specifikus, korai ROS termelésre, és így a betegség rezisztencia tüneti mellékhatásainak kiküszöbölésére.

---

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

**1/** Kutatásaink elsőként bizonyították, hogy a növényi vírusfertőzések által indukált hiperszenzitív reakciót (HR) alkotó rezisztencia és sejthalál eltérő gének által meghatározott, egymástól teljesen függetlenül öröklődő tulajdonságok is lehetnek. Kétféle kísérleti megközelítéssel igazoltuk, hogy a karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által a *Nicotiana edwardsonii* fajhibridben kiváltott HR esetében a rezisztencia és sejt/szövethalál (nekrózis) genetikailag szétválasztható.

**2/** Kimutattuk, hogy a növényi védekező rendszer egyes elemeinek (szalicilsav, glutation, *PR* gének, antioxidáns kapacitás) fokozott indukciója eltérően hat a vírusfertőzés által kiváltott HR-t alkotó rezisztenciára és lokális nekrozisra. A HR-típusú nekrozis visszaszorulása nem feltétlenül jelzi megbízhatóan a fokozott rezisztenciát. ezt különböző *Nicotiana* gazdanövények és két növényi vírus (TNV, TMV) interakcióiban igazoltuk.

**3/** Elsőként igazoltuk, hogy dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) a HR-rel járó, ill. tünetmentes (extrém) vírus rezisztencia között markáns különbségek vannak egyes védekezési folyamatok intenzitásában. A TMV által indukált HR-nél egyes védekezési gének és antioxidánsok fokozott expresszióját, ill. aktivitását tapasztaltuk, míg a PVX által kiváltott tünetmentes ER-nél ezek a védekezési folyamatok korán, ill. átmenetileg indukálódnak vagy

alig detektálhatók, összhangban az ER rendkívül korai (a vírusfertőzés utáni 6. órától) kialakulásával.

---

**4/** Elsőként mutattuk ki, hogy dohányban a vírusfertőzések által kiváltott tünetmentes (extrém), ill. HR-rel (lokális sejt/szövethalál) járó rezisztenciánál a reaktív oxigénszarmazékok (ROS, elsősorban szuperoxid  $/O_2^-/$ , hidrogén-peroxid  $/H_2O_2/$  és hidroxilgyök  $/OH^{\cdot}/$ ) korai termelődésének meghatározó szerepe van a (tünetmentes) rezisztencia kialakításában, míg a késői ROS termelődés elsősorban a sejthalálért felelős.

---

**5/** Kimutattuk, hogy árpában a  $O_2^-$  korai felhalmozódásának meghatározó szerepe van a biotróf gombakórokozókkal (pl. lisztharmatok, rozsdák) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciában is. A búzalisztharmattal (Bgt) fertőzött árpa (*Hordeum vulgare*) három, közel izogén vonalában (Mlo, Mla12, mlo5) a tünetmentes nemgazda rezisztenciát egy kombinált hő-sokk (49 °C, 45 mp) és antioxidáns (SOD + CAT) kezelés részben visszaszorította, és gyenge lisztharmatos tüneteket, ill. HR-típusú léziókat váltott ki.

---

**6/** Kísérleteink elsőként igazolták, hogy a  $O_2^-$ -nak meghatározó szerepe van a paprika lisztharmattal szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciájában is. A lisztharmat-rezisztens cv. Szentesi cseresznyepaprikában (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme*) detektált, NADPH-oxidáz enzimaktivitással összefüggő fokozott  $O_2^-$  felhalmozódás az oltványokban (cv. Szentesire oltott, eredetileg fogékony cv. Totál) a tünetmentes rezisztenciával együtt jelent meg.

---

## IRODALOMJEGYZÉK (A TÉZISEKBEN SZEREPLŐ HIVATKOZÁSOK)

Ahmadvand, R., Taller, J., Wolf, I., Polgar, Z. 2012. Identification of the resistance gene to PVX in Hungarian potato cultivars. Proceedings, 54th Georgikon Scientific Conference pp. 1-7.

Albert, R., Künstler, A., Lantos, F., Ádám, A.L., Király, L. 2017. Graft-transmissible resistance of cherry pepper (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme*) to powdery mildew (*Leveillula taurica*) is associated with elevated superoxide accumulation, NADPH oxidase activity and pathogenesis-related gene expression. Acta Physiol. Plant. 39, 53.

Ádám, A., Deising, H., Barna, B., Gullner, G., Király, Z., Mendgen, K. 1997. Imbalances in free radical metabolism: roles in the induction of hypersensitive response and local acquired resistance of plants. In: K. Rudolph, T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, J. von Kiezell (eds): *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens (Developments in Plant Pathology), Kluwer Academic Publishers vol. 9, pp. 111–121.

Ádám, A.L., Farkas, T., Somlyai, G., Hevesi, M., Király, Z. 1989. Consequence of O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. Physiol. Molec. Plant Pathol. 34, 13-26.

Bacsó, R., Künstler, A., Király, L. 2016. Tobacco necrosis virus replication and spread in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia – a potential system for studying plant defense reactions to symptomless virus infections. Acta Physiol. Plant. 38, 139.

Barna, B., Harrach, B., Viczián, O., Fodor, J. 2014. Heat induced susceptibility of barley lines with various types of resistance genes to powdery mildew. Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 49, 177-188.

Bendahmane, A., Kanyuka, K., Baulcombe, D.C. 1999. The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. Plant Cell 11, 781–791.

Burk, L. G. 1957. Overcoming seed dormancy in *Nicotiana*. Agronomy J. 49, 461.

Christie, S.R. 1969. *Nicotiana* hybrid developed as a host for plant viruses. Plant Disease Reporter 53, 939-941.

Christie, S.R., Hall, D.W. 1979. A new hybrid species of *Nicotiana* (*Solanaceae*). Baileyana 20, 133-136.



Clark, M.F., Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483.

Cole, A.B., Király, L., Lane, L.C., Wiggins, E.B., Ross, K., Schoelz, J.E. 2004. Temporal expression of PR-1 and enhanced mature plant resistance to virus infection is controlled by a single dominant gene in a new *Nicotiana* hybrid. *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.

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.

El-Zahaby, H.M., Hafez, Y.M., Király, Z. 2004. Effect of reactive oxygen species on plant pathogens *in planta* and on disease symptoms. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 39, 325-345.

Gland, A. 1981. Doubling chromosomes in interspecific hybrids by colchicine treatment. *Cruciferae Newsl.* 6, 20-22.

Griffith, O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212.

Hafez, Y.M., Bacsó, R., Király, Z., Künstler, A., Király, L. 2012. Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suppresses necrotic disease symptoms. *Phytopathology*, 102, 848-856.

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.

Harrach, B.D, Fodor, J., Pogány, M., Preuss, J., Barna, B. 2008. Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* 121, 21-33.

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

Hückelhoven, R., Kogel, K-H. 1998. Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* fsp. *hordei*). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 292-300.

Juhász, Cs., Gullner, G. 2014. The monoterpenoid (S)-carvone massively up-regulates several classes of glutathione S-transferase genes in tobacco leaf discs. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 49, 163–176.

Király, L., Albert, R., Zsemberi, O., Schwarczinger, I., Hafez, Y.M., Künstler, A., 2021. Reactive oxygen species contribute to symptomless, extreme resistance to *Potato virus X* in tobacco. *Phytopathology* 111, 1870–1884.

Király, L., Cole, A.B., Bourque, J.E., Schoelz, J.E. 1999. Systemic cell death is elicited by the interaction of a single gene in *Nicotiana* and gene VI of cauliflower mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 919-925.

Király, L., Hafez, Y.M., Fodor, J., Király, Z. 2008. Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotisation in tobacco at high temperature is associated with down-regulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase. *J. Gen. Virol.* 89, 799-808.

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

Klapheck, S., Zimmer, I., Cosse, H. 1990. Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 31, 1005-1013.

Künstler, A., Bacsó, R., Albert, R., Barna, B., Király, Z., Hafez, Y.M., Fodor, J., Schwarczinger, I., Király, L. 2018. Superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) accumulation contributes to symptomless (type I) nonhost resistance of plants to biotrophic pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 128, 115–125.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-ΔΔCT)</sup> method. *Methods* 25, 402–408.

Mauch, F., Dudler, R. 1993. Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102, 1193-1201.

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

Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. 2005. Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays*) plants. *Physiol. Plant.* 125, 356–364.

Pogány, M., von Rad, U., Grün, S., Dongó, A., Pintye, A., Simoneau, P., Bahnweg, G., Kiss, L., Barna, B., Durner, J. 2009. Dual roles of reactive oxygen

species and NADPH oxidase RBOHD in an Arabidopsis-*Alternaria* pathosystem. *Plant Physiol.* 151, 1459-1475.

Proels, R.K., Oberhollenzer, K., Pathuri, I.P., Hensel, G., Kumlehn, J., Hüchelhoven, R. 2010. RBOHF2 of barley is required for normal development of penetration resistance to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molec. Plant- Microbe Interact.* 23, 1143-1150.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J. 2008. Analyzing real time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nature Protocols* 3, 1101–1108.

Schoelz, J.E., Shepherd, R.J., Daubert, S. 1986. Region VI of Cauliflower mosaic virus encodes a host range determinant. *Mol. Cell Biol.* 6, 2632-2637.

Silvar, C., Merino, F., Díaz, J. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 165, 1120-1124.

Smith, I.K. 1985. Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol.* 79, 1044-1047.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B. 1997. Subcellular localization of  $H_2O_2$  in plants:  $H_2O_2$  accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11, 1187-1194.

Tóbiás, I., Rast, B., Maat, D.Z. 1982. Tobamoviruses of pepper, eggplant, and tobacco: comparative host reactions and serological relationships. *Netherlands J. Plant Pathol.* 88, 257-268.

Xia, X.J., Wang, Y.J., Zhou, Y.H., Tao, Y., Mao, W.H., Shi, K., Tadao, A., Chen, Z., Ju, J.Q. 2009. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiol.* 150, 801-814.

Zheng, Z., Nonomura, T., Appiano, M., Pavan, S., Matsuda, Y., Toyoda, H., Wolters, A-M.A., Visser, R.G.F., Bai, Y. 2013a. Loss of function in *Mlo* orthologs reduces susceptibility of pepper and tomato to powdery mildew disease caused by *Leveillula taurica*. *PLoS ONE* 8, e70723.

Zheng, Z., Nonomura, T., Bóka, K., Matsuda, Y., Visser, R.G.F., Toyoda, H., Kiss, L., Bai, Y. 2013b. Detection and quantification of *Leveillula taurica* growth in pepper leaves. *Phytopathology* 103, 623-632.

**A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ÉS TÉZISEK ALAPJÁUL  
SZOLGÁLÓ, REFERÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT  
PUBLIKÁCIÓK**

(csillaggal jelölve a levelező szerzőség)

**Király, L.**, Cole, A.B., Bourque, J.E., Schoelz, J.E. 1999. Systemic cell death is elicited by the interaction of a single gene in *Nicotiana* and gene VI of cauliflower mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 919-925.

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.

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.

**Király, L.\***, Hafez, Y.M., Fodor, J., Király, Z. 2008. Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotisation in tobacco at high temperature is associated with down-regulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase. *J. Gen. Virol.* 89, 799-808.

Bacsó, R., Hafez, Y.M., Király, Z., **Király, L.\*** 2011. Inhibition of virus replication and symptom expression by reactive oxygen species in tobacco infected with *Tobacco mosaic virus*. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 46, 1-10.

Hafez, Y.M., Bacsó, R., Király, Z., Künstler, A., **Király, L.\*** 2012. Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suppresses necrotic disease symptoms. *Phytopathology*, 102, 848-856.

**Király, L.**, Künstler, A., Höller, K., Fattinger, M., Juhász, Cs., Müller, M., Gullner, G., Zechmann, B. 2012. Sulfate supply

influences compartment specific glutathione metabolism and confers enhanced resistance to *Tobacco mosaic virus* during a hypersensitive response. *Plant Physiol. Biochem.* 59, 44-54.

Künstler, A., Bacsó, R., Gullner, G., Hafez, Y.M., **Király, L.\*** 2016. Staying alive - is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 93, 75–84.

Albert, R., Künstler, A., Lantos, F., Ádám, A.L., **Király, L.\*** 2017. Graft-transmissible resistance of cherry pepper (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme*) to powdery mildew (*Leveillula taurica*) is associated with elevated superoxide accumulation, NADPH oxidase activity and pathogenesis-related gene expression. *Acta Physiol. Plant.* 39, 53.

Künstler, A., Bacsó, R., Albert, R., Barna, B., Király, Z., Hafez, Y.M., Fodor, J., Schwarczinger, I., **Király, L.\*** 2018. Superoxide ( $O_2^-$ ) accumulation contributes to symptomless (type I) nonhost resistance of plants to biotrophic pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 128, 115–125.

**Király, L.\***, Albert, R., Zsembéri, O., Schwarczinger, I., Hafez, Y.M., Künstler, A., 2021. Reactive oxygen species contribute to symptomless, extreme resistance to *Potato virus X* in tobacco. *Phytopathology* 111, 1870–1884.

**A DOKTORI ÉRTEKEZÉSHEZ ÉS TÉZISEKHEZ NEM  
KAPCSOLÓDÓ, REFERÁLT FOLYÓIRATBAN  
MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK**

(csillaggal jelölve a levelező szerzőség)

Gullner, G., Kőmíves, T., **Király, L.** 1991. Enhanced inducibility of antioxidant systems in a *Nicotiana tabacum* L. biotype results in acifluorfen resistance. *Z. Naturforsch.* 46c, 875-881.

Hevesi, M., El-Arabi, K.F., **Király, L.** 1998. *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* cannot induce systemic acquired resistance to bacterial growth and necrotic symptoms in transgenic tobacco that expresses salicylate hydroxylase. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 33, 223-238.

**Király, L.**, Bourque, J.E., Schoelz, J.E. 1998. Temporal and spatial appearance of recombinant viruses formed between cauliflower mosaic virus (CaMV) and CaMV sequences present in transgenic *Nicotiana bigelovii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 309-316.

**Király, L.\*** 1999. The silencing of (trans)genes - a mechanism of virus resistance in plants. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 34, 263-275.

Schultheiss, H., Dechert, C., **Király, L.**, Fodor, J., Michel, K., Kogel, K.-H., Hückelhoven, R. 2003. Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Sci.* 165, 1275-1280.

Cawly, J., Cole, A. B., **Király, L.**, Qiu, W., Schoelz, J. E. 2005. The plant gene *CCDI* selectively blocks cell death during the hypersensitive response to *Cauliflower mosaic virus* infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 212-219.

Czelleng, A., Bozsó, Z., Ott, P. G., Besenyei, E., Varga, G. J., Szatmári, A., **Király, L.**, Klement, Z. 2006. Identification of virulence-associated genes of *Pseudomonas viridiflava* activated during infection by use of a novel IVET promoter probing plasmid. *Curr. Microbiol.* 52, 282-286.

**Király, L.**, Király Z. 2006. To die or not to die - is cell death dispensable for resistance during the plant hypersensitive response? *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 41, 11-21.

**Király, L.\***, Barna, B., Király, Z. 2007. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. *J. Phytopathol.* 155, 385-396.

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

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

**Király, L.**, Szöcs, G. 2009. Diagnostic marker for E- and Z-strains of *Ostrinia nubilalis*, expressing differentially in larval  $\Delta 11$  desaturase transcript. *J. Appl. Entomol.* 133, 272–277.

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

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

Kolozsvári Nagy, J., **Király, L.**, Schwarczinger, I. 2012. Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Central Eur. J. Biol.* 7, 1-12.

**Király, L.\***, Künstler, A., Bacsó, R., Hafez, Y.M., Király, Z. 2013. Similarities and differences in plant and animal immune systems – What is inhibiting pathogens? *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 48, 187-205.

Viczián, O., Künstler, A., Hafez, Y.M., **Király, L.\*** 2014. Catalases may play different roles in influencing resistance to virus-induced hypersensitive necrosis. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 49, 189–200.

Kolozsváriné Nagy, J., Schwarczinger, I., Künstler, A., Pogány, M., **Király, L.** 2015. Penetration and translocation of *Erwinia amylovora*-specific bacteriophages in apple - a possibility of enhanced control of fire blight. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 815–827.

Bacsó, R., Künstler, A., **Király, L.\*** 2016. *Tobacco necrosis virus* replication and spread in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia – a potential system for studying plant defense reactions to symptomless virus infections. *Acta Physiol. Plant.* 38, 139.

Hernández, J.A., Gullner, G., Clemente-Moreno, M.J., Künstler, A., Juhász, C., Díaz-Vivancos, P., **Király, L.** 2016. Oxidative stress and antioxidative responses in plant-virus interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 94, 134-148.

Nagy, Z.Á., Kátay, G., Gullner, G., **Király, L.**, Ádám, A.L. 2017. Azelaic acid accumulates in phloem exudates of TMV-infected tobacco

leaves, but its application does not induce local or systemic resistance against selected viral and bacterial pathogens. *Acta Physiol. Plant.* 39, 9.

Schwarczinger, I., Kolozsváriné Nagy, J., Künstler, A., Szabó, L., Geider, K., **Király, L.**, Pogány, M. 2017. Characterization of *Myoviridae* and *Podoviridae* family bacteriophages of *Erwinia amylovora* from Hungary - potential of application in biological control of fire blight. *Eur. J. Plant Pathol.* 149, 639–652.

Gullner, G., Kőmíves, T., **Király, L.**, Schröder, P. 2018. Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. *Front. Plant Sci.* 9, 1836.

Adhab, M., Angel, C., Rodriguez, A., Fereidouni, M., **Király, L.**, Scheets, K., Schoelz, J.E. 2019. Tracing the lineage of two traits associated with the coat protein of the *Tombusviridae*: silencing suppression and HR elicitation in *Nicotiana* species. *Viruses* 11, 588.

Künstler, A., **Király, L.**, Kátay, G., Enyedi, A.J., Gullner, G. 2019. Glutathione can compensate for salicylic acid deficiency in tobacco to maintain resistance to *Tobacco mosaic virus*. *Front. Plant Sci.* 10, 1115.

Künstler, A., Gullner, G., Ádám, A.L., Kolozsváriné Nagy, J., **Király, L.\*** 2020. The versatile roles of sulfur-containing biomolecules in plant defense – A road to disease resistance. *Plants* 9, 1705.

Künstler, A., Kátay, G., Gullner, G., **Király, L.\*** 2020. Artificial elevation of glutathione contents in salicylic acid-deficient tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NahG) reduces susceptibility to the powdery mildew pathogen *Euoidium longipes*. *Plant Biology* 22, 70-80.

Abdelaal, K., AlKahtani, M.D.F., Attia, K., Hafez, Y., **Király, L.**, Künstler, A. 2021. The role of plant growth-promoting bacteria in alleviating the adverse effects of drought on plants. *Biology* 10, 520.

Schwarczinger, I., Kolozsváriné Nagy, J., **Király, L.\*** Mészáros, K., Bányai, J., Kunos, V., Fodor, J., Künstler, A. 2021. Heat stress pre-exposure may differentially modulate plant defense to powdery mildew in a resistant and susceptible barley genotype. *Genes* 12, 776.

Abdelkhalek, A., Aseel, D.G., **Király, L.**, Künstler, A., Moawad, H., Al-Askar, A.A. 2022. Induction of systemic resistance to *Tobacco mosaic virus* in tomato through foliar application of *Bacillus amyloliquefaciens* strain TBorg1 culture filtrate. *Viruses* 14, 1830.

Abdelkhalek, A., **Király, L.**, Al-Mansori, A.-N.A., Younes, H.A., Zeid, A., Elsharkawy, M.M., Behiry, S.I. 2022. Defense responses and



metabolic changes involving phenylpropanoid pathway and PR genes in squash (*Cucurbita pepo* L.) following *Cucumber mosaic virus* infection. *Plants* 11, 1908.

El-Gendi, H., Al-Askar, A.A., **Király, L.**, Samy, M.A., Moawad, H., Abdelkhalek, A. 2022. Foliar applications of *Bacillus subtilis* HA1 culture filtrate enhance tomato growth and induce systemic resistance against *Tobacco mosaic virus* infection. *Horticulturae* 8, 301.

Kolozsváriné Nagy, J., Schwarczinger, I., **Király, L.**,\* Bacsó, R., Ádám, A.L., Künstler, A. 2022. Near-isogenic barley lines show enhanced susceptibility to powdery mildew infection following high-temperature stress. *Plants*, 11, 903.

Künstler, A., Füzék, K., Schwarczinger, I., Kolozsváriné Nagy, J., Bakonyi, J., Fodor, J., Hafez, Y.M., **Király, L.**\* 2023. Heat shock-induced enhanced susceptibility of barley to *Bipolaris sorokiniana* is associated with elevated ROS production and plant defense-related gene expression. *Plant Biology* 25, 803–812.

Otulak-Kozieł, K., Kozieł, E., Treder, K., **Király, L.** 2023. Glutathione contribution in interactions between *Turnip mosaic virus* and *Arabidopsis thaliana* mutants lacking respiratory burst oxidase homologs D and F. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 7128.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönöm az ATK Növényvédelmi Intézet (NÖVI) volt és jelenlegi igazgatóinak (Dr. Kőmíves Tamás, Dr. Barna Balázs, Dr. Kiss Levente, Dr. Kontschán Jenő), hogy biztosították a – DSc értekezésem beadásához is szükséges – kutatómunkám alapvető feltételeit.

Köszönöm egykori osztályvezetőmnek, a néhai Dr. Süle Sándornak, hogy osztályán (NÖVI Biotechnológiai Osztály) kezddhettem meg az intézeti munkámat, és saját kutatásaimban mindig teljes mértékben támogatott, biztatott.

Köszönet illeti Dr. Ádám Attilát és Dr. Gullner Gábort, akik már az egyetemista (diplomamunkás) időszakomban és később, mint közvetlen kollégák is, rengeteg hasznos tanáccsal és biztatással segítették kutatásaim megindulását.

Köszönöm a NÖVI-ben valamennyi egykori és jelenlegi kollégámnak a közös munkát, ötleteket, együttműködést, a jó munkahelyi (labor) hangulatot.

Köszönöm a doktori (Ph.D.) témavezetőmnek, Dr. James Schoelz-nak, hogy a doktori fokozat megszerzése érdekében öt évig növényvirológiai kutatócsoportjában dolgozhattam és tanulhattam – ez a külföldi szakmai tapasztalat meghatározó és példaértékű volt (és marad) számomra.

Köszönettel tartozom Prof. Karl-Heinz Kogelnek is, akinek laboratóriumában Eötvös ösztöndíjasként, ill. közös DAAD pályázatok keretében több alkalommal is dolgozhattam, és aki felkeltette érdeklődésem a lisztharmit fertőzések élettani hátterének kutatása iránt.

Köszönöm két egykori Ph.D. hallgatónak (Dr. Albert Réka és Dr. Künstler András) a korábbi és jelenlegi közös együttműködést, kutatómunkát, a laboratóriumi kísérletek megvalósításához nyújtott kreatív ötleteket.

Köszönet illeti szűkebb családomat, hogy türelemmel viselték a DSc értekezés összeállításával járó többlet elfoglaltságomat.

Köszönöm Édesapámnak, aki meghatározó szerepet játszott abban, hogy a kutatói pályát választottam.