

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

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

Király Lóránt

ATK Növényvédelmi Intézet

Budapest

2023

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS ÉS KUTATÁSI CÉL	3
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
- A növényi betegség rezisztencia fő formái.....	5
- A növényi betegség rezisztencia fontosabb biokémiai faktorai.....	19
ANYAGOK MÓDSZEREK	31
- Felhasznált növények, növénynevelés és kezelések, kórokozók és kimutatásuk.....	31
- Növényi génexpressziós vizsgálatok.....	36
- Növényi biokémiai vizsgálatok.....	38
EREDMÉNYEK	41
- A növényi vírusfertőzésekkel szembeni hiperszenzitív reakcióban (HR) a rezisztencia és a nekrosis (sejt/szövethalál) egymástól függetlenül öröklődhet.....	41
- A növényi védekezés fokozása – eltérő hatások a vírusfertőzésekkel szembeni HR-t alkotó rezisztenciára és nekrozisra (sejt/szövethalálra).....	47
- A HR-rel (sejt/szövethalál) járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – különbségek a védekezési gének és antioxidánsok aktiválódásában.....	59
- A HR-rel járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – a reaktív oxigénszármazékok (ROS) szerepe a rezisztencia, ill. sejthalál kialakításában.....	65
- Tünetmentes nemgazda rezisztencia biotróf gombakórokozók (pl. lisztharmat) szemben – a szuperoxid (O_2^-) korai felhalmozódásának szerepe.....	79
- A paprika lisztharmattal (<i>Leveillula taurica</i>) szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciája – a szuperoxid (O_2^-) felhalmozódásának meghatározó szerepe.....	89
EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	96
- A növényi vírusfertőzésekkel szembeni hiperszenzitív reakcióban (HR) a rezisztencia és a nekrosis (sejt/szövethalál) egymástól függetlenül öröklődhet.....	96
- A növényi védekezés fokozása – eltérő hatások a vírusfertőzésekkel szembeni HR-t alkotó rezisztenciára és nekrozisra (sejt/szövethalálra).....	100
- A HR-rel (sejt/szövethalál) járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – különbségek a védekezési gének és antioxidánsok aktiválódásában.....	105
- A HR-rel járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – a reaktív oxigénszármazékok (ROS) szerepe a rezisztencia, ill. sejthalál kialakításában.....	108
- Tünetmentes nemgazda rezisztencia biotróf gombakórokozók (pl. lisztharmat) szemben – a szuperoxid (O_2^-) korai felhalmozódásának szerepe.....	113
- A paprika lisztharmattal (<i>Leveillula taurica</i>) szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciája – a szuperoxid (O_2^-) felhalmozódásának meghatározó szerepe.....	118
Tünetmentes (extrém) rezisztenciától a HR-típusú rezisztencián át a szisztemikus HR-ig – a növényi védekezés fokozatai és a jól időzített/késői ROS felhalmozódás.....	122
ÖSSZEFOGLALÁS	125
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	130
IRODALOMJEGYZÉK	131
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	152

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 természetesen növényfajták előállításának, 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 vírusfertőzéseknel 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^-) 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 nekrosis 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 gombakórokozókkal (pl. lisztharmat) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciában, árpában?

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

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Ebben a fejezetben a növényi betegség rezisztencia fő formáit és az ezeket kialakító fontosabb biokémiai tényezőket mutatom be a teljesség igénye nélkül, elsősorban a doktori értekezésben ismerttetett saját kutatások témájának szempontjából (sejthalál és reaktív oxigénszármazékok a növényi rezisztenciában, vírus- és lisztharmat-fertőzéseknel).

A növényi betegségrezisztencia fő formái

Elsősorban négy alapvető tényező határozza meg azt, hogy egy adott növény mennyire sikeresen képes ellenállni egy kórokozó fertőzésének: mindenekelőtt a gazdanövény fogékonysága/rezisztenciája, a kórokozó virulenciája (fertőzőképessége) és a környezeti körülmények (Scholthof, 2007). A negyedik – nem elhanyagolható – tényező a gazdanövény sikeres védekezésének kialakításhoz szükséges idő, hiszen minél hamarabb aktiválódik a megtámadott növény védekezési rendszere, annál nagyobb eséllyel képes a gyors és hatékony (tünetmentes) rezisztenciára (Bendahmane et al., 1999; Künstler et al., 2016; Hernández et al., 2016).

A növények szempontjából (hasonlóan pl. az állatokhoz) a gazda-kórokozó kapcsolatok kimenetele alapvetően kétféle: kompatibilitás (fogékonyság) vagy inkompatibilitás (rezisztencia). Annak ellenére, hogy a növények nem rendelkeznek olyan adaptív immunitással, mint pl. az emlősállatok, az őket támadó kórokozókkal szemben sokféle, változatos rezisztenciaforma alakult ki. Ezek két alapvető csoportja a veleszületett (*innate*) valamint a szerzett (*acquired*) rezisztencia. A veleszületett rezisztencián belül megkülönböztethető két kategória, amely valójában két különböző, de egymással összefüggő növényi védelmi vonalat jelent: az ún. általános, vagy nem-specifikus, és a specifikus ellenálló képesség.

Veleszületett (*innate*), általános (nem-specifikus) rezisztencia

Az általános, nem-specifikus ellenálló képességre jellemző, hogy minden, a növény számára idegen (mikro) organizmust gátol. A nem specifikus védekezés a növény elsődleges védelmi vonalát jelenti, amelynek fő alkotórészei a növényi plazmamembránon található ún. mintázat felismerő receptorok (*Pattern Recognition Receptor*, PRR). Ezek a receptorok (PRR) felelősek a – patogén és nem patogén – mikroorganizmusok konzervált molekuláris mintázatainak (*Microbe Associated Molecular Patterns / Pathogen Associated Molecular Patterns*, MAMP / PAMP) felismeréséért. Ilyen típusú sejtfelszíni PAMP pl. a legtöbb gomba sejtfalában előforduló kitin, valamint a baktériumok ostorát alkotó flagellin (Newman et al., 2013). A növény a flagellin fehérjén belül egy 22 aminosavból álló peptidláncot (flg22) ismer fel egy PRR, az ún. *Flagellin Sensing Receptor 2* (FLS2) segítségével (Fürst et al., 2020). A fentiek alapján a növények elsődleges védelmi vonalát

PAMP által kiváltott immunitásnak (*PAMP-Triggered Immunity*, PTI) vagy bazális (alap) rezisztenciának is nevezik (Peng et al., 2018). A PRR-ek általi kórokozó felismerést követően a PTI során a növényben különböző jelátviteli folyamatok indukálódnak: sejtmembránon keresztüli ionáramlások, reaktív oxigén származékok (*Reactive Oxygen Species*, ROS) szintjének változásai, génexpressziós változások (pl. az ún. patogenezissel kapcsolatos *PR* géneknél), antimikrobiális vegyületek termelődése (lásd pl. Newman et al., 2013).

Nemgazda rezisztencia

Az ún. nemgazda rezisztencia a növényvilágban a legáltalánosabb nem-specifikus ellenállási forma. Nemgazda rezisztenciáról akkor beszélünk, amikor egy adott növényfaj minden fajtája (és egyede) rezisztens a legtöbb kórokozó faj minden törzsével (rasszával) szemben (Heath, 2000c). Ez a típusú ellenálló képesség az élővilágban leginkább elterjedt és egyik leghatékonyabb (leggyorsabb) és legtartósabb növényi rezisztenciaforma, hiszen a legtöbb növény a legtöbb kórokozóval szemben ellenálló (Mysore és Ryu, 2004; Niks és Marcel, 2009; Schulze-Lefert és Panstruga, 2011; Gill et al., 2015; Lee et al., 2017). A nemgazda rezisztencia tipikusan tünetmentes ez az ún. I. típusú nemgazda ellenálló képesség. A nem-adaptált patogén által megtámadott növény ilyenkor nem mutat látható (makroszkopikus) tüneteket, feltehetően azért, mert a kórokozó gyorsan és hatékonyan gátlódik, elsősorban a növényben indukálódó első védelmi vonal (PTI vagy bazális rezisztencia) aktiválódása miatt. A lassabban kialakuló, ún. II. típusú (tünetes) nemgazda rezisztencia során viszont programozott sejt- és szövethalál (hiperszenzitív reakció, HR) indukálódik, ugyanis a kórokozó ilyenkor leküzdi az első védelmi vonalat (PTI) és csak a patogenezis későbbi szakaszában ismeri fel a megtámadott növény (Mysore and Ryu, 2004; Senthil-Kumar and Mysore, 2013; Lee et al., 2017). A nemgazda rezisztencia általában akkor tünetmentes (I. típusú), amikor az adott kórokozó gazda- és nemgazda növénye közötti filogenetikai távolság nagy (pl. dohány és árpa) és ezért a fertőzést beindító kórokozó fehérjék (effektorok) feltehetően nem tudnak kapcsolódni a megfelelő növényi célfehérjékhez. Ugyanakkor a HR-tünetes (II. típusú) nemgazda ellenállóképesség akkor alakul ki, ha a gazda- és nemgazda növény filogenetikai rokonsága szoros (pl. dohány és paradicsom) és ezért a kórokozó effektorok a nemgazda növényben legalább néhány célfehérjét fel tudnak ismerni és így egy korlátozott mértékű fertőzést indukálni (Schulze-Lefert és Panstruga, 2011).

Egyelőre nem ismert olyan általános biokémiai, élettani mechanizmus, amely a tünetmentes (I. típusú) és a HR-tünetekkel járó (II. típusú) nemgazda rezisztencia minden esetére magyarázatot adhat. A NADPH-oxidázok és az általuk termelt ROS nemgazda rezisztenciában játszott szerepére utal, hogy *N. benthamiana*-ban két NADPH-oxidázt kódoló gén csendesítése a ROS szint visszaeséséhez és a *Phytophthora infestans*-szal szembeni, HR-típusú nemgazda rezisztencia gyengüléséhez vezet (Yoshioka et al., 2003). Több baktérium-növény kapcsolatban is kimutatták, hogy a NADPH-oxidáz aktivitás és a ROS akkumuláció meghatározó a tünetmentes és HR-típusú nemgazda rezisztencia kialakításában (An et al., 2017; Moeder et al., 2005). Az árpa-búzalisztharmat (*B. graminis* f. sp. *tritici*) kapcsolatban kialakuló tünetmentes nemgazda rezisztenciában egy

transzmembrán receptor-szerű kináz fehérjét kódoló gén (*HvLEMK1*) csendesítése a lisztharmat gomba korlátozott terjedéséhez és sporulációjához vezetett (Rajaraman et al., 2016). A glükozinolátok bioszintézisében sérült növényekben a lisztharmatokkal szembeni nemgazda rezisztencia is részlegesen gátolt (Bednarek et al., 2009). Ezek szerint a tünetmentes, ill. HR-tünetekkel járó nemgazda rezisztencia kialakításában meghatározó lehet többek között a ROS, a glükozinolátok és egyes receptor-szerű kinázok működése is.

Nem rassz-specifikus mlo-rezisztencia

Ezt a szabad szemmel tünetmentes rezisztenciaformát árpában fedezték fel az 1930-as években. Az árpa *Mildew resistance locus o* (*Mlo*) génjének funkcióvesztéses, recesszív mutáns alléljei (*mlo*) okozzák és az árpa lisztharmatgomba (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) legtöbb rassza ellen hatásos. A tipikus, ún. *R* gének által meghatározott, rassz-specifikus, dominánsan öröklődő rezisztenciával szemben (tárgyalását ld. alább) az *mlo* alapú rezisztencia egy nem rassz-specifikus, azaz széles spektrumú ellenálló képesség (Jørgensen, 1992; Lyngkjær és Carver; 2000 Brown, 2015). Az *mlo* mutációk már több, mint 40 éve biztosítanak tartós, tünetmentes lisztharmat rezisztenciát, Közép-Európában pl. a termesztett tavaszi árpa fajták legalább felében (Jørgensen, 1992; Kusch és Panstruga, 2017).

Az *mlo* mutáns növények jellemző fenotípusa az egyes epidermisz sejtek falában spontán, abiotikus vagy biotikus stressz hiányában is, kialakuló kallóz lerakódások – ez főleg az öregedő levelekben észlelhető – párhuzamosan a szintén spontán megjelenő elhalt mezofill sejtekkel és klorofill lebomlással, amely makroszkopikusan látható klorotikus és nekrotikus léziók kialakulásához vezethet (Wolter et al. 1993; Peterhänsel et al., 1997; Piffanelli et al., 2002). Régóta ismert az is, hogy lisztharmattal fertőzött árpában a gomba által megtámadott, de rezisztens epidermisz sejtek ún. papillákat (sejtfal-vastagodásokat) képeznek, amely gátolhatja a lisztharmat behatolását, ill. növekedését (Koga et al., 1990; Hüchelhoven et al., 1999). A programozott sejthalált gátló BAX INHIBITOR 1 (BI-1) fehérjét kódoló gén túltermeltetése *mlo* mutáns árpa epidermisz sejtjeiben a lisztharmatfogékonyságot közel a vad típus szintjére állítja helyre (Hüchelhoven et al., 2003). Mindezek alapján az *Mlo* gén terméke – amely egy transzmembrán fehérje – a lisztharmat-rezisztencia, ill. a növényi sejthalál negatív regulátorának tekinthető (Büsches et al., 1997; Piffanelli et al., 2002).

Hangsúlyozandó, hogy az *mlo* alapú rezisztencia a növény szinte valamennyi életszakaszában hatásos, míg az említett pleiotróp hatások (limitált klorózis, nekrosis, stb.) szinte kizárólag az érett, idősebb levelekben jelentkeznek (Kusch és Panstruga, 2017). Feltehetően ez lehet az egyik oka annak, hogy az *mlo* mutáns árpák az élő növényi szöveteket preferáló (biotróf) lisztharmattal szemben ugyan rezisztensek, de a fertőzés során a gazdasejtek elhalását indukáló (ún. hemibiotróf és nekrotróf) gombákra a vad típusú növénynél jóval fogékonyabbak lehetnek (Jarosch et al., 1999; Kumar et al., 2001; Jansen et al., 2005; Gruner et al., 2020).

Az *Mlo* gén(ek) az árpán kívül megtalálható több más egy- és kétszikű növényben is, többek között búzában, lúdfüben (*Arabidopsis thaliana*) paradicsomban és paprikában, ahol szintén a lisztharmat fogékonyság meghatározó faktorai (Consonni et al., 2006; Bai et

al., 2008; Zheng et al., 2013a; Acevedo-Garcia et al., 2014). Ugyanez igaz az *mlo* mutáns növényekre is. Pl. paradicsomban és borsóban is azonosítottak már természetes *mlo* mutáns vonalakat (Bai et al., 2008; Humphry et al., 2006; Sulima és Zhukov, 2022), búzában pedig kémiai, ill. molekuláris úton előállított *mlo* vonalakat hoztak létre (Várallyai et al., 2012; Acevedo-Garcia et al., 2017; Wang et al., 2014; Li et al., 2022a). Mindezek alapján az *mlo* mutációk által meghatározott, nem rassz-specifikus rezisztencia egy meglehetősen általánosnak tekinthető lisztharmat-ellenállósági formának tekinthető a növényvilágban.

Veleszületett (*innate*), specifikus rezisztencia

A növény specifikus ellenálló képessége azt jelenti, hogy elsősorban egy növényfaj adott fajtája vagy vonala mutat rezisztenciát egy kórokozó faj adott izolátumára vagy rasszára. Ez a rezisztencia forma tehát igen szűk spektrumú, de – rövid- és középtávon – rendkívül hatásosan gátolhatja a kórokozót.

„Gén-génnel szembeni” rezisztencia

A specifikus rezisztenciák közül talán az egyik legismertebb és leginkább kutatott növényi védekezés régebbi elnevezéssel az ún. gén-génnel szembeni (*gene for gene*) ellenálló képesség (Flor, 1971). E rezisztencia forma kialakulásának élettani háttere, hogy a kórokozók speciális virulencia faktorokat, ún. effektor fehérjéket, juttatnak be a növényi gazdasejtekbe, így a támadó mikroorganizmus sikeresen leküzdí az első növényi védelmi vonalat (a nem specifikus PTI védekezést) ezáltal biztosítva a gazdanövény megfertőződését (Cui et al., 2015). A növényekben azonban kialakult egy második védelmi vonal is, ennek hatására az effektorok felismerésével a növény képes védekezni bizonyos kórokozókkal szemben. A növényeknek ezt a specifikus rezisztenciáját irányító *R* (rezisztencia) gének termékei általában intracelluláris, ún. *Nucleotide-binding/Leucine-rich-Repeat* (NLR) receptorok, melyek közvetlenül vagy közvetítő fehérjék segítségével kapcsolatba lépnek az effektorokkal (Bent és Mackey, 2007; Bentham et al., 2020). Ennek hatására a nem specifikus PTI védekezéshez hasonló élettani/biokémiai folyamatok aktiválódnak a növényben (pl. ROS felhalmozódás a kórokozó behatolás helyén, *PR* és más növényi védekezési gének fokozott expressziója, antimikrobiális vegyületek termelődése). Ezt a specifikus ellenálló képességet újabban effektor által kiváltott immunitásnak (*Effector-Triggered Immunity*, ETI) nevezik (Dangl et al., 2013; Cui et al., 2015; Gouveia et al., 2017).

Az ETI-nek, régebbi nevén gén-génnel szembeni rezisztenciának, tehát fő jellemzője, hogy egy patogén, ún. avirulencia gén által kódolt effektor fehérje kapcsolatba lép egy növényi *R* (rezisztencia) gén termékével (általában egy NLR receptorral). Ilyenkor sok esetben programozott sejt- és szövethalál (hiperszenzitív reakció, HR) indukálódik a megfertőzött növényi sejtekben a kórokozó behatolási helye körül és egyben a kórokozó szaporodása is gátlódik (Klement, 1982; Goodman és Novacky, 1994; Morel és Dangl, 1997).

Az ETI vagy gén-génnel szembeni rezisztencia azonban hosszabb távon kevésbé tartós, mivel a kórokozókban, a növényi rezisztencia elkerülését elősegítve, folyamatosan új típusú effektor fehérjék termelődnek, ill. a meglévők – mutációk révén – változnak. Így előbb-utóbb a növény már nem ismeri fel többé a patogént és a rezisztencia megszűnik (Dangl et al., 2013). Mindez a gyakorlatban azt jelenti, hogy a gén-génnel szembeni rezisztencia (ETI) felhasználásával ugyan sikeresen előállíthatók kórokozó rezisztens növényfajták, de az ellenálló képesség egy adott kórokozónak csak egyetlen vagy néhány törzsével (rasszával) szemben érvényesül, és a kórokozó hamar le tudja törni ezt a típusú növényi védekezést új törzsek (rasszok) kialakításával (Flor, 1971; Jones és Dangl, 2006; Bent és Mackey, 2007).

Extrém rezisztencia

A gén-génnel szembeni rezisztencia (ETI) nem mindig jár hiperszenzitív reakció (programozott sejt- és szövethalál, HR) indukálásával. Az ETI sok esetben teljesen tünetmentes, ennek egyik legismertebb típusa az ún. extrém rezisztencia (ER), amely egy elsősorban növényi vírusfertőzésekkel szemben érvényesülő, gyors és hatékony ellenálló képesség. Az ER-t megfigyelték már több, gazdaságilag jelentős károkat is okozó növényi vírus fertőzése esetén, mint pl. a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX), burgonya Y vírus (*Potato virus Y*, PVY), szója mozaik vírus (*Soybean mosaic virus*, SMV), tarlórépa göndörödés vírus (*Turnip crinkle virus*, TCV) és uborka mozaik vírus *Cucumber mosaic virus*, CMV) (Bendahmane et al., 1999; Cooley et al., 2000; Hajimorad és Hill, 2001; Sekine et al., 2008 Rui et al., 2017; Ross et al., 2021).

Az egyik legjobban ismert és jellemzett extrém rezisztencia a PVX ellen érvényesül, az ellenálló képességet a burgonya *Rx1* vagy *Rx2* génje irányítja (Bendahmane et al., 1999, 2000). Érdekes, hogy ha a PVX köpenyfehérjét (CP) – a vírus effektorát – kódoló gént tranziensen kifejeztették *Rx1* rezisztencia gént hordozó dohányban, a CP programozott sejt- és szövethalált (HR-t) váltott ki (Bendahmane et al., 1999). Ezek szerint az *Rx* gének által meghatározott extrém rezisztencia olyan gyorsan kialakul (a vírus olyan hamar gátlódik), hogy a PVX CP nem képes elég magas koncentrációban felhalmozódni ahhoz, hogy HR-t váltson ki. Egy hasonló modellel magyarázták a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) TCV-vel és CMV-vel szembeni rezisztenciájának bizonyos eseteit is. A *HRT* (*HR to TCV*), ill. *RCY1* (*Resistance to CMVY1*) rezisztencia gént hordozó *A. thaliana* növények HR-típusú ellenálló képességet mutatnak a TCV, ill. CMV fertőzéssel szemben (Cooley et al., 2000; Sekine et al., 2008). Ugyanakkor a *HRT* vagy *RCY1* gént túltermelő transzgenikus növényekben a vírusfertőzésre nem alakul ki HR, hanem tünetmentes ER, feltehetően azért, mert ilyenkor a növények rendkívül gyorsan reagálnak a TCV, ill. CMV fertőzésére (Cooley et al., 2000; Sekine et al., 2008). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a betegség rezisztencia hatékonysága elsősorban a gazdanövény reakciójának sebességétől függ: a növény gyors védekezése biztosítja a korai vírusgátlást, mielőtt még bármilyen tünet (pl. HR) megjelenik (kialakul az extrém rezisztencia).

Annak ellenére, hogy a védekezés sebessége (hatékonysága) az egyik meghatározó tényezője lehet a tünetmentes, extrém rezisztencia kialakulásának, nem ismert olyan általános biokémiai, élettani mechanizmus, amely ennek a gyors antivirális növényi válasznak minden esetére magyarázatot adna. Ismert pl., hogy egyes védekezéssel

kapcsolatos poliamin vegyületek és a konjugált (kötött) szalicilsav nagy mennyisége hozzájárulhat egy paradicsom vonalnak (VFNT) a paradicsom tarkulás mozaik vírussal (*Tomato mottle mosaic virus*, ToMMV) szemben mutatott extrém rezisztenciájához (Nagai et al., 2020). A szója – SMV kapcsolatban az ER elsődleges mechanizmusa feltehetően a vírus sejtről-sejtre történő terjedésének gátlása a sejtfalakban kialakuló kallóz lerakódások által, amelyet egy abszcizinsav által irányított jelátviteli útvonal szabályoz (Seo et al., 2014; Alazem et al., 2018).

A tünetmentes, extrém vírus rezisztenciát irányító egyik lehetséges mechanizmus az ún. reaktív oxigénszármazékok (ROS) felhalmozódása lehet. Évtizedek óta ismert, hogy a ROS, elsősorban a szuperoxid (O_2^-) és a belőle képződő hidrogén-peroxid (H_2O_2) termelődésének meghatározó szerepe van a HR-típusú növényi vírus rezisztenciában (Doke és Ohashi, 1988; Rossetti és Bonatti, 2001; Király et al., 2008; Lukan et al., 2020). Bendahmane és munkatársai (1999) már több, mint 20 éve feltételezték, hogy a korai ROS (pl. szuperoxid) felhalmozódás lehet az egyik oka a gyors és hatékony, tünetmentes ER-nek is az olyan vírusokkal szemben, mint pl. a PVX. Jóval később mások kimutatták, hogy egy kukoricából származó, szuperoxid-szintézist szabályozó gén (*ZmRop1*) túltermeltetése PVX-re fogékony *Nicotiana benthamiana*-ban a vírusfertőzés gátlásával járt, ami a szuperoxidnak a PVX elleni ER-ben játszott szerepét valószínűsíti (Cao et al., 2012). Ugyanakkor a hidrogén-peroxid is egy lehetséges komponense az *Rx1* gén által meghatározott, PVX elleni ER-nek, mivel a PVX effektorát (a vírus köpenyfehérjét) termelő *N. benthamiana*-ban az *Rx1* rezisztencia fehérje aktiválását követő 1-2 órán belül megnőtt a H_2O_2 szintje (Knip et al., 2019). Mindezek ellenére továbbra is tisztázatlan maradt az, hogy a ROS ténylegesen – funkcionálisan – hozzájárul-e a növényi vírusokkal szembeni extrém rezisztenciához?

RNS által közvetített kórokozó rezisztencia

A veleszületett (*innate*), specifikus rezisztencia egyik formájának tekinthető az ún. RNS által közvetített vírusrezisztencia (*RNA mediated virus resistance*), ami a növényi poszttranszkripcionális géncsendesítés mechanizmusán alapul (*Post Transcriptional Gene Silencing*, PTGS) (Baulcombe, 1996; Van den Boogaart et al., 1998; Wang et al., 2012a). A PTGS a növényi, állati, stb. génműködés egyik fő szabályozója, szerepet játszik pl. a környezeti változásokra adott növényi válaszbán (Baulcombe és Dean, 2014). Ugyanakkor a PTGS egy minden eukariótában működő „nukleinsav alapú immunitásnak” is felfogható, amely a „parazita” nukleinsavak, így a viroidok, vírusok és a transzpozonok ellen védi a gazdaszervezetet. A vírusfertőzés során a növénybe jutott vírus RNS-ről a vírusreplikáció során kettősszálú RNS (dsRNS) képződik, amit a növény idegenként ismer fel (egy egészséges eukarióta sejt gyakorlatilag nem tartalmaz dsRNS-t) és így a fertőző vírus saját maga ellen ható géncsendesítést indukál, ami a dsRNS-sel homológ valamennyi vírus RNS szekvencia-specifikus lebomlásához vezet (Lindbo és Dougherty, 2005; Wang et al., 2012a). Érdekes, hogy növényekben az RNS alapú vírusrezisztencia, illetve a PTGS hőmérsékletfüggő: mindkét folyamat körülbelül 25 °C -nál magasabb hőmérsékleten működik hatékonyabban. Feltehetően ez lehet az egyik magyarázata annak, hogy

szabadszíven a növényi vírusbetegségek sokszor alacsonyabb hőmérsékleten (kb. 15-23 °C) terjednek jobban, ill. produkálnak súlyosabb tüneteket (Szittyá et al., 2003).

A növényi PTGS azonban a vírusok mellett olyan más kórokozók ellen is hatásos lehet, amelyek genetikai anyaga nem jut be a gazdanövénybe (pl. baktériumok, gombák). Ha ugyanis a transzgenikus gazdanövény a kórokozó adott génjére specifikus dsRNS-t túltermeli, akkor a PTGS „végrehajtói” – a dsRNS lebomlásából keletkező kis (21-24 nt), ún. siRNS-ek – a gazdanövényből a kórokozó sejtekbe transzlokálódnak és rezisztenciát indukálnak. Ezt a kísérleti megközelítést gazdanövény által indukált géncsendesítésnek (*Host-Induced gene Silencing*, HIGS) nevezik és a jövőben egy ígéretes technológia lehet kórokozó-rezisztens természetű növényfajták előállítására (ld. pl. Koch és Kogel, 2014; Bilir et al., 2022).

A növények két védelmi vonala (általános és specifikus rezisztencia) közötti kapcsolat

A növények elsődleges (PTI) és másodlagos (ETI) védelmi vonala egymásra épül, hiszen a kórokozó a PTI leküzdése során effektor fehérjéinek segítségével próbálja a gazdanövényt megfertőzni, míg az erre adott növényi válasz az ETI, amely a kórokozót végül gátolja (ennek tárgyalását ld. fentebb). Feltételezhető, hogy a két védelmi rendszer alapmechanizmusa legalább részben közös, hiszen régóta ismert, hogy a PTI és ETI során hasonló vagy olykor azonos védekezési folyamatok aktiválódnak (pl. reaktív oxigén származékok /ROS/ felhalmozódása, *PR* és más növényi védekezési gének fokozott expressziója, antimikrobiális vegyületek termelődése) (Navarro et al., 2004; Zipfel et al., 2004).

Felmerül a kérdés, hogy az ETI – bár aktiválódása a PTI következménye – képes-e hatékonyan működni a PTI-től teljesen függetlenül, annak hiányában? Újabb kutatások szerint a funkcionális PRR vagy PRR ko-receptor fehérjék megléte nélkül, tehát lényegében PTI-hiányos lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) mutánsokban a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 baktérium fertőzésekor a PTI hiányában az ETI is sérül (Ngou et al., 2021; Yuan et al., 2021). Ugyanaz a két kutatócsoport azt is kimutatta, hogy az ETI is képes erősíteni a PTI-t, tehát a két védelmi vonal kölcsönösen fokozza egymás hatását. A PTI és ETI jelátviteli folyamatainak összekapcsolásában egy ROS, a szuperoxid játszik kulcsszerepet, amelynek termelődéséért egy NADPH-oxidáz enzim, az RBOHD felel (ld. Pruitt et al., 2021).

A növénypatogének effektor fehérjéinek egy része a nem specifikus PTI védekezés leküzdése során úgy aktiválja a fertőzési folyamatot, hogy egy működő, specifikus növényi rezisztenciát, a géncsendesítésen (PTGS) alapuló RNS által közvetített kórokozó rezisztenciát hatástalanít. A növényi vírusok PTGS szuppresszor (ún. *Viral Suppressors of RNA-mediated resistance*, VSR) fehérjéket termelnek – ezek voltaképpen virulencia faktorok, de egyben a sikeres fertőzés effektorai (végrehajtói) is (Roth et al., 2004; Moissiard és Voinnet, 2004). Hasonló, PTGS-szuppresszor fehérjék nem-vírus kórokozókban is működnek, ilyen pl. a *Phytophthora sojae*-ban azonosított két, ún. PSR fehérje (*Phytophthora Suppressor of RNA silencing*), amelyek jelenléte fokozott fogékonyságot okoz szóján és lúdfűn is (Xiong et al., 2014; Hou et al., 2019).

A fentiek alapján tehát a növényi nem specifikus és specifikus rezisztencia formák több szálon (PTI-ETI, PTI-PTGS-ETI) is kapcsolódhatnak egymással, növelve ezáltal a rezisztencia hatékonyságát.

Szerzett (*acquired*) rezisztencia

A szerzett – szisztemikusan is érvényesülő – növényi betegség rezisztenciát különböző lokális növény-mikroba kapcsolatok indukálják és az indukció helye és az indukáló mikroorganizmus életformája szerint két alaptípusa ismert: a szisztemikus szerzett rezisztencia (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) és az ún. indukált szisztemikus rezisztencia (*Induced Systemic Resistance*, ISR) (Vlot et al., 2009, 2021; Pieterse et al., 2014). Az SAR-t a gazdanövény levelét fertőző kórokozók, míg az ISR-t a gyökerekkel kapcsolatba kerülő hasznos (nem patogén, szimbióta) mikroorganizmusok váltják ki. A növényben a lokális indukciót követően a fokozott védekezés – különféle jelátviteli útvonalakon – szisztemizálódik, és a távoli szövetekben is egy „készenléti” állapotot (*priming*) hoz létre (Conrath et al., 2015), melynek segítségével fokozott rezisztencia alakul ki egy következő (másodlagos) fertőzéssel vagy abiotikus stresszel szemben. A szerzett rezisztencia tehát nem specifikus, a kiváltó ágensek (mikroorganizmusok, ill. kémiai vegyületek) tekintetében sem, ráadásul rendszertanilag egymástól távol álló növényekben és a patogének széles spektruma ellen hatásos.

Szisztemikus szerzett rezisztencia

Az ún. biotróf és hemibiotróf kórokozók (amelyek a patogenezis legalább kezdeti fázisában élő növényi sejteket/szöveteket preferálnak) a fertőzés helyén aktiválhatják a gazdanövény elsődleges és másodlagos védelmi vonalát (a PTI-t és az ETI-t) is. Mind a PTI, mind az ETI folyamata nagyban függ egy fontos növényi hormon, a szalicilsav (2-hidroxi-benzoészav, SA) jelenlététől. Ugyanakkor a PTI és az ETI védekezés közül bármelyik képes egy lokális majd szisztemikus, szintén SA-függő, védekezési választ indukálni egy későbbi fertőzésre vagy abiotikus stresszre, ez az ún. lokális, ill. szisztemikus szerzett rezisztencia (LAR, ill. SAR) (Ross, 1961a, b; Kuć, 1982; Strobel és Kuć, 1995; Vlot et al., 2009, 2021; Spoel és Dong, 2012; Conrath et al., 2015; Klessig et al., 2018). Ez egyben azt is jelenti, hogy a LAR/SAR egy többnyire sejt- és szöveti elhalással járó elsődleges fertőzés után alakul ki, de kiváltásához nem feltétlenül szükséges a növényi sejt-, ill. szövetelhalál, azaz a folyamatot egy teljesen tünetmentes fertőzés is aktiválhatja (Liu et al., 2010; Shopova et al., 2020). A LAR/SAR ugyanakkor nemcsak fertőzésekre, hanem abiotikus (pl. herbicid) stressz által okozott sejt/szöveti nekrozis hatására is indukálódhat (Sziráki et al., 1980; Strobel és Kuć, 1995).

A szalicilsav a LAR és SAR egyik kulcsvegyülete, felhalmozódása az első fertőzés után a távoli levelekben is megfigyelhető (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990). Évtizedek óta ismert, hogy pl. dohányban és lúdfüben (*A. thaliana*) egy transzgenikus úton működő bakteriális SA-hidroxiláz (*nahG*) nagyrészt teljesen lebontja a növényi szalicilsavat és ez mind a LAR, mind a SAR folyamatát gátolja (Gaffney et al., 1993; Vlot

et al., 2009). Ugyanakkor dohányban oltásos kísérletekkel igazolták, hogy a sikeres SAR-hoz a szalicilsavnak a szisztemikus – de nem a lokális – szövetekben történő felhalmozódása feltétlenül szükséges (Vernooij et al., 1994). Ezek szerint a szisztemikus növényi szövetekben a SA jelenlétének fő szerepe az SAR szisztemikus jelátvivő vegyületeinek (pl. metil-szalicilsav, azelainsav, glicerín-3-foszfát, DIR1 lipid transzfer protein) érzékelése, de önmagában nem a SA felelős a szisztemikus jelátvitelért (Park et al., 2007; Ádám et al., 2018; Vlot et al., 2021).

Fontos megemlíteni, hogy a SAR kialakulását nem minden esetben a szalicilsav irányítja, a SA-függő út mellett párhuzamosan a növényekben működik egy olyan típusú SAR, amely elsősorban egy nem-fehérje aminosavtól, a pipekolinsavtól (Pip), ill. annak származékától, az N-hidroxi-pipekolinsavtól (NHP) függ. A két SAR típus jelátviteli folyamatai hasonlóak és a SA-függő, ill. Pip/NHP-függő rezisztencia folyamatok egymást is erősíthetik (Gao et al., 2015; Vlot et al., 2021).

A SAR során a szalicilsav aktiválja az ún. *Nonexpressor of PR Genes 1 (NPR1)* géneket/fehérjéket, ennek hatására indukálódik az ún. patogenezissel kapcsolatos (*Pathogenesis-related*, PR) gének transzkripciója, ill. a PR fehérjék termelődése, amelyek szerepet játszhatnak a kórokozók gátlásában, ill. jelzik a rezisztencia kialakulását (Mou et al., 2003; Spoel és Dong, 2012; Breen et al., 2017). A SAR kialakulásának helyszínén, egy másodlagos fertőzés során, az antioxidánsok koncentrációja/aktivitása is megemelkedik, ennek következtében a ROS mennyisége lecsökken, és a szöveti nekrozis visszaszorul – feltehetően ez az oka annak, hogy a SAR a sejt- és szövethalált kiváltó abiotikus stresszekkel szemben is védelmet nyújthat (Fodor et al., 1997; Király et al., 2002b; Hafez et al., 2004).

Az SAR egyrészt a (hemi)biotróf patogének széles spektruma ellen működik, másrészt viszonylag hosszú ideig hatásos, laboratóriumi körülmények között is legalább 3-10 napig (az adott növény-kórokozó kapcsolattól függően) (Vlot et al., 2021). Rendkívül érdekes viszont, hogy a SAR ennél jóval tovább is hatásos lehet, ugyanis a fokozott védekezést mutató szülő növények utódaiba is tovább adódhat, öröklődhet, ez az ún. transzgenerációs SAR jelensége (Luna et al., 2012).

Indukált szisztemikus rezisztencia

Az ún. indukált szisztemikus rezisztenciát (*Induced Systemic Resistance, ISR*) a rizoszférával (gyökerekkel) kapcsolatba kerülő hasznos (nem patogén, szimbióta) mikroorganizmusok váltják ki (Pieterse et al., 2014; Vlot et al., 2021). Az SAR-hez képest az ISR a patogének jóval szélesebb spektruma ellen hatásos, ugyanis védelmet nyújt nemcsak a (hemi)biotróf, hanem a nekrotróf patogénekkel szemben is (amelyek patogenezisük kezdeti fázisában a megtámadott növényi sejteket/szöveteket toxinjaik segítségével előlik).

Az ISR-t indukáló (nem patogén) mikroorganizmusok lehetnek ún. növényi növekedést serkentő rizobaktériumok (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*, PGPR), pl. *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. és *Streptomyces* spp., valamint növényi növekedést serkentő gombák (*Plant Growth-Promoting Fungi*, PGPF), többek között *Trichoderma* fajok és a *Piriformospora indica* (újabb nevén *Serendipita indica*) (Gill et al., 2016; Vlot et

al., 2021). Nevüknek megfelelően a PGPR és PGPF mikrobák stimulálják a növény növekedését, de egyben rezisztenciát is képesek indukálni (hemi)biotróf, és nekrotróf patogénnel szemben. A SAR-hoz hasonlóan ez az indukált rezisztencia szintén a növény föld feletti (szisztemikus) részét védi a fertőzéstől (Pieterse et al., 2014; Vlot et al., 2021). A *P. indica* pl. árpában fokozza nemcsak a sóstresszel szembeni toleranciát, hanem a biotróf árpa lisztharmattal (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) és a nekrotróf *Fusarium culmorum*-mal szembeni rezisztenciát is (Waller et al., 2005). Érdekes, hogy az árpa lisztharmat ellen a *P. indica* által kiváltott ISR esetében nem a védekezési folyamatok erőssége változik, hanem azok időzítése: a védekezéssel kapcsolatos génexpressziós változások hamarabb és gyorsabban alakulnak ki (Waller et al., 2008; Molitor et al., 2011). Ezek szerint – ahogy az ISR védekezés sok más esetében is – a *P. indica* által kiváltott ISR a növényben egy „készenléti” állapotot (*priming*) hoz létre (Pieterse et al., 2014; Conrath et al., 2015).

Mivel az ISR a patogének jóval szélesebb spektruma ellen hatásos, mint a SAR, talán nem meglepő, hogy az ISR fő jelátviteli útját irányító hormon elsősorban nem a szalicilsav (SA), hanem a jázmonsav (JA) és etilén. Ennek megfelelően az ISR jelátviteli folyamatát a növényi védekezés irányító fehérjéje, az NPR1 (tárgyalását ld. feljebb) SA-független működésével hozták összefüggésbe (Nie et al., 2017). Ezek szerint viszont az SAR és az ISR jelátviteli folyamatai részben átfednek, erre utal az is, hogy az NPR1 mellett közös jelátvivő molekula az azelainsav és a glicerín-3-foszfát is (Cecchini et al., 2015, 2019; Vlot et al., 2021).

Tünetmentesség és hiperszenzitív sejthalál a növényi betegség rezisztenciában

A növényi rezisztenciával kapcsolatos első tudományos igényű beszámoló több, mint 120 évvel ezelőtt jelent meg (Ward, 1902). A munka egy „immunreakciót” ír le, amely a rozsok barnarozsdával szembeni rezisztenciájában nyilvánul meg. Ezt a növényi reakciót később Stakman (1915) – aki a búza szárrozsda betegség hátterét kutatta – hiperszenzitív reakciónak (HR) nevezte el, mert a növény ellenálló képessége kapcsolódott egy szabad szemmel is jól látható tünehez, a fertőzési helyeken kialakuló lokális nekrotikus léziókhöz. Később a HR-t vírusos és baktériumos fertőzések esetében is kimutatták (Holmes, 1929; Klement et al., 1964). Mai ismereteink szerint a HR-t az említett kórokozókön kívül sokféle más – részben nem kórokozónak tekintett – ágens is kiválthatja: pl. a növényeket fertőző oomicéták mellett HR-t okozhatnak fonálférgék (Dropkin, 1969), rovarok (Rossi et al., 1998) és parazita növények is (Balint-Kurti, 2019).

A növényi rezisztencia első és második védelmi vonalának működésekor (PTI és ETI, tárgyalását ld. korábban) a kórokozó felismerés folyamata HR-t is eredményezhet. Ilyenkor a kórokozó lokalizálása a behatolás (fertőzés) helyén együtt jár egy szintén lokalizált programozott sejthalállal (*Programmed Cell Death*, PCD), mindez pedig sok esetben makroszkopikusan is látható, lokális nekrotikus léziókat (szöveti nekrozis) eredményezhet (Klement, 1982; Goodman és Novacky, 1994; Balint-Kurti, 2019; Dalio et al., 2021). Hangsúlyozandó viszont, hogy az ETI sokkal gyakrabban jár együtt HR-rel, mint a PTI (Jones és Dangl, 2006; Tsuda és Katagiri, 2010; Spoel és Dong, 2012). A PTI –

a rezisztencia első növényi védelmi vonala – az esetek többségében teljesen tünetmentes, hacsak részlegesen nincs visszaszorítva pl. a fehérjeszintézis gátlása vagy kompatibilis baktériummal, ill. bakteriális effektorral történő előkezelés miatt, ilyenkor ugyanis a PTI HR-típusú tünetekkel (lokalizált sejt/szövethalál) jár együtt (Bozsó et al., 1999; Klement et al., 2003; Crabill et al., 2010).

A HR során kialakuló programozott sejthalál (PCD) morfológiai szempontból sok közös vonást mutat az állatokban leírt PCD típusokkal (pl. apoptózis). Ilyen sejten belüli változások pl. a citoplazma és citoskeleton kollapszusa, kromatin kondenzáció, a mitokondriumok duzzadása és membrán károsodása, genomi DNS törések (*DNA laddering*) (Ryerson és Heath, 1996; Heath, 2000a, b; Liu et al., 2005; Dalio et al., 2021). A növényi HR során kialakuló PCD-re, annak végső fázisában, specifikusan jellemző viszont a fokozott vakuólum képződés és a kloroplasztiszok szétesése (Salguero-Linares és Coll, 2019). Általánosan elfogadott a kutatók között, hogy a növényi HR ugyan sok szempontból hasonlít az állatokban leírt PCD-hez, de vannak sajátos vonásai – ennek alapján a HR során előforduló sejthalál a PCD egy specializált típusának tekinthető (Mur et al., 2008; Coll et al., 2011; Balint-Kurti, 2019).

Mivel a HR során a növényi rezisztencia együtt jár a sejt/szövethalállal, ezért nyilvánvalónak tűnik, hogy a HR-t alkotó rezisztencia és a sejthalál élettani és genetikai szempontból is szorosan összefügg. Ezek szerint a sejthalál hozzájárul a rezisztenciához, sőt, a rezisztencia lényeges eleme. Mindez egyértelmű lehet, ha a támadó kórokozó biotróf (az élő növényi sejteket/szöveteket preferálja). A HR szerepe azonban kérdéses pl. a nekrotróf kórokozókkal szembeni rezisztenciában, ugyanis ezek a patogének toxinjaik segítségével előlik a megtámadott növényi gazdasejteket. Govrin és Levine (2000) kimutatta, hogy ha a nekrotróf, több növényfajon is súlyos tüneteket okozó, *Botrytis cinerea* gombával lúdfüvet (*A. thaliana*) fertőznek, a gomba növekedése fokozódik azáltal, ha párhuzamosan egy HR-t indukáló baktériummal (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) is megfertőzik a növényt. A szerzők ebből arra következtettek, hogy a HR-típusú sejt/szövethalál nem képes megvédeni a növényt egy nekrotróf kórokozó fertőzésével szemben – ellenkezőleg, a HR jelenléte fokozhatja a nekrotróf kórokozók fertőzését.

Tünetmentes és HR-rezisztencia gombás fertőzéseknél

A fentiek alapján valószínű, hogy a HR-t alkotó rezisztencia és sejthalál a növény kórokozó kapcsolatok legalább egy részében egymástól elválasztható, független folyamatnak tekinthetők, ill. a HR-típusú sejthalál a rezisztencia nem megfelelő működésének (későn indukálódó, ill. „túlvezérelt” védekezés) köszönhető. Ezt először gombás fertőzéseknél bizonyították több, mint 50 évvel ezelőtt. Brown és munkatársai (1966) a búza szárrozsdával (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici*) szembeni HR-típusú rezisztenciát tanulmányozva ellenálló és fogékony búza vonalakban nem találtak összefüggést a kolonizált levelek egységnyi felületén kialakuló rozsdatelepek és HR-típusú nekrozis mennyisége között. Mindez arra utal, hogy búzában a szárrozda elleni rezisztencia során a HR-típusú sejt/szövethalál (nekrozis) a növény ellenálló képességének inkább következménye, mint oka (Brown et al., 1966). Ezt az eredményt, ill. hipotézist nem sokkal később magyar kutatók funkcionálisan is bizonyították (Király et al., 1972). Ha

a gazdanövény szövetekben a kórokozó növekedését kémiai vagy hőkezeléssel szelektíven gátolták, HR-típusú lokális nekrotikus léziók jelentek meg a *Phytophthora infestans*-sal fertőzött burgonya gumókon, ill. a rozsdagombákkal (*P. graminis* f.sp. *tritici* és *Uromyces phaseoli*) fertőzött búza- és bab leveleken. A szerzők arra következtettek, hogy a HR-típusú nekrozis a kórokozó gátlása miatt alakul ki, azaz a sejt/szövethalál a rezisztencia következménye, de nem oka, legalábbis a vizsgált növény-kórokozó kapcsolatokban (Király et al., 1972).

A HR-t alkotó rezisztencia és sejthalál függetlenségét a gombás fertőzések által kiváltott HR során további kutatások is bizonyították, többek között az árpának a lisztharmattal (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) szembeni, az *Mlg* rezisztencia gén által irányított ellenálló képességében. Az *Mlg* gén terméke a megtámadott epidermisz sejtekben HR-t, de egyben sejtfal-vastagodást (ún. papilla-képződést) is indukál. Kiderült, hogy az *Mlg*-rezisztencia által kiváltott HR nem szükséges a lisztharmat gátlásához, ugyanis ha a HR-t a transzkripció-inhibitor cordicepinnel gátolták, nem alakult ki fogékonyság, azaz nem keletkeztek gomba hausztóriumok. Ugyanakkor az *Mlg* genotípusú árpa koleoptil szöveiben ugyanaz a lisztharmat rassz tünetmentes (HR nélküli) rezisztenciát indukált, ami szintén arra utal, hogy ehhez a rezisztenciához nem feltétlenül szükséges a sejthalál, amely a rezisztenciának feltehetően csak egy lehetséges következménye (Schiffer et al., 1997). Ezt támasztja alá az az eredmény is, hogy az *Mlg* génre heterozigóta (*Mlg mlg*) árpában, a homozigótával (*Mlg Mlg*) ellentétben, a változatlan lisztharmat-rezisztencia mellett a HR-típusú sejthalál drasztikusan visszaszorul (Görg et al., 1993). Kimutatták azt is, hogy a hidrogén-peroxid meghatározó lehet az árpalisztharmat elleni védekezésben, de nemcsak az *Mlg*, hanem más rezisztencia gének működésekor is, függetlenül attól, hogy az ellenálló képesség HR-típusú sejthalállal vagy tünetmentes papilla-képződéssel jár (Hückelhoven et al., 1999).

Tünetmentes és HR-rezisztencia baktériumos fertőzéseknel

A növényi HR-t alkotó rezisztencia és sejthalál szétválasztását baktérium fertőzések esetén is kimutatták már több évtizeddel ezelőtt. Baktériumos fertőzésre HR-típusú rezisztenciát adó dohányban a baktériumszám nem változott jelentősen, ha a lokalizált nekrozist albuminnal gátolták (Király et al., 1977). Ehhez hasonlóan a citokinin túltermeltetése transzgenikus növényekben visszaszorította a HR-típusú sejt/szövethalált, de a baktériumszám nem változott szignifikánsan a *P. syringae* pv. *tomato*-ra rezisztens dohányban (Barna et al., 2008; Sheikh et al., 2014). Ezek szerint a sejthalál (PCD) a baktériumfertőzés által indukált HR esetén sem feltétlenül lényeges a rezisztencia működéséhez, amit később genetikai módszerekkel is bizonyítottak: PCD-ben gátolt fenotípust hoztak létre lúdfűben (*A. thaliana*), egy metakaspázt kódoló gén (*AtMCI1*) mutálásával, amely a baktériumfertőzés által okozott HR-típusú sejthalált drasztikusan gátolta, de a baktérium szaporodása nem változott, a rezisztencia érintetlen maradt (Coll et al., 2010). Érdekes, hogy a bakteriális HR bizonyos eseteiben viszont a sejthalál részlegesen képes befolyásolni a rezisztenciát: Ott és munkatársai (2003) kimutatták, hogy egy kalcium csatorna inhibitor, a lantán, gátolja a HR-sejthalált a *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*-val inokulált dohányban, viszont a kórokozó rezisztenciát is részlegesen

visszaszorította. A baktériumokkal szembeni HR-típusú rezisztenciának tehát lehetnek sejthalállal összefüggő és sejthaláltól független komponensei is.

Ha a bakteriális HR-ben a rezisztencia és sejthalál független genetikai és élettani folyamatok eredménye, akkor nem meglepő, hogy egyes környezeti hatások változásai, (pl. alacsony oxigénnyomás, magas páratartalom és hőmérséklet) gátolhatják a HR-típusú sejthalált, de a rezisztenciát nem befolyásolják (Goodman et al., 1972; Mittler et al., 1996). A lúdfű (*A. thaliana*) *dnd1* (*defence no death*) mutánsának segítségével sikerült először genetikailag is igazolni, hogy a bakteriális HR két komponense (rezisztencia és sejthalál) szétválasztható. A *dnd1* mutáns növényekben egyes védekezési folyamatok (pl. fokozott szalicilsav termelés és PR gén expresszió) konstitutívan „bekapcsolt” állapotban vannak (a növények törpenövésűek), ezért a rezisztencia is feltehetően korábban/gyorsabban indukálódik: a *P. syringae* pv. *glycinea* baktérium fertőzésére a *dnd1* mutánsok egy teljesen tünetmentes, HR-sejthalál nélküli rezisztenciával reagálnak (Yu, et al., 1998).

Gassmann és munkatársai (2005) mutatták ki, hogy a bakteriális HR két komponense (rezisztencia és sejthalál) egymástól függetlenül is öröklődhet, mivel eltérő gének határozhatják meg. A *P. syringae* pv. *syringae* 61 baktérium egyes lúdfű (*A. thaliana*) vonalakban képes HR-sejthalál nélküli, tünetmentes rezisztenciát kiváltani. Két rezisztens, de eltérő fenotípusú (tünetmentes rezisztencia, ill. HR) lúdfű vonalat keresztezve tisztázták, hogy a (tünetmentes) rezisztenciát a domináns *RPS6* gén, míg a sejthalált a recesszív *hed1* lókuszt határozza meg, a két gén egyidejű működése pedig HR-t (rezisztencia és sejthalál) eredményez (Gassmann et al., 2005; Kim et al., 2009).

Tünetmentes és HR-rezisztencia vírusfertőzéseknel

A növényi vírusfertőzésekre adott HR-típusú rezisztenciánál is elválasztható a HR-t alkotó rezisztencia és a sejthalál, élettani és genetikai szempontból egyaránt. Régóta ismert, hogy dohány (*Nicotiana*) fajoknak a TMV-vel szembeni, *N* gén által meghatározott rezisztenciájánál a HR-típusú léziókhöz közeli élő sejtekben is detektálhatók virionok akkor is, amikor a nekrotikus lézió növekedése már leállt. Mindez arra utal, hogy a rezisztencia és a sejthalál ebben a vírus által indukált HR-ben is elválasztható, mivel a növény más-más részében nyilvánul meg (Da Graça és Martin, 1976; Wright et al., 2000). Ugyanakkor, habár az elhalt növényi sejtekben egy obligát biotróf kórokozó (vírus) nem tud replikálódni, elképzelhető az is, hogy az elhalt sejtek által beindított egyes jelátviteli folyamatok (ionáramlások, reaktív oxigénszármazékok, programozott sejthalál, szalicilsav-termelés) révén a kórokozó legalább részlegesen gátlódik (Lamb és Dixon, 1997). Hatsugai et al. (2004, 2015) kimutatták, hogy az *N* gén által meghatározott, TMV-vel szembeni HR-nél a vakuólum kollapszus (membrán-károsodás) által beindított programozott sejthalálhoz (PCD) szükséges egy speciális enzim (*Vacuolar Processing Enzyme, VPE*) működése: a VPE hiánya csökkentette a HR-nekrotizációt, viszont a TMV mennyisége nőtt. Ezek szerint a PCD bizonyos típusai szerepet játszanak a vírus gátlásban.

A növényi antioxidáns kapacitás fokozásával járó kezelések általában jelentősen csökkentik a vírusfertőzésre adott HR-típusú léziók számát és/vagy méretét, de a rezisztencia nem változik vagy csak kis mértékben nő. Úgy tűnik, hogy az antioxidánsok függetlenül hatnak a HR-en belüli sejthalálra és rezisztenciára. TMV-vel fertőzött

dohányban ezt a jelenséget magyar kutatók már több évtizede kimutatták, amikor a növényeket glutationnal vagy aszkorbinsavval, ill. citokininnel kezelték (Farkas et al., 1960; Balázs et al., 1976). Későbbi kutatások szerint citokinin túltermelő és fokozott antioxidáns kapacitású dohányban a dohány nekrozis vírus (*Tobacco necrosis virus*, TNV) által kiváltott HR-típusú sejthalál jelentősen visszaszorul, de a vírus titer csak kis mértékben csökken (Pogány et al., 2004). Hasonló eredmény, hogy TMV-dohány kapcsolatban indukált HR-típusú rezisztenciánál egy antioxidáns, a glutation (GSH) szintjének kismértékű növelése (S)-karvon (egy monoterpén vegyület) előkezeléssel szintén csökkentette a HR-léziók számát és méretét, de a vírusszint változatlan maradt (Gullner et al., 1999). Ugyanakkor az OTC (L-2-oxo-4-tiazolidin-karboxilsav, egy GSH prekursor) előkezelés jelentősen növelte a növény GSH tartalmát, ami viszont már nemcsak a HR-léziók számát, hanem a TMV felhalmozódását is nagymértékben csökkentette (Gullner et al., 1999). Ez utóbbi eredmény arra utal, hogy a GSH nemcsak antioxidáns, hanem a betegség rezisztenciát is fokozhatja és ez a két hatás egymástól függetlenül érvényesül – ezt azóta már több növény-kórokozó kapcsolatban is kimutatták (Han et al., 2013; Kovács et al., 2015; Ghanta et al., 2011, 2014; Künstler et al., 2019; Zechmann, 2020).

A fentiek alapján a növényi antioxidáns kapacitás fokozása csökkenti a HR-tüneteket, de a kórokozó rezisztencia alapvetően nem változik. Az viszont még nagyrészt tisztázásra szorul, hogy a növényi védekező rendszer más elemeinek (pl. szalicilsav-tartalom, védekezési /*PR*/ gének) fokozott indukciója mennyire hat eltérően a vírusfertőzés által kiváltott HR-t alkotó rezisztenciára és lokális nekrozisra, azaz a HR-típusú nekrozis visszaszorulása megbízhatóan jelezheti-e a fokozott rezisztenciát? Ismert, hogy egyes növényi vírus rezisztencia gének fokozott expressziója a HR-típusú vírusrezisztenciát erősíti, mivel kisebb, ill. hamarabb megjelenő nekrotikus léziók („mikro-HR”) vagy tünetmentes (extrém) rezisztencia alakul ki (ennek tárgyalását ld. fent) (Bendahmane et al., 2000; Cooley et al., 2000; Sekine et al., 2008). Feltételezhető, hogy ilyenkor az adott rezisztencia gén hatékonyabb működése miatt a növényi védekező rendszer egyes elemei is gyorsabban indukálódnak.

A vírusfertőzésekre adott HR két komponense (rezisztencia és sejthalál) genetikailag is szétválasztható, ezt a lúdfű (*A. thaliana*) *dnd1* (*defence no death*) mutánsának (tárgyalását ld. fentebb) segítségével sikerült igazolni (Takahashi et al., 2012). Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) ellen ható *RCY* rezisztencia gént hordozó *dnd1* mutáns növényekben a HR-sejthalál visszaszorult, de a rezisztencia továbbra is ugyanúgy működött, mint a vad típusban. Ezek szerint a HR-típusú sejthalál nem játszik kritikus szerepet az *RCY* gén által irányított, CMV-vel szembeni rezisztenciában.

Egy másik kutatócsoport azt is bizonyította, hogy a vírus-indukált HR két összetevője (rezisztencia és sejthalál) egymástól részben függetlenül is öröklődhet, mivel részben eltérő gének határozhatják meg (Kachroo et al., 2000). Kimutatták, hogy a tarlórépa göndörödés vírussal (*Turnip crinkle virus*, TCV) fertőzött lúdfűben (*A. thaliana*) a HR-típusú rezisztenciáért egy dominánsan öröklődő gén, a *HRT* (*HR to TCV*) felelős, de csak részben, mivel a rezisztenciát egy másik, recesszív gén (*rrt*) is szabályozza. Eredményeik szerint tehát az *Arabidopsis*-TCV interakcióban kialakuló HR során a rezisztenciát két külön gén (*HRT* és *rrt*), míg a sejthalált csak az egyik gén (*HRT*)

szabályozza (Kachroo et al., 2000). A vírus-indukált HR-t alkotó rezisztencia és sejthalál teljesen független, eltérő gének által meghatározott, öröklődését azonban ebben az időszakban (1998-2000) még nem igazolták.

A növényi betegség rezisztencia fontosabb biokémiai faktorai

A növények többféle élettani-biokémiai mechanizmuson alapuló stratégiákkal védekeznek a kórokozók támadása ellen. A teljesség igénye nélkül ilyen védekezési stratégiák pl. az ún. patogenezissel kapcsolatos (PR) fehérjék és glutation-S-transzferáz enzimek, ill. kódoló génjeik indukciója, a sejtfal megerősítése (papilla képződés), lokalizált sejt- és szövetelhalás (hiperszenzitív reakció, HR), egy növényi hormon, a szalicilsav termelése, és mindezekkel összefüggően a reaktív oxigén származékok (ROS) felhalmozódása (Jones és Dangl 2006; Torres, 2010; Spoel és Dong 2012; Lehmann et al., 2015; Andersen et al., 2018; Mittler et al., 2022).

Patogenezissel kapcsolatos fehérjék

A szalicilsav (SA) által indukált növényi védekezésnél az SA aktiválja az ún. *Nonexpressor of PR Genes 1 (NPR1)* fehérjét, ill. géneket: az NPR1 oligomer fehérje a diszulfid hidak redukciója nyomán monomerekké esik szét, az NPR1 monomerek pedig a sejtmagba jutnak, ahol interakcióba lépnek a TGA transzkripciós faktorokkal (Mou et al., 2003; Tada et al., 2008). Ezen folyamatok hatására indukálódik az ún. patogenezissel kapcsolatos (*Pathogenesis-related, PR*) gének transzkripciója, ill. a PR fehérjék termelődése, amelyek a kórokozók gátlásában is szerepet játszhatnak, ill. a rezisztencia kialakulásának markerei (Mou et al., 2003; Spoel és Dong, 2012; Breen et al., 2017).

A PR fehérjék általában nem halmozódnak fel egészséges növényekben. A PR fehérjék termelődését (a PR gének indukcióját) kórokozó fertőzés vagy abiotikus stressz indukálhatja (Van Loon et al., 2006). Ugyanakkor a PR fehérjék/gének korai, erős aktiválódása főleg az inkompatibilis növény-kórokozó kapcsolatok (a rezisztencia) jellemzője (Bell et al., 1986; Van Loon et al., 2006). Érdekes, hogy kompatibilis kapcsolatokban (fogékonyságnál) főleg a patogenezis késői szakaszában észlelhető PR indukció, amikor a fertőzés előrehaladtával a növény már jól látható, súlyosabb tüneti károsodásokat mutat (Reiss és Bryngelsson 1996; Manandhar et al., 1999; Schultheiss et al., 2003; Yeom et al., 2011). Mindezek alapján a PR fehérjék szerepet játszhatnak a betegség elleni rezisztencia kialakításában, de ehhez a megfelelő időben és helyen történő felhalmozódásuk szükséges.

A PR fehérjék indukcióját először dohány mozaik vírussal (TMV) fertőzött növényben mutatták ki (Van Loon és Van Kammen, 1970; Gianinazzi et al., 1970). Későbbi kutatások azonban a PR géneket konstitutívan kifejező transzgenikus dohányok vizsgálatával egyértelműen igazolták, hogy legalább három PR génnek, ill. fehérjének nincs tényleges szerepe a vírusfertőzésekkel szembeni ellenálló képességben (Cutt et al.,

1989; Linthorst et al., 1989). A *PR-10* gén esetén viszont tényleges összefüggés mutatható ki a kórokozó (vírus és gomba) rezisztenciával, a *PR-10* gének ugyanis ribonukleáz kódolnak, amelynek közvetlen szerepe lehet a TMV-vel szembeni védekezésben, mivel paprikában képes a vírus genomi RNS lebontására (Park et al., 2004). A *PR-10* ribonukleáz aktivitásával, ill. a citokinin felhalmozódás serkentésével hozták összefüggésbe a paprikában és dohányban nekrotróf kórokozó gombákkal szembeni fokozott rezisztenciát is (Soh et al., 2012; Agarwal et al., 2016). Ugyanakkor a β -1,3-glukanázt kódoló *PR* gének (*PR-2* csoport) által kódolt néhány fehérje – a fertőzés meglététől függetlenül – a vírusok sejtről-sejtre terjedését elősegítő plazmodezmákhoz kötődik, és ott a kallóz lebontásával nem a rezisztenciát, hanem a vírussal szembeni fogékonyságot segíti elő (ld. pl. Zavaliev et al., 2013).

A *PR* fehérjék szerepe a növényi betegség rezisztenciában a baktériumos fertőzéseknél sem egyértelmű. A *PR-13* fehérje antimikrobiális hatást fejt ki a *P. syringae* pv. *tomato*-val fertőzött *Nicotiana attenuata* növényekben, azonban egy másik *PR* fehérje, a *PR-1* nem mutat antimikrobiális aktivitást, csak a rezisztenciát jelzi (Rayapuram et al., 2008). Egy kitinázt kódoló dohány *PR-3* gén (*NtPR-Q*) túltermeltetése viszont növelte a *Ralstonia solanacearum*-mal szembeni rezisztenciát (Tang et al., 2017). A *PR* fehérjék közül a kitinázoknak a rezisztenciában játszott szerepére már az 1990-es években rámutattak: egy bab kitinázt expresszáló dohány a szokásosnál jobban ellenállt egy nekrotróf gomba, a *Rhizoctonia solani* fertőzésének (Brogue et al., 1991). Ezek szerint a nagy mennyiségben termelt kitináz hatékonyan bonthatja a gombák és baktériumok sejtfalában levő kitint. Későbbi eredmények igazolták, hogy gomba és oomicéta kórokozók (*Phytophthora infestans*, *Uromyces fabae*, *R. solani*) fertőzésénél a rezisztenciában közvetlen szerepe lehet a növényi *PR-1* és *PR-5* fehérjéknek is, amelyek a kórokozó hifa növekedését és differenciálódását gátolják (Vigers et al., 1992; Rauscher et al., 1999; Liu et al., 2011). Újabb kutatások szerint a *PR-1* fehérje többféle módon is képes a kórokozó gátlásra: a gombák sejtfalában levő szterolokat megköti, ill. védekezési szignál peptidként működhet, ennek megfelelően több kórokozó effektorainak célfehérjéje is lehet (ld. Breen et al., 2017).

Érdekes, hogy néhány *PR* fehérje olyan enzimaktivitást mutat, amely alapján a kórokozókra kifejtett gátló hatásuk közvetlenül összefügg a növényi ROS felhalmozódásával. A *PR-9* fehérjéje dohányban egy ligninképző peroxidázként működik, amely kórokozó fertőzéseknél a megtámadott növényi sejtekben valószínűleg részt vesz a papilla képzéshez szükséges H_2O_2 termelésében (Lagrimini et al., 1987). Ugyanakkor az árpa *PR-15* és *PR-16* fehérjék oxalát-oxidáz, ill. oxalát-oxidáz-szerű (szuperoxid-dizmutáz) enzimaktivitása H_2O_2 -t halmoz fel a liztharmattal (*B. graminis* f. sp. *hordei*) szemben rezisztens növényekben (Zhang et al., 1995; Wei et al., 1998).

A fentiek alapján a növények *PR* fehérjéi – sokoldalú biokémiai-életteni hatásaik révén – egyes gazda-kórokozó kapcsolatokban közvetlenül hozzájárulhatnak a rezisztenciához, a patogenezis előrehaladott fázisában viszont fogékonysági faktorokként is hathatnak, és a betegség tünetekkel, ill. a kórokozó felhalmozódásával együtt járó stressz markerei lehetnek.

Glutation, glutation-S-transzferázok

A glutation (GSH, γ -L-glutamil-L-ciszteinil-glicin) a növényekben legnagyobb koncentrációban előforduló nem-fehérje tiolvegyület, amely antioxidáns hatása révén fontos szerepet játszik a ROS eliminálásában abiotikus és biotikus stresszek során egyaránt (Noctor et al., 2012; Hasanuzzaman et al., 2017, 2019). Régóta ismert pl., hogy egy oxidatív stresszt generáló herbicidre, a paraquatra toleráns dohány (*N. tabacum* cv. Samsun) biotípus, amely fokozottan ellenáll többféle abiotikus és biotikus stressznek is, nagy mennyiségű GSH-t halmoz fel pl. herbicid kezelésre, ugyanakkor vírus (TNV) fertőzésre a szokásosnál kisebb mértékű HR nekrozissal és emelt szintű glutation-S-transzferáz (GST) aktivitással reagál (Barna et al., 1993; Gullner et al., 1991, 1995). Növényekben a GST izoenzimek általában méregtelenítő reakciókban vesznek részt, egyes toxikus elektrofil vegyületek és a GSH közötti konjugációt katalizálva (Wagner et al., 2002; Dixon és Edwards, 2009; Dixon et al., 2011). Egyes ún. theta és tau osztályú növényi GST-k viszont glutation-peroxidáz (GPX), tehát antioxidáns aktivitást mutatnak, mivel képesek a lipid peroxidáció termékeinek (pl. az elhaló sejtekben felhalmozódó lipid hidroperoxidok) lebontására (Bartling et al., 1993; Dixon és Edwards, 2009; Dixon et al., 2009). Ennek megfelelően a GST-k és a GSH meghatározó szerepet játszhat a HR-típusú rezisztenciában a lokális sejt/szövethalál szabályozásában. Elsőként Fodor és munkatársai (1997) mutatták ki, hogy a TMV által dohányban kiváltott HR-típusú rezisztenciánál a lokális nekrotikus léziók megjelenését követően a GSH mennyisége valamint a GST és más antioxidáns enzimek (glutation-reduktáz, GR és APX) aktivitása jelentősen megnő. A TMV által dohányban indukált HR-nél kimutatták theta és tau osztályú növényi GST gének (*NtGSTU1*, *NtGSTT2*) fokozott expresszióját is (pl. Künstler et al., 2007b; Juhász és Gullner, 2014).

A GSH-nak, ill. az általa szabályozott enzimaktivitásoknak azonban nemcsak a HR-típusú nekrozis mérséklésében, de a kórokozó (pl. vírus) rezisztenciában is szerepe lehet. TMV-re fogékony dohányban a normál kénellátottság által – a kénhiányos állapothoz képest – biztosított rezisztencia (késve jelentkező mozaikos tünetek, csökkent vírusszint) együtt járt az emelt cisztein (GSH prekursora) és GSH szintekkel valamint a cisztein és GSH bioszintézisében részt vevő két gén (*NtAPR*, *NtGSH1*) indukciójával (Höller et al., 2010). A *GSH1* és a glutation szintézist irányító másik gén (*GSH2*) csendesítése *N. benthamiana*-ban ugyanakkor nemcsak a GSH felhalmozódását gátolta, hanem PVX és TMV fertőzésnél a vírus replikációját fokozta (azaz a vírus rezisztenciát is gátolta) (De et al., 2018; Zhu et al., 2021). A GSH tartalom és a betegség rezisztencia közötti összefüggést nemcsak növény-vírus kapcsolatokban, de más kórokozók (baktériumok, gombák) esetén is kimutatták (Vanacker et al., 1998; Großkinsky et al., 2012; Zechmann 2020). A növény GSH tartalmának növelése a legalább 1-2 nappal a fertőzés előtt történő külső kezelésekkel vagy transzgenikus úton egyaránt fokozta a vírusos-, baktériumos- és gombás fertőzésekkel szembeni rezisztenciát (Gullner et al., 1999; Ghanta et al., 2011, 2014; Künstler et al., 2019, 2020). Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy a növényben már a fertőzés kezdet előtt – időben – megnövelt GSH szint kulcsfontosságú lehet a sikeres rezisztencia kialakításában.

Korábbi kutatások szerint viszont a kórokozó (TMV) fertőzés előtt nem 1-2 nappal, hanem csak közvetlenül előtte (injektálással) megnövelt növényi GSH szint ugyan csökkenti a HR-típusú nekrotikus léziók számát, de számottevő vírus rezisztenciát nem okoz (Farkas et al., 1960). Ezek szerint a GSH a kórokozó fertőzés körül vagy az után már elsősorban antioxidánsként hat, mivel a gazdanövényben a rezisztenciát a fertőzést megelőzően tudja hatékonyan indukálni (ld. Gullner et al., 1999; Ghanta et al., 2011, 2014; Künstler et al., 2019, 2020). A GSH antioxidáns hatása a patogenezis előrehaladott szakaszában hozzájárulhat a biotróf kórokozók (pl. lisztharmat- és rozsdagombák) szembeni fogékonysághoz, ezt mutatták ki a saját lisztharmatával (*B. graminis* f. sp. *hordei*), fertőzött árpában, ahol a fogékony növényekben a fertőzés után viszonylag későn (5-7 nappal) sokkal erőteljesebben nőtt a GSH koncentrációja és a GST és más antioxidáns enzimek (SOD, APX, GR) aktivitása, mint a rezisztens növényekben (El-Zahaby et al., 1995; Harrach et al., 2008). A GSH (és GST aktivitás) antioxidáns hatása egy növény kórokozó vírus replikációját közvetlenül is elősegítheti: *N. benthamiana*-ban a bambusz mozaik vírus (*Bamboo mosaic virus*, BaMV) fertőzésekor az *NbGSTU4* gén aktív működése szükséges a vírus felhalmozódásához és az *in vitro* BaMV replikációs komplexhez hozzáadott GSH fokozza a negatív polaritású (-) vírus RNS szintézisét, feltehetően azért, mert az NbGSTU4 fehérje a GSH jelenlétében kapcsolódik a BaMV RNS 3' végéhez (Chen et al., 2013).

Összefoglalva elmondható, hogy növényekben a GSH (ill. az általa szabályozott enzimaktivitások) jelenléte a fertőzés előtt (korai időzítés) rezisztenciát indukálhat, míg a patogenezis előrehaladott fázisában (késői időzítés) már inkább a GSH antioxidáns hatása érvényesül.

Szalicilsav

A szalicilsav (2-hidroxi-benzoésav, SA) egy kulcsfontosságú szabályozó növényi hormon, amely részt vesz többek között az abiotikus stresszekkel szembeni tolerancia biztosításában (Horváth et al., 2007; Liu et al., 2022), de a kórokozó rezisztencia kialakításában is (pl. szerzett rezisztencia, ld. korábban), elsősorban a biotróf patogének fertőzésekor (Vlot et al., 2009, 2021). A SA rezisztenciát indukáló hatásáról több évtizede számoltak be először, dohány mozaik vírussal (TMV) fertőzött dohánynál (White, 1979). Kiderült, hogy rezisztens dohányban (*N. tabacum* cv. Xanthi NN) a TMV fertőzés hatására az inokulált levelekben korán és jelentős mértékben felhalmozódik a SA, elsősorban a lokális nekrotikus (HR-típusú) léziókban, ill. azok körül (Malamy et al., 1990; Enyedi et al., 1992). A továbbiakban több kutatás is igazolta a SA szerepét a vírus, gomba és baktérium kórokozók szembeni rezisztenciában (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994; Fodor et al., 1997; Lee et al., 2016; Klessig et al., 2018; Zhang et al., 2019; Vlot et al., 2009, 2021).

Fertőzött növényekben a SA hiánya a rezisztencia elvesztéséhez, ill. fokozott fogékonysághoz vezet. Egy bakteriális szalicilát-hidrozilázt kódoló gént (*nahG*) kifejező transzgenikus növények nem képesek megfelelő mennyiségű SA-t felhalmozni, ami a növényi védekezés és rezisztencia visszaszorulását eredményezi (Gaffney et al., 1993;

Delaney et al., 1994; Künstler et al., 2019, 2020). Hasonló jelenség figyelhető meg olyan növényekben, ahol a SA bioszintézis gátolt (Pallas et al., 1996; Wildermuth et al., 2001).

A növények a SA-t a sejtek vakuólumaiban tárolják, különféle kötött (konjugált) – elsősorban glikozilált – formában, mint pl. a 2-O- β -D-glikozid (SAG) és a szalicilát glükóz-észter (SGE) (Lee és Raskin, 1998, 1999; Song, 2006; Ding és Ding, 2020). Mind az SAG, mind az SGE a szalicilsav inaktív formájának tekinthető, de szabad szalicilsavvá hidrolizálhatók, amely a vakuólumokból a többi sejtalkotóba szállítódik (Yao et al., 2007; Vaca et al., 2017), ezért közvetetten szerepet játszhatnak a növények betegség rezisztenciájában. A SA-glikozidok (elsősorban az SAG) konstitutív túltermelése viszont bizonyos esetekben gátolhatja a kórokozó rezisztenciát (Song et al., 2008; Kobayashi et al., 2020), ami arra utal, hogy a növényi szervezetben alapvető fontosságú a SA szabad és kötött formáinak egyensúlya. A SA a rezisztencia szisztemikus jelátvitelében részt vevő metil szalicilsavvá (MeSA) is átalakulhat (Park et al., 2007). A MeSA-nak létezik glikozilált formája is (MeSAG) (Dean et al., 2003), de a MeSAG túltermelése gátolja a MeSA átalakulását szabad szalicilsavvá és ezáltal a növényi betegség ellenállóságot is. (Chen et al., 2019).

A növények fokozott reaktív oxigén származék (ROS) termelése, ill. felhalmozódása szorosan kapcsolódik a szalicilsav védekezési funkciójával. A SA fokozhatja a H₂O₂ akkumulációt, mivel képes közvetlenül gátolni több H₂O₂-lebontó (antioxidáns) enzim aktivitását is (pl. kataláz, APX, GPX, GST) (Chen et al., 1993; Durner és Klessig, 1995; Manohar et al., 2015). A rezisztencia kialakulása során megemelkedő SA és ROS koncentráció azonban végső soron növeli a növényi antioxidáns kapacitást is (GSH és aszkorbinsav szintézis, GST, GPX és APX aktivitás) (Fodor et al., 1997; Király et al., 2002b; Urbanek Krajnc et al., 2011). Ugyanakkor a ROS (pl. H₂O₂) a SA felhalmozódását váltja ki (Neuenschwander et al., 1995; Leon et al., 1995), amely az ún. *Nonexpressor of PR Genes 1 (NPR1)* géneket/fehérjéket is aktiválja (tárgyalását ld. korábban), ugyanis az NPR1 fehérjék egyben SA receptorok. A folyamat hatására indukálódik az ún. patogenezissel kapcsolatos (PR) és más védekezési gének transzkripciója (Murphy et al., 2020; Chen et al., 2021). A ROS és a SA kölcsönhatásában a glutationnak (GSH) is kiemelt szerepe van, mivel a növényi sejteken belül a H₂O₂ növeli a GSH szintjét, amely a szalicilsav által irányított jelátvitelt aktiválja abiotikus stressznél és a kórokozók elleni védekezésben egyaránt (Ghanta et al., 2011, 2014; Han et al., 2013; Herrera-Vásquez et al., 2015; Künstler et al., 2019). Hangsúlyozandó, hogy nemcsak a GSH hat a szalicilsavra, hanem fordítva is, mivel a SA külső adagolása a GSH felhalmozódását és fokozott vírus (TMV) rezisztenciát is kiválthat (Fodor et al., 1997; Srivastava és Dwivedi, 1998; Mateo et al., 2006).

Ismert, hogy amíg a SA elsősorban a biotróf kórokozók elleni rezisztenciát indukálja, addig egy másik növényi hormon, a jázmonsav (JA) a nekrotrof kórokozók és a sebzések (pl. rovar kártétel) elleni védekezést irányítják (Glazebrook, 2005; Grant és Lamb, 2006; Barna et al., 2012; Carls et al., 2015; Stroud et al., 2022). A szalicilsav részben a PR gének indukálásán keresztül hat a rezisztenciára, a JA viszont más típusú védekezési géneket/fehérjéket aktivál (pl. az ún. defenzinek). A SA és JA kölcsönösen gátolja a másik molekula által indukált jelátviteli, ill. rezisztencia folyamatokat (antagonista hatás). Többek között lúdfű (*A. thaliana*) fertőzése biotróf gombával a SA

jelátvitelt aktiválja, de visszaszorítja a JA által indukált védekezést – feltehetően ezért nő meg a gazdanövény fogékonysága egy nekrotróf kórokozó későbbi fertőzésével szemben (Spoel et al., 2007). Érdekes viszont, hogy a SA és JA által indukált rezisztencia folyamatok közötti kölcsönhatás nemcsak egyszerű antagonizmus. Erre egy jó példa, hogy a nekrotróf *Botrytis cinerea* gomba a SA-jelátvitel aktiválásával képes fogékonyabbá tenni a paradicsomot saját fertőzésével szemben (Abd El Rahman et al., 2012). Egy baktériummal (*P. syringae* pv. *tomato*) fertőzött *A. thaliana*-ban viszont a kórokozó egy a JA hatását utánozó toxin, a koronatin segítségével nyomja el a SA jelátvitelt, így lényegében fogékonyságot indukálva a növényben a saját fertőzésével szemben (Laurie-Berry et al., 2006; Uppalapati et al., 2007; Zheng et al., 2012; Stroud et al., 2022).

Reaktív oxigénszármazékok, antioxidánsok

A növények a különböző környezeti stresszekre (pl. szárazság, magas/alacsony hőmérséklet, kórokozó fertőzés) adott válasza többek között az ún. reaktív oxigénszármazékok (*reactive oxygen species*, ROS) felhalmozódása. Egy bizonyos mértékű állandó ROS termelés az eukarióta (növényi) szervezetekben normálisnak tekinthető (pl. fotoszintézis és légzési lánc elektrontranszportjában), de a növények aktívan is képesek ROS előállítására pl. kórokozók támadása és egyéb (abiotikus) stresszek esetén (ld. pl. Mittler et al., 2022).

ROS-nak tekinthetők a párosítatlan elektronnal rendelkező oxigén szabadgyökök, pl. a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilgyök (OH^{\cdot}), valamint az olyan molekulák, mint a hidrogénperoxid (H_2O_2) és a szinglett oxigén (1O_2), amelyekből további reakcióik során szabad gyökök képződnek. A szuperoxid molekuláris oxigénből keletkezik egyelektronos redukcióval, mérsékelten reakcióképes, rövid életidejű (felezési ideje kb. 1-4 μs) szabadgyök (Mittler, 2017; Poór, 2020). Nem képes a membránokon keresztüli diffúzióra, de protonált formája, a hidroperoxil (perhidroxil) gyök (HO_2^{\cdot}), lipid közegben oldékonyabb. A szuperoxid – és általában a többi ROS is – közvetlenül hidrogénperoxiddá redukálódik, ez lehet spontán (enzimes katalízis nélküli) folyamat, de egy antioxidánsnak tekinthető enzimes csoport, a szuperoxid-dizmutázok (SOD) segítségével is végbe mehet (Elstner, 1982; Halliwell és Gutteridge, 2015). A H_2O_2 az egyik legstabilabb ROS (felezési ideje kb. 1 ms), semleges töltésű, emiatt kevésbé reakcióképes molekula (Halliwell, 2006; Halliwell és Gutteridge, 2015), amely akvaporin fehérjék segítségével a membránokon is képes átjutni (Pastori és Foyer, 2002; Fox et al., 2017). A sejtekben levő H_2O_2 spontán úton vagy egy antioxidáns enzim, a kataláz enzim segítségével vízzé (H_2O) és molekuláris oxigénné (O_2) alakul át (Elstner, 1982; Halliwell, 2006). A H_2O_2 az ún. Fenton reakcióban réz- vagy vas ionokkal (Cu^{2+} , Fe^{2+}) reagálhat, a hidroxilgyök (OH^{\cdot}) keletkezése mellett. Az OH^{\cdot} az egyik leginkább reakcióképes ROS (felezési ideje kb. 1 ns), amely gyakorlatilag a sejtben levő összes molekulával (nukleinsavak, fehérjék, lipidek) reagálhat (Halliwell, 2006; Gill és Tuteja, 2010).

Ha a ROS mennyisége tartósan a növény által tolerálható szint fölé emelkedik, oxidatív stressz alakul ki, amelyet a ROS és a sejt antioxidáns védelmi rendszere közötti egyensúly megszűnése okoz, a ROS koncentrációjának szabályozása ugyanis döntően az

antioxidáns rendszer feladata (Elstner, 1982; Barna et al., 2003a; Foyer és Noctor, 2005; Lehmann et al., 2015). Az antioxidánsok lehetnek enzimek (pl. SOD, kataláz, ld. fent), de nem enzimatis vegyületek is (pl. glutation és aszkorbinsav). A ROS semlegesítésében fontos szerepet játszik az ún. aszkorbát–glutacion ciklus. Az aszkorbinsav oxidált formájából (dehidro aszkorbinsav, DHA) a dehidroaszkorbát-reduktáz (DHAR) katalízisével, a glutationból (GSH) származó elektron felvételével regenerálódik aszkorbinsavvá. Az oxidált glutationt (GSSG) a glutation-reduktáz (GR) redukálja, a folyamatban a redukáló erő végső soron a NADPH-ból származik (Alscher et al., 1997; Gullner és Kőmíves, 2006). Hangsúlyozandó, hogy a sikeres antioxidáns védelemben a redukált aszkorbinsav és glutation megfelelő aránya – és nem a mennyiségük – fontosabb (Noctor és Foyer, 1998).

ROS és a növényi betegség rezisztencia

Az utóbbi közel 40 évben egyre intenzívebben kutatták a ROS, elsősorban a szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) és hidrogén-peroxid (H_2O_2), szerepét az állati (humán) immunitásban és a növényi betegség rezisztenciában, döntően két okból. Egyrészt tisztázódott az állati fagocitózis és a ROS felhalmozódás közötti ok-okozati kapcsolat (Morel et al., 1991; Segal, 2008). Másrészt kiderült, hogy a ROS felhalmozódás tipikus és funkcionális velejárója a növényi betegség rezisztenciának (ld. pl. Baker és Orlandi 1995; Delledonne et al., 2001; Torres et al., 2002; Shang et al., 2010; Torres, 2010; Dubiella et al., 2013; Mittler et al., 2022).

Az 1980-as években Doke (1983a, b) úttörő felfedezése igazolta, hogy a burgonya hiperszenzitív sejthalállal járó rezisztenciája (HR) egy oomicéta kórokozóval (*Phytophthora infestans*) szemben specifikusan együtt jár egy ROS, a szuperoxid felhalmozódásával, amely később hidrogén-peroxiddá alakul. Doke és Ohashi (1988) egy hasonló jelenségre hívták fel a figyelmet a dohányynak egy vírus patogénnel (TMV) szembeni HR-típusú rezisztenciájában. A növények baktériumos fertőzésével szembeni rezisztencia (HR) kialakulásában a ROS (szuperoxid) szerepét elsőként magyar kutatók igazolták (Ádám et al., 1989). Később kiderült, hogy egy másik növény-baktérium kapcsolatban (*A. thaliana* – *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) a H_2O_2 gyors felhalmozódása figyelhető meg (Alvarez et al., 1998).

A fenti eredmények alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a növényekben a ROS nemcsak abiotikus, hanem biotikus stressz (kórokozó fertőzés) során is fokozottan termelődnek és a növényi rezisztencia válaszok kulcsfontosságú komponenseinek számítanak. A ROS (elsősorban H_2O_2) képződés hozzájárul a kórokozó behatolást gátló növényi sejtfal-vastagodások (papillák) kialakulásához úgy, hogy 1/ a sejtfalban levő glikoproteinekben keresztkötéseket hoz létre (Bradley et al., 1992), 2/ a lignin és szuberin polimerek sejtfali bioszintézise során a prekursorokban oxidatív keresztkötéseket indukál (Thordal-Christensen et al., 1997). Emellett a ROS közvetlen antimikrobiális hatást is kifejt (a kórokozókat gátolja), amit *in vitro* és *in planta* is kimutattak (Averyanov és Lapikova, 1988; Peng és Kuć, 1992; Király et al. 1993). Ugyanakkor a ROS részt vesz a védekezési gének aktiválását és más növényi védekezési folyamatokat elősegítő jelátvitelben, pl. transzkripció faktorok szabályozásával redox változásokon keresztül

(Mou et al., 2003; Pandey, és Somssich, 2009) vagy egyéb jelátviteli komponensekkel történő interakciók által, mint pl. foszforilációs kaszkádok (Kovtun et al., 2000; Dubiella et al., 2013) és a szalicilsav (Chen et al., 1993; Torres et al., 2006; Herrera-Vásquez et al., 2015). A ROS hozzájárulhat olyan fitoalexinek és más növényi másodlagos anyagcsere termékek szintéziséhez is, amelyek szerepet játszhatnak a kórokozó gátlásban (Lamb and Dixon 1997; Thoma et al. 2003). Végül, de nem utolsósorban a ROS felhalmozódása szorosan összefügg a hiperszenzitív (lokális sejthalállal kísért) betegség rezisztenciával (HR) (Doke 1983a, b; Doke és Ohashi 1988; Ádám et al. 1989; Levine et al. 1994; Alvarez et al. 1998; Lukan et al., 2020). A HR nemcsak a kórokozó gátláshoz járulhat hozzá, hanem további lokális és szisztémikus védekezési válaszokat is indukálhat (*priming*, LAR és SAR, tárgyalásukat ld. korábban).

A ROS (és antioxidánsok) növényi kórfolyamatban játszott szerepe alapvetően különbözhet az ún. biotróf és nekrotrof kórokozók fertőzésekor. A biotróf kórokozóknak (gombák: pl. lisztharmatok, peronoszpórák, rozsdák, valamint a vírusok és fitoplazmák) élő növényi sejtekre van szükségük, hogy a gazdaszervezet tápanyagait felhasználhassák. Biotróf kórokozók fertőzésekor a fogékony gazdanövény antioxidáns kapacitása fokozott mértékű (pl. SOD és aszorbát-peroxidáz aktivitás, glutation, aszorbinsav termelés), így jelentősen csökken a ROS-felhalmozódás és ezért feltehetően a kórokozó gátlása is (El-Zahaby et al., 1995; Vanacker et al., 1998; Mittler et al., 1998; Harrach et al., 2008). Ezzel szemben a nekrotrof kórokozók (pl. *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Alternaria brassicicola*), többek között toxinjaik és sejtfalbontó enzimeik segítségével, ROS termelést – és csökkenő antioxidáns kapacitást – indukálnak, ezáltal a növényi sejteket roncsolják, hogy hozzájussanak a szükséges tápanyagokhoz (Govrin és Levine, 2000; Able, 2003; Barna et al., 2012; Harrach et al., 2013; Spanu és Panstruga, 2017; Kámán-Tóth et al., 2019). Mindezek ellenére a nekrotrof (és hemibiotrof) patogének is érzékenyek a ROS gátló hatására. Ennek oka feltehetően az, hogy egyrészt – a hemibiotrófokhoz hasonlóan – a nekrotrof gombák patogenezisében is van egy kezdeti, igen rövid, biotróf szakasz, amikor a kórokozó saját effektorai segítségével gátolja a gazdanövény ROS termelését (Rajarammohan, 2021; Veselova et al., 2021), másrészt a nekrotrof fázisba való átmenetkor a kórokozó már a saját antioxidáns aktivitását fokozhatja, de emellett a növényi antioxidánsokat gátolja (Blackman és Hardham, 2008).

NADPH-oxidázok ROS termelése: hatás a növényi betegség rezisztenciára

Eukarióta (növényi és állati) szervezetekben a ROS termelésért elsősorban a plazma membránhoz kötött NADPH-oxidáz enzimek felelősek. A NADPH-oxidázok leginkább stresszek és kórokozók hatására aktiválódnak, az általuk közvetlenül generált ROS, a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$), a kórokozó elölésében/limitálásában és a (növényi) betegségezisztencia jelátvitelében is szerepet játszik. Közel 40 éve egy japán kutatócsoport (Doke, 1985; Doke és Miura, 1995) *P. infestans*-szal fertőzött rezisztens burgonyagumók plazmamembrán frakciójában, növényekben elsőként igazolta egy NADPH-függő és szuperoxid-generáló enzim működését. Növényekben a NADPH-oxidáz enzimeket, ill. a kódoló géneket az emlősök fagocitáiban működő, ún. *respiratory burst* („légzési robbanás”) folyamatában (a kórokozók eliminálásában) részt vevő NADPH-oxidáz alegységgel (gp91phox) való hasonlóság alapján fedezték fel (Groom et al., 1996; Keller et al., 1998; Torres et al.,

1998). Ezek alapján a NADPH-oxidáz gének/fehérjék általánosan használt rövidített neve az RBOH.

Növény-kórokozó kapcsolatokban a NADPH-oxidázok működése szorosan összefügg a sejtmembránhoz kötött ROS (szuperoxid és a belőle képződő H_2O_2) termelésével (Suzuki et al., 2011; Marino et al., 2012; Hu et al., 2020). *Nicotiana benthamiana*-ban két RBOH gén (*NbRBOHA* és *NbRBOHB*) csendesítése a ROS felhalmozódás csökkenéséhez és a *P. infestans*-szal szembeni rezisztencia elvesztéséhez vezetett (Yoshioka et al., 2003). Kimutatták azt is, hogy *Alternaria brassicicola*-val fertőzött lúdfüben (*A. thaliana*) az *AtRBOHD* gén, ill. enzimfehérje a gomba által károsított növényi sejtekben elhalást (ROS felhalmozódást) okoz, míg a szomszédos sejtekben gátolja az elhalást (Pogány et al., 2009). Biotróf kórokozók (pl. lisztharmatok) esetében a NADPH-oxidáz (*RBOH*) gének működésének hiánya fokozza a növény fogékonyságát, ezt több gazdanövénynél is kimutatták, többek között lúdfű/*Golovinomyces cichoracearum* (Berrocal-Lobo et al., 2010) és árpa/*Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Proels et al. 2010; Pereira Torres et al., 2017) gazda-kórokozó kapcsolatban. Ezek szerint növényekben a NADPH-oxidáz függő ROS termelés ténylegesen szerepet játszhat a biotróf kórokozók gátlásában, amelyhez hozzájárulhat a növényi lokális sejt/szöveti elhalás (HR), ill. a megtámadott gazdasejtek papilla képzése (sejtfal-vastagodások) (Király et al. 1993; El-Zahaby et al., 2004; Proels et al. 2010). Nekrotróf kórokozók fertőzésénél viszont a növényi NADPH-oxidáz gének mutációja gyakran fokozza a rezisztenciát, ez figyelhető meg pl. *A. brassicicola*-val fertőzött lúdfüben és *Botrytis cinerea*-val fertőzött *N. benthamiana*-ban (Asai és Yoshioka, 2009; Pogány et al., 2009). A NADPH-oxidázok által termelt ROS feltehetően segíti a növény nekrotrófok általi kolonizációját, a megtámadott gazdasejtek elhalásának elősegítésével (Govrin és Levine, 2000; Barna et al., 2012).

ROS felhalmozódás, jól időzítve – hatékonyabb, tünetmentes rezisztencia?

A ROS-nak a növény-kórokozó kölcsönhatásokban alapvetően kettős szerepe van: 1/ nagy koncentrációban növényi sejthalált okozhat, de a kórokozókat is előlheti/limitálja, erős toxicitása miatt (Halliwell és Gutteridge, 2015), 2/ alacsonyabb koncentrációban a fertőzési helyekkel szomszédos egészséges sejtekben jelátvivőként indukálja a védekezési válaszokat, többek között az antioxidánsok és a patogenezissel kapcsolatos (PR) gének/fehérjék aktiválásával (Levine et al., 1994; Dat et al., 2000; Pogány et al., 2009; Torres et al., 2005, 2006).

ROS (H_2O_2) túltermelő transzgenikus növények baktériumos és gombás fertőzésekre is rezisztenciát mutatnak. Egy gomba glükóz-oxidáz gént kifejező, konstitutívan H_2O_2 -t termelő transzgenikus dohány-, burgonya- és káposztanövények rezisztenssé váltak különféle növénykórokozó baktériumokkal (pl. *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*) szemben, elsősorban a baktériumok hatékony gátlása és/vagy előlése miatt (Chamngpol et al., 1998; Wu et al., 1995; Lee et al., 2002). Más, H_2O_2 -t termelésért felelős gének (pl. *GLP-1*, *oxalát-oxidáz*) kifejeztetése lúdfüben (*A. thaliana*) rezisztenciát eredményezett gyökér kórokozó gombákkal (*Verticillium longisporum*, *Rhizoctonia solani*)

szemben (Knecht et al., 2010), ill. paradicsomban a *Botrytis cinerea* fertőzésére (Walz et al., 2008).

A fentiek alapján a (transzgenikus) gazdanövény által már a fertőzés kezdetén, időben termelt ROS-nak (pl. H_2O_2) meghatározó szerepe lehet a patogének gátlásában, ill. előlésében. Ezt először Jordan és munkatársai (1992) igazolták, amikor kimutatták, hogy egy szuperoxidot generáló ágenssel (riboflavin és metionin) előkezelt burgonya levelekben jelentősen visszaszorulnak a *P. infestans* fertőzés által okozott betegség tünetek. Későbbi eredmények szerint liztharmatra (*B. graminis* f. sp. *hordei* A6) fogékony árpában (*Mlo* genotípus) rezisztencia indukálható, ha a növényeket 50 mM H_2O_2 -dal vagy ROS-képző ágensekkel kezelik (Hafez és Király, 2003). Ha a ROS-kezelés az inokuláció után korán (1 nappal) történt, tünetmentes rezisztencia alakult ki, míg HR-típusú lokális léziók (sejt/szövethalál) jelentek meg, ha a ROS-kezelés az inokuláció után később (3 nappal) történt. Érdekes, hogy a liztharmattal szemben HR-típusú rezisztenciát mutató árpa (*Mla12* genotípus) a korai ROS-kezelésre szintén tünetmentes rezisztenciát adott, míg a késői ROS-kezelésre fokozott HR-nekrózissal reagált (a HR-léziók nagyobb számban jelentek meg). Hasonló jelenséget (tünetmentes rezisztencia indukálása korai ROS-kezelésre, és HR megjelenése későbbi ROS-kezelésre) tapasztaltak egyéb gomba- és baktérium kórokozók fertőzött árpában és más növényekben is (El-Zahaby et al., 2004).

A fertőzött növény jól időzített (korai) ROS termelésének szerepe a hatékony (gyors és tünetmentes) rezisztencia kialakításában vírusfertőzések esetében is valószínűsíthető. Évtizedek óta ismert, hogy a ROS, elsősorban a szuperoxid és a belőle képződő H_2O_2 , viszonylag korai (az inokuláció után 6-10 órával észlelhető) felhalmozódásának meghatározó szerepe van a növényi vírusokkal (TMV) szembeni HR-típusú rezisztenciában (Doke és Ohashi, 1988; Rossetti és Bonatti, 2001). A ROS patogén-limitáló hatásai fokozottan érvényesülhetnek vírusos fertőzéseknel, hiszen ezek a biotrófnak tekinthető kórokozók a gazdasejtek intracelluláris terébe jutnak be, ahol a citoplazmával és a sejtalkotókkal (pl. kloroplasztisz, mitokondrium) közvetlenül érintkeznek. Ennek megfelelően a fertőzött növény antivirális védekezési válaszai nagymértékben támaszkodnak a sejten belüli, ROS-termeléssel kapcsolatos biokémiai folyamatokra (Hernández et al., 2016; Künstler et al., 2016; Kuźniak és Kopczeński, 2020). Kompatibilis (fogékonyságot eredményező) vírusfertőzések gátolhatják a kloroplasztiszokban a II. fotokémiai rendszer (PSII) oxigéntermelő komplexének fehérjéit (PsbO, PsbP és PsbQ), ezáltal a ROS termelést is csökkenthetik (Rahoutei et al. 2000; Abbink et al., 2002; Lehto et al. 2003; Perez-Bueno et al. 2004; Di Carli et al. 2010; Manfre et al., 2011; Balasubramaniam et al., 2014; Kong et al. 2014; Bobik és Burch-Smith, 2015). Mindez azt mutatja, hogy egy vírus által megtámadott növényi sejten belül – többek között a kloroplasztiszokban végbemenő – korai ROS termelés meghatározó lehet a sikeres rezisztencia kialakulásában.

Növényekben a vírus rezisztencia sok esetben a HR-re jellemző sejt/szövethalál nélkül is hatékony lehet, ilyen az ún. extrém rezisztencia (ER), amely nemcsak tünetmentes, hanem a kórokozó replikációját/terjedését is szinte teljes mértékben gátolja (tárgyalását ld. korábban). Az ER a tünetes (HR-típusú) vírus rezisztenciánál gyorsabban alakul ki, azaz a kórokozó gátlása az ER-nél hamarabb történik, mint a HR-nél (Bendahmane et al., 1999; Cooley et al., 2000; Sekine et al., 2008). Ennek egyik oka a

ROS (a szuperoxid és a belőle képződő H_2O_2) korai felhalmozódása lehet, ahogyan ezt Bendahmane és munkatársai (1999) már több, mint 20 éve feltételezték. Azóta ismertté vált, hogy a H_2O_2 az *Rx1* gén által meghatározott, PVX elleni ER-nek egy lehetséges komponense – a PVX effektorát (köpenyfehérje) rezisztens növényekbe juttatva az *Rx1* aktiválását („ER”) követő 1-2 órán belül megnőtt a H_2O_2 szintje (Knip et al., 2019). Mindezek ellenére továbbra is tisztázatlan maradt, hogy vírusfertőzéseknél a ROS felhalmozódás megfelelő időzítésének van-e tényleges szerepe abban, hogy a rezisztencia korábban (tünetmentesen) vagy később (HR-típusú sejthalállal együtt) alakul ki?

Ha a korai ROS felhalmozódás a növényi betegség rezisztencia meghatározó tényezője, akkor a patogenezis előrehaladott szakaszában észlelhető, gyakran intenzív ROS termelés feltehetően azt tükrözi, hogy a gazdanövény későn, de már sikertelenül próbálkozik a rezisztenciát indukálni. Egy hemibiotróf gombával, a *Bipolaris sorokiniana*-val fertőzött, fogékony árpadában a nekrotikus foltok körüli egészséges sejtek kloroplasztiszaiban nagy mennyiségű szuperoxid detektálható (Schäfer et al., 2004). Ugyanakkor a szilvahimlő vírusra (*Plum pox virus*, PPV) fogékony kajsziabarack fajták szisztémikusan fertőzött leveleinek apoplasztjában nagymértékben felhalmozódik a H_2O_2 (Díaz-Vivancos et al., 2006; Hernández et al., 2006). A PPV-vel fertőzött, erősen klorózisos levelekben tapasztalható szisztémikus „ H_2O_2 robbanás” is arra utalhat, hogy a gazdanövény későn és sikertelenül próbálja a szisztémikus szövetekben a rezisztenciát indukálni. Feltehetően ehhez hasonló folyamat játszódik le CMV-vel szisztémikusan fertőzött dohányban is, ahol a mozaikos levelek vírusmentes, ún. zöld szigeteiben nagy mennyiségű szuperoxid akkumulálódik (Shang et al., 2010).

A fentiek alapján nyilvánvalónak tűnik, hogy a ROS felhalmozódás megfelelő – korai – időzítése a növényi betegség rezisztencia (egyik) meghatározó tényezője lehet. Ennek megfelelően a fertőzött növény még a patogenezis késői szakaszában is megpróbálja a kórokozót gátolni olyan folyamatok segítségével, amelyek ROS felhalmozódással járnak.

ROS hullámok és a növényi betegség rezisztencia átvitele oltással

Növényekben a fokozott ROS termelés, ill. felhalmozódás nemcsak a fertőzés helyén (lokálisan) játszik szerepet a rezisztencia (pl. HR) indukálásában. Maga a HR-típusú rezisztencia az egyik fő kiváltója a szisztémikus szerzett rezisztenciának (SAR, tárgyalását ld. korábban) (Chen et al., 1993; Gaffney et al., 1993; Vlot et al., 2009). A ROS, a szalicilsavval (SA) együtt viszont meghatározó szerepet játszik a SAR kialakításában, egymás hatását kölcsönösen erősítve (ROS-SA; SA-ROS) (Durrant and Dong 2004; Vlot et al., 2021). Ugyanakkor a ROS közvetlen szerepét a szisztémikus jelátvitelben pl. a SAR során sokáig kérdésesnek tartották, két okból: 1/ a ROS érzékenyek az antioxidánsokra, 2/ a ROS rövid életidejűek és *in planta* terjedésük is erősen korlátozott ($O_2^{\cdot-}$: 30 nm; H_2O_2 : 1 μ m; OH^{\cdot} : 1 nm) (Mittler, 2017; Poór, 2020).

Újabb kutatások szerint a növényi szöveteket érő abiotikus stressz (erős fény, hő, hideg, só- és mechanikai stressz) fokozott, lokális ROS termelést vált ki és egyben egy szisztémikus, autopropagatív, ROS felhalmozódási hullámot indukál, amely a stressznek kitett szövetből a növény távoli részeire akár 8,5 cm/perc sebességgel terjedhet át (Miller et

al., 2009; Mittler et al. 2011, 2022; Gilroy et al. 2014; Fichman és Mittler, 2021). Ez a NADPH-oxidáz (RBOHD) függő ROS hullám voltaképpen nem a ROS diffúzióját jelenti, hanem a szomszédos sejtekben a „ROS érzékelés, termelés, transzport” állapot tovaterjedését (Mittler et al., 2022): minden sejt aktiválja a saját RBOHD enzimjét, a képződő szuperoxidból az apoplasztban keletkező H₂O₂ eljut a következő sejtig, amelyben azt a megfelelő receptor érzékeli, és a folyamat kezdődik előlről.

Az autopropagatív, szisztemikus ROS hullámok feltehetően a növényi betegség rezisztencia kiváltása során is működnek, ezt már régebbi kutatási eredmények is valószínűsítik. Burgonyagumók kezelése kórokozó elicitorral a távoli, kezeletlen szövetben ROS felhalmozódást indukált (Park et al., 1998). Ha dohány és lúdfű (*A. thaliana*) leveleket rezisztenciát indukáló vírus vagy baktérium patogénnel fertőzték, a felső levelekben a ROS koncentráció megemelkedését egysejtes elhalások („mikro-HR”) kialakulása követte, ami a SAR kialakulásának szükséges feltétele (Alvarez et al., 1998; Fodor et al., 2001). Egy későbbi kutatás már egy baktérium rezisztencia kialakításához szükséges ROS hullám működéséről számol be (Dubiella et al., 2013), ahol a növény PAMP vagy ROS kezelésével aktiválnak egy kalcium-függő kinázt (CPK5), amely az RBOHD fehérjét *in vivo* is aktiválja (foszforilálja). Ez a jelátvitel (ROS hullám) végül a távolabbi szövetekben is fokozott ROS szintézishez és a *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 baktériummal szembeni rezisztenciához vezetett (Dubiella et al., 2013).

A kertészeti oltással átvihető növényi betegségrezisztenciával kapcsolatban az elmúlt évtizedekben sokféle eredmény született, de ezek a munkák leginkább a talajban, a gyökérzetet károsító betegségek elleni védekezésről számolnak be (Wutscher, 1979; King et al., 2008; Mudge et al., 2009; Louws et al., 2010; Al-Mawaali et al., 2012). Újabb kutatások szerint viszont az oltással átvitt rezisztencia a leveleket károsító gombás, baktériumos és vírusos betegségekkel szemben is hatásos lehet. Oltással sikerült rezisztenciát elérni a ráoltott („nemes”) növényi részben pl. dinnyében és uborkában liztharmat (*Podospaera xanthii*) és peronoszpóra (*Pseudoperonospora cubensis*) ellen (Sakata et al., 2006; Louws et al., 2010; Kousik et al., 2018) valamint újabban kávéban (*Coffea arabica*) a kávérozsdával (*Hemileia vastatrix*) szemben is (Couttolenc-Brenis et al., 2021). Hasonlóan sikeres volt a rezisztencia oltással történő átvitele a növény (oltvány) föld feletti részébe vírusos és baktériumos betegségeknel is (Vulić et al., 2013; Zhao és Song, 2014; Chen et al., 2020; Manickam et al., 2021).

A fent említett eredmények olyan, oltással átvihető jelátviteli molekulák működésére utalnak, amelyek a ráoltott növényi részben betegségrezisztenciát indukálhatnak. A jelenség lehetséges biokémiai/genetikai mechanizmusa azonban még részben ismeretlen, ugyanis jelenleg nem ismerünk olyan védekezési folyamatot, amely az oltással átvihető betegség rezisztencia minden esetéért felelős lehet. Egyes vírusfertőzéseknel igazolták, ill. valószínűsíthető a vírus eredetű kis interferáló RNS-ek (siRNS) jelátviteli szerepe (Zhao és Song, 2014; Spanò et al., 2017; Chen et al., 2020). Más adatok szerint a növényi betegségek elleni védekezésben fontos szerepet játszó fenilalanin-ammónia-liáz enzim szubsztrátjainak (növényi fenolvegyületek) koncentrációja nem feltétlenül korrelál az oltással átvitt betegségrezisztenciával (Guan és Zhao, 2012; Wallis et al., 2013), de egyes védekezési – pl. PR és sebzéssel, ill. oxidatív stresszel kapcsolatos – gének expressziója viszont igen (Spanò et al., 2020; Couttolenc-Brenis et

al., 2021). Oltott zöldségekben és dinnyében az abiotikus stresszekkel szembeni fokozott ellenálló képesség nagyobb antioxidáns enzimaktivitásokkal és szalicilsav felhalmozással járhat együtt, mint a saját gyökerű növényekben (He et al. 2009; Wei et al. 2009; Guan és Zhao 2012; Shu et al., 2016; Cheng et al., 2021). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a ROS – felhalmozódás, ill. az alanyból a ráoltott növényi részbe terjedő ROS hullámok is hozzájárulhatnak az oltott növények fokozott stressz tűréséhez, ill. betegség ellenállóságához. A megfelelően időzített, korai ROS akkumuláció, ill. ROS hullámok szerepe az oltással átvihető (tünetmentes) növényi betegség rezisztenciában azonban saját kutatásaink kezdetéig (2013-14) még nem tisztázódott.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felhasznált növények, növénynevelés és kezelések, kórokozók és kimutatásuk

Felhasznált növények, a növénynevelés körülményei

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

Az *N. edwardsonii* (n = 34) egy olyan amfidiploid (allotetraploid) fajhibrid, amelyet az *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), amely a teljes kromoszóma garnitúrát tartalmazza (Cole et al., 2001). A szintézis menete a következő volt: *N. glutinosa* (♀) és *N. clevelandii* (♂) keresztezéséből kapott F₁ növények virágait a termékenység helyreállítása (kromoszómaszám megduplázása) érdekében kolhicinnel kezeltük. A kolhicines kezelés Gland (1981) módszere alapján történt, kis változtatással: kolhicines oldattal (0,05% kolhicin, 5% etanol, 0,5% dimetil-szulfoxid) átitatott vattadugókat helyeztünk a fiatal virágbimbókra, a kezelést 24 óra múlva megismételtük majd 2 nap múlva befejeztük. Az egyik kolhicinnel kezelt F₁ növényen 2 virág lett termékeny, az ezekből származó magokból 5 db F₂ egyedet neveltünk fel, amelyek habitusa egységes volt. Az F₂ növényeket öntermékenyítve a kapott F₃ generáció, és a többi nemzedékek is, termékenyek voltak, az F₂ generációéhoz hasonló egységes habitussal. Az *N. edwardsonii* var. Columbia (♀) növényeket kereszteztük az *N. clevelandii*-vel (♂) is, a reciprok keresztezés hasonló habitusú F₁ és F₂ generációt eredményezett. A fent említett *Nicotiana* gazdanövények és hibridjeik magját vetés előtt, a dormancia megtörése (jobb kelés) érdekében 15-20 percig 2 %-os nátrium-hipoklorit oldatban áztattuk, Burk (1957) leírása szerint.

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. A cv. Samsun NN-t Bernd Zechmann (University of Graz, Ausztria) jóvoltából használhattuk. 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 (Deák et al., 1999). Az SR1 dohány vonalakat Dudits Dénes (SzBK, Szeged) bocsájtotta rendelkezésünkre. A cv. Samsun NN Rx1 dohányokat (ld. fent) (♀) kereszteztük a két ferritin túltermelő dohánnyal (cv. SR1 C8 és F9) valamint a vad típusú SR1 vonallal (♂), a reciprok keresztezések hasonló habitusú F₁ generációkat eredményeztek. A kapott F₁ növényekben a megfelelő 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 fajtáját használtuk (cv. Hópehely és cv. White Lady), amelyek Magyarországon kereskedelmi forgalomban beszerezhetők.

A szőlő (*Vitis vinifera*) két fajtáját használtuk (cv. Nimrang és cv. Kishmish vatkana), ezeket Kozma Páltól (Pécsi Tudományegyetem) kaptuk.

Az általunk használt étkezési paprika (*Capsicum annuum* cv. Totál) és cseresznyepaprika fajta (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme* cv. Szentesi) Magyarországon kereskedelmi forgalomban beszerezhetők. A paprikák egymásra oltása 8 hetes korban történt úgy, hogy az alany és nemes növényeket sziklevél fölött 45 fokos szögben borotvapenge segítségével elvágtuk, majd az egyszerű párosítás elvét követve a cv. Szentesi cseresznyepaprika gyökér részét (sziklevéllel) és a cv. Totál növény sziklevél fölötti részét egy oltó klipsz segítségével egymásba helyeztük. Az oltványokban két hetes akklimatizálást (25 °C, 90% relatív páratartalom) követően az oltási eredés kb. 65%-os volt (ld. Albert et al., 2017).

Az árpa (*Hordeum vulgare*) Ingrid fajtájának vad típusát (*Mlo* genotípus) és két, közel izogén vonalát (*Mla12* és *mlo5* genotípus) Ralph Hückelhoven (Technical University of Munich, Németország) bocsájtotta rendelkezésünkre. A közel izogén árpa vonalak előállítását korábban leírták (ld. Harrach et al., 2008 és a benne további hivatkozásokat).

Az általunk használt cv. Botond árpa valamint két búzafajta (*Triticum aestivum* cv. Buzogány és cv. MV-Emma) Magyarországon kereskedelmi forgalomban beszerezhetők.

A felhasznált kétszikű növényeket üvegházi körülmények között neveltük (18-23 °C, 16 órás fotoperiódus, 160 μmol m⁻² s⁻¹ kiegészítő világítással, 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 rozsda miatt elsősorban növénynevelő kamrákban (Panasonic MLR-352) neveltük 20-25 napig, ahol a növények 23 °C/20 °C nappali/éjszakai hőmérsékleten, 16 órás fotoperiódus szerint nőttek, 110 μmol m⁻² s⁻¹ fényintenzitás és 50-70% relatív páratartalom mellett.

A növények kezelése (szulfátos tápoldat, hőstressz, ROS-képző ágensek, antioxidánsok)

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 (a fent leírt körülmények között növénynevelő kamrában tartottuk). Az egyik csoport növény szulfát tartalmú (+S), míg a másik csoport 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 CaCl_2) tartalmazott (ld. Höller et al., 2010 és 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 (Panasonic MLR-352), 16 órás fotoperiódus, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás és 50-70% relatív páratartalom mellett.

Az árpa (*H. vulgare*) cv. Ingrid közel izogén vonalait (Mlo /vadtípus/, Mla12 és mlo5) egy rövid hő-előkezelésnek (hő-sokk) vetettük alá, Barna et al. (2014) leírása szerint: 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_2O_2) történő „immunizálásához” a növényeket a vírus (TMV) inokuláció előtt 1 nappal csapvízzel, ill. 5, 7, 10 és 12,5 mM H_2O_2 -al permeteztük (ld. 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 és 2 mM glükóz, 3/ 25 mM H_2O_2 (ld. Király et al., 2008).

A PVX fertőzésre használt fogékony dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun NN) a rezisztencia kialakításához az inokulált levelek egyik felét a vírusfertőzés után 2 órával szuperoxidot (O_2^-) képző ágenssel (66 μM riboflavin, 10 mM L-metionin), a másik levélfelet pufferrel (10 mM kálium-foszfát, pH=7,8) infiltráltuk, injekciós tű és fecskendő segítségével (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, injekciós tű és fecskendő segítségével, kontrollként csapvizet kezelést használtunk (ld. Hafez et al., 2012).

A PVX fertőzésre használt extrém rezisztens dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) a fogékonyság kialakításához 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 /vad típus/, 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 tű és fecskendő segítségével, Hafez és Király (2003) leírása szerint.

Felhasznált kórokozók, a kórokozók kimutatása

Felhasznált kórokozók

A karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 és D4 törzsét amerikai kutatási partnerünktől (James Schoelz, University of Missouri, USA) kaptuk. A CaMV-t tarlórépában (*Brassica rapa* var. *rapa*) tartottuk fenn, az inokulumot a korábban leírtak szerint készítettük (Schoelz et al., 1986; Király et al., 1999). 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. Az *N. edwardsonii*-t és *N. edwardsonii* var. Columbia-t szintén 50-55 napos korban fertőztük két másik vírussal, TMV-vel és TNV-vel is. TNV-vel történő inokulációhoz az *N. tabacum* cv. Samsun nn inokulált leveleit használtuk (ld. lent).

A dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) U1 törzse valamint a dohány nekrosis vírus (*Tobacco necrosis virus*, TNV) DEH törzse (Bacsó et al., 2016) az ATK NÖVI törzsgyűjteményéből származott. A burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) Ny izolátumát (Ahmadvand et al., 2012) Polgár Zsolt (MATE Georgikon Campus, Keszthely) bocsájtotta rendelkezésünkre. A vírusokat fogékony dohány növényeken tartottuk fenn (TMV és TNV: *N. tabacum* cv. Samsun nn, PVX: *N. tabacum* cv. Xanthi NN) a fentebb ismertetett üvegházi körülmények között. A kísérletekhez használt *N. tabacum* gazdanövényeket (cv. Xanthi NN, cv. Samsun nn, cv. Samsun NN, cv. Samsun NN Rx1) 60-70 napos korban fertőztük TMV-vel, ill. PVX-szel. A vírus inokulációhoz a fertőzött fogékony növények felső leveleit mozsárban, csapvízben, abrazívum (karborundum) hozzáadásával dörzsöltük el (kb. 1 g levél/10 ml csapvíz) és az így nyert inokulummal mechanikai úton (levelek bedörzsölése) fertőztünk. A kontroll („mock”) inokulálást karborundumos csapvízzel végeztük.

A kísérleteinkben használt árpa lisztharmat (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) rasszt (A6) Ralph Hückelhoven (Technical University of Munich, Németország) jóvoltából használhattuk. A búzarozsda (*Puccinia trititica*, 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 (ld. fent). A szőlő lisztharmat fenntartását üvegházi körülmények között (ld. fenn) végeztük a

fogékony Nimrang szőlő (*V. vinifera*) fajtán. A *P. infestans*-t szelektív borsótáptalajon (PBA, ld. Küntler et al., 2018) tartottuk fenn, 20 °C-os hőmérsékleten.

A paprika lisztharmatot (*Leveillula taurica*) egy dél-alföldi (Szentés) fóliasátorból izoláltuk és fogékony paprika gazdanövényen (cv. Totál) tartottuk fenn, növénynevelő kamrában (ld. fent). A lisztharmattal történő inokulációt a Zheng és munkatársai által (2013a, b) leírtak szerint végeztük, kivéve, hogy a paprika levelekre a lisztharmat-szuszenziót (25.000 konídium/ml) egy finom ecsettel vittük fel.

Kórokozók kimutatása

A CaMV virionok jelenlétét, ill. a vírus koncentrációját ELISA módszerrel (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Clark és Adams 1977) mutattuk ki a CaMV W260 törzsre generált antitestekkel, a korábban leírtak szerint (Anderson et al., 1991), míg a TMV és TNV ELISA-val történő kimutatásához Clark és Adams (1977) és Tóbiás et al. (1982) módszerét használtuk. A levélmintákat 0,8% Tween 20-at, 0,2% polivinil-pirrolidont (PVP) és 0,2% marha szérum albumint (BSA) tartalmazó 50 mM-os PBS (Na- és K-foszfáttal pufferelt NaCl) oldatban (pH=7,4) homogenizáltuk, és 1:10, 1:20 és 1:50 arányban hígítottuk. A TMV detektálásához Bioreba (Reinach, Svájc), míg a TNV kimutatásához Loewe (Sauerlach, Németország) gyártmányú egységcsomagot (kitet) használtunk, TMV U1, ill. TNV-E szerotípusra generált valamint alkalikus-foszfáttal konjugált IgG antitestekkel. Az abszorbancia értékeket az ELISA leolvasóról 405 nm-en, 10, 20, ill. 30 perccel a szubsztráttal (p-nitrofenil foszfát) történő inkubáció után olvastuk le.

A vírusfertőzések (TNV, TMV, PVX) szemikvantitatív, ill. kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) módszerrel történő kimutatása a „Növényi génextpressziós vizsgálatok” részben (ld. alább) leírtak szerint történt, mindegyik vírus esetén a köpenyfehérjét (*coat protein*, CP) kódoló gén szekvenciájára tervezett oligonukleotid primerek (indító szekvenciák) segítségével (**0-1. táblázat**).

A paprika lisztharmat kórokozó (*Leveillula taurica*) kimutatásához a fertőzött és egészséges (kontroll) növényekből teljes növényi DNS-t vontunk ki. A folyékony nitrogénben lefagyasztott leveleket mozsárban eldörzsöltük, majd szilikagél membrán oszlopos módszerrel izoláltuk a DNS-t (REDEExtract-N-AmpTM Plant PCR Kit, Sigma Aldrich, Németország). A kivont 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 (**0-1. táblázat**), azaz a lisztharmat gomba *LtLV* DNS mennyiségét ehhez a génhez, mint referenciához hasonlítottuk (ld. Silvar et al., 2008; Zheng et al., 2013b; Albert et al., 2017). A kvantitatív PCR-t a reagenst gyártó (KAPA 2x SYBR FAST Universal qPCR Kit, KAPA Biosystems, USA) útmutatása szerint végeztük, a paprika lisztharmat gomba DNS mennyiségi különbségeinek számszerűsítéséhez az ún. komparatív C_T (2^{-ΔΔCT}) módszert alkalmaztuk (Livak és Schmittgen, 2001; Schmittgen és Livak, 2008) (ld. alább a „Növényi génextpressziós vizsgálatok” részt).

Növényi génexpressziós vizsgálatok

A növényi védekezéssel kapcsolatos 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. A folyékony nitrogénben lefagyasztott leveleket mozsárban eldörzsöltük, majd az eldörzsölt szövetből (100 mg/minta) szilikagél membrán oszlopos módszerrel (Plant Total RNA Extraction Miniprep System, Viogene BioTek, Tajvan, ill. paprikánál SV Total kit, Promega, USA) vontuk ki az RNS-t, az egységcsomagokhoz mellékelt útmutatásoknak megfelelően. A növényi RNS izolálás után a kapott RNS oldatot először DNázzal (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, USA) kezeltük majd mennyiségét és tisztaságát formaldehid-agaróz gél elektroforézissel és spektrofotométeren (260 és 280 nm-en) is ellenőriztük.

A génkifejeződés vizsgálatához, ill. vírus kimutatáshoz ezután valamennyi növényi RNS mintában reverz transzkripciót (RT, azaz cDNS szintézis) végeztünk, mintánként 1 µg RNS oldat felhasználásával. Az RT reakciókat a RevertAid™ H⁻ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével végeztük, a gyártó útmutatásának megfelelően, egy oligo-dT primer, ill. – vírus kimutatásnál – oligo-dT és a vírus köpenyfehérje génekre (*TNV-CP*, *TMV-CP* és *PVX-CP*) specifikus reverz primerek felhasználásával. Az RT során negatív kontrollként egy növényi RNS-t tartalmazó, de reverz transzkriptázt nem tartalmazó mintát alkalmaztunk.

A génkifejeződés vizsgálatához, ill. vírus kimutatáshoz a szemikvantitatív PCR-t (*Nicotiana* spp.) a felhasznált egységcsomagot 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, azaz minden vizsgált génnél olyan, külön-külön beállított ciklusszámmal dolgoztunk, ahol még megmaradtak a különbségek a különböző átíródási szintek között. Az RT-PCR-t követően a génexpressziós különbségek kimutatásához a mintákat 1%-os 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 hígított (20x) templát cDNS-t használva (ld. Künstler et al., 2019). A qPCR-hez a gyártó ajánlásai alapján 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) specifikitását 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 egy-egy aktin referencia génhez (*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 az ún. komparatív C_T (2^{-ΔΔCT}) módszert

alkalmaztuk (Livak és Schmittgen, 2001; Schmittgen és Livak, 2008), mivel az általunk vizsgált géneknél használt primerek hatékonysága 97-100 % volt.

A génekifejződés vizsgálatához, ill. vírus kimutatáshoz a szemikvantitatív PCR és qPCR során használt oligonukleotid primerek (indító szekvenciák) listáját ld. a mellékelt táblázatban (**0-1. táblázat**). A primer szekvenciákat a Primer Premier 5 számítógépes program segítségével terveztük, kivéve az alábbi gének esetén: *NtAOX1-2* (Chivasa et al., 1997), *NtGSTPhi* (Juhász és Gullner, 2014), *StRx1* (Ahmadvand et al., 2012), *HvUbi* (Proels et al., 2010), *CaPR-1*, *CaPR-2* (Silvar et al., 2008), *CaMlo1* és *CaMlo2* (Zheng et al., 2013a).

0-1. táblázat: A növényi génexpressziós vizsgálatokban és kórokozó kimutatáshoz felhasznált oligonukleotid indító szekvenciák (primerek)

Gén neve	Génbanki azonosító	Primer szekvencia (5'- 3')	PCR termék hossza ^a
TNV ^b köpenyfehérje (<i>TNV-CP</i>)	U62546 KX085229	CTTCTGGGCTTAGTTTCC CCTGCGTTCTTGTCGTA	351
TMV ^c köpenyfehérje (<i>TMV-CP</i>)	AJ429078	CTTGTCATCAGCGTGGGC AAGTCACTGTCAGGGAAC	165
PVX ^d köpenyfehérje (<i>PVX-CP</i>)	X88784	GGCATCAGCAGAGCTAGACTG CGGGGATCCTCGAGAAGCTTTTTTTTT	467
<i>N. tabacum</i> ^e aktin (<i>NtAct</i>)	X69885	CGGAATCCACGAGACTACATA GGGAAGCCAAGATAGAGC	230
<i>N. glutinosa</i> ^f patogenezissel kapcsolatos 1 (<i>NgPR-1</i>)	U49241	ACTTGGGACGACGAGGTA GCACAATGATTTGAGCC	197
<i>N. tabacum</i> patogenezissel kapcsolatos 1a (<i>NtPR-1a</i>)	D90196	GCAGATTGTAACCTCGTA CAATTAGTATGGACTTTTCG	297
<i>N. tabacum</i> patogenezissel kapcsolatos 1b (<i>NtPR-1b</i>)	X03465	CAGGGAAGTGGCGATTTTATG AGACCACTGGACTTTTTACAGAT	400
<i>N. tabacum</i> patogenezissel kapcsolatos 1c (<i>NtPR-1c</i>)	X12487	GGATGCCATAACACAGC TTTTTCCCCATAATCAAGAGC	568
<i>N. tabacum</i> patogenezissel kapcsolatos B-1b (<i>NtPRB-1b</i>)	X66942	GGGATACTCCACAACATTAG CACATACATATACACACC	744
<i>N. tabacum</i> Phi glutation S-transzferáz (<i>NtGSTphi</i>)	AY206005	CTGGKGAWCACAAGAAGC GCCAARATATCAGCACACC	490
<i>N. tabacum</i> Tau1 glutation S-transzferáz (<i>NtGSTTau1</i>)	AY206006	GATGGCAGAAGTGAAGTTG X56263 CTCCTAGCCAAAATSCCA	487
<i>N. tabacum</i> BAX inhibitor-1 (<i>NtBI-1</i>)	AF390556	GCGACACCTCTGTATGAA ATGAAAGAAGACCTCCAA	223
<i>N. tabacum</i> alternatív oxidáz (<i>NtAOX1-2</i>)	S71335 X79768	GAAACAGTGGCTGCAGTGCC GTGATACCCAATTGGTGC	516
<i>N. tabacum</i> kataláz (<i>NtCat1</i>)	U93244	TCCGCTTGATGTGACTAAA TCCACCCACCGACGAATA	501
<i>N. tabacum</i> szalicilsav-kötő kataláz (<i>NtCATSAB</i>)	U03473	GCCATATTGTCCCTGGTCTTT GTATCTTTCTCCTGCCTGCTT	326
<i>N. tabacum</i> szuperoxid-dizmutáz (<i>NtSOD</i>)	X55974 EU123521	GCCGTCCTTAGCAGCAGT ACAAGCAACCCTTCCACC	420
<i>N. tabacum</i> aszkorbát-peroxidáz (<i>NtAPX</i>)	U15933 D85912	CTGATGTTCCCTTTCACCCTG CACTCCCAACTCTTCCTCCT	451
<i>N. tabacum</i> NADPH-oxidáz (<i>NtRBOHD</i>)	AJ309006 AF506374	AACCACAGGGCTACAAAT GAGCAGAACGAGCATCAC	681
burgonya <i>Rx1</i> (<i>StRx1</i>)	AJ011801	GGAGAAATCCTGCAATATAAT CGACCGAACTTACATTTTCCC	974

lucerna ferritin (<i>MsFer</i>)	X97059	ATTCGTGGTGGAAGAGTG TTATTATGGCTCCAAGTC	477
árpa ubiquitin (<i>HvUbi</i>)	M60175	ACCCTCGCGACTACAACAT CAGTAGTGGCGGTCGAAGTG	240
árpa szuperoxid- dizmutáz (<i>HvSOD1</i>)	KU179438	TCAAGGGCACCATCTTCTTC	214
árpa BAX inhibitor-1 (<i>HvBI-1</i>)	CK566184	TTTCCGAGGTCACCAGCAT	
	AJ290421	ATGTTCTCGGTGCCAGTCT GGGCGTGCTTGATGTAGTC	409
paprika lisztharmat ITS (<i>LtLV</i>)	MF327258	AGCCGACTAGGCTTGGTCTT GCGGGTATCCCTACCTGATT	208
paprika aktin (<i>CaAct</i>)	AY572427	ATCCCTCCACCTCTTCACTCTC GCCTTAACCATTCTGTTCATTATC	128
paprika patogenezissel kapcsolatos 1 (<i>CaPR-1</i>)	AF053343	GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT CAAGCAATTATTTAAACGATCCA	301
paprika patogenezissel kapcsolatos 2 (<i>CaPR-2</i>)	AF227953	ACAGGCACATCTTCACTTACC CGAGCAAAGGCGAATTTATCC	226
paprika Mlo1 (<i>CaMlo1</i>)	AY934528	CAAACATCATTCAAATCCAGCAACACCA AATTTGATGCATATGGGACGGCGAAGAC	235
paprika Mlo2 (<i>CaMlo2</i>)	JN896629	CTGGCACAATACAGCGAAAA TTCATTAGCCAGCCTTCAT	199

^a PCR termék hossza bázispárban

^b TNV = dohány nekrozis vírus (*Tobacco necrosis virus*)

^c TMV = dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*)

^d PVX = burgonya X vírus (*Potato virus X*)

^e *Nicotiana tabacum*

^f *Nicotiana glutinosa*

degenerált bázisok kódjai: K = G vagy T; R = A vagy G; S = C vagy G; W = A vagy T

Növényi biokémiai vizsgálatok

Szalicilsav mérés

A *N. edwardsonii* és *N. edwardsonii* var. Columbia növények szabad és kötött szalicilsav (SA) tartalmát egy 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, belső standardként orto-anizinsavat (o-ANI) alkalmaztunk. Mintánként 1 g levélszövetet folyékony nitrogénben és kvarchomokban, mozsárban eldörzsöltünk, az eldörzsölt szövetet 70 %-os metanolban extraháltuk. A kötött SA-t 4 M sósavban (HCl) hidrolizáltuk. Az extrakció további lépéseit a korábban leírtak szerint (Cole et al., 2004; Pál et al., 2005) végeztük el. A HPLC mérés kezdete előtt a bepárolt mintákat 1 ml HPLC indító mobil fázisban (15% acetonitril, 25 mM KH₂PO₄ pH 2,6 pufferben) oldottuk vissza. A mintákban az SA mennyiségét fluorimetriával határoztuk meg (gerjesztés 305 nm-en, emisszió 407 nm-en).

NADPH-oxidáz enzimaktivitás mérése

A NADPH-oxidáz enzim aktivitásának mérését a korábban leírtak szerint (Ádám et al., 1997 és Xia et al., 2009) végeztük, néhány módosítással. Dohány és paprika mintáknál a kivonáshoz (0,5 g levélszövethez) nyolcszoros térfogatú extrakciós puffert (50 mM Tris-HCL, pH 7,5, 0,25 M szaharóz, 1 mM Na₂S₂O₅, 1 mM EDTA, 0,6% PVP) használtunk. Árpánál az extrakciós puffer (0,5 g levélszövethez) négyszeres térfogatú volt és az 1 mM Na₂S₂O₅ helyett 1 mM aszkorbinsavat és 1 mM PMSF-et (fenil-metil szulfonil-fluorid) tartalmazott. 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). Az ultracentrifugáláskor kapott csapadékot (pellet) 0,5 ml extrakciós pufferben reszuszpendáltuk, ezt az oldatot használtuk a NADPH-oxidáz enzimaktivitás méréshez: a fotometria során a reakcióelegybe (100 mM HEPES pH 6,8, 0,2 mM NADPH, 0,3 mM NBT) 50 µl szuszpendált csapadékot adtunk. 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).

Antioxidáns enzimaktivitások (kataláz, gvajakol-peroxidáz, aszkorbát-peroxidáz)

Az antioxidáns enzimaktivitások (kataláz, gvajakol-peroxidáz, aszkorbát-peroxidáz) detektálásához (ld. Hafez et al., 2012) 0,5 g dohány mintát (TMV- és „mock”-inokulált levelekből) 4°C-on homogenizáltunk, 3 ml extrakciós pufferben (1 mM EDTA-Na₂ és 7.5% polyvinil-pirrolidon /PVP/, 50 mM TRIS pufferben /pH 7,8/). 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 (H₂O₂) 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.

Glutation mérés, glutation-reduktáz és glutation-S-transzferáz enzimaktivitás

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; ld. még Király et al., 2021). 0,5 g növényi mintát 2 ml, 6 %-os metafoszforsavban homogenizáltunk. Centrifugálást (20 perc, 12 000 rpm, 4 °C) követően 100-100 µl felülúszót használtunk a teljes (GSSG+GSH), ill. oxidált (GSSG) glutation mennyiségi meghatározására, miután a pH-t 5,5-6,5 közé állítottuk be, 1,5 M trietanolamin segítségével. 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 az antioxidáns (CAT, POX, APX) enzimaktivitás méréseknél ismertetett módon (ld. fent). 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).

ROS (szuperoxid és hidrogén-peroxid) felhalmozódás kimutatása

A szuperoxid (O_2^-) szövetfestéssel történő kimutatását vírussal (TMV, PVX) fertőzött dohány-, ill. lizstarmattal fertőzött árpa- és paprika levelekben végeztük, 10 mM kálium-foszfát pufferben (pH=7,8) oldott 0,1% nitroblue-tetrazolium-kloriddal (NBT), Ádám et al. (1989) módszere szerint. Az NBT-vel vákuum-infiltrált mintákat 15 percig megvilágítottuk majd 2 napra színtelenítő oldatba (0,15% triklórecetsav, etanol és kloroform 4:1 arányú elegyében) helyeztük (Hückelhoven és Kogel, 1998). Ezt követően a levélmintákat 50% glicerinben tároltuk, majd fóliára kiterítve beszkeneltük. Az NBT szövetfestés mennyiségi értékelését (NBT-vel festett levélfelület %) a nyilvánosan hozzáférhető ImageJ számítógépes program (<https://imagej.nih.gov/ij>) segítségével végeztük.

A hidrogén-peroxid (H_2O_2) szövetfestéssel történő kimutatását vírussal (TMV) fertőzött dohánylevelekben végeztük, desztillált vízben oldott 0,1% 3,3-diaminobenzidinnel (DAB), Thordal-Christensen et al. (1997) módszere szerint. A DAB-bal vákuum-infiltrált mintákat 2 óráig megvilágítottuk, a minták színtelenítése és vizuális, ill. mennyiségi értékelése a szuperoxid kimutatásnál leírtak szerint (ld. fent) történt.

Növényi sejthalál kimutatása

Paprika levelek szövetében az elhalt sejteket laktofenolos Tripán kék-festés segítségével detektáltuk, Pogány et al. (2009) módszere alapján. A festéshez használt törzsoldatot (10 g fenol, 10 ml glicerin, 10 ml tejsav, 10 ml desztillált víz és 0,02 g Tripánkék) 96%-os etanolban 1:2 arányban hígítottuk, majd a levélmintákat a hígított festékben 1 percig főztük, 4 napig inkubáltuk és telített klorál-hidrát [$Cl_3CCH(OH)_2$] oldatban (1 kg klorál-hidrát / 400 ml desztillált víz) színtelenítettük.

Statisztika

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 vírusfertőzésekkel szembeni hiperszenzitív reakcióban (HR) a rezisztencia és a nekrozis (sejt/szövethalál) egymástól függetlenül öröklődhet

A növények vírusfertőzésekkel szembeni rezisztenciája sokszor az ún. hiperszenzitív reakcióban (HR) nyilvánul meg, amikor a vírus lokalizálása a gazdában sejt-, ill. szövethalállal (nekrotikus léziók) jár együtt. A vírusrezisztencia azonban számos esetben sejt/szövethalál nélkül is hatékony (pl. az ún. extrém rezisztencia, Bendahmane et al., 1999; Hajimorad et al., 2001). Egyes vírus-gazdanövény kapcsolatokban más-más védekezési gének felelősek a HR-típusú nekrozisért, ill. a vírusreplikáció gátlásáért (ld. Komatsu et al., 2010) és egyes rezisztencia gének különböző alléljai HR-t, ill. tünetmentes rezisztenciát határozhatnak meg (Bendahmane et al., 2000).

Mindezek alapján feltételezhető, hogy – bizonyos esetekben – a vírusfertőzésekre kifejlődő HR-t alkotó rezisztencia és sejt/szövethalál genetikailag eltérő eredetű és függetlenül öröklődő tulajdonságok. Ezt próbáltuk bizonyítani *Nicotiana edwardsonii*-ban a karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által kiváltott HR esetén.

A karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által *Nicotiana edwardsonii*-ban kiváltott hiperszenzitív reakció: a HR-t alkotó rezisztencia és nekrozis eltérő genetikai eredete

A *N. edwardsonii* ($n = 34$) egy olyan amfidiploid (allotetraploid) fajhibrid, amelyet a *N. glutinosa* ($n = 12$) és *N. clevelandii* ($n = 24$) keresztezéséből hozták létre (Christie, 1969; Christie és Hall 1979). A CaMV W260 fertőzésére a *N. edwardsonii* az inokuláció után kb. 8-10 nappal lokális nekrotikus léziókat (HR) ad (**1. ábra**), de a vírusfertőzés nem terjed át a növény többi részébe, ami a szisztémikus terjedést gátló valódi rezisztenciára utal (**1. táblázat**). Érdekes, hogy a *N. edwardsonii* két szülő faja közül egyik sem ad HR-típusú rezisztenciát a CaMV W260 fertőzésére. A *N. clevelandii* a CaMV W260-ra lokális nekrotikus léziókkal (HR) és szisztémikus nekrozissal reagál (**1. ábra**), és korábban kimutattuk, hogy ezt a tulajdonságot (sejt/szövethalál, nekrozis) a *ccd1* (CaMV cell death) gén határozza meg (Király et al., 1999; Cawly et al., 2005). A *N. glutinosa* a CaMV W260-ra rezisztensnek bizonyult, a vírusfertőzés nem terjed át a növény többi részébe (**1. táblázat**), de az inokulált leveleken nekrotikus (HR) léziók helyett klorotikus léziók

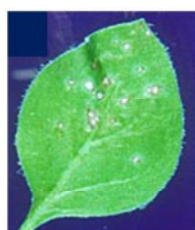
fejlődnek ki (**1. ábra**). A *N. edwardsonii* két szülőjének a CaMV W260-ra adott reakciója alapján feltételezhető, hogy ebben a fajhibridben a CaMV W260-nal szembeni HR-típusú rezisztenciát két független tulajdonság (gén) határozza meg: a rezisztencia a *N. glutinosa*-ból, míg az azt kísérő nekrozis a *N. clevelandii*-ből származik (**1. ábra**).



lokális klorotikus léziók,
rezisztens
N. glutinosa / CaMV W260



Lokális **nekrotikus léziók (HR)** szisztemikus nekrozis
X
N. clevelandii / CaMV W260



Lokális **nekrotikus léziók (HR)**,
rezisztens
N. edwardsonii / CaMV W260

1. ábra: A karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által kiváltott rezisztencia és nekrozis (sejt/szövethalál) öröklődése a *Nicotiana glutinosa* és *N. clevelandii* keresztezéséből létrehozott *N. edwardsonii* fajhibridben (Christie, 1969). Feltételezhető, hogy a *N. edwardsonii*-nak a CaMV W260-ra adott, hiperszenzitív reakcióval (lokális nekrotikus léziók, HR) járó rezisztenciáját két független tulajdonság határozza meg: a rezisztencia a *N. glutinosa*-ból, míg a nekrozis a *N. clevelandii*-ből származik. A lokális tünetek az inokuláció után több, mint 20 nappal, a szisztemikus tünetek az inokuláció után több, mint 40 nappal láthatók.

1. táblázat: Vírus felhalmozódás^a a karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzsével fertőzött *Nicotiana* gazdanövényekben

Gazdanövény	inokulált levelek ^b	felső (szisztemikus) levelek ^c
<i>N. edwardsonii</i>	0,3 ± 0,1 (10) ^d HR ^e	0 (14)
<i>N. clevelandii</i>	1,0 ± 0,3 (10) HR	2,9 ± 1,0 (10)
<i>N. glutinosa</i>	0,3 ± 0,1 (8) lokális klorózis	0 (14)
<i>N. edwardsonii</i> var. Columbia	0,4 ± 0,1 (10) HR	0 (14)

^a A vírus felhalmozódást (μg virion / g levélszövet) ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) módszerrel mértük (A_{405})

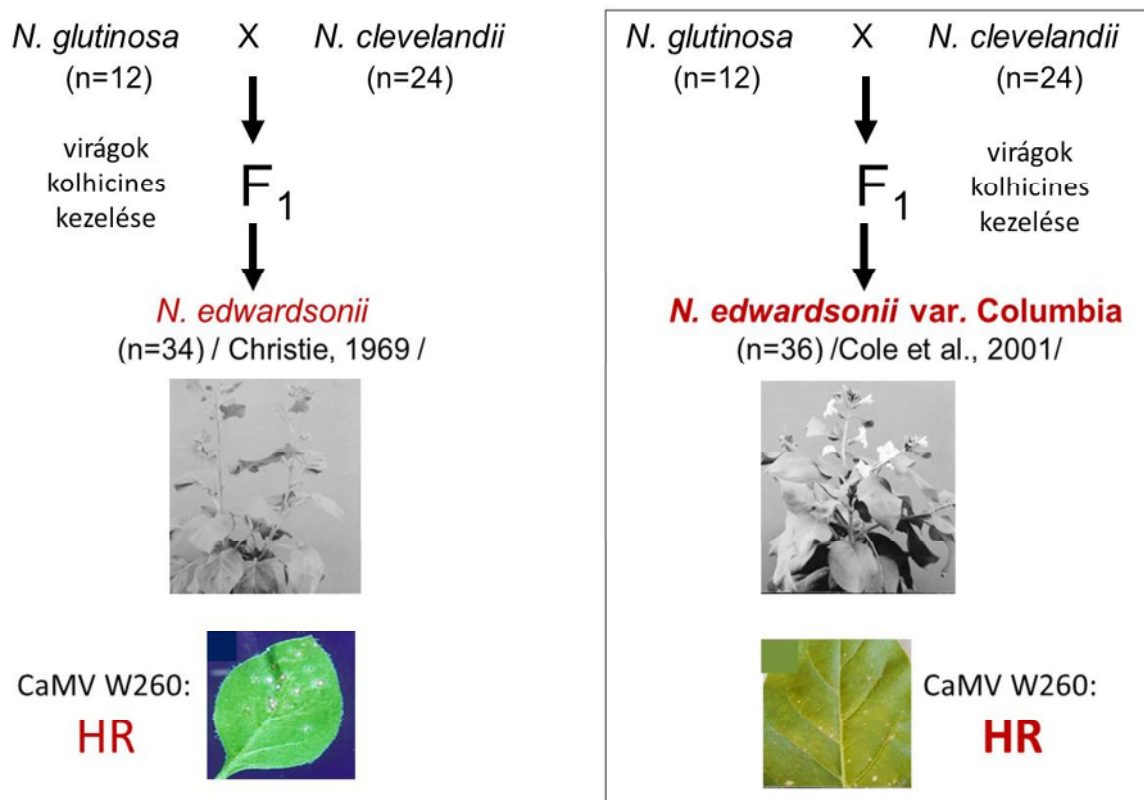
^b A CaMV W260 felhalmozódása az inokuláció után 20 nappal (inokulált levelek)

^c A CaMV W260 felhalmozódása az inokuláció után 40 nappal a virágzat alatti szisztemikus levelekben

^d Az ELISA méréshez használt növényi minták száma (zárójelben)

^e A gazdanövények rezisztenciája az inokulált leveleken; HR = hiperszenzitív reakció (lokális nekrotikus léziók), lokális klorózis = lokális klorotikus léziók. A CaMV W260 egyedül a *N. clevelandii*-ben képes megtörni a rezisztenciát és szisztemikus fertőzést okozni.

Annak igazolására, hogy a *N. edwardsonii*-nak a CaMV W260-ra adott, HR-típusú rezisztenciáját a két szülőből származó független tulajdonságok (rezisztencia, ill. nekrotizálás) határozzák meg, újra létrehoztuk a *N. glutinosa* ($n = 12$) és *N. clevelandii* ($n = 24$) keresztezéséből származó eredeti *N. edwardsonii* fajhibridet (Christie, 1969) (**2. ábra**). A kapott F_1 növények virágait a termékenység helyreállítása (kromoszómaszám megduplázása) érdekében kolhicinnel kezeltük. A kezelt virágokból kapott magvakat elvetve termékeny egyedeket kaptunk. Amerikai kutatási partnerünk (J. Schoelz és munkatársai, University of Missouri) eredményei szerint ezekben a növényekben az összkromoszómaszám valóban megduplázódott, 72-re nőtt ($n = 36$) (Cole et al., 2001). Az eredeti *N. edwardsonii* genomja viszont a várt 72 helyett csak 68 kromoszómát tartalmaz ($n = 34$) (Christie, 1969). Feltehetően ez lehet az oka a két *N. edwardsonii* fajhibrid eltérő habitusának: az új *N. edwardsonii* levele és virága nagyobb, növekedése pedig kompaktabb, mint a régi *N. edwardsonii*-nak (**2. ábra**). Az újraszintetizált *N. edwardsonii* fajhibridből nyert további generációkban ezek a morfológiai jelek stabilan megmaradtak.



2. ábra: Az eredeti *Nicotiana edwardsonii* fajhibrid (Christie, 1969) újra szintetizálása a szülőkből (*N. glutinosa* és *N. clevelandii*): az általunk létrehozott új fajhibrid (*N. edwardsonii* var. Columbia) (Cole et al., 2001) az eredeti *N. edwardsonii*-től kromoszómaszámában és habitusában kis eltérést mutat. Ugyanakkor a karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által a *N. glutinosa*-ban kiváltott rezisztencia (lokális klorotikus léziók) a *N. clevelandii*-vel történő keresztezés után hiperszenzitív reakcióval (lokális nekrotikus léziók, HR) járó rezisztenciává konvertálható minkét fajhibridben (lásd az 1. ábrát is). Ezzel részben igazoltuk azt a hipotézisünket, hogy a *N. edwardsonii*-nak a CaMV W260-ra adott, HR-típusú rezisztenciáját két független tulajdonság határozza meg: a rezisztencia a *N. glutinosa*-ból, míg a nekrosis (sejt/szövethalál) a *N. clevelandii*-ből származik.

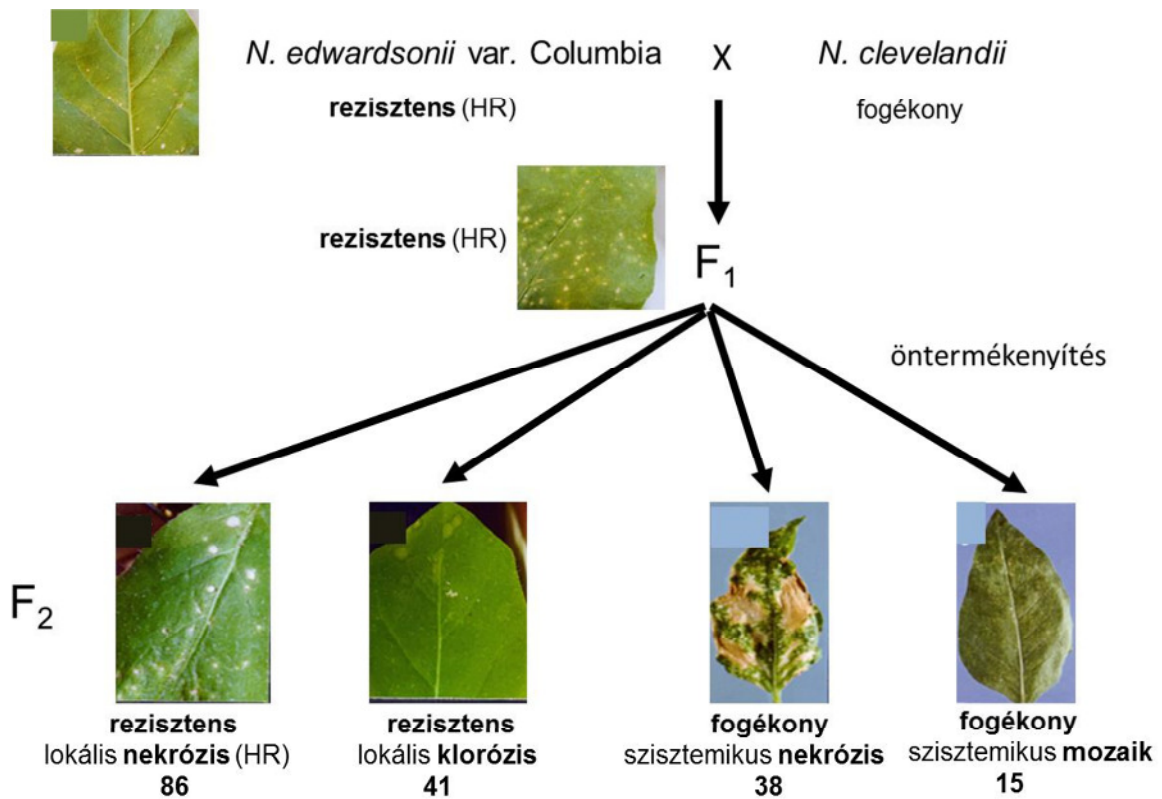
A két fajhibrid közötti nyilvánvaló habitusbeli eltérések miatt az általunk létrehozott új fajhibridet *N. edwardsonii* var. Columbia-nak neveztük el (Cole et al., 2001). Hangsúlyozandó viszont, hogy a CaMV W260-ra mindkét fajhibrid HR-típusú rezisztenciával (lokális nekrotikus léziók) reagált, bár a Columbia növényekben a HR-léziók mérete valamivel kisebb volt (**1. táblázat** és **2. ábra**). Eredményeink szerint tehát a CaMV W260 törzse által a *N. glutinosa*-ban kiváltott rezisztencia (lokális klorotikus léziók) a *N. clevelandii*-vel történő keresztezés után HR-típusú rezisztenciává (lokális nekrotikus léziók) konvertálható minkét fajhibridben (**1. és 2. ábra, 1. táblázat**). Ezzel részben igazoltuk azt a hipotézisünket, hogy a *N. edwardsonii*-nak a CaMV W260-ra adott, HR-típusú rezisztenciáját két független tulajdonság határozza meg: a rezisztencia a *N. glutinosa*-ból, míg a nekrosis (sejt/szövethalál) a *N. clevelandii*-ből származik.

A karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által *Nicotiana edwardsonii*-ban kiváltott hiperszenzitív reakció: a HR-t alkotó rezisztencia és nekrosis az utódokban függetlenül öröklődik

Amennyiben a *N. edwardsonii* fajhibridnek a CaMV W260-ra adott hiperszenzitív reakciójában (HR) a rezisztenciát és a nekrosist a két szülőből származó, egymástól független gének határozzák meg, akkor a HR-t alkotó rezisztencia és nekrosis az utódokban is függetlenül öröklődik. Ennek igazolására az eredeti *N. edwardsonii* fajhibridet kereszteztük a fogékony szülővel (*N. clevelandii*). Az így kapott F₁ növények azonban terméketlenek voltak, feltehetően azért, mert az eredeti *N. edwardsonii* genomja a várt 72 kromoszóma helyett csak 68 kromoszómát tartalmaz (n = 34) (Christie, 1969). Ugyanakkor az általunk létrehozott új *N. edwardsonii* fajhibrid (var. Columbia) (n = 36) és a *N. clevelandii* keresztezéséből kapott F₁ növények termékenyek voltak, így az F₂ populációban lehetségessé vált a rezisztencia és nekrosis öröklődésének nyomon követése.

A *N. edwardsonii* var. Columbia és a *N. clevelandii* keresztezéséből kapott F₁ növények a CaMV W260 fertőzésére HR-típusú, lokális léziókat adtak (**3. ábra**). A vizsgált 33 F₁ egyed nagyobb része, 29 egyed rezisztensnek bizonyult. A növényegyedek rezisztensnek lettek értékelve, ha az inokuláció után több mint 45 nappal egyáltalán nem vagy csak maximum egy levélen észleltünk szisztemikus tüneteket. A 33 F₁ növényből 4 egyed viszont nem volt rezisztens a CaMV W260-ra, mivel 45 nappal az inokuláció után növényenként átlagosan 20 levél mutatott szisztemikus tüneteket és a szisztemikus levelekben a vírustiter kb. akkora volt, mint a fogékony *N. clevelandii*-ben (**1. táblázat**).

Az F₁ növények nagy részének (33-ból 29 egyed) a vírusfertőzésre adott reakciója alapján a *N. edwardsonii* var. Columbia szülő által átörökölt rezisztencia inkomplett (nem teljes) dominanciát mutat.



3. ábra: A karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által kiváltott rezisztencia és nekrozis (sejt/szövetelhalál) hasadása a *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia és *N. clevelandii* keresztezéséből származó F₂ populációban. Ez a kísérlet igazolja, hogy a *N. edwardsonii* var. Columbia-nak a CaMV W260-ra adott, hiperszenzitív reakciójában (HR) a rezisztenciát és a nekrozist egymástól független gazdanövény gének határozzák meg. Az adott fenotípushoz tartozó F₂ növények száma a fényképek alatt van feltüntetve. A növényegyedek rezisztensnek lettek értékelve, ha az inokuláció után több, mint 45 nappal egyáltalán nem vagy csak maximum egy levélen észleltünk szisztemikus tüneteket.

A CaMV W260 fertőzésére rezisztenciát (HR) mutató F₁ egyedek beltenyésztésével kapott F₂ generáció növényeiből 4 független kísérletben összesen 180 egyedben értékeltük a lokális léziók fenotípusát (nekrotikus /HR/, ill. klorotikus) és a rezisztencia, ill. szisztemikus tünetek meglétét (**3. ábra**). Az F₂ növényegyedek nagyobb része rezisztensnek bizonyult, mivel az inokuláció után több mint 45 nappal egyáltalán nem vagy csak maximum egy levélen észleltünk szisztemikus tüneteket. A fogékonynak értékelt F₂ növényekben 45 nappal az inokuláció után növényenként átlagosan 22 levél mutatott szisztemikus tüneteket. Az értékelés alapján a 180 F₂ növényegyed 2,4 : 1 arányban szegregált a rezisztenciára, ill. fogékonyságra (**3. ábra**). Ugyanakkor a fogékony *N. clevelandii*-vel visszakeresztelt F₁ növények utódai 0,9 : 1 arányban szegregáltak a rezisztenciára, ill. fogékonyságra (ld. Cole et al., 2001). Ezek a hasadási arányok azt jelzik, hogy a *N. edwardsonii* var. Columbia által átörökölt, CaMV W260-ra adott rezisztencia egy gén által meghatározott domináns tulajdonság.

A rezisztensnek, ill. fogékonynak értékelt F₂ növényegyedeket tovább tudtuk csoportosítani a lokális, ill. szisztemikus nekrosis (sejt/szövethalál) megléte vagy hiánya alapján. Az F₂ egyedek nagy részében a nekrosis a rezisztenciával együtt szegregált, ezek a növények CaMV W260 fertőzésre HR-típusú rezisztenciával reagáltak, míg a növények egy része fogékony volt és szisztemikus mozaikos tüneteket mutatott (**3. ábra**). A fentiek mellett ugyanakkor két olyan F₂ növénycsoportot is megfigyeltünk, amelyekben a rezisztencia és a nekrosis külön, egymástól függetlenül szegregált. Az egyik csoportban az F₂ növények szisztemikus nekrotikus tüneteket mutattak, míg a másik csoportban az egyedek rezisztensek voltak a CaMV W260-ra, de nem HR-t, hanem lokális klorotikus léziókat adtak a vírusfertőzésre (**3. ábra**). Ezek az eredmények igazolják, hogy a *N. edwardsonii* var. Columbia-nak a CaMV W260-ra adott, hiperszenzitív reakciójában (HR) a rezisztenciát és a nekrotizist egymástól függetlenül öröklődő (szegregálódó) gazdanövény gének határozzák meg: a rezisztencia gén(ek) a *N. glutinosa*-ból, míg a nekrotizist (sejt/szövethalál) meghatározó gén (*ccd1*, ld. Király et al., 1999; Cawly et al., 2005). a *N. clevelandii*-ből származik.

A karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által kiváltott lokális és szisztemikus nekrosis (sejt/szövethalál) nem befolyásolja a vírus rezisztenciát *Nicotiana* gazdanövényekben

Eredményeink szerint *N. edwardsonii* fajhibridekben a CaMV W260-ra adott, hiperszenzitív reakcióval (lokális nekrotikus léziók, HR) járó rezisztenciát két független tulajdonság határozza meg: a rezisztencia az egyik szülőből (*N. glutinosa*), míg a nekrosis a másik, fogékony szülőből (*N. clevelandii*) származik és az utóbbi tulajdonságot a *ccd1* gén határozza meg (Király et al., 1999; Cawly et al., 2005).

Az említett gazda-kórokozó kombinációkban a vírusfertőzésre adott rezisztencia és nekrosis függetlenségét a következők is alátámasztják: a CaMV W260 a *N. clevelandii*-ben HR-t és szisztemikus nekrotizist okozott, míg a CaMV egy másik törzse (D4) ugyanebben a gazdában lokális klorotizist és szisztemikus mozaikot váltott ki és a D4 vírus koncentrációja – az inokulált és felső, szisztemikus levelekben egyaránt – kétszer-háromszor akkora volt, mint a W260 titer (**2. táblázat**). Felmerül a kérdés, hogy a CaMV W260 jóval kisebb mértékű felhalmozódását okozhatják-e a lokális és szisztemikus nekrotikus tünetek? A kérdés tisztázásához ugyanezzel a két vírussal (CaMV W260 és D4 törzs) fertőztünk egy másik, rokon gazdanövényt (*N. bigelovii*), amely mindkét fertőzésre lokális klorotizist és szisztemikus mozaikot adott, de a D4 vírus koncentrációja ebben az esetben is kétszer-háromszor akkora volt, mint a W260 titer (**2. táblázat**). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CaMV W260 által *N. clevelandii*-ben kiváltott – a gazda *ccd1* génje által meghatározott – lokális és szisztemikus nekrosis nem befolyásolja a vírus rezisztenciát és megerősítik, hogy ez a nekrosis a CaMV rezisztenciától valóban függetlenül öröklődik.

2. táblázat: A karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által kiváltott lokális és szisztemikus nekrosis (sejt/szövethalál) nem befolyásolja a vírus felhalmozódását^a *Nicotiana* gazdanövényekben

vírus	<i>N. bigelovii</i>		<i>N. clevelandii</i>	
	inokulált levelek ^b	felső (szisztemikus) levelek ^c	inokulált levelek ^b	felső (szisztemikus) levelek ^c
D4	6,9 ± 1,1 (12) ^d lokális klorózis ^e	10,8 ± 3,1 (23) mozaik	2,7 ± 0,7 (12) lokális klorózis	11,3 ± 3,6 (24) mozaik
W260	1,6 ± 0,1 (12) lokális klorózis	5,7 ± 1,8 (21) mozaik	1,1 ± 0,1 (12) HR	4,2 ± 1,1 (29) SN

^a A vírus felhalmozódást (µg virion / g levélszövet) ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) módszerrel mértük (A₄₀₅)

^b A CaMV (W260 és D4 törzs) felhalmozódása az inokuláció után 20 nappal (inokulált levelek)

^c A CaMV (W260 és D4 törzs) felhalmozódása az inokuláció után 40 nappal a virágzat alatti szisztemikus levelekben

^d Az ELISA méréshez használt növényi minták száma (zárójelben)

^e A gazdanövények CaMV-fertőzésre adott reakciója; lokális klorózis = lokális klorotikus léziók, HR = hiperszenzitív reakció (lokális nekrotikus léziók), SN = szisztemikus nekrosis.

A növényi védekezés fokozása – eltérő hatások a vírusfertőzésekkel szembeni hiperszenzitív reakciót (HR) alkotó rezisztenciára és nekrosisra (sejt/szövethalálra)

Korábban kimutatták, hogy egyes növényi vírus rezisztencia gének fokozott expressziója a HR-típusú vírusrezisztenciát erősíti, mivel kisebb, ill. hamarabb megjelenő nekrotikus léziók („mikro-HR”) vagy tünetmentes rezisztencia alakul ki. Feltételezhető, hogy ilyenkor az adott rezisztencia gén hatékonyabb működése miatt a növényi védekező rendszer – vagy annak egyes elemei – is gyorsabban indukálódnak (Bendahmane et al., 2000; Cooley et al., 2000). Ugyanakkor ismert, hogy a növényi antioxidáns kapacitás fokozásával járó kezelések jelentősen csökkentik a vírusfertőzésre adott HR-típusú léziók számát és /vagy méretét, de a rezisztencia nem változik vagy csak kismértékben nő (Farkas et al., 1960; Gullner et al., 1999; Pogány et al., 2004). Kérdés, hogy a növényi védekező rendszer más elemeinek fokozott indukciója mennyire hat eltérően a vírusfertőzés által kiváltott HR-t alkotó rezisztenciára és lokális nekrosisra, azaz a HR-típusú nekrosis visszaszorulása megbízhatóan jelzi-e a fokozott rezisztenciát?

A fenti kérdés tisztázásához azt vizsgáltuk, hogy egyes vírus-gazdanövény kapcsolatokban az emelt szalicilsav-tartalom, az optimális szulfát ellátottság és az ún.

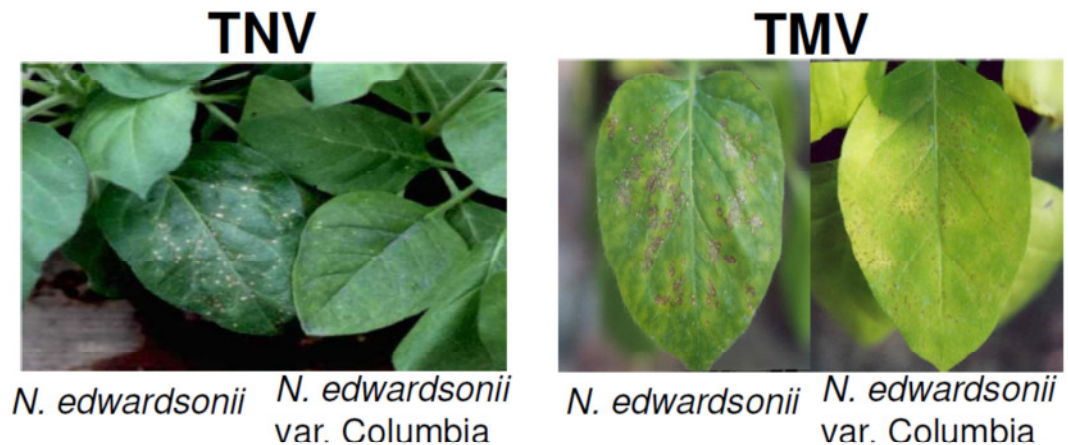
patogenezissel kapcsolatos (*PR*) gének fokozott expressziója a HR-típusú nekrosis visszاسzorulása mellett ténylegesen együtt jár-e a vírus felhalmozódás hasonló mértékű csökkenésével (azaz a vírus rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával)?

A *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia-ban a vírusfertőzések által kiváltott HR-típusú nekrosis visszاسzorulása nem mindig jár együtt a rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával

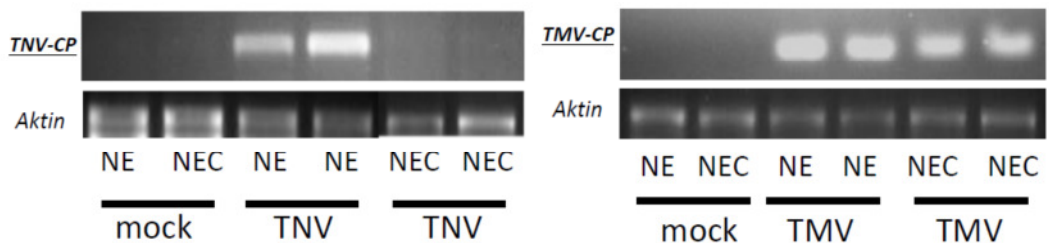
A *N. edwardsonii* fajhibridet eredetileg a *N. glutinosa* és *N. clevelandii* keresztezéséből hozták létre több évtizede (Christie, 1969; Christie és Hall 1979). A két szülőből mi újra létrehoztuk ezt a fajhibridet (*N. edwardsonii* var. Columbia) (Cole et al., 2001), annak igazolására, hogy a karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzsére adott HR-típusú rezisztenciát a két szülőből származó független tulajdonságok (rezisztencia, ill. nekrosis-képzés) határozzák meg (ld. előző fejezet). Bár a CaMV W260-ra mindkét fajhibrid HR-típusú rezisztenciával (lokális nekrotikus léziók) reagált, a Columbia növényekben a HR-léziók mérete láthatóan kisebb volt (**1. táblázat** és **2. ábra**), ami arra utalt, hogy ez a fajhibrid fokozottan rezisztens lehet erre a vírusra. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a *N. edwardsonii* var. Columbia 1/ fokozottan rezisztens-e többféle vírusfertőzésre is, 2/ a vírusfertőzések által kiváltott HR-típusú nekrosis visszاسzorulása mindig együtt jár-e a rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával?

Az eredeti *N. edwardsonii*-t és a *N. edwardsonii* var. Columbia-t két, egymástól rendszertani szempontból távol álló vírus kórokozóval fertőztük: a dohány nekrosis vírussal (*Tobacco necrosis virus*, TNV) és a dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV). A két vírus az említett gazdanövényekben más jellegű rezisztenciát okoz: a TNV egy HR-típusú nemgazda-rezisztenciát, míg a TMV egy olyan, HR-típusú gazda-rezisztenciát vált ki, amelyet a jól ismert *N* rezisztencia gén határoz meg (Christie, 1969; Cole et al., 2004; Adhab et al., 2019).

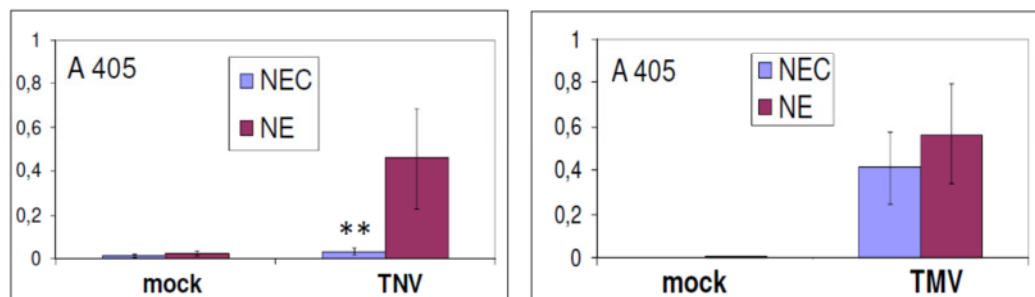
Eredményeink szerint a var. Columbia-ban – a *N. edwardsonii*-hoz képest – az inokulált leveleken a HR-nekrozist mutató felület TNV fertőzést követően legalább 25 %-ra, míg TMV fertőzés után kb. 50 %-ra csökkent (**4. ábra**), ami a gazdanövény fokozott vírusrezisztenciáját jelezheti. Érdekes, hogy TNV fertőzésre a var. Columbia-ban a rezisztencia a HR-nekrosis visszاسzorulásával (25 %) összhangban változott: a TNV titer az *N. edwardsonii*-ban mértnek kb. 25 %-a volt, amit szemikvantitatív RT-PCR és ELISA módszerrel is sikerült kimutatni (**4. ábra**). Ugyanakkor TMV fertőzést követően a var. Columbia rezisztenciája a HR-nekrosis visszاسzorulásához (az *N. edwardsonii* tüneteinek 50 %-a) képest alig nőtt, mivel a vírustiter az *N. edwardsonii*-ban mértnek csak mintegy 80 %-a volt (a várt 50 % helyett) (**4. ábra**). Ezek szerint a HR-típusú lokális nekrosis visszاسzorulása nem mindig jár együtt a vírus rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával.



RT-PCR (5 DAI)



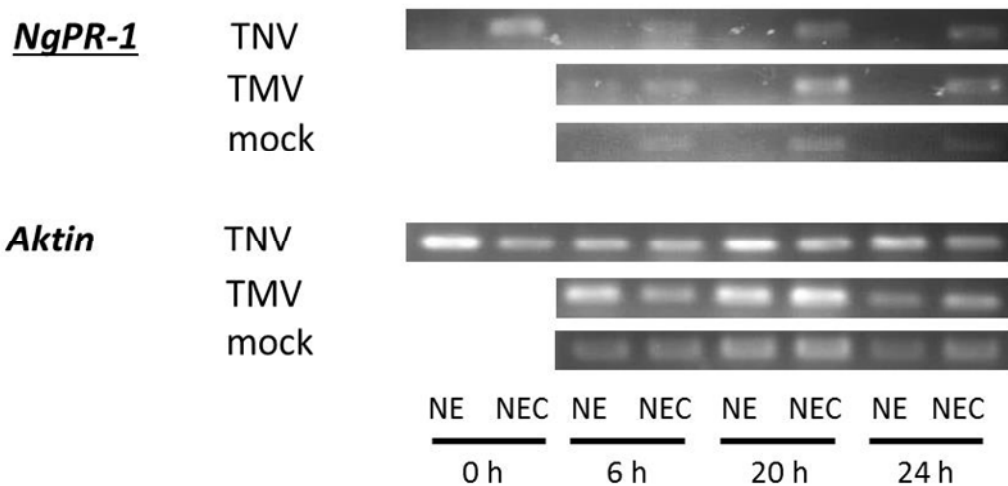
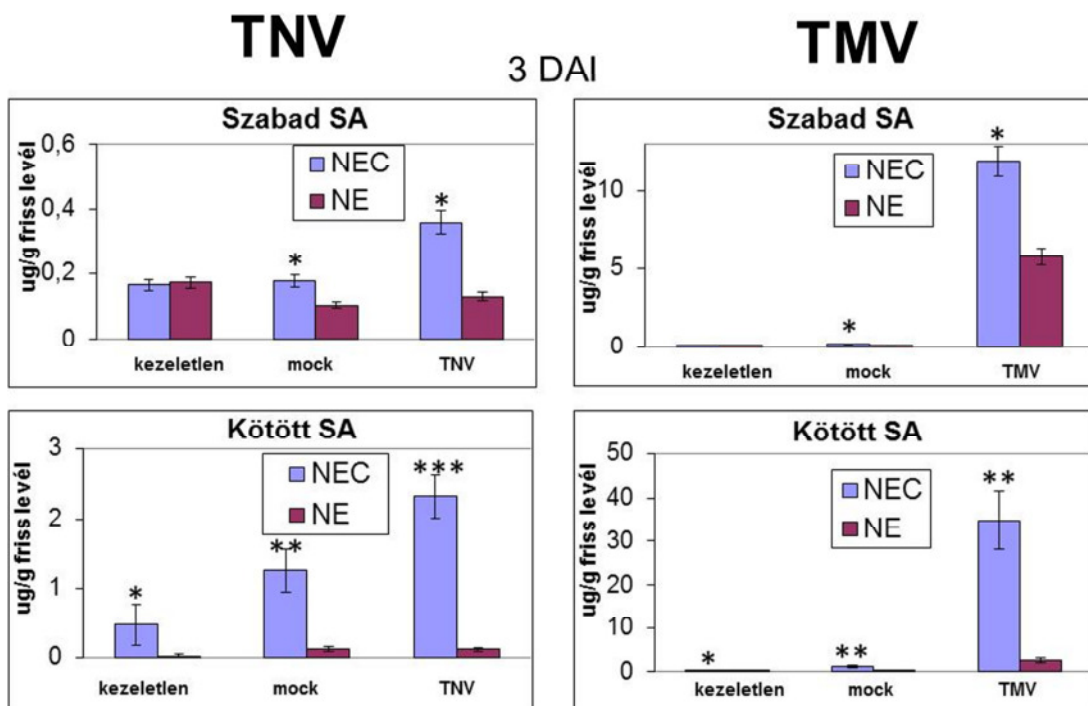
ELISA (5 DAI)



4. ábra: A *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia-ban (NEC) a hiperszenzitív (HR) típusú lokális nekrotikus visszaszorulása a *N. edwardsonii*-hoz (NE) képest nem mindig jár együtt a vírus felhalmozódás hasonló mértékű csökkenésével (azaz a vírus rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával). Felső képek: HR-típusú lokális nekrotikus tünetek dohány nekrotikus vírussal (*Tobacco necrosis virus*, TNV) és dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) történő inokuláció után 5 nappal (5 DAI). Középső és alsó ábrarész: TNV, ill. TMV felhalmozódása az inokulált levelekben, szemikvantitatív RT-PCR és ELISA módszerrel mérve. Az RT-PCR-nél a vírus köpenyfehérje gének (*TNV-CP* és *TMV-CP*) expresszióját mértük, referenciának egy *Aktin* gén expresszióját tekintettük. „mock” = kontroll inokulált levelek. ** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,01$) az NE-hez képest.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a *N. edwardsonii* var. Columbia-ban a TNV és TMV vírusfertőzések hasonló mértékben indukálják-e a szalicilsav-felhalmozódást és egyes patogenezissel kapcsolatos (PR) gének expresszióját akkor is, ha – pl. TMV fertőzésnél – a *N. edwardsonii*-hoz képest fokozott rezisztencia nincs összhangban a HR-

nekrózis visszaszorulásával? Érdekes, hogy a var. Columbia már fertőzés nélkül is sokkal nagyobb koncentrációban tartalmazott kötött (glikozilált) szalicilsavat, ill. jóval erősebben expresszálta a vírusrezisztencia markerének számító *NgPR-1* gént, mint az *N. edwardsonii* (5. ábra), ami az emelt szintű TMV- és TNV-rezisztencia egyik oka lehet. A TNV, ill. TMV inokuláció után 3 nappal a var. Columbia növényekben hasonló mértékben – többszörösére – nőtt mind a szabad, mind a kötött szalicilsav szintje, a vírusfertőzések utáni első napban pedig hasonló mértékben fokozódott a *NgPR-1* gén expressziója (a *N. edwardsonii*-hoz képest) (5. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a szalicilsav és a PR gének által meghatározott növényi védekezés hasonló mértékben indukálódik akkor is, ha a HR-típusú lokális nekrosis visszaszorulása nem jár együtt a vírus rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával.

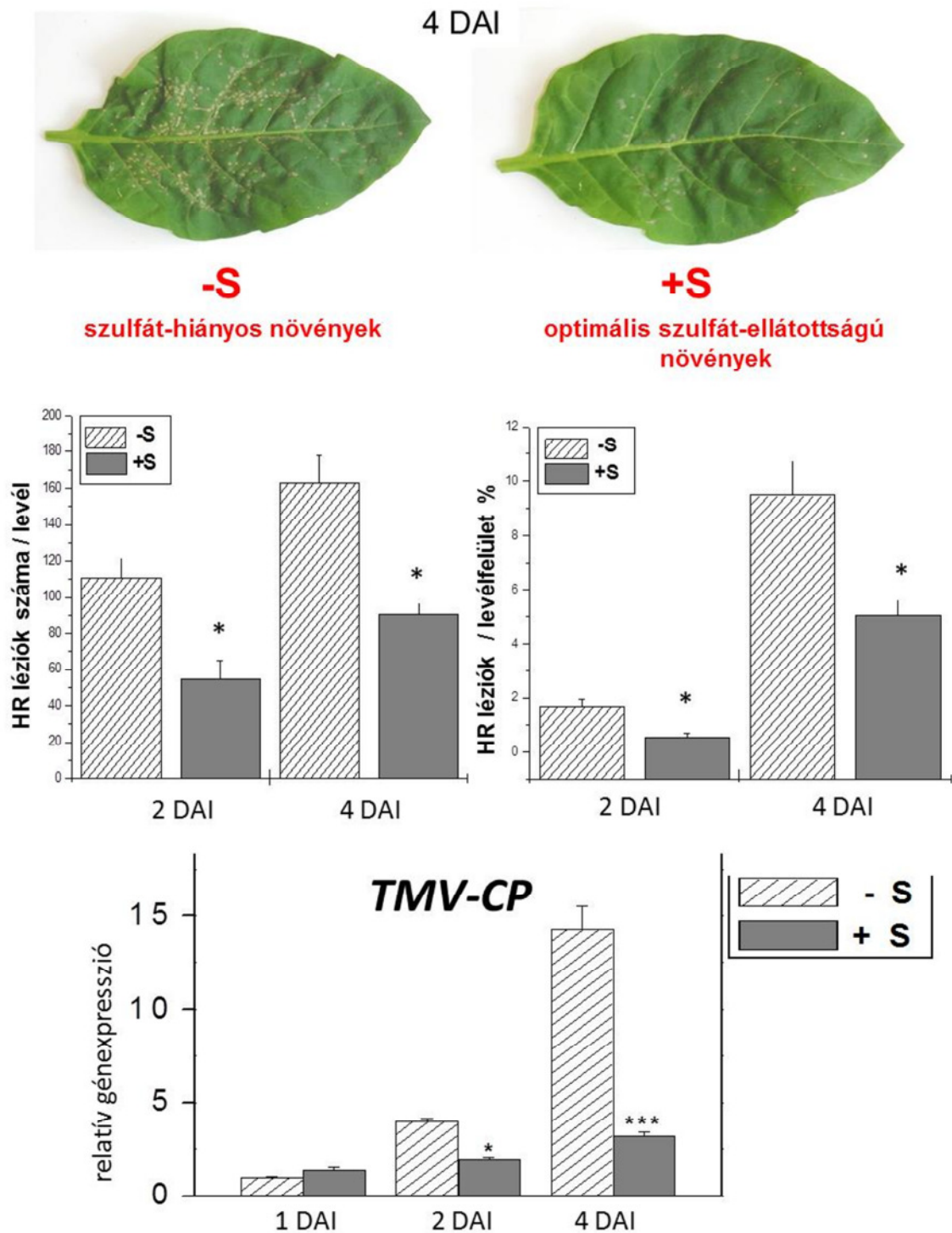


5. ábra: A *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia –ban (NEC) a dohány nekrotikus vírus (Tobacco necrosis virus, TNV) és dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) történő fertőzés hasonló mértékben indukálja a szalicilsav (SA) felhalmozódását és egyes patogenezissel kapcsolatos (*PR*) gének fokozott expresszióját, a *N. edwardsonii*-hoz (NE) képest (annak ellenére, hogy TMV fertőzésnél a *N. edwardsonii* var. Columbia-ban a HR-típusú lokális nekrotikus visszazorulása a *N. edwardsonii*-hoz képest nem jár együtt a vírus rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával, ld. 4. ábra). Felső ábrarész: szabad és kötött szalicilsav felhalmozódása (kimutatás HPLC-vel) a TNV, ill. TMV inokuláció után 3 nappal (3 DAI). Alsó ábrarész: az *NgPR-1* gén expressziójának változása a vírusterhelés utáni 1 napon belül (szemikvantitatív RT-PCR). Referenciának egy *Aktin* gén expresszióját tekintettük. „mock” = kontroll inokulált levelek. *, ** és *** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ és $p \leq 0,001$) az NE-hez képest.

A *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN-ben az optimális szulfát ellátottság által biztosított emelt szintű hiperszenzitív vírusrezisztencia – a HR-típusú nekrotikus visszazorulásánál a rezisztencia nagyobb mértékben fokozódhat

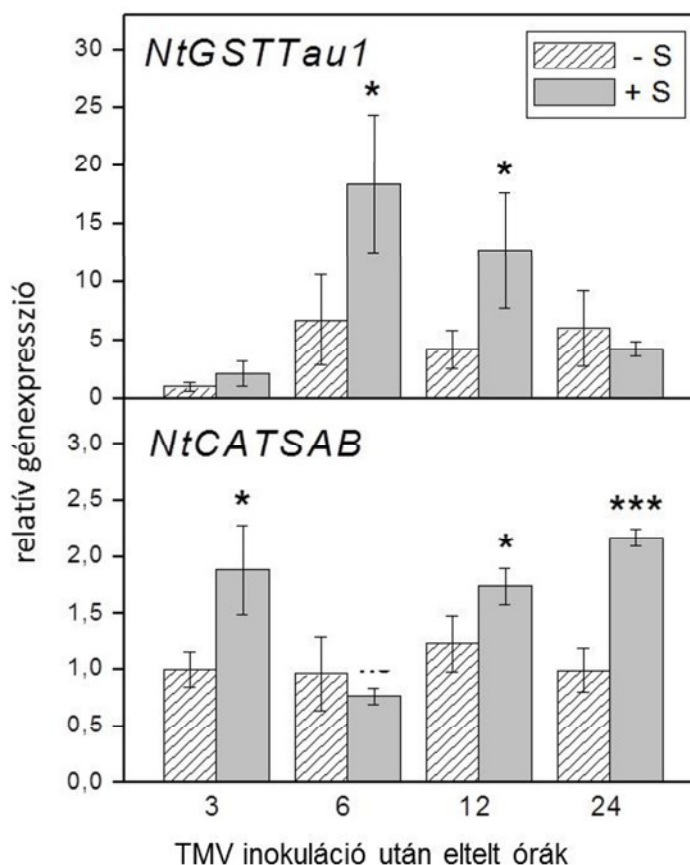
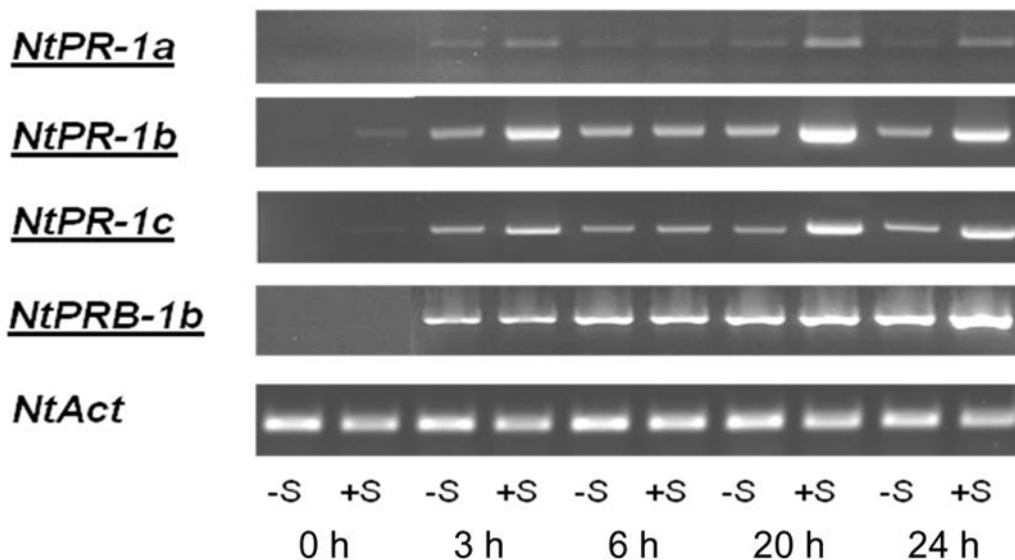
Korábbi eredményeink szerint dohány mozaik vírussal (TMV) fertőzött fogékony dohányban (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun nn) az optimális szulfát ellátottság hatására mérséklődnek a szisztemikus mozaikos tünetek és fokozódik a vírus rezisztencia (Höller et al., 2010). Kíváncsiak voltunk arra, hogy optimális szulfát ellátottság esetén 1/ fokozódik-e a TMV-vel szembeni, genetikailag (az *N* gén által) meghatározott, HR-típusú rezisztencia is, 2/ a TMV fertőzés által kiváltott HR-típusú nekrotikus visszazorulása mindig együtt jár-e a rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával (a TMV felhalmozódás hasonló mértékű csökkenésével)?

A TMV-re genetikailag rezisztens dohányban (cv. Samsun NN) az optimális szulfát ellátottság (+S) szemmel láthatóan emelt szintű hiperszenzitív rezisztenciát biztosított: a vírusterhelés után 2 és 4 nappal a +S növényekben a HR-típusú lokális nekrotikus léziók száma és levélfelülethez viszonyított százalékos aránya is kb. 50 %-a volt annak, amit a szulfát-hiányos (-S) dohányokban tapasztaltunk (**6. ábra**). A TMV-vel szembeni rezisztencia az inokulált +S levelekben a fertőzés után 2 nappal a HR-nekrotikus visszazorulásával (50 %) összhangban változott: a TMV titer a hasonló -S levelekben mértnek kb. 50 %-a volt (valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mérve). A vírusterhelés után 4 nappal viszont az inokulált +S levelekben a TMV-szint a -S dohányok hasonló leveleiben mért értéknek már a 25 %-ára esett vissza, annak ellenére, hogy a HR-nekrotikus visszazorulásának mértéke (50 %) nem változott (**6. ábra**). Ezek szerint optimális szulfát ellátottság (+S) esetén fokozódik a TMV-vel szembeni, genetikailag (az *N* gén által) meghatározott, HR-típusú rezisztencia. Ugyanakkor a HR-típusú lokális nekrotikus visszazorulása nem jár együtt a rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával (a TMV felhalmozódás hasonló mértékű csökkenésével): a fertőzés előrehaladásával a HR-típusú nekrotikus visszazorulásánál a rezisztencia nagyobb mértékben fokozódik.



6. ábra: A *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN-ben az optimális szulfát ellátottság (+S) által biztosított emelt szintű hiperszenzitív rezisztencia dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) szemben: a HR-típusú lokális nekrotikus visszazorulásánál a vírus felhalmozódás nagyobb mértékben csökkenhet (a vírus rezisztencia nagyobb mértékben fokozódhat). Felső képek: HR-típusú lokális nekrotikus tünetek a TMV-vel történő inokuláció után 4 nappal (4 DAI). Középső ábrarész: a TMV-fertőzés által kiváltott HR-típusú lokális nekrotikus léziók száma és levélfelülethez viszonyított százalékos aránya. Alsó ábrarész: TMV felhalmozódása az inokulált levelekben, valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mérve. *TMV-CP* = TMV köpenyfehérje gén. * és *** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,001$) a -S-hez képest.

Osztrák kutatási partnerünkkel (B. Zechmann és munkatársai, University of Graz) közösen végzett mérések szerint a TMV-re genetikailag rezisztens dohányban (cv. Samsun NN) az optimális szulfát ellátottság (+S) által előidézett emelt szintű hiperszenzitív rezisztencia elsősorban a megnövekedett glutation és cisztein tartalomra vezethető vissza (ld. Király et al., 2012). Kíváncsiak voltunk azonban arra is, hogy optimális szulfát ellátottság (+S) mellett a TMV fertőzés erősebben indukálja-e egyes védekezési gének expresszióját (pl. patogenezissel /PR/ és a glutation védekezési funkciójával kapcsolatos, ill. antioxidáns gének) akkor is, ha a szulfát-hiányos (-S) dohányhoz képest a HR-típusú nekrosis visszaszorul, de a rezisztencia ennél nagyobb mértékben fokozódik? A TMV fertőzés első 24 órájában a patogenezissel kapcsolatos-1 típusú védekezési marker fehérjéket kódoló gének (*NtPR-1a*, *NtPR-1b*, *NtPR-1c* és *NtPRB-1b*) kifejeződése az inokulált levelekben jelentősen megnőtt. Az optimális szulfát ellátottság (+S) azonban ezeknek a géneknek a további, még erősebb indukcióját eredményezte (**7. ábra**). A továbbiakban két olyan védekezési (stressz) gén működését vizsgáltuk, amelyek közül az egyik a glutation védekezési funkciójával kapcsolatos, ún. Tau osztályú glutation-S-transzferáz fehérjét kódoló gén (*NtGSTTau1*), a másik pedig a növényi betegség-rezisztenciában szerepet játszó antioxidáns, egy szalicilsav-kötő kataláz génje (*NtCATSAB*) (ld. Király et al., 2012). A TMV fertőzés első 24 órájában a +S dohányokban – a -S növényekhez képest – mindkét gén (*NtGSTTau1* és *NtCATSAB*) expressziója jelentősen indukálódott (**7. ábra**). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az optimális szulfát ellátottság, ill. a glutation és a PR gének által meghatározott növényi védekezés jelentősen indukálódik akkor is, ha a HR-típusú lokális nekrosis visszaszorulása nem jár együtt a vírus rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával (a HR-típusú nekrosis visszaszorulásánál a rezisztencia nagyobb mértékben fokozódik).

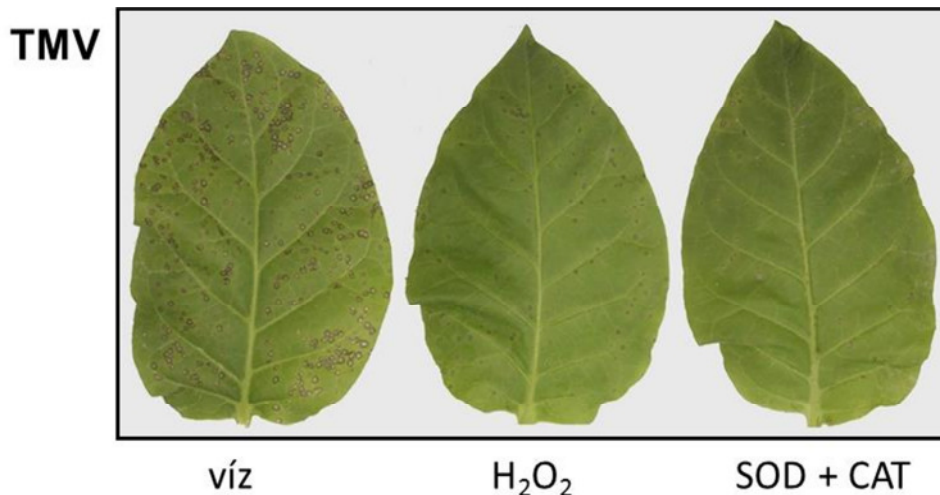


7. ábra: A *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN-ben az optimális szulfát ellátottság (+S) által biztosított emelt szintű hiperszenzitív rezisztencia dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) szemben (a HR-típusú nekrosis visszaszorulásánál a rezisztencia nagyobb mértékben fokozódik, ld. 6. ábra): védekezési gének fokozott indukciója a szulfát-hiányos (-S) növényekhez képest. Felső ábrarész: patogenezissel kapcsolatos-1 típusú fehérjéket kódoló gének (*NtPR-1a*, *NtPR-1b*, *NtPR-1c* és *NtPRB-1b*) kifejeződése az inokulált levelekben, a TMV fertőzés első 24 órájában (szemikvantitatív RT-PCR). Referenciának egy dohány aktin gén (*NtAct*) expresszióját tekintettük. Alsó ábrarész: egy Tau osztályú glutation-S-transzferázt és egy szalicilsav-kötő katalázt kódoló gén (*NtGSTTau1*, *NtCATSAB*) kifejeződése az inokulált levelekben, a TMV fertőzés első 24 órájában (valós idejű, kvantitatív RT-PCR). * és *** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,001$) a -S-hez képest.

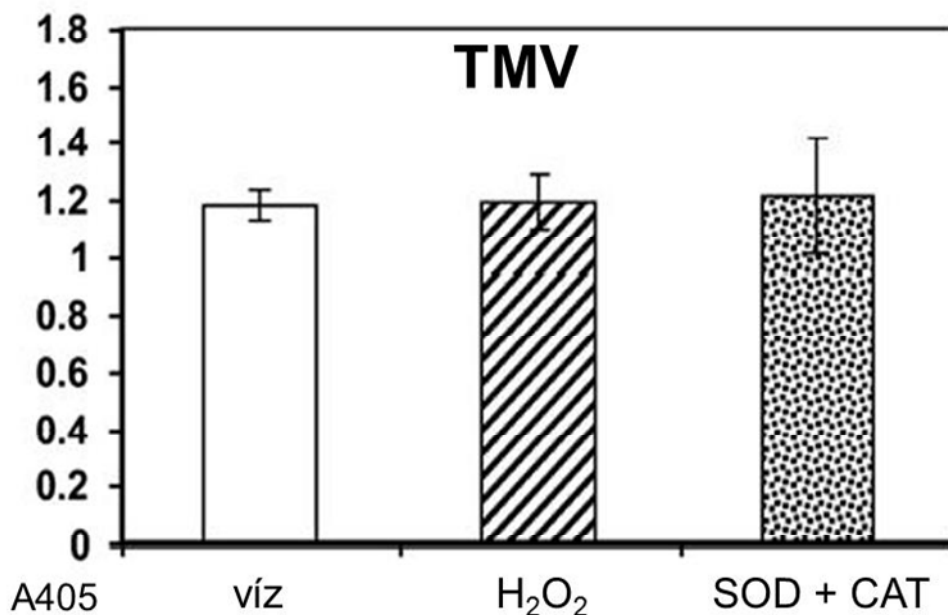
A növényi antioxidáns kapacitás fokozása hidrogén-peroxid kezeléssel – a vírusfertőzések által kiváltott HR-típusú nekrozis visszaszorulásával a rezisztencia nem változik

Ismert, hogy a növényi antioxidáns kapacitás fokozásával járó kezelések (pl. S-karvon vagy aszkorbinsav, emelt citokinin tartalom) jelentősen visszaszorítják a vírusfertőzésre adott HR-típusú lokális nekrozist, de a rezisztencia lényegében nem változik (Farkas et al., 1960; Gullner et al., 1999; Pogány et al., 2004). Kíváncsiak voltunk arra, hogy ugyanez a jelenség megfigyelhető-e olyan, dohány mozaik vírus (TMV) fertőzésre HR-rezisztenciát adó dohányban (*N. tabacum* cv. Xanthi NN) is, amely kis koncentrációjú hidrogén-peroxid (H_2O_2) előkezelést kapott? Korábbi kutatások szerint ugyanis a viszonylag kis koncentrációjú (5-20 mM) hidrogén-peroxiddal előkezelt dohány és borsó fokozottan toleráns lesz többféle, nekrotikus tünetekkel járó abiotikus stresszre és ezzel összhangban a növényi antioxidáns kapacitás is jelentősen aktiválódik (Gechev et al., 2002; Barba-Espín et al., 2010).

Kérdés, hogy a H_2O_2 által biztosított, nekrotikus tünetekkel szembeni ellenálló-képességben milyen szerepet játszanak egyes antioxidánsok? Ennek tisztázásához a TMV-vel fertőzött dohánynövényeket nemcsak hidrogén-peroxiddal, hanem a H_2O_2 -szintet szabályozó két antioxidáns enzimmal (szuperoxid-dizmutáz, SOD és kataláz, CAT) is kezeltük, és arra is kíváncsiak voltunk, hogy a H_2O_2 , ill. SOD/CAT kezelések a HR-típusú lokális nekrotikus tünetek visszaszorítása mellett befolyásolják-e a vírus rezisztenciát? A dohányleveleket a TMV-inokuláció előtt 1 nappal 5, 7, 10 és 12,5 mM H_2O_2 -al permeteztük, ennek hatására valamennyi kezelésnél jelentősen csökkent a HR-nekrozist mutató levélfelületet. Hasonló eredményt kaptunk, ha a növényeket a TMV-inokuláció után azonnal SOD és CAT keverékével (3000 U/ml SOD és 5000 U/ml CAT) infiltráltuk (**8. ábra**). Ugyanakkor a H_2O_2 , ill. SOD/CAT kezelések a HR-típusú lokális nekrotikus tünetek visszaszorítása mellett nem befolyásolták a TMV-vel szembeni rezisztenciát: a vírus-inokuláció után 3 nappal a TMV titer valamennyi kezelés hatására teljesen azonos szintű volt (**8. ábra**). Ez az eredmény megerősíti azokat a korábbi adatokat, melyek szerint a növényi antioxidáns kapacitás fokozásával járó kezelések a vírusfertőzésre adott HR-típusú lokális nekrozist visszaszorítják, de a rezisztencia nem változik (Farkas et al., 1960; Gullner et al., 1999; Pogány et al., 2004).

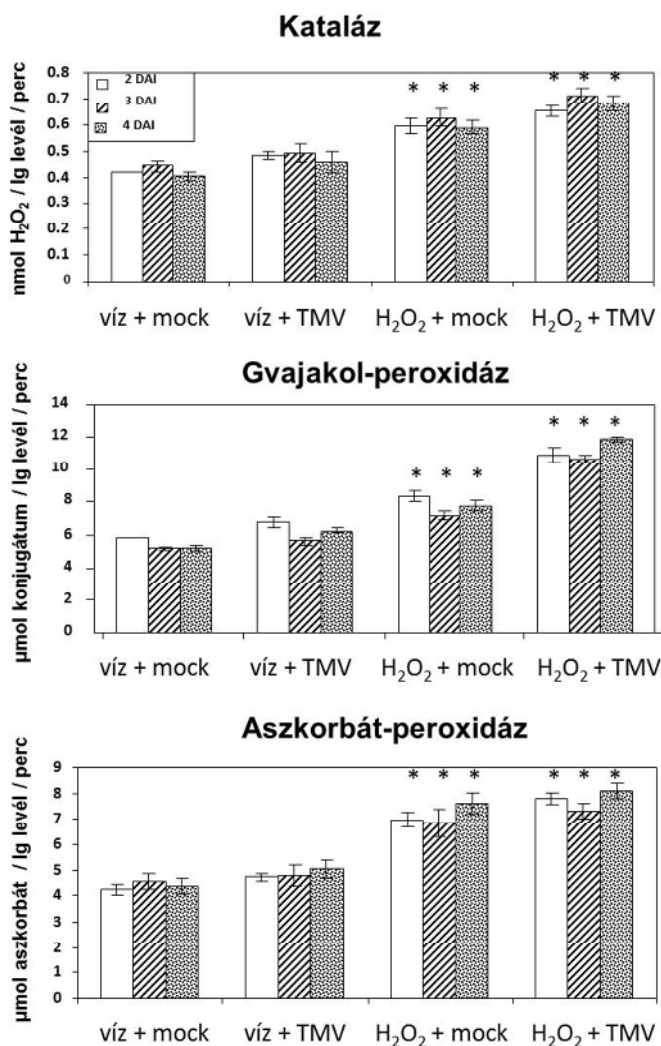


Kezelések	HR léziók száma / cm ²	HR léziók mérete (mm)
kontroll (víz + TMV)	8,53 ± 1,85	1,57 ± 0,29
7 mM H ₂ O ₂ + TMV	5,80 ± 1.30 *	0,70 ± 0,11 **
10 mM H ₂ O ₂ + TMV	5,90 ± 1,25 *	0,77 ± 0,20 **
12.5 mM H ₂ O ₂ + TMV	6,07 ± 1,70 *	0,84 ± 0,15 **
SOD + CAT + TMV	5,90 ± 1,05 *	0,79 ± 0,14 **

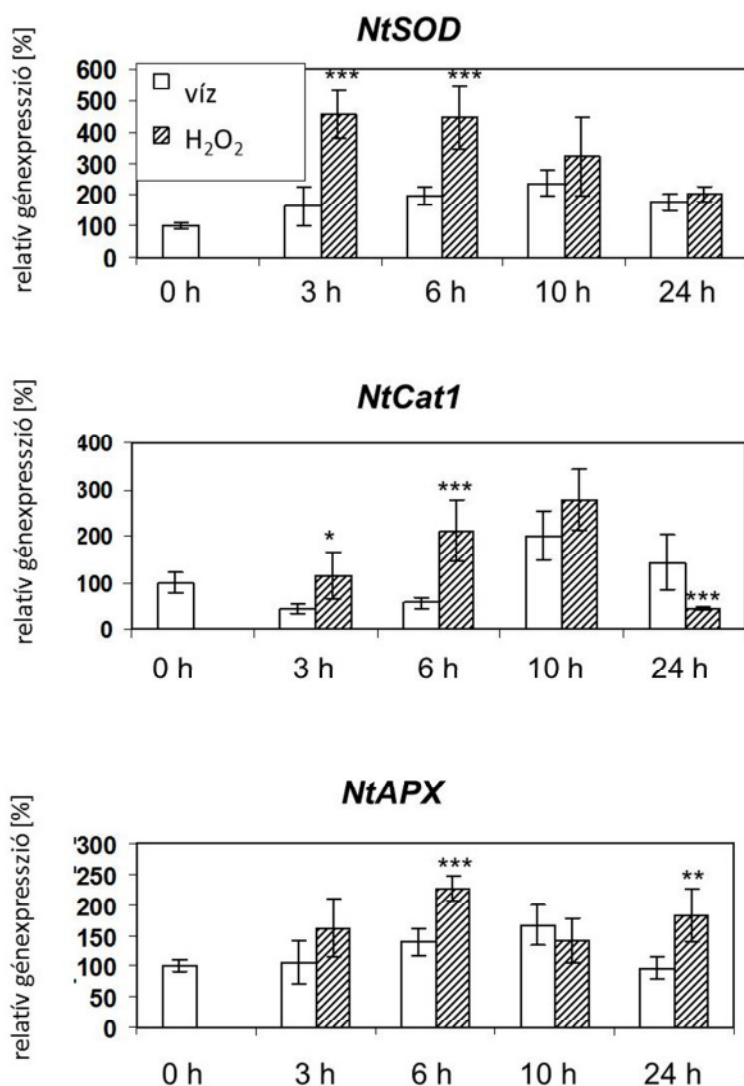


8. ábra: A dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzésére adott hiperszenzitív (HR) típusú lokális nekrosis visszaszorulása *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN-ben, a TMV-vel történő inokuláció után 3 nappal, hidrogén-peroxid (H₂O₂) és antioxidáns kezelésekre hatására – a vírus rezisztencia nem változik. Felső képek: a TMV-fertőzés által kiváltott HR-típusú lokális nekrotikus tünetek. Középső ábrarész: a TMV-fertőzés által kiváltott HR-típusú lokális nekrotikus léziók száma és mérete. * és ** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) a kontrollhoz képest. Alsó ábrarész: TMV felhalmozódása az inokulált levelekben, ELISA módszerrel mérve. A dohányleveleket a TMV-inokuláció előtt 1 nappal csapvízzel és 5, 7, 10 és 12,5 mM H₂O₂-al permetezték, ill. a TMV-inokuláció után azonnal szuperoxid-dizmutáz és kataláz keverékével (3000 U/ml SOD és 5000 U/ml CAT) infiltráltuk. A felső képeken és az alsó ábrarészen: H₂O₂ = 5 mM H₂O₂-vel történő permetezés.

Mivel a növények H₂O₂-előkezelése által biztosított abiotikus stressz tolerancia fokozza az antioxidáns kapacitást (Gechev et al., 2002; Barba-Espín et al., 2010) és a H₂O₂, ill. antioxidáns (SOD/CAT) kezelések egyaránt visszaszorították a TMV által kiváltott HR-nekrózist (**8. ábra**), ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy a H₂O₂-al előkezelt és TMV-vel fertőzött dohányban fokozottan aktiválódnak/indukálódnak-e egyes antioxidáns enzimek, ill. gének? A TMV-inokuláció utáni 2., 3. és 4. napon a kataláz, gvajakol-peroxidáz és aszkorbát-peroxidáz (APX) aktivitás jelentősen megemelkedett a H₂O₂-al előkezelt növényekben, a csapvízzel permetezett kontrollokhoz képest (**9. ábra**). Érdekes, hogy az enzimaktivitások a H₂O₂-előkezelés hatására a kontroll („mock”) inokulált növényekben is közel ugyanilyen mértékben emelkedtek (**9. ábra**), ami arra utal, hogy ezek a folyamatok nagyrészt függetlenek a TMV-vel szembeni rezisztenciától, amely a H₂O₂-előkezelés hatására nem változott (ld. 8. ábra). A H₂O₂-al előkezelt és TMV-vel fertőzött dohányban három, antioxidáns enzimeket kódoló gén (*NtSOD*, *NtCAT*, és *NtAPX*) expressziója is jelentősen megemelkedett (a csapvízzel permetezett kontrollhoz képest), már 3 és 6 órával a TMV-inokuláció után (**10. ábra**). Ezek az eredmények igazolják, hogy dohányban a kis koncentrációjú (5-10 mM) H₂O₂-előkezelés a növényi antioxidáns kapacitás fokozásán keresztül biztosítja a TMV által kiváltott HR-típusú nekrosis visszaszorulását, de a rezisztencia befolyásolása nélkül.



9. ábra: A dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzésére adott hiperszenzitív (HR) típusú lokális nekrosis visszaszorulása *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN-ben, hidrogén-peroxid (H_2O_2) előkezelés hatására (a vírus rezisztencia nem változik, ld. 8. ábra): antioxidáns enzimaktivitások fokozott indukciója a H_2O_2 -al előkezelt növények inokulált leveleiben, a TMV inokuláció utáni 2., 3. és 4. napon (DAI). A dohányleveleket a TMV-inokuláció előtt 1 nappal csapvízzel, ill. 5 mM H_2O_2 -al permeteztük. „mock” = kontroll inokulált levelek. * = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) a csapvizet kontrollhoz képest.



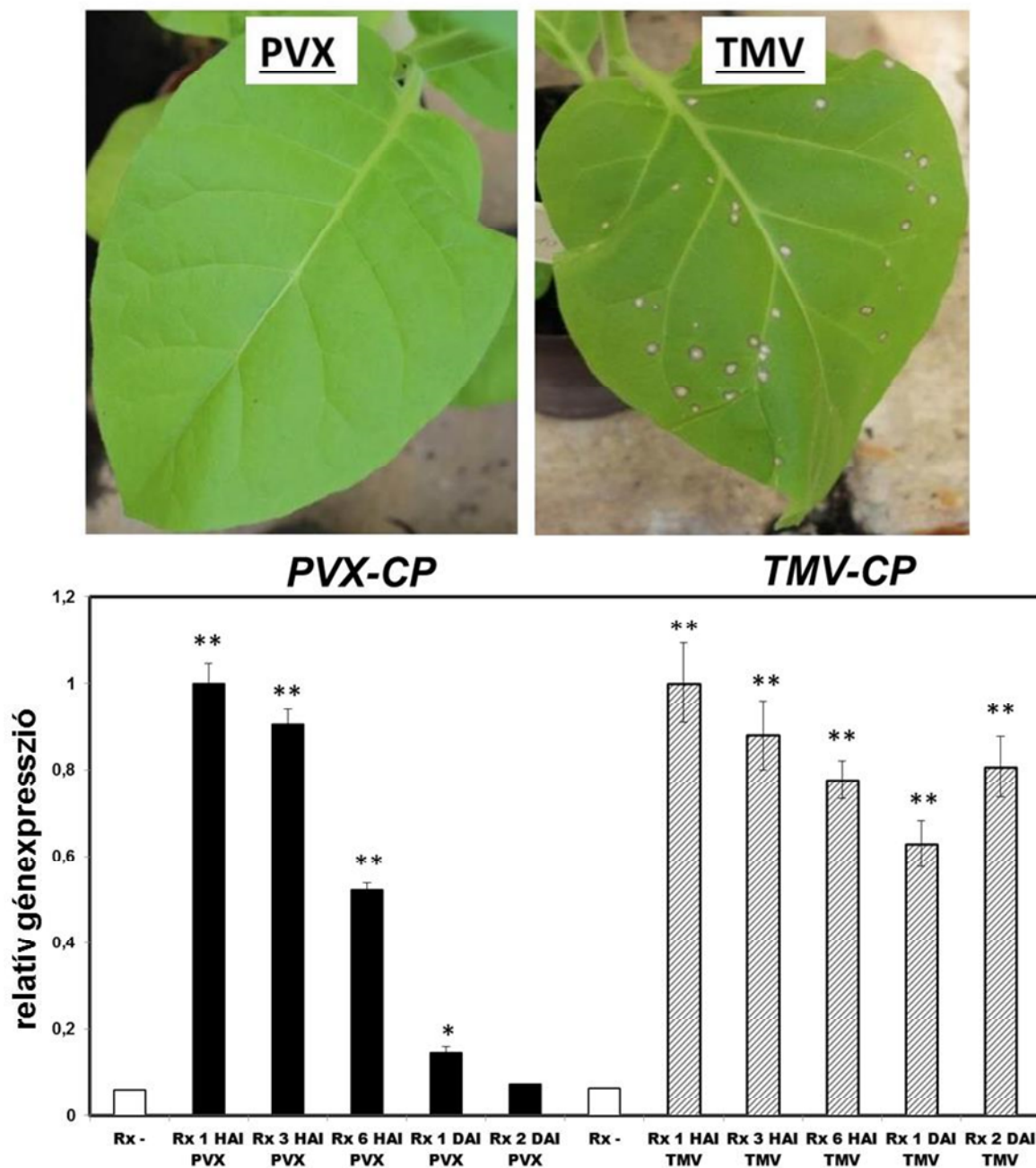
10. ábra: A dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzésére adott hiperszenzitív (HR) típusú lokális nekrosis visszaszorulása *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN-ben, hidrogén-peroxid (H_2O_2) előkezelés hatására (a vírus rezisztencia nem változik, ld. 8. ábra): antioxidáns enzimeket (szuperoxid-dizmutáz, kataláz, aszkorbát-peroxidáz) kódoló gének fokozott indukciója a H_2O_2 -al előkezelt növények inokulált leveleiben, a TMV fertőzés első 24 órájában (valós idejű, kvantitatív RT-PCR). A dohányleveleket a TMV-inokuláció előtt 1 nappal csapvízzel, ill. 5 mM H_2O_2 -al permeteztük. *, ** és *** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ és $p \leq 0,001$) a csapvizet kontrollhoz képest.

A hiperszenzitív nekrozissal (sejt/szövethalál) járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – különbségek a védekezési gének és antioxidánsok aktiválásában

A növények vírusfertőzésekkel szembeni rezisztenciájának legismertebb formája az ún. hiperszenzitív reakció (HR), amikor a vírus lokalizálását a gazdában sejt-, ill. szövethalál (nekrotikus léziók) kíséri. Ugyanakkor a vírusrezisztencia tünetmentesen (pl. sejt/szövethalál nélkül) is hatékony lehet, pl. az ún. extrém rezisztencia (ER) során, amikor a behatolás (inokuláció) helyén a fertőző vírus szinte teljes mértékben gátlódhat (Bendahmane et al., 1999; Hajimorad et al., 2001). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a HR-típusú nekrozissal járó, ill. tünetmentes (extrém) vírus rezisztencia kialakulása mögött – legalább részben – eltérő növényi védekezési folyamatok állnak. Az ún. reaktív oxigénszármazékok (ROS) és a ROS-szintet szabályozó antioxidánsok szerepe a HR-típusú vírus rezisztenciában évtizedek óta ismert (Doke és Ohashi, 1988; Moeder et al., 2005; Király et al., 2008; Lukan et al., 2020, 2023). Kíváncsiak voltunk tehát arra, hogyan változik egyes védekezési (ún. patogenezissel kapcsolatos /PR/, sejthalál-gátló, ill. antioxidáns) gének expressziója, valamint egyes nem enzimátikus és enzimátikus antioxidánsok mennyisége, ill. aktivitása e két vírusrezisztencia mechanizmus (tünetmentes ER és lokális nekrozissal járó HR) során?

A vírus felhalmozódás eltérő mintázata a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) által kiváltott HR-típusú, és a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) által kiváltott tünetmentes (extrém) rezisztenciánál dohányban

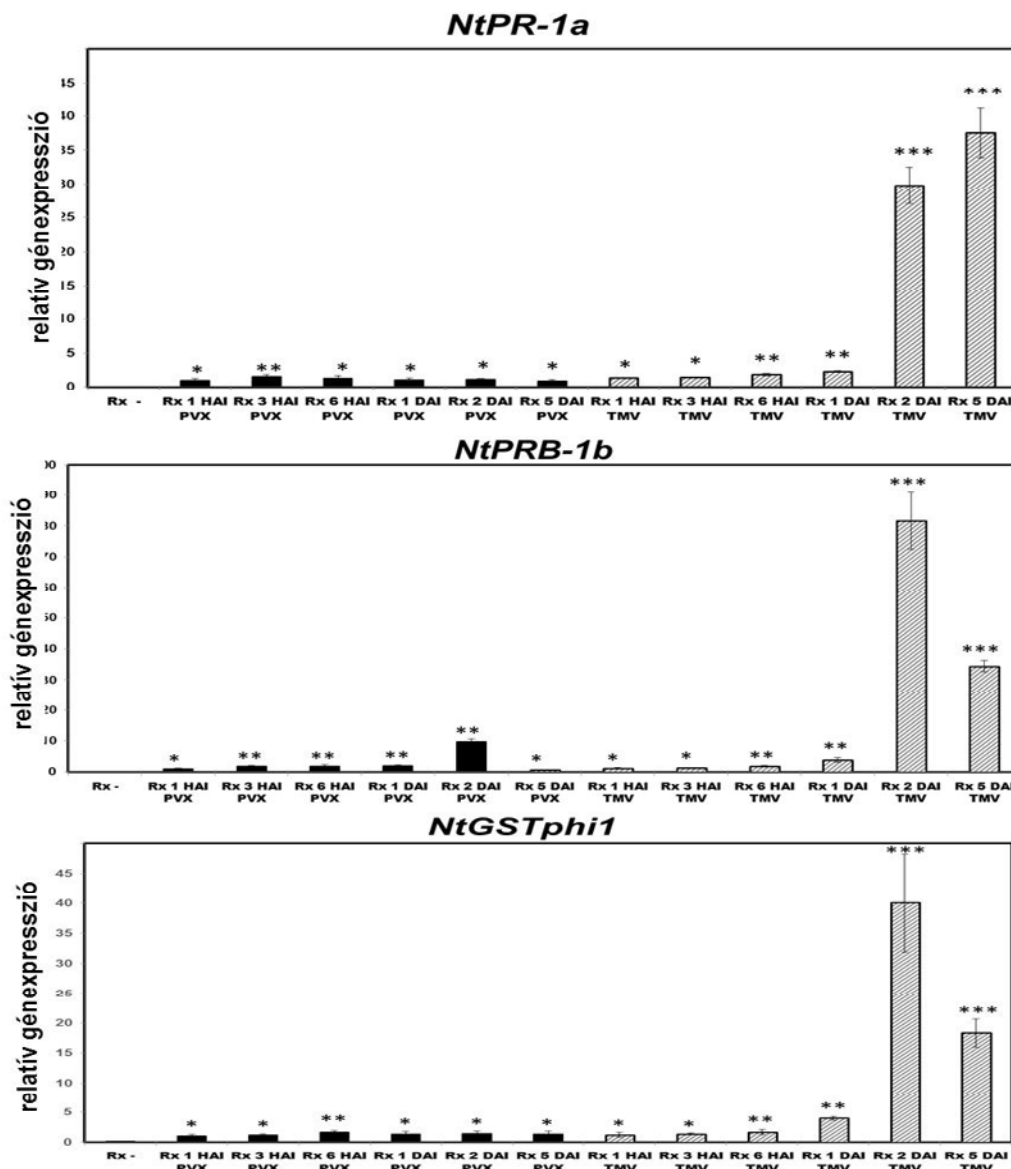
A HR-típusú, és a tünetmentes (extrém) rezisztencia összehasonlításához a *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN Rx1 dohány genotípust használtuk. Ebben a dohányvonalban a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) fertőzésekor az Rx1 rezisztenciagén által meghatározott ún. extrém rezisztencia (ER) tünetmentes, míg az N rezisztenciagén által meghatározott, dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) szembeni ellenálló képességet HR-típusú lokális sejt- és szövetelhalás kíséri (ld. Bendahmane et al., 1999) (**11. ábra**). A PVX-szel szembeni tünetmentes (ER) és a TMV-vel szembeni HR típusú vírus rezisztenciát – a PVX, ill. TMV felhalmozódását – ugyanabban a dohány genotípusban összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az ER már a vírusfertőzés utáni 6. órától kialakul (a PVX gátolva van), míg a HR során a vírusszint (TMV) a lokális nekrotikus léziók megjelenésével (2. nap) még emelkedik. Ezek szerint a fertőzés utáni első 2 napban a HR során a vírus (TMV) felhalmozódás kb. egy nagyságrenddel nő, míg a tünetmentes ER-nél a vírus (PVX) a fertőzés után 2 nappal már szinte teljesen visszaszorul (**11. ábra**). Eredményeink megerősítik azt a korábbi megfigyelést (ld. Bendahmane et al., 1999), hogy a PVX által dohányban kiváltott, Rx1 rezisztenciagén által meghatározott ER sokkal gyorsabb és hatékonyabb, mint a HR-típusú rezisztencia (pl. az N rezisztenciagén által meghatározott, TMV által kiváltott HR).



11. ábra: Tünetmentes (extrém) és hiperszenzitív (HR) vírusrezisztencia dohányban (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN Rx1). Baloldali kép: Az *Rx1* rezisztenciagén által meghatározott extrém rezisztencia (ER) burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) fertőzések. Jobboldali kép: Az *N* rezisztenciagén által irányított HR dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzés esetén. A felvételek 2 nappal a vírusfertőzés után készültek. Alsó ábrarész: PVX és TMV felhalmozódása a vírusfertőzés után különböző időpontokban (1, 3 és 6 óra, 1 és 2 nap), valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mérve. *PVX-CP* = PVX köpenyfehérje gén, *TMV-CP* = TMV köpenyfehérje gén. * és ** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) a fertőzetlen mintákhoz (-) képest.

Védekezési gének expressziója a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) által kiváltott HR-típusú, és a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) által kiváltott tünetmentes (extrém) rezisztenciánál dohányban

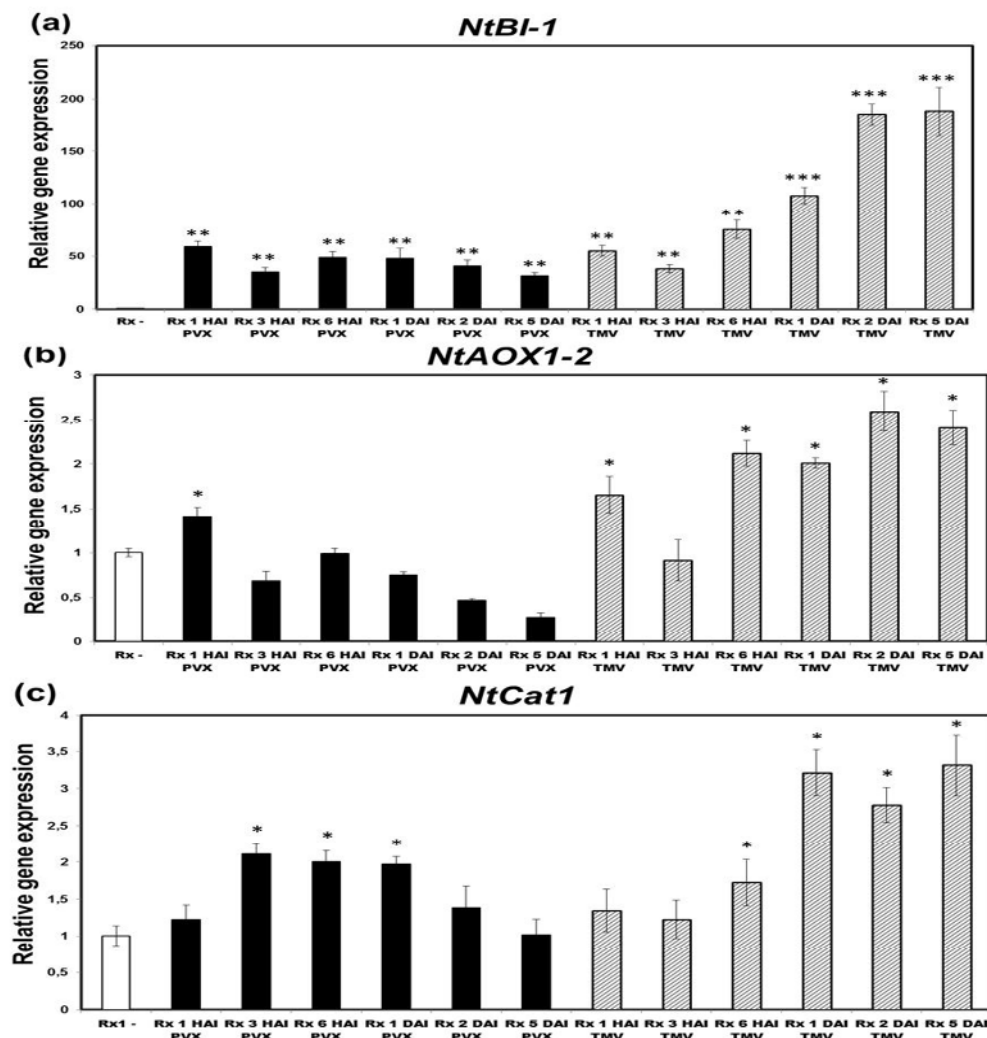
A TMV-vel szembeni HR típusú, és a PVX-szel szembeni tünetmentes (extrém) rezisztenciánál (ER) először két, ún. patogenezissel kapcsolatos (PR) gén (*NtPR-1a* és *NtPRB-1b*), valamint egy szintén PR génnek tekinthető, tipikusan stressz-indukált, glutation-S-transzferázt kódoló gén (*NtGSTphi1*) expresszióját vizsgáltuk *N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1 dohányban. Az *NtPR-1a* gén kifejeződése a PVX-inokuláció után 1 és 3 órával kissé (de szignifikánsan) nőtt, majd a fertőzés 6. órájától – az ER kialakulásával egy időben – fokozatosan csökkent (12. ábra, lásd még a 11. ábrát is). A TMV fertőzése által kiváltott HR-nél viszont az *NtPR-1a* expresszió az inokuláció után először fokozatosan emelkedett, majd a 2. és 5. napra (amikor a HR-léziók kifejlődnek) már kb. egy nagyságrenddel (tízszerezésre) nőtt. (12. ábra).



12. ábra: Három védekezési (stressz) gén (*NtPR-1a*, *NtPRB-1b* és *NtGSTphi1*) kifejeződése burgonya X vírussal (*Potato virus X*, PVX) és dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzött, PVX-re és TMV-re rezisztens dohányban (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN Rx1) a vírusfertőzés után különböző időpontokban (1, 3 és 6 óra, 1, 2 és 5 nap), valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mérve. *, ** és *** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ és $p \leq 0,001$) a fertőzetlen mintákhoz (-) képest.

Az *NtPRB-1b* gén expressziója mindkét rezisztenciatípusnál kezdetben nőtt, és a fertőzést követő 2. napon tetőzött, de a PVX-fertőzött, ER-t mutató levelekben az mRNS szint csak töredéke (kb. 10 %-a) volt annak, amit a TMV-fertőzött, HR-rezisztens levelekben mértünk. A vírusfertőzés 5. napjára az *NtPRB-1b* expressziója mindkét növény-vírus kapcsolatban jelentősen csökkent, de a PVX-fertőzött, ER-t mutató levelekben a génkifejeződés teljesen visszaszorult (12. ábra). Az *NtGSTphil* expressziója a PVX-fertőzött növényekben a fertőzés utáni első 6 órában (az ER kialakulásával párhuzamosan) nőtt, de utána fokozatosan visszaszorult, ill. stagnált, míg a TMV fertőzés (HR) után 2 és 5 nappal az *NtGSTphil* kifejeződése a többszörösére nőtt (a *NtPRB-1b*-hez hasonló expressziós trendet követve) (12. ábra).

A PVX-szel szembeni tünetmentes (ER) és a TMV-vel szembeni HR típusú rezisztenciánál figyelemmel kísértük három további olyan védekezési gén aktivitását is, amelyek a sejthalál gátlásban (*BAX* inhibitor-1, *NtBI-1*), ill. a ROS-felhalmozódás szabályozásában (alternatív-oxidáz, *NtAOX1-2* és kataláz, *NtCat1*) játszanak szerepet. PVX fertőzésnél az *NtBI-1* gén expressziója egy kezdeti átmeneti visszaesést követően az inokulációt követő 6. óra után fokozatosan lecsökkent (összhangban az ER kialakulásával). Ugyanakkor a TMV fertőzés 6. órájától a génexpresszió folyamatosan nőtt és a 2. napra – a HR-léziók kialakulásával egyidőben – az *NtBI-1* mRNS szint többszörösére emelkedett (13. ábra).



13. ábra: Sejthalál gátló (*NtBI-1* = BAX inhibitor-1), ill. ROS felhalmozódást szabályozó gének (*NtAOXI-2* = alternatív-oxidáz és a *NtCat1*=kataláz) kifejeződése burgonya X vírussal (*Potato virus X*, PVX) és dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzött, PVX-re és TMV-re rezisztens dohányban (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN Rx1) a vírusfertőzés után különböző időpontokban (1, 3 és 6 óra, 1, 2 és 5 nap), kvantitatív RT-PCR-rel mérve. *, ** és *** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ és $p \leq 0,001$) a fertőzetlen mintákhoz (-) képest.

Az *NtAOXI-2* expressziója mindkét rezisztenciatípusnál (ER és HR) a fertőzést követő 3. órában szintén átmeneti visszaesést mutatott. A 6. órától a tünetmentes ER-nél (PVX fertőzés) a génexpresszió markánsan csökkent, míg HR-nél (TMV fertőzés) az *NtAOXI-2* mRNS szintje ugyanebben az időpontban kb. a kétszeresére emelkedett, még jóval a HR-léziók megjelenése előtt (**13. ábra**). A hidrogén-peroxidot lebontó, kataláz kódoló *NtCat1* expressziója ER-nél, a PVX fertőzés után 3 órával jelentős mértékben nőtt, de innentől kezdve a génexpresszió már fokozatosan csökkent. HR során (TMV fertőzés), a BAX inhibitorhoz és az alternatív-oxidázhoz hasonlóan, az *NtCat1* génnél is megfigyelhető volt a fertőzés után 3 órával az expresszió átmeneti visszaesése, de ezután az *NtCat1* expressziója több mint a kétszeresére nőtt, még a HR-léziók megjelenése előtt (a fertőzés 1. napjára) (**13. ábra**).

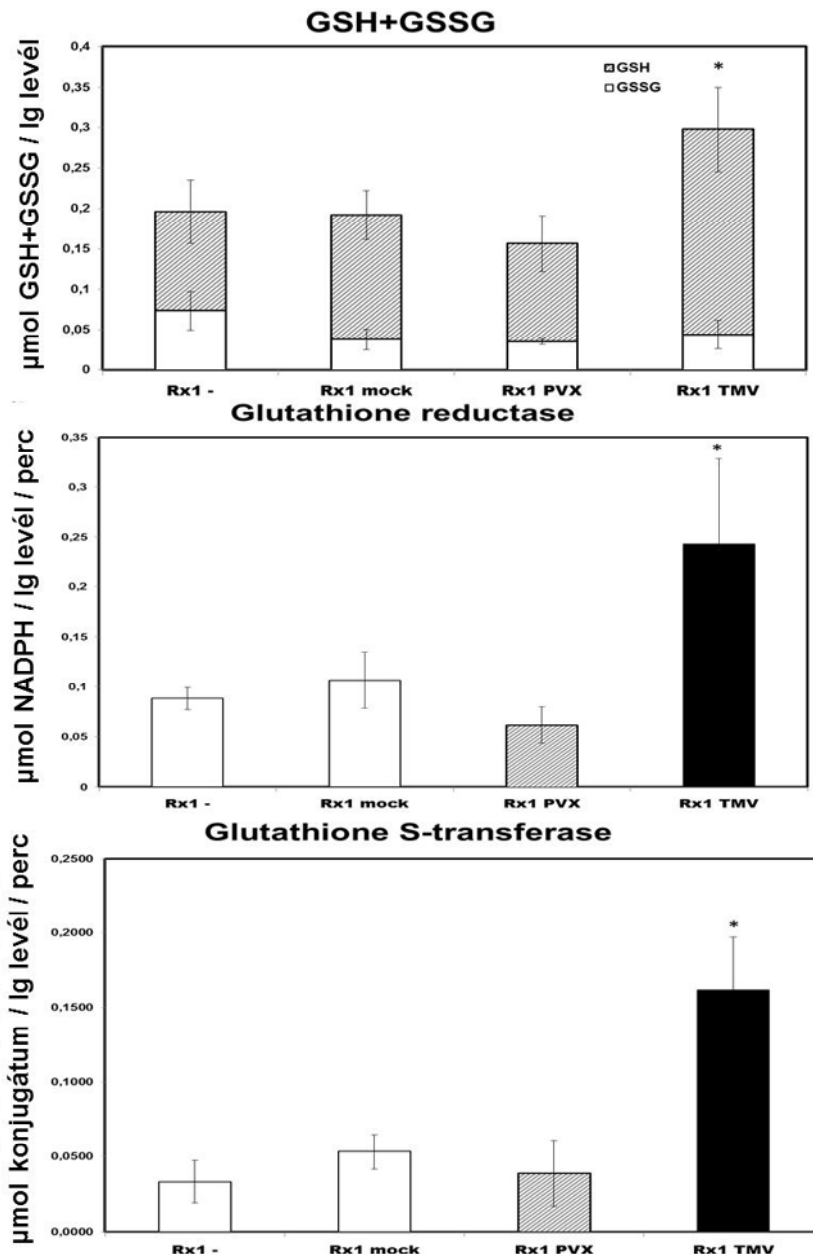
Összefoglalva a fentieket: a vizsgált védekezési (PR) gének expressziója a tünetmentes ER (PVX fertőzés) esetén csak alig feleakkora mértékben vagy – a PR gének, az *NtBI-1* és *NtGSTphi1* esetén – kb. egy nagyságrenddel kisebb mértékben indukálódott, mint a lokális nekrotikus léziókkal járó HR-nél (TMV fertőzés). Ennek oka feltehetően az, hogy az ER rendkívül gyors lefolyású, már a vírusfertőzés után 6 órával kialakul (ld. 11. ábra), ezért hosszabb távon nincs szükség a védekezési gének fokozott expressziójára.

Antioxidánsok mennyisége, ill. aktivitása a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) által kiváltott HR-típusú, és a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) által kiváltott tünetmentes (extrém) rezisztenciánál dohányban

A TMV-vel szembeni HR típusú, és a PVX-szel szembeni tünetmentes (extrém) rezisztenciánál (ER) a védekezési folyamatok jobb összehasonlítása érdekében arra is kíváncsiak voltunk, hogyan változik egyes nem enzimikus és enzimikus antioxidánsok mennyisége, ill. aktivitása?

A glutation (GSH) egy antioxidáns hatású tripeptid, amely jelátvivőként többek között a növényi vírus rezisztencia egyik meghatározó tényezője (De et al., 2018; Gullner et al., 2017b; Künstler et al., 2019; Zechmann, 2020). A vírusfertőzés későbbi szakaszában (4. nap) az össz-glutation szintje (redukált és oxidált glutation, GSH és GSSG) a tünetmentes ER (PVX fertőzés) során nem változott szignifikánsan az egészséges, fertőzetlen növényekben mért szinthez képest. Ugyanakkor a TMV-vel fertőzött, HR-típusú rezisztenciát mutató dohányban mind az össz-glutation szintje, mind a redukált és oxidált glutation aránya (GSH:GSSG) kb. kétszer akkora volt, mint a PVX-fertőzött levelekben és egészséges kontrollokban, ami feltehetően a nekrotikus (HR) léziók megjelenésével van összefüggésben (**14. ábra**).

A PVX-szel (ER) és TMV-vel (HR) fertőzött dohányokban két, a glutation működésében szerepet játszó és a növényi vírusfertőzések elleni védekezésében részt vevő, antioxidáns hatású enzim, a glutation reduktáz (GR) és a glutation-S-transzferáz (GST) (ld. Gullner et al. 2018; Hernández et al. 2017) aktivitását is mértük. A vírusfertőzés után 4 nappal a GR és GST aktivitása a tünetmentes ER (PVX fertőzés) során nem változott szignifikánsan a fertőzetlen növényekhez képest. Ezzel ellentétben HR (TMV fertőzés) esetén a GR és GST aktivitás a PVX-fertőzött és egészséges kontroll növényekhez képest a többszörösére nőtt, feltételezhetően a HR léziók megjelenésével összefüggésben (14. ábra).



14. ábra: Glutation felhalmozódása és az oxidált és redukált glutation aránya (legfelső ábrarész) valamint glutation-reduktáz (GR) és glutation-S-transzferáz (GST) enzimaktivitás (középső és alsó ábrarész) burgonya X vírussal (*Potato virus X*, PVX) és dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzött, PVX-re és TMV-re rezisztens dohányban (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN Rx1), a vírusfertőzés után 4 nappal. „mock” = kontroll inokulált növények. * = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) a fertőzetlen mintákhoz (-) képest.

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 rezisztencia (ER) során ezek a védekezési folyamatok vagy korán, ill. átmenetileg indukálódnak vagy alig detektálhatók, különösen a vírusfertőzés későbbi szakaszában, ami összhangban van az ER rendkívül korai (a vírusfertőzés utáni 6. órától) kialakulásával (ld. 11. ábra).

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

Eredményeink szerint dohány növényekben a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) által kiváltott, lokális nekrotikus léziókkal járó (HR-típusú), és a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) által okozott tünetmentes (extrém) vírus rezisztencia kialakulása mögött – legalább részben – eltérő időzítésű védekezési folyamatok állnak. A PVX fertőzés által kiváltott tünetmentes extrém rezisztencia (ER) során egyes védekezési gének és antioxidánsok (ROS-szabályozók) vagy korán, ill. átmenetileg indukálódnak vagy alig detektálhatók, míg a TMV által kiváltott HR-típusú rezisztenciánál ezek a védekezési folyamatok csak később, lassabban aktiválódnak (ld. az előző fejezetet). Mivel a vizsgált védekezési faktorok nagy része közvetlenül vagy közvetve szabályozza a ROS-szintet (pl. glutation, glutation-S-transzferáz, kataláz, alternatív-oxidáz), feltételezhető, hogy a ROS-felhalmozódás eltérő – korai, ill. késői – időzítése meghatározó szerepet játszik a rezisztencia, ill. sejthalál kialakításában.

Mindezek alapján tisztázni kívántuk, hogy 1/ A TMV-fertőzésre HR-típusú rezisztenciát adó dohányban a ROS gátlása, ill. a ROS-felhalmozódás időzítése hogyan befolyásolja a sejt/szövethalált (lokális nekrozist) és a tényleges vírus rezisztenciát, 2/ A PVX-fertőzésre tünetmentes extrém rezisztenciát (ER) adó dohányban a ROS-felhalmozódás hogyan járul hozzá az ER kialakulásához?

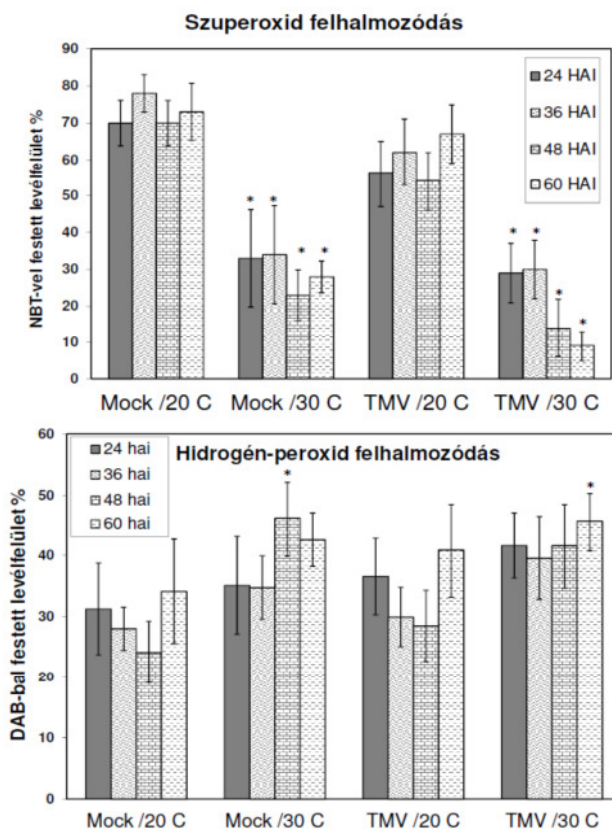
A ROS gátlása és a ROS-felhalmozódás időzítése – hatás a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) által kiváltott HR-t alkotó sejt/szövethalálra és rezisztenciára

A ROS-termelés gátlása magas hőmérsékleten – hatás a TMV által kiváltott HR-típusú sejt/szövethalálra és rezisztenciára

A reaktív oxigénszármazékok (ROS), elsősorban a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) és a belőle képződő hidrogén-peroxid (H_2O_2) meghatározó szerepe a HR-típusú vírus rezisztenciában évtizedek óta ismert (Doke és Ohashi, 1988; Moeder et al., 2005; Király et al., 2008;

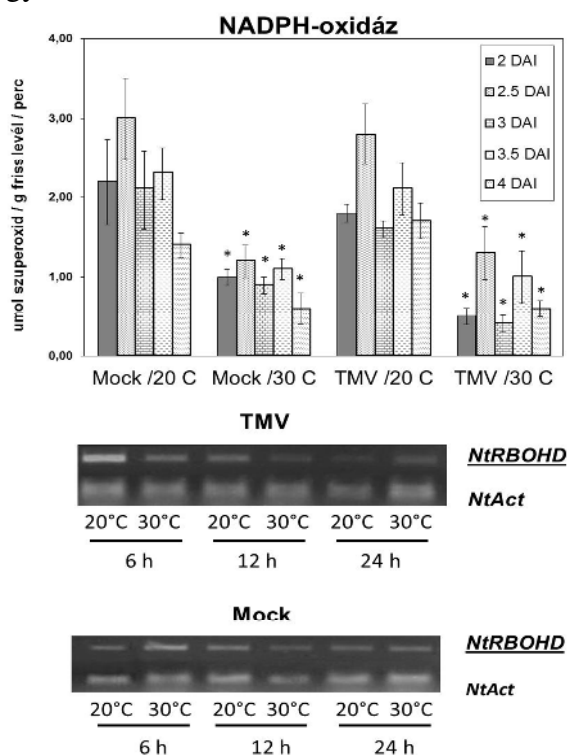
Lukan et al., 2020, 2023). Ha az *N* rezisztencia gént hordozó, TMV-fertőzésre HR-t adó dohányban a szuperoxid termelését transzgenikus úton gátolták (egy szuperoxid-termelést gátló fehérje túlermelésével), a szokásosnál kisebb HR-típusú nekrotikus léziók késve jelentek meg, ami arra utal, hogy a ROS (szuperoxid) hiányának hatására feltehetően a vírus rezisztencia is sérült (Moeder et al., 2005). Régóta ismert az is, hogy az *N* gén által meghatározott TMV-rezisztencia magas hőmérsékleten (28 °C felett) szintén sérül: nem alakul ki HR-típusú nekrozis és a gazdanövény a vírusfertőzésre fogékony lesz (Samuel, 1931). Amennyiben a ROS-felhalmozódás valóban meghatározó szerepet játszik a HR-típusú vírus (TMV) rezisztenciában, akkor a magas hőmérséklettel járó fogékonyság során is gátlódhat a ROS felhalmozódása. Kíváncsiak voltunk tehát arra, hogy az *N* gént hordozó, 30 °C-on tartott dohányban (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN) a TMV által kiváltott HR-típusú rezisztencia sérülése mennyiben jár együtt a ROS (szuperoxid és H₂O₂) felhalmozódás gátlásával?

A 20, ill. 30 °C-on tartott növények TMV-vel inokulált leveleiben a szuperoxid (O₂⁻) és H₂O₂ mennyiségét nitroblue-tetrazolium-kloridos (NBT), ill. diamino-benzidines (DAB) szövetfestéssel határoztuk meg, az inokuláció utáni 3 napon belüli időpontokban. A szuperoxid felhalmozódása 30 °C-on (a HR-típusú rezisztencia hiányában) jelentős mértékben visszaszorult a normál hőmérsékleten (20 °C) tartott növényekhez képest, elsősorban a TMV-fertőzött, de a kontroll inokulált („mock”) mintákban is (15. ábra). A H₂O₂ mennyisége viszont nem mutatott szignifikáns eltérést a 30 °C-on, ill. 20 °C-on tartott növények mintáiban (a késői időpontokban a 30 °C hatására a H₂O₂-szint enyhén nőtt) (15. ábra). Ezek szerint a TMV-rezisztencia magas hőmérsékleten (30 °C) történő visszaszorulásának egyik oka feltehetően a szuperoxid-szint jelentős, több mint 50 %-os csökkenése lehet.



15. ábra: Szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) és hidrogén-peroxid (H_2O_2) felhalmozódása dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzött és kontroll inokulált („Mock”) dohány (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN) levelekben, normál (20 °C) és magas (30 °C) hőmérsékleten, a TMV inokuláció utáni első 3 napon belüli időpontokban. A 30 °C-on tartott növényekben a TMV-vel szembeni hiperszenzitív (HR) típusú rezisztencia (lokális nekrotikus léziók) nem alakul ki. A szuperoxidot NBT (nitroblue-tetrazolium-klorid), míg a hidrogén-peroxidot DAB (diamino-benzidin) szövetfestéssel detektáltuk. * = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) a 20 °C-on tartott növényekhez képest.

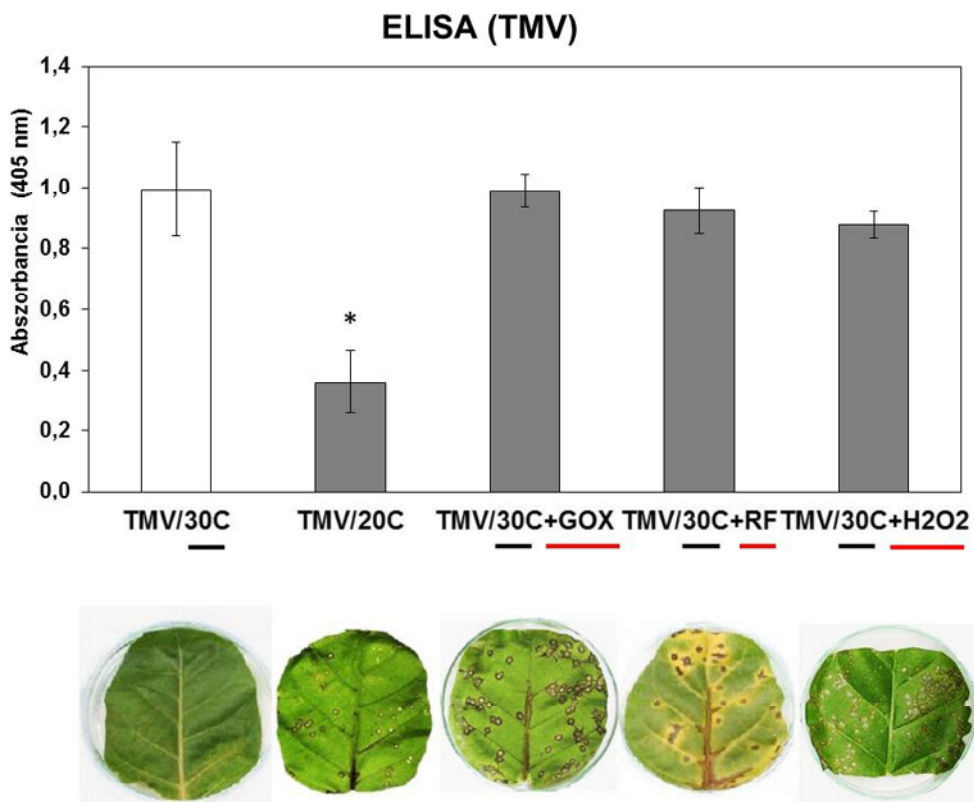
A HR-típusú vírus rezisztenciában (többek között TMV-fertőzésnél is) a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) felhalmozódását a fertőzés helyén NADPH-oxidáz enzimek katalizálják (Doke és Ohashi, 1988; Moeder et al., 2005; Lukan et al., 2020). Eredményeink szerint a 30 °C-on tartott (HR-típusú rezisztenciát nem mutató) dohány TMV-vel inokulált leveleiben a NADPH-oxidáz enzimaktivitás (az inokuláció utáni 5 napon belül) jelentősen kisebb volt, mint a normál hőmérsékleten (20 °C) tartott növényekben, mind a TMV-fertőzött, mind a kontroll inokulált („mock”) mintákban (**16. ábra**). A NADPH-oxidáz aktivitás csökkenése hasonló trendet mutatott, mint a szuperoxid-szint csökkenése (lásd 15. és 16. ábra). Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a 30 °C-on tartott, a TMV-vel szemben HR-típusú rezisztenciát nem mutató dohányban hogyan változik egy olyan, NADPH-oxidázt kódoló gén (*NtRBOHD*) expressziója, amely a növényi rezisztencia válaszokban a szuperoxid-felhalmozódást irányítja (Simon-Plas et al., 2002). Az *NtRBOHD* expressziója a 30 °C-on tartott dohány TMV-vel inokulált leveleiben a vírusfertőzés utáni korai időpontokban (6 és 12 óra) jelentősen visszaszorult a normál hőmérsékleten (20 °C) tartott növényekhez képest (kontroll inokulált „mock”) mintákban az *NtRBOHD* gén kifejeződése nem változott (**16. ábra**). Feltételezhető tehát, hogy az *NtRBOHD* kifejeződésének 30 °C-on észlelt szuppressziója hozzájárul a NADPH-oxidáz aktivitás, ill. a szuperoxid-szint csökkenéséhez, amely a HR-típusú TMV-vel szembeni rezisztencia visszaszorulásának egyik kiváltó oka.



16. ábra: NADPH-oxidáz enzimaktivitás (felső ábrarész) és egy NADPH-oxidázt kódoló gén (*NtRBOHD*) expressziója (alsó ábrarész) dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzött és kontroll inokulált („Mock”) dohány (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN) levelekben, normál (20 °C) és magas (30 °C) hőmérsékleten, a TMV inokuláció utáni első 4 napon, ill. 24 órán belüli időpontokban. A 30 °C-on tartott növényekben a TMV-vel szembeni hiperszenzitív (HR) típusú rezisztencia (lokális nekrotikus léziók) nem alakul ki. Az *NtRBOHD* gén expresszióját szemikvantitatív RT-PCR-rel mértük, referenciának egy dohány aktin gén (*NtAct*) expresszióját tekintettük. * = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) a 20 °C-on tartott növényekhez képest.

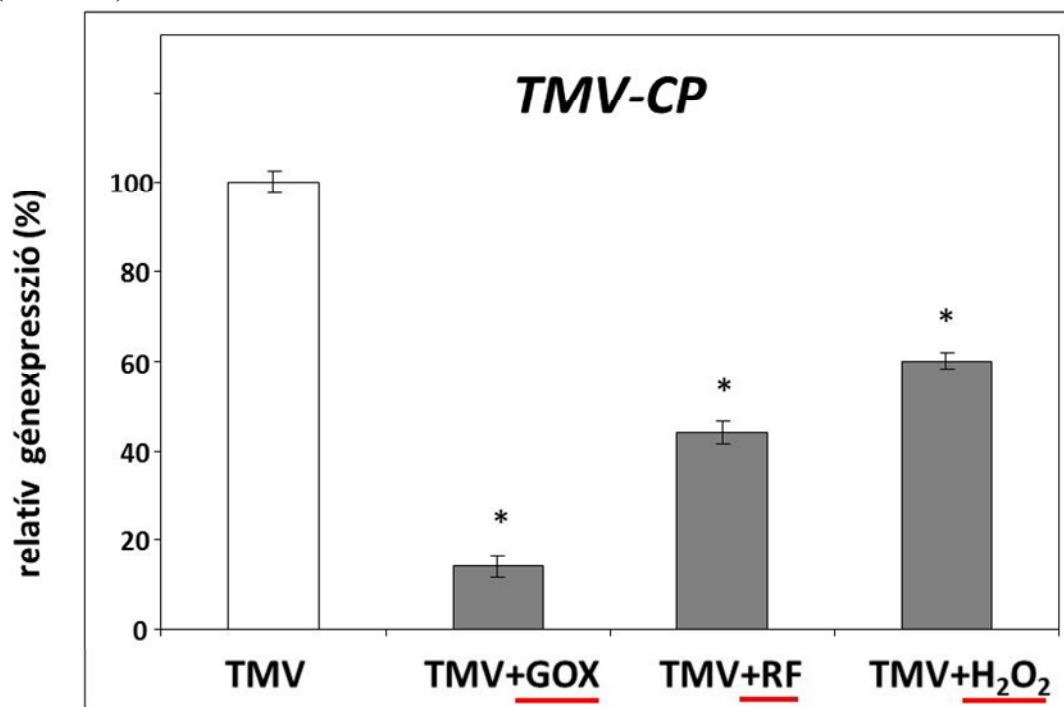
A ROS-felhalmozódás időzítése a vírusfertőzés után pár nappal vagy pár órával – hatás a TMV által kiváltott HR-típusú sejt/szövethalálra és rezisztenciára

Eredményeink szerint a HR-típusú TMV-rezisztencia magas hőmérsékleten (30 °C) történő visszatorzulásának egyik oka a ROS – elsősorban a szuperoxid – felhalmozódásának csökkenése lehet. Amennyiben a ROS ténylegesen szerepet játszik a HR-t alkotó vírus rezisztencia, ill. sejthalál kialakításában, akkor a 30 °C-on tartott dohány (*N. tabacum* cv. Xanthi NN) inokulált leveleiben a ROS-felhalmozódás mesterséges előidézése feltehetően visszaállítja a HR-típusú TMV-rezisztenciát. Ha a 30 °C-on tartott növények TMV-inokulált leveleit az inokuláció után 3 nappal szuperoxidot ($O_2^{\cdot -}$) 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 (**17. ábra**). Ezek szerint 1/ a TMV titer elsősorban a hőmérséklettől és nem a HR-típusú nekrotikus tünetektől függ, 2/ a TMV-fertőzés utáni 3. nap már túl késő a HR-típusú rezisztencia kialakításához, a lokális nekrotikus léziók megjelenése önmagában ehhez nem elégséges.



17. ábra: A magas hőmérsékleten (30 °C) tartott dohány növényekben (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN) a dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) szembeni hiperszenzitív (HR) típusú rezisztencia (lokális nekrotikus tünetekkel) nem alakul ki – a 30 °C-on tartott növényekben a HR-típusú lokális nekrozis előidézése sem befolyásolja a TMV felhalmozódását: ha a 30 °C-on tartott növények TMV-inokulált leveleit az inokuláció után 3 nappal (3 DAI) reaktív oxigénszármazékokat (ROS) képző ágensekkel kezeljük, a HR-típusú léziók kialakulnak, de a vírusrezisztencia nem. Felső ábrarész: TMV felhalmozódása az inokulált levelekben az inokuláció után 6 nappal, ELISA módszerrel mérve. Alsó ábrarész: a TMV-inokulált, 30 °C-on tartott levelek kezelése (infiltrálása) ROS-képző ágensekkel (3 DAI) további 3 nap elteltével HR-tüneteket eredményez. A magas hőmérséklet, ill. a ROS képző ágensek önmagukban nem okoztak HR-tüneteket. ROS képző ágensek: GOX = 200 U ml⁻¹ glükóz-oxidáz, 2 mM glükóz; RF = 266 µM riboflavin, 10 mM L-metionin; H₂O₂ = 25 mM H₂O₂. A kontroll növények („TMV/30” és „TMV/20”) csapvizet kaptak. * = szignifikáns különbség (p≤0,05) a 30 °C-on tartott növényekhez képest.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy TMV-re fogékony dohányban a ROS-felhalmozódás mesterséges előidézése a fertőzés utáni korai időpontokban (pár órával az inokuláció után) képes-e – HR-típusú nekrozissal vagy tünetmentesen – kialakítani a rezisztenciát? Ha a TMV-re genetikailag fogékony dohány növények (*N. tabacum* cv. Samsun nn) inokulált leveleit a vírus inokuláció után 2 órával szuperoxidot (O₂⁻) és H₂O₂-t képző ágensekkel (riboflavin / metionin, glükóz / glükóz-oxidáz, H₂O₂) kezeltük, kialakult a TMV-rezisztencia, de tünetmentesen (HR-típusú lokális nekrozis nélkül): a ROS-kezelések hatására a TMV titer a kezeltlen kontrollhoz képest legalább a felére csökkent (18. ábra).



18. ábra: Rezisztencia előidézése a dohány mozaik vírusra (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fogékony dohányban (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun nn): ha a TMV-inokulált leveleket az inokuláció után 2 órával (2 HAI) reaktív oxigénszármazékokat (ROS) képző ágensekkel kezeljük, kialakul a TMV-rezisztencia, de tünetmentesen (HR-típusú lokális nekrozis nélkül). Felső ábrarész: TMV felhalmozódása az inokulált levelekben az inokuláció után 6 nappal, valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mérve. *TMV-CP* = TMV köpenyfehérje gén. Alsó ábrarész: a TMV-inokulált levelek kezelése (infiltrálása) ROS-képző ágensekkel (2 HAI) további 6 nap elteltével sem eredményez tüneteket. ROS képző ágensek: GOX = 200 U ml⁻¹ glükóz-oxidáz, 2 mM glükóz; RF = 266 µM riboflavin, 10 mM L-metionin; H₂O₂ = 25 mM H₂O₂. A kontroll növények („TMV”) csapvizet kaptak. * = szignifikáns különbség (p≤0,05) a kontroll növényekhez képest.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy dohányban a TMV-vel szemben hatékony, tünetmentes rezisztencia alakítható ki, ha a ROS (szuperoxid, ill. H₂O₂) felhalmozódás előidézése a vírusfertőzés utáni korai időpontokban (pl. 2 órával) történik, míg a fertőzés utáni későbbi időpontokban (pl. 3 nappal) adott ROS-kezeléseknél a HR-típusú nekrotikus léziók megjelenése nem jár együtt a vírusrezisztenciával. Ezek szerint a fertőzött növényben 1/ a megfelelően időzített, korai (a fertőzés után pár órával) ROS-felhalmozódás szükséges a vírus rezisztencia kialakításához, 2/ a későn időzített ROS-felhalmozódás hatására kialakuló HR-típusú, lokális nekrotikus tünetek nem feltétlenül jelzik a vírus rezisztencia meglétét.

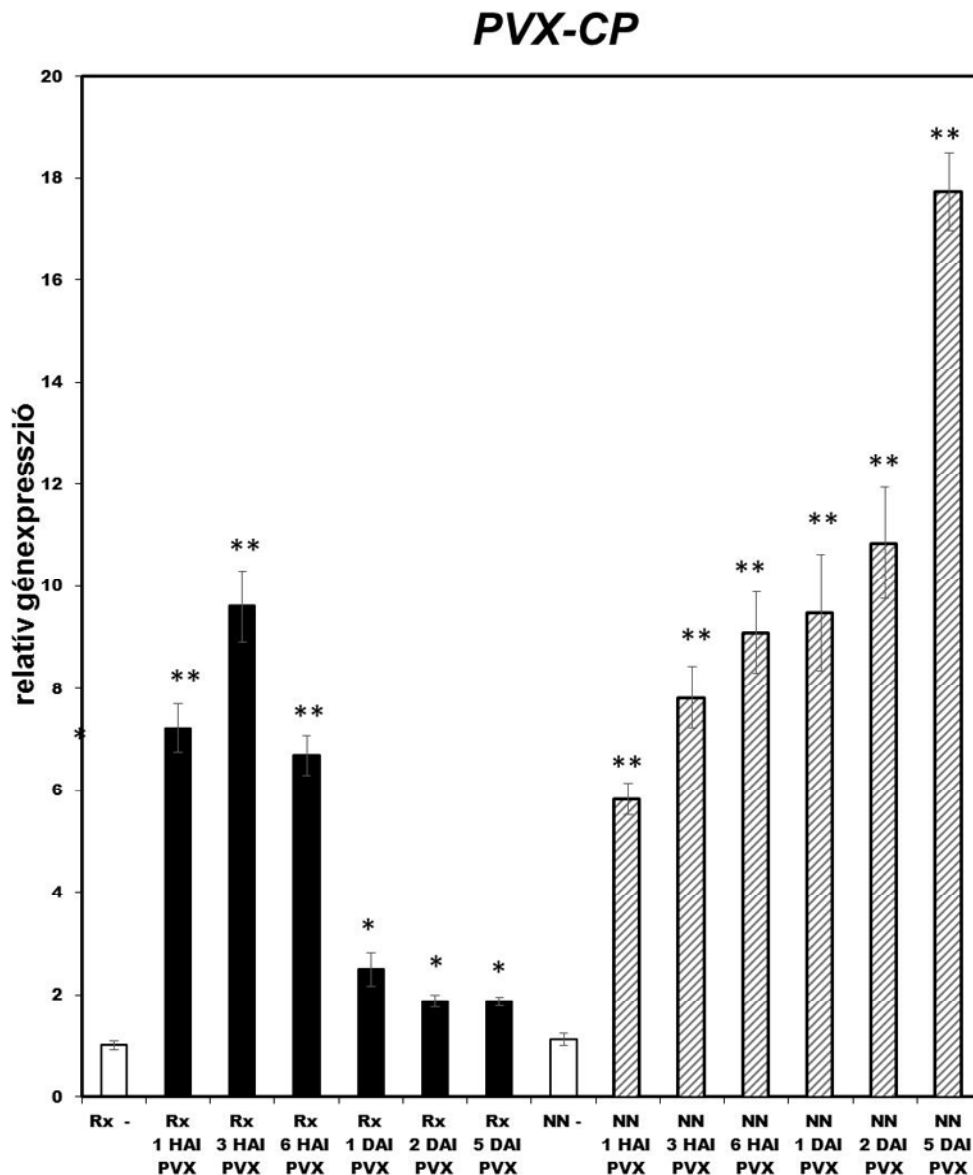
A ROS-felhalmozódás szerepe a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) által kiváltott tünetmentes, extrém rezisztenciában (ER)

Eredményeink alapján a TMV-fertőzött, fogékony dohányban a tünetmentes (HR nélküli) vírus rezisztencia kialakításához a ROS korai (a fertőzés után 2 órával) felhalmozódása szükséges (ld. előző fejezet). Ezek szerint a korai ROS (pl. szuperoxid) felhalmozódás lehet az egyik oka a gyors és hatékony, tünetmentes, ún. extrém rezisztenciának (ER) is az olyan vírusokkal szemben, mint pl. a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX), ahogy azt már több mint 20 éve feltételezték (Bendahmane et al., 1999). A burgonyában a PVX legtöbb törzse ellen hatásos ER-t az *Rx* rezisztencia gének (*Rx1* és *Rx2*) biztosítják, és ez a tünetmentes rezisztencia az *Rx1* gént kifejező transzgenikus dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun NN *Rx1*) is megnyilvánul (ld. Bendahmane et al., 1999). Kíváncsiak voltunk arra, hogy az *Rx1* gént kifejező transzgenikus dohánynak a PVX-fertőzésre adott tünetmentes, extrém rezisztenciájában van-e tényleges szerepe a ROS – elsősorban a szuperoxid – korai (a fertőzés után pár órán belüli) felhalmozódásának?

A burgonya X vírus (Potato virus X, PVX) által az Rx1 gént kifejező dohányban kiváltott tünetmentes, extrém rezisztencia 6-24 órán belül kialakul

Ismert, hogy az általunk használt magyar PVX izolátum (PVX-Ny) tünetmentes, extrém ellenállóságot (ER) vált ki az *Rx1* rezisztencia gént kifejező burgonyában (Ahmadvand et al., 2012). Kimutattuk, hogy a PVX-Ny az *Rx1* gént kifejező transzgenikus

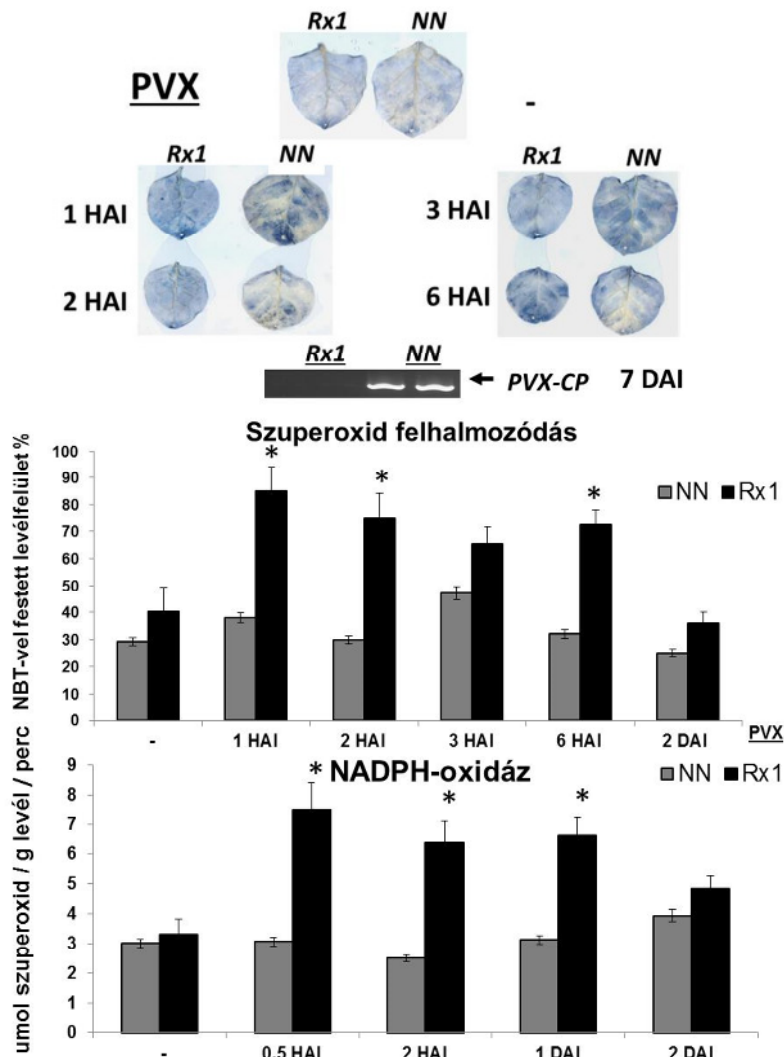
dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) szintén nem okoz makroszkopikus tüneteket, sem az inokulált, sem a felső, nem-inokulált levelekben, ami az ER kialakulására utal (a fogékony – Rx1 gént nem tartalmazó – dohányban a PVX-Ny enyhe lokális sárgulást és szisztemikus mozaikot okozott). Az ER-t mutató Rx1 dohány inokulált leveleiben a PVX felhalmozódása az inokuláció utáni 6. órát követően meredeken csökkent, míg a vad típusú, fogékony növényekben a vírus titer folyamatosan emelkedett (19. ábra). A vírus inokuláció után 5 nappal a PVX szint az ER-t mutató Rx1 dohányban már kb. egy nagyságrenddel volt kisebb, mint a fogékony növényekben. Eredményeink szerint a PVX által az Rx1 gént kifejező dohányban kiváltott tünetmentes, extrém rezisztencia meglehetősen korán, az inokuláció után 6-24 órán belül kialakul.



19. ábra: Burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) felhalmozódása az Rx1 extrém rezisztenciagént kifejező dohányban (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN Rx1) és a fogékony kontroll növényekben (*N. tabacum* cv. Samsun NN), a vírusfertőzés után különböző időpontokban (1, 3 és 6 óra, 1, 2 és 5 nap), valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mérve. PVX-CP = PVX köpenyfehérje gén. * és ** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) a fertőzetlen mintákhoz (-) képest.

A burgonya X vírus (Potato virus X, PVX) által az Rx1 gént kifejező dohányban kiváltott tünetmentes, extrém rezisztenciát megelőzi a szuperoxid korai felhalmozódása

Korábbi kutatások feltételezték, hogy a PVX fertőzésére burgonyában, ill. dohányban kialakuló, az *Rx1* gén által meghatározott tünetmentes, extrém rezisztenciában (ER) meghatározó szerepe lehet a ROS, elsősorban a szuperoxid (O_2^-) gyors, korai felhalmozódásának (Bendahmane et al., 1999). E hipotézis alapján egyik fő célkitűzésünk volt annak tisztázása, hogy az *Rx1* gént kifejező transzgenikus dohánynak a PVX-fertőzésre adott extrém rezisztenciájában van-e tényleges szerepe a fertőzés utáni korai (a fertőzés után pár órán belüli) szuperoxid felhalmozódásnak? A szuperoxid szintet egy ER-t mutató és fogékony dohány vonalban (*N. tabacum* cv. Samsun NN *Rx1* és NN) nitroblue-tetrazolium-kloridos (NBT) szövetfestéssel detektáltuk, a PVX-inokuláció után 1, 2, 3 és 6 órával, valamint 2 nappal. Kimutattuk, hogy a szuperoxid az ER-t mutató levelekben (*Rx1* dohány) a PVX-fertőzés után már 1 és 2 órán belül is jóval intenzívebben halmozódik fel, mint a fogékony növényekben (20. ábra). Az NBT szövetfestés kvantifikálása alapján viszont egyértelmű volt az is, hogy a vírusfertőzés utáni 2. napra a szuperoxid mennyisége az ER-t mutató *Rx1* dohánylevelekben a fertőzetlen, ill. PVX-re fogékony növényekre jellemző szintre esik vissza (20. ábra).



20. ábra: A burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) által dohányban (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN Rx1) kiváltott tünetmentes, extrém rezisztencia együtt jár a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) korai felhalmozódásával és a fokozott NADPH-oxidáz enzimaktivitással. Felső ábrarész: Szuperoxid felhalmozódása a PVX-re extrém rezisztens Rx1 dohányban és a fogékony kontroll növényekben (*N. tabacum* cv. Samsun NN), a PVX inokuláció után 1, 2, 3 és 6 órával (- = fertőzetlen növények). A szuperoxidot NBT (nitroblue-tetrazolium-klorid) szövetfestéssel detektáltuk. A panel alsó részén levő gékép a PVX-szel szembeni extrém rezisztencia meglétét/hiányát szemlélteti a vizsgált növényekben, 7 nappal a vírus inokuláció után (a PVX mennyisége szemikvantitatív RT-PCR-rel mérve, *PVX-CP* = PVX köpenyfehérje gén). Középső ábrarész: A szuperoxid felhalmozódás (NBT szövetfestéssel detektálva) kvantifikálása, a PVX-re extrém rezisztens Rx1 dohányban és a fogékony kontroll növényekben, a PVX inokuláció után 1, 2, 3 és 6 órával valamint 2 nappal (- = fertőzetlen növények). Alsó ábrarész: NADPH-oxidáz enzimaktivitás a PVX-re extrém rezisztens Rx1 dohányban és a fogékony kontroll növényekben, a PVX inokuláció után 0,5 és 2 órával valamint 1 és 2 nappal. * = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) a fogékony kontroll növényekhez képest.

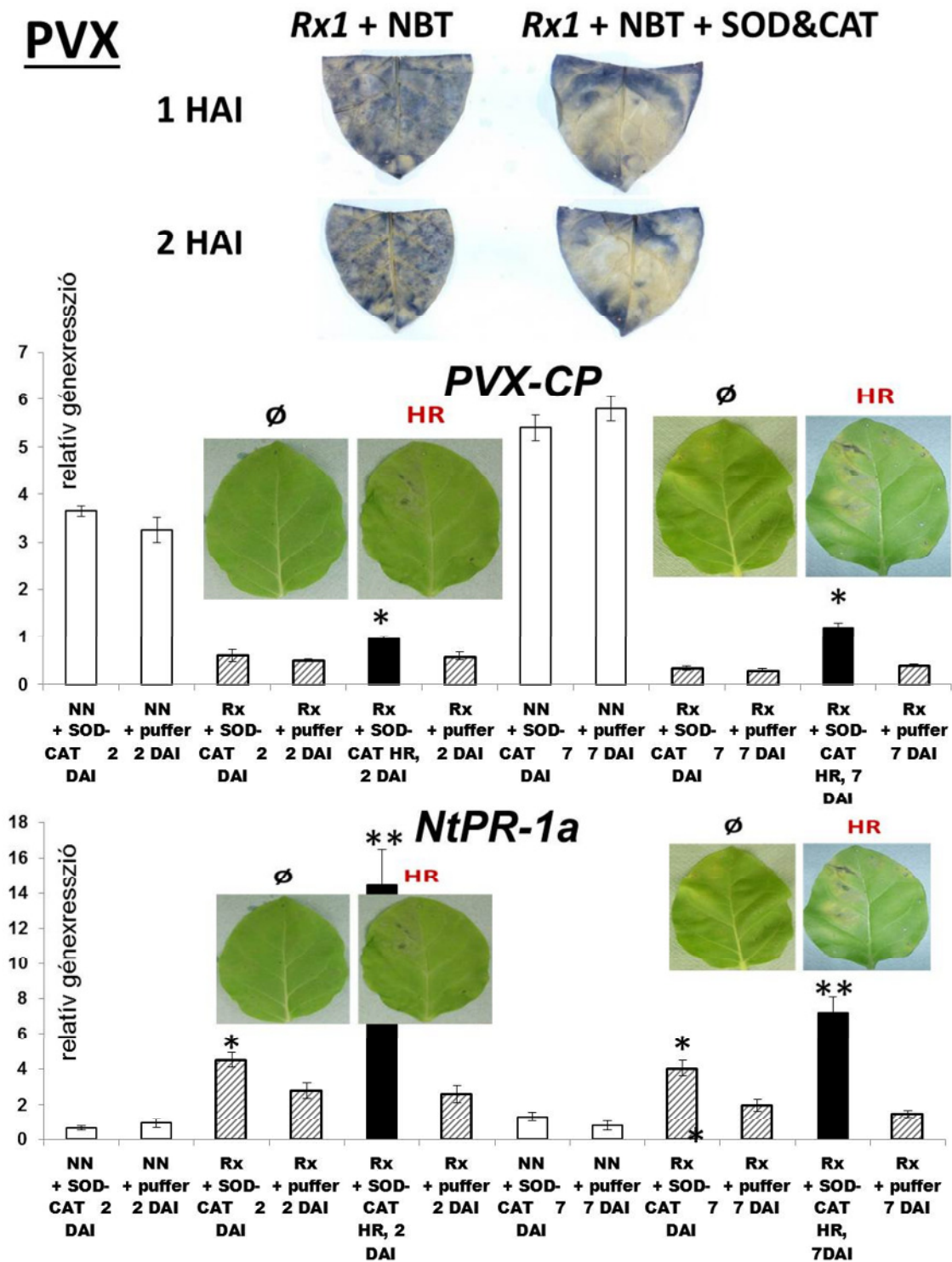
Eredményeink szerint tehát a PVX által kiváltott tünetmentes ER során a szuperoxid a vírusfertőzés utáni 6 órán belül halmozódik fel jelentős mértékben, míg a PVX titer csak ezt követően (az inokuláció után 6-24 órán belül) esik vissza (vö. a 19. és 20. ábrát). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a tünetmentes ER során a szuperoxid közvetlenül is hozzájárulhat a fertőző vírus (PVX) gátlásához.

Mivel a NADPH-oxidázoktól függő szuperoxid felhalmozódás a HR-típusú vírus rezisztencia egyik jellemzője (Doke és Ohashi 1988; Rossetti és Bonatti, 2001; Király et al., 2008), feltételezhető, hogy egy hasonló folyamat a tünetmentes ER kialakításához is hozzájárulhat. A NADPH-oxidáz enzimaktivitást ER-t mutató és fogékony dohány vonalban (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1 és NN) mérve azt tapasztaltuk, hogy az ER során jelentkező fokozott, korai (a PVX-inokuláció után 1 napon belüli) NADPH-oxidáz aktivitás jól követi a szuperoxid felhalmozódásának időbeli mintázatát (**20. ábra**). Ezek szerint a NADPH-oxidáz aktivitással összefüggő szuperoxid felhalmozódás fontos szerepet játszhat a PVX-szel szembeni tünetmentes, extrém rezisztencia kialakításában.

A szuperoxid-felhalmozódás hozzájárul a PVX által dohányban kiváltott extrém rezisztenciához: antioxidáns enzimek (SOD és CAT) infiltrálása visszaszorítja a szuperoxidot és a rezisztenciát

Megfigyeltük, hogy a PVX által kiváltott tünetmentes ER során jelentkező korai szuperoxid-felhalmozódás, ill. NBT szövetfestés (ld. 20. ábra) visszaszorítható, ha az inokulált leveleket az NBT mellett antioxidáns enzimekkel (szuperoxid-dizmutáz, SOD és kataláz, CAT) infiltráljuk a PVX fertőzés utáni 1. és 2. órában (1 és 2 HAI) (**21. ábra**). A SOD a szuperoxidnak ($O_2^{\cdot-}$) hidrogén-peroxiddá (H_2O_2) történő átalakulásáért (dizmutációjáért), míg a CAT a H_2O_2 lebomlásáért felelős (Halliwell és Gutteridge 2015). Ezzel a kísérlettel tehát igazoltuk, hogy 1/ a PVX-szel fertőzött, extrém rezisztens (ER) dohánylevelekben az NBT specifikusan reagál a szuperoxiddal, 2/ a SOD és CAT infiltrálása a PVX által kiváltott ER-t megelőzően (1 és 2 HAI) termelt rendkívül nagy mennyiségű szuperoxidot is képes visszaszorítani. Mindezek alapján feltételeztük, hogy a PVX fertőzés kezdetétől biztosított nagy *in planta* antioxidáns kapacitás nemcsak a szuperoxid szintet csökkenti, de a tünetmentes, extrém vírus rezisztenciát is képes visszaszorítani. Korábbi kutatások alapján ugyanis ismert, hogy pl. árpában a liztharmat

(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) által kiváltott tünetmentes rezisztencia antioxidáns (SOD és CAT) kezelések hatására jelentősen csökken (Hafez és Király, 2003).



21. ábra: A szuperoxid (O_2^-) korai felhalmozódása és a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) által dohányban (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN Rx1) kiváltott tünetmentes, extrém rezisztencia (ER) visszazorítható, ha a PVX-szel inokulált leveleket antioxidáns enzimekkel (szuperoxid-dizmutáz, SOD és kataláz, CAT) infiltráljuk. Felső ábrarész: A szuperoxidot NBT (nitroblue-tetrazolium-klorid) szövetfestéssel detektáltuk. A PVX inokuláció után 1, ill. 2 órával (HAI) a baloldali leveleket NBT-vel, míg a jobboldali leveleket ugyanezekben az időpontokban NBT-vel, valamint SOD (3000 U/ml) és CAT (CAT, 5000 U/ml) enzimekkel infiltráltuk. Az NBT specifikusan reagál a szuperoxiddal, mivel az NBT-festés (szuperoxid

felhalmozódás) SOD és CAT jelenlétében visszaszorul. Középső ábrarész: A PVX által dohányban kiváltott tünetmentes ER antioxidáns (SOD és CAT) kezelése hatására részlegesen visszaszorul, ez a vírusfertőzés után 2 és 7 nappal is észlelhető. Az ER-t mutató és fogékony dohányok (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1 és NN) PVX-szel inokulált leveleinek bal, ill. jobb felét a vírusfertőzés után közvetlenül SOD (3000 U/ml) és CAT (5000 U/ml) oldattal, ill. 10 mM kálium-foszfát pufferrel (pH=7,8) infiltráltuk. A „SOD-CAT” és „puffer” jelzésű oszlopok a PVX felhalmozódását mutatják egy adott inokulált levél bal, ill. jobb felében. HR = hiperszenzitív lokális nekrozisra (HR) emlékeztető tünetek az inokulált levelek bal felében. A PVX felhalmozódását valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel (RT-qPCR) mértük. PVX-CP = PVX köpenyfehérje gén. Alsó ábrarész: A PVX által dohányban kiváltott tünetmentes ER visszaszorulása együtt jár a HR megjelenésével és egy patogenezissel-kapcsolatos (PR) gén, az *NtPR-1a* fokozott expressziójával (RT-qPCR). * és ** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) a pufferrel infiltrált levélfelekhez képest.

Amennyiben tehát az *Rx1* gént kifejező dohányban a PVX fertőzésénél tapasztalt korai szuperoxid felhalmozódás ténylegesen hozzájárul az ER-hez, akkor a szuperoxid szint csökkentése antioxidáns (SOD és CAT) kezelésekkal legalább részben megtörheti ezt a tünetmentes vírus rezisztenciát is. A hipotézis bizonyításához az ER-t mutató és fogékony dohányok (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1 és NN) PVX-szel inokulált leveleinek bal, ill. jobb felét a vírusfertőzés után közvetlenül SOD (3000 U/ml) és CAT (5000 U/ml) oldattal, ill. pufferrel infiltráltuk. Az *Rx1* dohányok a PVX fertőzésére ER-t adtak, de a vírusfertőzés után 2-7 nappal a növények kb. felénél az antioxidáns enzimekkel (SOD és CAT) infiltrált levélfélben szabad szemmel látható, hiperszenzitív lokális nekrozisra (HR) emlékeztető tünetek alakultak ki és ezzel együtt a PVX mennyisége is jelentősen (kb. kétszeresére) nőtt a többi, tünetmentes (SOD/CAT-infiltrált, ill. puffer-infiltrált) levélfélhez képest. Ugyanakkor a PVX-re fogékony dohánynövények inokulált levelei enyhe sárgulásos tüneteket és nagyon magas vírus titert mutattak, függetlenül az antioxidáns (SOD/CAT) kezelésektől vagy hiányától (nem bemutatott adatok, **21. ábra**).

Érdekes, hogy a PVX által kiváltott ER részleges visszaszorulása és a HR-re emlékeztető szöveti nekrozis megjelenése jól korrelált egy ún. patogenezissel kapcsolatos (PR) gén, az *NtPR-1a* fokozott expressziójával, amely a HR-szerű tüneteket mutató, SOD/CAT-infiltrált levélfelekben a PVX fertőzés után már 2 nappal észlelhető volt (**21. ábra**). Ez a megfigyelésünk megerősíti azokat a korábbi eredményeket, amelyek szerint vírusfertőzések során egyes PR gének, ill. fehérjék (pl. PR-1a) a rezisztenciával járó szöveti stressz (HR-nekrozis) markerei, de a rezisztenciában nincs tényleges szerepük (Cutt et al., 1989; Linthorst et al., 1989).

Eredményeink rámutatnak arra, hogy a szuperoxid ténylegesen hozzájárul a PVX fertőzés által kiváltott tünetmentes, extrém vírus rezisztenciához (ER), mivel a szokásosnál nagyobb *in planta* antioxidáns kapacitás nemcsak a korai szuperoxid-felhalmozódást, de az ER-t is képes – legalább részben – visszaszorítani. Ugyanakkor a szuperoxid-felhalmozódás és az ER gátlása egy HR-típusú (lokális nekrotikus léziókkal járó) rezisztenciához vezet, amely már nem képes hatékonyan csökkenteni a fertőző vírus replikációját (ld. Bendahmane et al., 1999).

A hidroxilgyök (OH) is hozzájárulhat a PVX által dohányban kiváltott extrém rezisztenciához: a ferritin túltermelése (OH hiánya) visszaszorítja a rezisztenciát

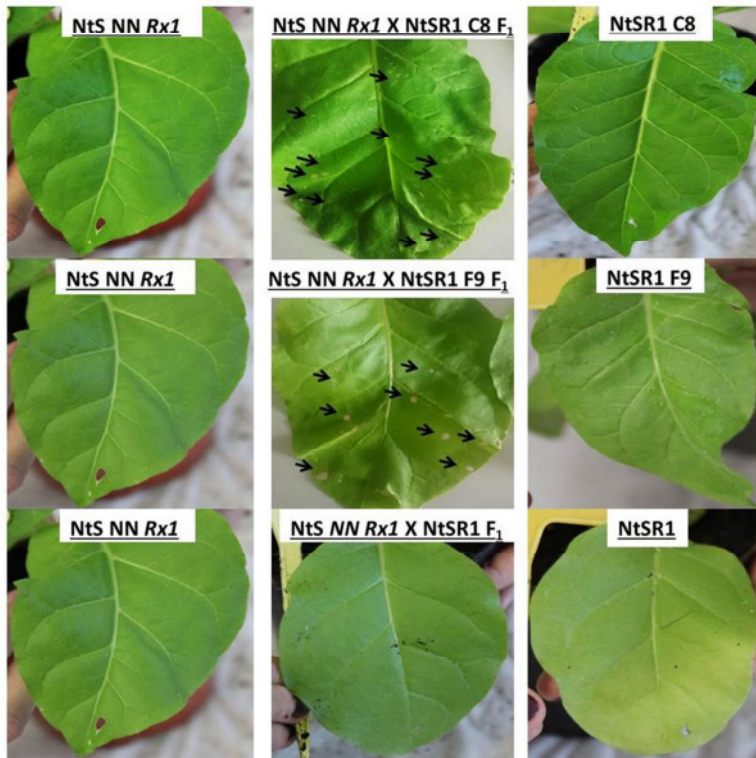
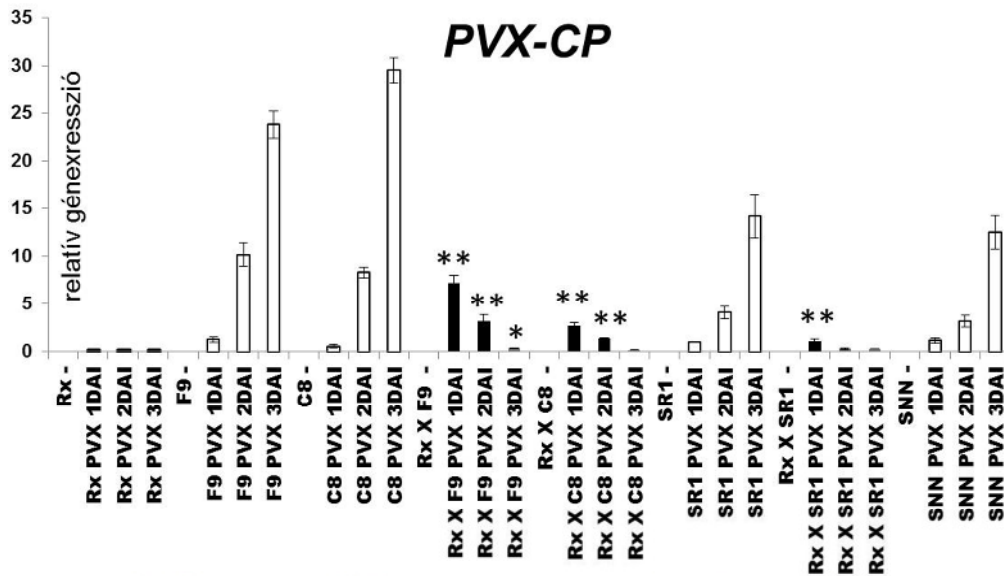
Újabb kutatások szerint egy ROS, a hidrogén-peroxid (H_2O_2) a PVX által kiváltott extrém rezisztencia egyik lehetséges összetevője: *Nicotiana benthamiana*-ban a PVX mesterségesen termelt effektora (a vírus köpenyfehérje) az Rx1 fehérje aktiválása után 1-2 órán belül jelentős mértékű hidrogén-peroxid felhalmozódást okoz (Knip et al., 2019). Ha a ROS (pl. szuperoxid és esetleg H_2O_2 vagy más ROS) korai felhalmozódása valóban hozzájárul a PVX által dohányban kiváltott extrém rezisztenciához (ER), akkor az *in planta* ROS-termelés gátlása legalább részben visszaszoríthatja ezt a tünetmentes vírus rezisztenciát.

A fentiek alapján tisztázni szeretnénk volna, hogy a hidroxilgyök (OH^\cdot) – az egyik leginkább reakcióképes ROS, amely pl. H_2O_2 -ből és szabad vasból (Fe^{2+}) keletkezhet – milyen szerepet játszik a PVX által dohányban kiváltott ER-ban? A kísérletekhez olyan transzgenikus dohányokat használtunk, amelyek túltermelnek egy lucernából származó, vasat megkötő (raktározó) fehérjét, a ferritint (Deák et al., 1999). A ferritinek a növényi sejtek oxidatív stressz elleni védelméhez járulnak hozzá úgy, hogy megkötik a OH^\cdot -termelésben részt vevő Fe^{2+} -t, így a ferritin-túltermelő növények OH^\cdot -hiányosnak tekinthetők (Deák et al., 1999; Van Wuytswinkel et al., 1999; Ravet et al., 2009; Zang et al., 2017).

Feltételeztük, hogy az ER-t mutató Rx1 dohányvonalat a ferritint túltermelő növényekkel keresztezve az F_1 utódokban csökken a ROS képződés és így a PVX fertőzésével szemben az ER helyett egy legalább részleges fogékonyság alakulhat ki. Az Rx1 dohányokat (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) két ferritin túltermelő dohánnyal (*N. tabacum* cv. SR1: C8 és F9 vonal) kereszteztük: a C8 vonalban a lucerna ferritin gén (*MsFer*) rövidebb formája expresszálódik (a szignál peptid nélkül), míg az F9 vonal a teljes fehérjét fejezi ki (Deák et al., 1999). Kontrollként az Rx1 dohányt a – normál ferritin szintet mutató – vad típusú SR1 vonallal is kereszteztük.

A keresztezésekből kapott F_1 utódgenerációkban a PVX felhalmozódását mérve azt tapasztaltuk, hogy a ferritin túltermelő F_1 hibrid egyedekben ($Rx1 \times C8$ és $Rx1 \times F9$) az ER részlegesen visszaszorult, mivel az inokulált levelekben a PVX titer kb. egy nagyságrenddel nagyobb volt, mint az Rx1 dohányban, de csak a vírusfertőzés első 2 napjában. Érdekes viszont, hogy a normál ferritin szintet mutató F_1 hibrid egyedekben ($Rx1 \times SR1$) a PVX által kiváltott ER – a ferritin túltermelő F_1 növényekhez képest – alig szorult vissza. Ezek szerint az *in planta* ROS (OH^\cdot) képződés ferritin túltermelés miatti gátlása specifikusan képes visszaszorítani ezt a tünetmentes vírus rezisztenciát. A kapott eredményt megerősíti az a megfigyelésünk is, hogy a ferritin túltermelő szülő dohányvonalak (cv. SR1: C8 és F9) sokkal fogékonyabbak voltak a PVX fertőzésére, mint a – normál ferritin szintet mutató – vad típusú vonalak (cv. SR1 és cv. Samsun NN) (**22. ábra**). A ferritin túltermelésnek a PVX elleni ER visszaszorulásában játszott szerepét jelzi az is, hogy a vírusfertőzés után 5 nappal a legtöbb ferritin túltermelő F_1 egyed ($Rx1 \times C8$ és $Rx1 \times F9$) inokulált leveleiben szabad szemmel látható HR-típusú nekrotikus léziók alakultak ki, míg a normál ferritin szintet mutató F_1 hibrid egyedek ($Rx1 \times SR1$) tünetmentesek maradtak (**22. ábra**). Eredményeink szerint az *in planta* ROS (OH^\cdot) képződés ferritin túltermelés miatti gátlása részlegesen, de kimutathatóan képes visszaszorítani a PVX által kiváltott tünetmentes, extrém rezisztenciát, és egy HR-típusú

(lokális nekrotikus léziókkal járó) rezisztenciához vezet, amely már jóval kevésbé képes csökkenteni a fertőző vírus replikációját (ld. Bendahmane et al., 1999).

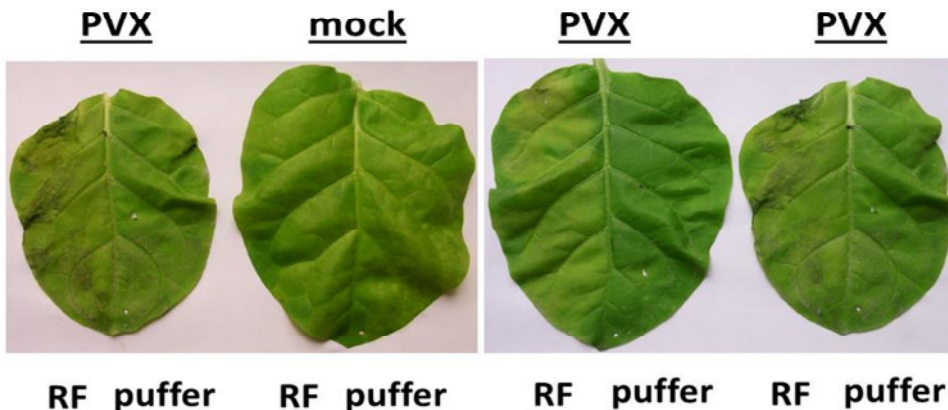
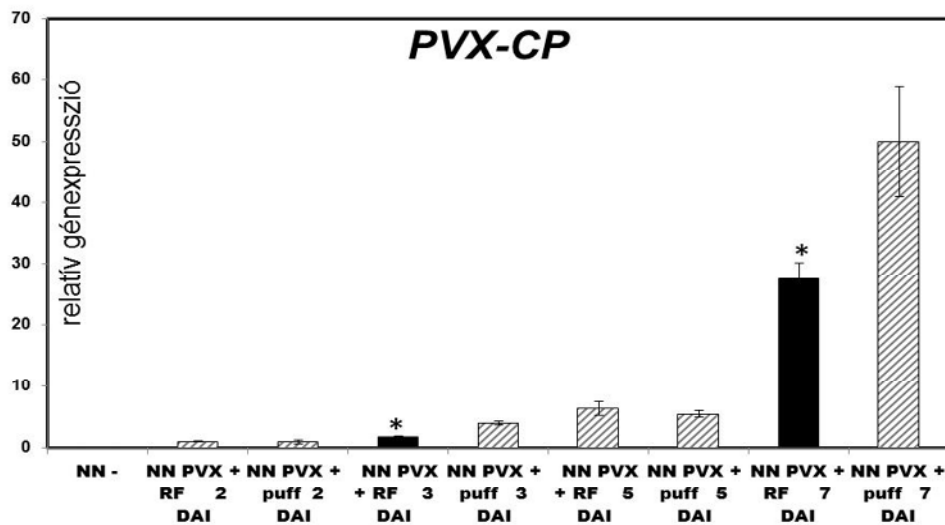


22. ábra: A burgonya X vírussal (*Potato virus X*, PVX) szembeni tünetmentes, extrém rezisztencia (ER) részleges megtörése ER-t mutató dohány (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN Rx1) és két fogékony, ferritint túltermelő dohányvonal (*N. tabacum* cv. SR1: C8 és F9) keresztezéséből kapott F₁ utódnövényekben, a PVX fertőzés első 5 napján. Kontrollként az Rx1 dohányt a – normál ferritin szintet mutató – vad típusú SR1 vonallal is kereszteztük (- = fertőzetlen növények; SNN = fogékony kontroll vad típusú cv. Samsun NN dohányvonal). Felső ábrarész: Az inokulált levelekben a PVX felhalmozódását (*PVX-CP* relatív génexpresszió) valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel követtük a PVX inokuláció után 1, 2, és 3 nappal. * és ** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) a PVX-szel inokulált mintákban az Rx1 – Rx1 × F9 F₁, Rx1 – Rx1 × C8 F₁ és Rx1 – Rx1 × SR1 F₁ növények között. Alsó ábrarész: A PVX által dohányban kiváltott tünetmentes ER részleges visszazorulása az inokulált levelekben a fertőzés 5. napján együtt jár a hiperszenzitív lokális nekrotikus léziók megjelenésével (HR, nyilakkal jelölve) az Rx1 × C8 F₁ és Rx1 × F9 F₁ növényekben, de nem az Rx1 × SR1 F₁ dohányban.

A külsőleg előidézett szuperoxid-felhalmozódás PVX-rezisztenciát alakít ki fogékony dohányban (cv. Samsun NN)

Korábban kimutattuk, hogy TMV-vel fertőzött, fogékony dohányban tünetmentes (HR nélküli) vírus rezisztencia alakítható ki, ha a fertőzés után 2 órával az inokulált leveleket egy szuperoxidot (O_2^-) képző ágenssel (riboflavin/metionin) infiltráljuk (ld. 18. ábra). Azt is megfigyeltük, hogy a PVX-re tünetmentes extrém rezisztenciát (ER) adó Rx1 dohányban a vírusfertőzés után már 1 és 2 órával intenzíven felhalmozódik a szuperoxid (ld. 20. ábra). Ha az *Rx1* gént kifejező PVX-rezisztens dohányban a ROS (pl. szuperoxid és OH^\cdot) korai felhalmozódása ténylegesen hozzájárul az ER-hez, akkor fogékony dohányban az *in planta* szuperoxid szint növelése mérsékelheti a fogékonyságot (azaz a fogékony dohányban legalább részleges rezisztencia alakul ki a PVX fertőzésével szemben).

A fenti hipotézis bizonyításához PVX fertőzésére fogékony dohány (*N. tabacum* cv. Samsun NN) inokulált leveleinek egyik felét a vírusfertőzés után 2 órával szuperoxidot képző ágenssel (RF = 66 μ M riboflavin és 10 mM L-metionin), míg a másik levélfelet pufferrel infiltráltuk. Ezek a növények továbbra is fogékonyak voltak a PVX-re, de a vírusfertőzés után 3 és 7 nappal az inokulált levelek RF-infiltrált felében a vírusszint jelentősen (kb. 50 %-al) kisebb volt a pufferrel infiltrált levélfelhez képest (23. ábra).



23. ábra: A burgonya X vírussal (*Potato virus X*, PVX) szembeni részleges rezisztencia kialakítása fogékony dohányban (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) a PVX fertőzés utáni első 7 napon, szuperoxidot ($O_2^{\cdot-}$) képző ágens (66 μ M riboflavin, 10 mM L-metionin) infiltrálásával az inokulált levelek egyik felébe (RF) a vírusfertőzést követően 2 órával. A levelek másik felét 10 mM kálium-foszfát pufferrel (pH=7,8) infiltráltuk. Felső ábrarész: Az inokulált levelekben a PVX felhalmozódását (PVX-CP relatív génexpresszió) valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel követtük a PVX inokuláció után 2, 3, 5 és 7 nappal. - = fertőzetlen növények. * = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) a pufferrel infiltrált levélfelekhez képest. Alsó ábrarész: Az RF-infiltrált levélfelekben a PVX-szel szembeni részleges rezisztencia kialakítása együtt jár a hiperszenzitív lokális nekrozisra (HR) emlékeztető tünetek megjelenésével a vírusfertőzés 5. napján. mock = kontroll inokulált növények.

A PVX fertőzés utáni 5. napra ugyanakkor az RF-infiltrált levélfelek nagy részében szabad szemmel látható, erősebb vagy gyengébb, HR-típusú lokális nekrozisra emlékeztető tünetek alakultak ki (**23. ábra**). Eredményeink szerint a PVX-re fogékony dohányban az *in planta* szuperoxid (ROS) szint mesterséges növelése feltehetően nem képes extrém rezisztenciát előidézni, de részben képes visszaszorítani a PVX replikációját, és így egy lassabb, HR-típusú rezisztenciához vezet (ld. Bendahmane et al., 1999).

Eredményeink rámutatnak arra, hogy 1/ a PVX fertőzésével szembeni tünetmentes, extrém rezisztenciánál a ROS (pl. szuperoxid és OH^{\cdot}) korai felhalmozódása ténylegesen hozzájárul a vírus replikáció gátlásához, és 2/ megerősítik azokat a korábbi eredményeket, amelyek szerint a vírusfertőzések által indukált HR-típusú (lokális nekrotikus léziókkal járó) rezisztencia egy viszonylag későn, lassabban kialakuló védekezési folyamat, mint a tünetmentes extrém rezisztencia (ld. pl. Bendahmane et al., 1999; Hernández et al., 2016; Künstler et al., 2016).

Tünetmentes nemgazda rezisztencia biotróf gombakórokozókkal (pl. liztharmat) szemben – a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) korai felhalmozódásának szerepe

Kutatásaink során tisztáztuk, hogy egyes növényi vírusfertőzéseknel a reaktív oxigénszármazékok (ROS) – elsősorban a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) – korai felhalmozódásának meghatározó szerepe van abban, hogy a rezisztencia gyors és tünetmentes legyen, és ne alakuljon ki a sejt/szövetállal járó hiperszenzitív reakció (HR) (ld. az Eredmények előző fejezetét). Emellett azonban kíváncsiak voltunk arra is, hogy a ROS (szuperoxid) milyen funkciót töltenek be abban a tünetmentes (ún. I. típusú) nemgazda rezisztenciában, amelyet a biotróf (a fertőzéskor élő növényi sejtekből táplálkozó) gombakórokozók – elsősorban liztharmatok és rozsdák – váltanak ki azokon a növényfajokon, amelyeket nem tudnak megfertőzni?

A szuperoxid (O_2^-) korai felhalmozódása a biotróf gombakórokozók által kiváltott tünetmentes nemgazda rezisztencia jellemzője

A szuperoxid (O_2^-) felhalmozódás mintázatát háromféle típusú növény-kórokozó kapcsolatban hasonlítottuk össze, amelyek 1/ fogékonyással, 2/ tünetmentes (ún. I. típusú) nemgazda rezisztenciával vagy 3/ sejt/szövetelállal (lokális nekrotikus léziók) kísért, HR-típusú gazda rezisztenciával járnak. Valamennyi általunk vizsgált növény-kórokozó kapcsolatban biotróf gombakórokozókat (lisztharmatok [*Blumeria* és *Erysiphe* spp.] és rozsdák [*Puccinia* spp.]) használtunk, ill. a hemibiotróf (= csak a fertőzés korai szakaszában biotróf) burgonyavész kórokozót (*Phytophthora infestans*). A szuperoxidot az inokuláció után 1, 2, 3 vagy 4 nappal detektáltuk, az inokulált levelek nitroblue-tetrazolium-kloridos (NBT) szövetfestésével. Eredményeink szerint a vizsgált időpontokban a szuperoxid felhalmozódása mindkét rezisztencia típusnál (tünetmentes nemgazda- és HR-típusú gazda rezisztencia) észlelhető volt, míg a tipikus betegség tünetekkel járó fogékony növény-patogén kapcsolatokban nem. Hangsúlyozandó ugyanakkor, hogy a szuperoxid-felhalmozódás a tünetmentes nemgazda rezisztenciánál mindig kb. 24 órával korábban jelentkezett, mint a HR-típusú gazda rezisztenciánál (**3. táblázat**).

A **24. ábrán** bemutatott képek alapján az árpának (cv. Ingrid Mla12) a búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciáját jól jelzi a szuperoxid korai (1 nappal az inokuláció után, 1 DAI) felhalmozódása, míg az árpalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh) szembeni HR-típusú gazda rezisztencia során ebben az időpontban (1 DAI) nem detektálható jelentős mennyiségű szuperoxid. A lisztharmat inokuláció után 2 nappal (2 DAI) viszont mindkét rezisztencia típusnál (tünetmentes nemgazda rezisztencia Bgt-re és HR-típusú gazda rezisztencia Bgh-ra) nagy mennyiségű szuperoxid halmozódott fel a cv. Ingrid Mla12 árpa levelekben. Az árpalisztharmatra (Bgh) fogékony cv. Ingrid Mlo (vad típusú) árpa leveleiben a Bgh inokulációja utáni 2. napig (2 DAI) nem észleltünk szuperoxid felhalmozódást (**24. ábra**). Az árpa Bgt-vel 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. Ezekben a növény-kórokozó kapcsolatokban, amennyiben a levelekbe a Bgt-inokuláció után közvetlenül két antioxidáns enzimet (szuperoxid-dizmutáz, SOD és kataláz, CAT) infiltráltunk, jelentősen visszaszorult az NBT szövetfestés mértéke. Mivel a SOD és CAT a szuperoxid (O_2^-) H_2O_2 -dá történő átalakulásáért (dizmutációjáért), ill. a H_2O_2 lebomlásáért felelős (Halliwell és Gutteridge 2015), ezért ez az eredményünk igazolta, hogy a Bgt-vel fertőzött, tünetmentes nemgazda rezisztenciát mutató árpa levelekben az NBT specifikusan reagál a szuperoxiddal (**24. ábra**).

3. táblázat: A szuperoxid (O_2^-) felhalmozódás mintázata fertőzött levelekben, háromféle típusú növény-kórokozó kapcsolatban, amelyek fogékonysággal, sejt/szövethalállal (lokális nekrotikus léziók) kísért, HR-típusú gazda rezisztenciával vagy tünetmentes (I. típusú) nemgazda rezisztenciával járnak

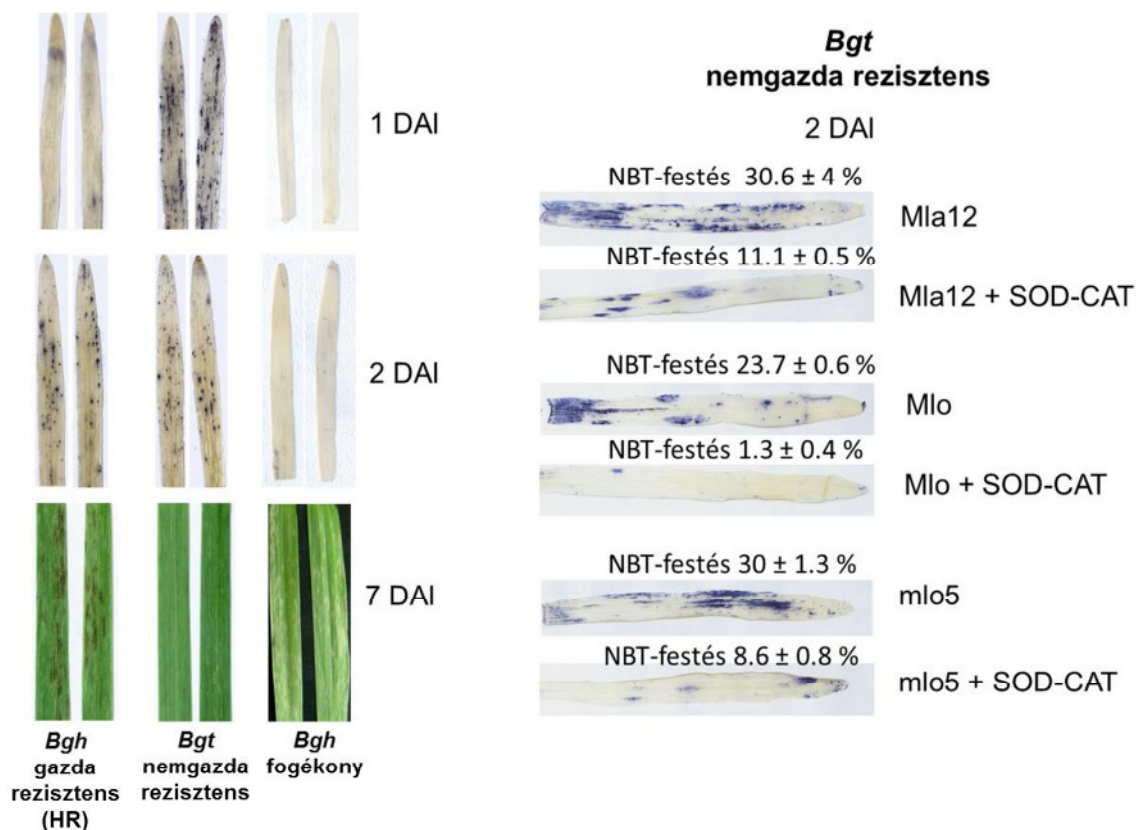
<u>növény – kórokozó kapcsolat</u>	<u>növényi válasz</u>	<u>szuperoxid (O_2^-)^a</u>
<i>Hordeum vulgare</i> – <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> , A6 cv. Ingrid Mlo (wt)	fogékonyság	- (48 HAI-ig)
<i>H. vulgare</i> – <i>B. graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> , A6 cv. Ingrid Mla12	gazda rezisztencia (HR)^b	+ (44-48 HAI)
<i>H. vulgare</i> – <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> , cv. Ingrid Mla12 magyar izolátum	nemgazda rezisztencia^c	+ (22-24 HAI)
<i>H. vulgare</i> , – <i>Puccinia hordei</i> , magyar izolátum cv. Ingrid Mlo (wt)	fogékonyság	- (48 HAI-ig)
<i>H. vulgare</i> – <i>Puccinia hordei</i> , magyar izolátum cv. Botond	gazda rezisztencia (HR)	+ (44-48 HAI)
<i>H. vulgare</i> – <i>Puccinia triticina</i> , 77-es rassz cv. Botond	nemgazda rezisztencia	+ (22-24 HAI)
<i>Triticum aestivum</i> – <i>Puccinia triticina</i> , 77-es rassz cv. Buzogány	fogékonyság	- (96 HAI-ig)
<i>T. aestivum</i> – <i>Puccinia triticina</i> , 77-es rassz cv. MV-Emma	gazda rezisztencia (HR)	+ (92-96 HAI)
<i>T. aestivum</i> – <i>Puccinia hordei</i> , magyar izolátum cv. MV-Emma	nemgazda rezisztencia	+ (68-72 HAI)
<i>Vitis vinifera</i> – <i>Erysiphe necator</i> , cv. Nimrang magyar izolátum	fogékonyság	- (48 HAI-ig)
<i>V. vinifera</i> – <i>Erysiphe necator</i> cv. Kishmish vatkana magyar izolátum	gazda rezisztencia^d	+ (44-48 HAI)
<i>V. vinifera</i> – <i>B. graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> , A6 cv. Kishmish vatkana	nemgazda rezisztencia	+ (22-24 HAI)
<i>Solanum tuberosum</i> – <i>Phytophthora infestans</i> , K-39 cv. Hópehely	fogékonyság	- (48 HAI-ig)
<i>Solanum tuberosum</i> – <i>Phytophthora infestans</i> , K-39 cv. White Lady	gazda rezisztencia (HR)	+ (44-48 HAI)
<i>Solanum tuberosum</i> – <i>B. graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> , A6 cv. White Lady	nemgazda rezisztencia	+ (22-24 HAI)

^a A szuperoxidot (O_2^-) az inokuláció után különböző időpontokban (HAI = az inokuláció után eltelt órák) detektáltuk, az inokulált levelek nitroblue-tetrazolium-kloridos (NBT) szövetfestésével. A mintákat szuperoxid-pozitívnak (“+”) tekintettük, ha az NBT-vel festődött levélfelület nagyobb volt, mint 5 %

^b HR= hiperszenzitív reakció (lokális nekrotikus léziók)

^c nemgazda rezisztencia = I. típusú, látható HR-tünetek nélkül

^d makroszkopikusan látható HR-tünetek nélkül.

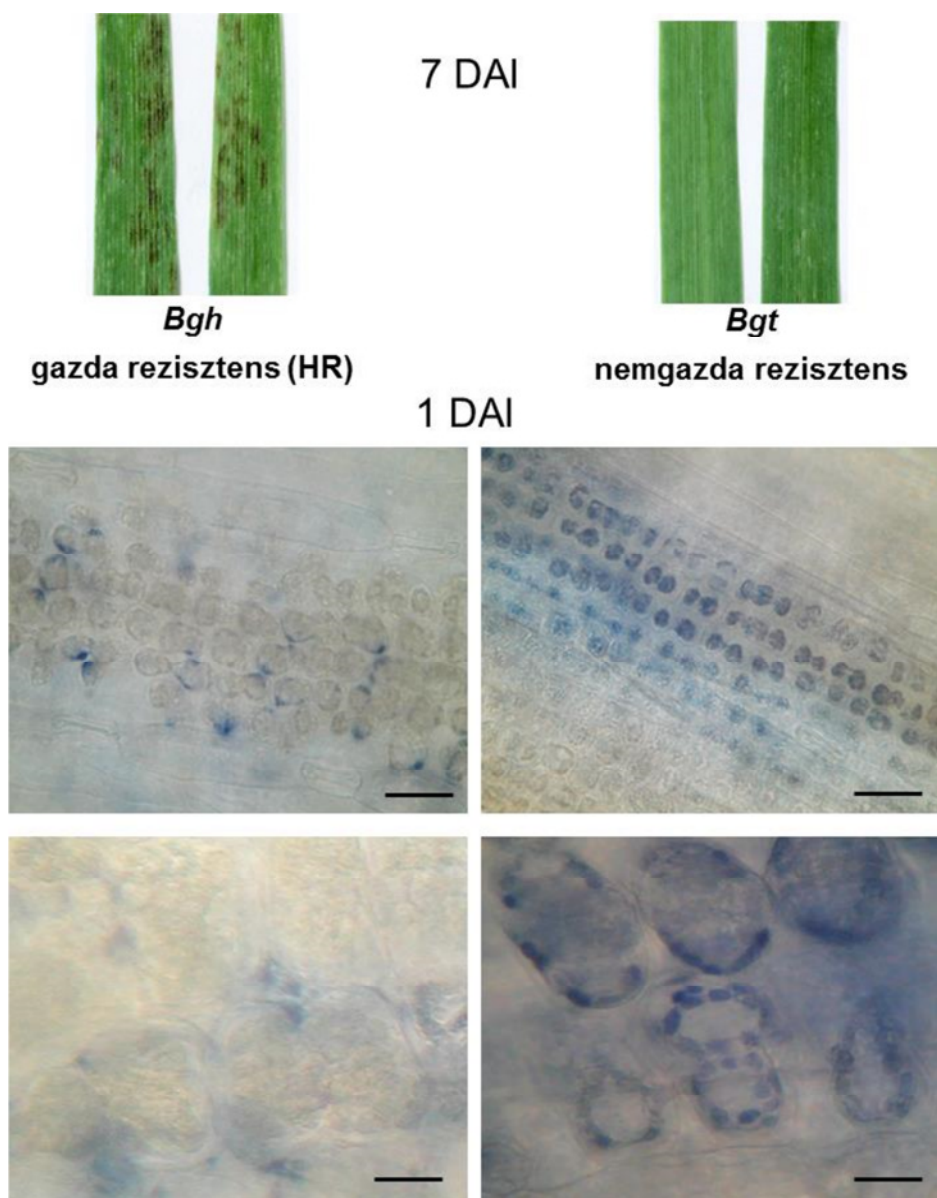


24. ábra: Baloldali ábrarész: Az árpának (*Hordeum vulgare* cv. Ingrid Mla12) a búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciáját jól jelzi a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) korai felhalmozódása (1 nappal az inokuláció után, 1 DAI) az inokulált levelekben. A szuperoxidot NBT (nitroblue-tetrazolium-klorid) szövetfestéssel detektáltuk. „Bgh gazda rezisztens (HR)” = az árpának (cv. Ingrid Mla12) az árpalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh) szembeni HR-típusú (lokális nekrotikus léziókkal járó) gazda rezisztenciája. „Bgh fogékony” = az árpának (cv. Ingrid Mlo, vad típus) az árpalisztharmattal szembeni fogékonysága. Jobboldali ábrarész: Az árpa Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciája és a korai szuperoxid-felhalmozódás közötti kapcsolat a cv. Ingrid árpa három, ún. közel izogén vonalában (Mla12, Mlo és mlo5). A leveleket infiltrálása antioxidáns enzimekkel (szuperoxid-dizmutáz, SOD [2500 U/ml] és kataláz, CAT [5000 U/ml]) közvetlenül a Bgt-inokuláció után visszaszorítja a szuperoxid felhalmozódását (az NBT tehát specifikusan reagál a szuperoxiddal). A szuperoxid felhalmozódás kvantifikálásához az NBT-vel festett levélfelület % van megadva.

A szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) korai felhalmozódása a búzalisztharmattal szemben tünetmentes nemgazda rezisztenciát mutató árpában az inokulált levelek mezofill sejtjeiben (a kloroplasztiszokban) figyelhető meg

Kíváncsiak voltunk arra, hogy árpában a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) korai felhalmozódása a búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztencia során milyen szövetekben, sejtekben, ill. milyen sejtorganellumokban figyelhető meg? Ennek érdekében a Bgt-vel inokulált levelek NBT-vel történő festődését sejtszinten (mikroszkóppal) is detektáltuk. Elsősorban a levelek mezofill szövetét vizsgáltuk, két okból: 1/ ismert, hogy az árpának (cv. Pallas Mla12) a saját lisztharmat kórokozójával (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh) szembeni HR-típusú (lokális sejt/szövethalál) gazda rezisztenciája során a szuperoxid elsősorban a fertőzési helyekkel szomszédos mezofill sejtek kloroplasztiszaiban halmozódik fel, de csak viszonylag későn,

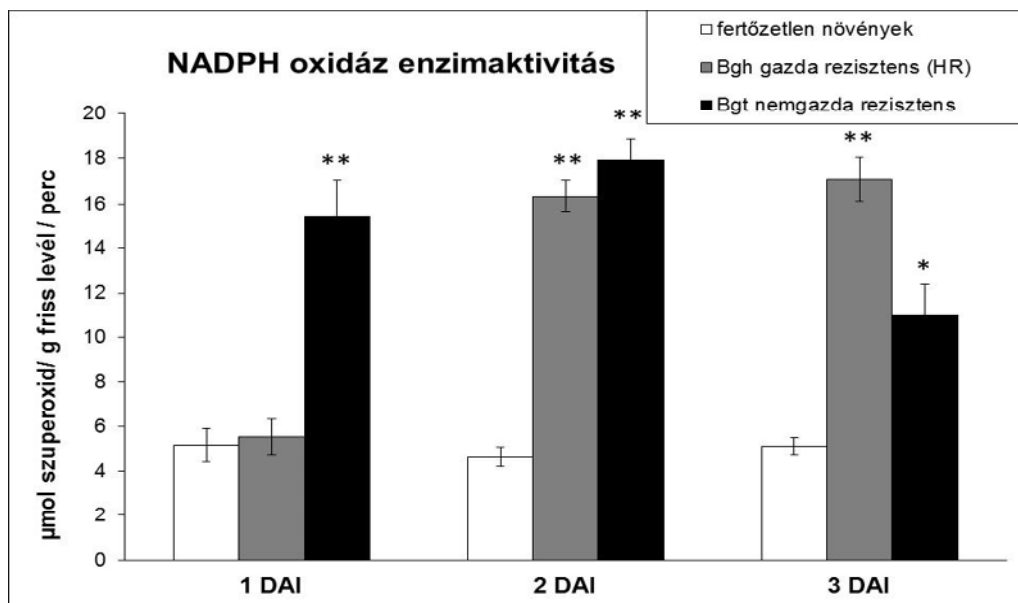
a fertőzés után 2 nappal (a HR megjelenésével összhangban) (Hückelhoven és Kogel, 1998), 2/ az árpanak (cv. Pallas Mlg) a Bgh-val szembeni tünetmentes gazda rezisztenciája során a szuperoxid szintén a fertőzési helyekkel szomszédos mezofill sejtek kloroplasztiszaiban akumulálódik, de korábban, a fertőzés után már 1 nappal (Hückelhoven és Kogel, 1998). Hangsúlyozandó ugyanakkor, hogy árpaiban az *Mlg* rezisztenciagén által meghatározott, makroszkopikusan tünetmentes, Bgh-val szembeni gazda rezisztencia kóréletteni szempontból nagyon hasonló a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciához (Hückelhoven és Kogel, 1998; Trujillo et al., 2004b). Mindezek alapján feltételeztük, hogy az árpa Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciája során a szuperoxid korai (1 nappal a fertőzés után) felhalmozódása szintén a mezofill sejtekben, ill. azok kloroplasztiszaiban lokalizálható. 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 kloroplasztiszaiban akumulálódott, míg a Bgh-val szembeni HR-típusú gazda rezisztenciánál mindezt nem tapasztaltuk (**25. ábra**).



25. ábra: Az árpának (*Hordeum vulgare* cv. Ingrid Mla12) a búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciáját (felső ábrarész) jól jelzi a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) korai felhalmozódása (1 nappal az inokuláció után, 1 DAI) az inokulált levelekben, a mezofill sejtek kloroplasztiszaiban (középső és alsó ábrarész). A szuperoxidot NBT (nitroblue-tetrazolium-klorid) szövetfestéssel detektáltuk. „Bgh gazda rezisztens (HR)” = az árpának (cv. Ingrid Mla12) az árpalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh) szembeni HR-típusú (lokális nekrotikus léziókkal járó) gazda rezisztenciája. „-” (középső ábrarész) = 40 μm ; „-” (alsó ábrarész) = 20 μm .

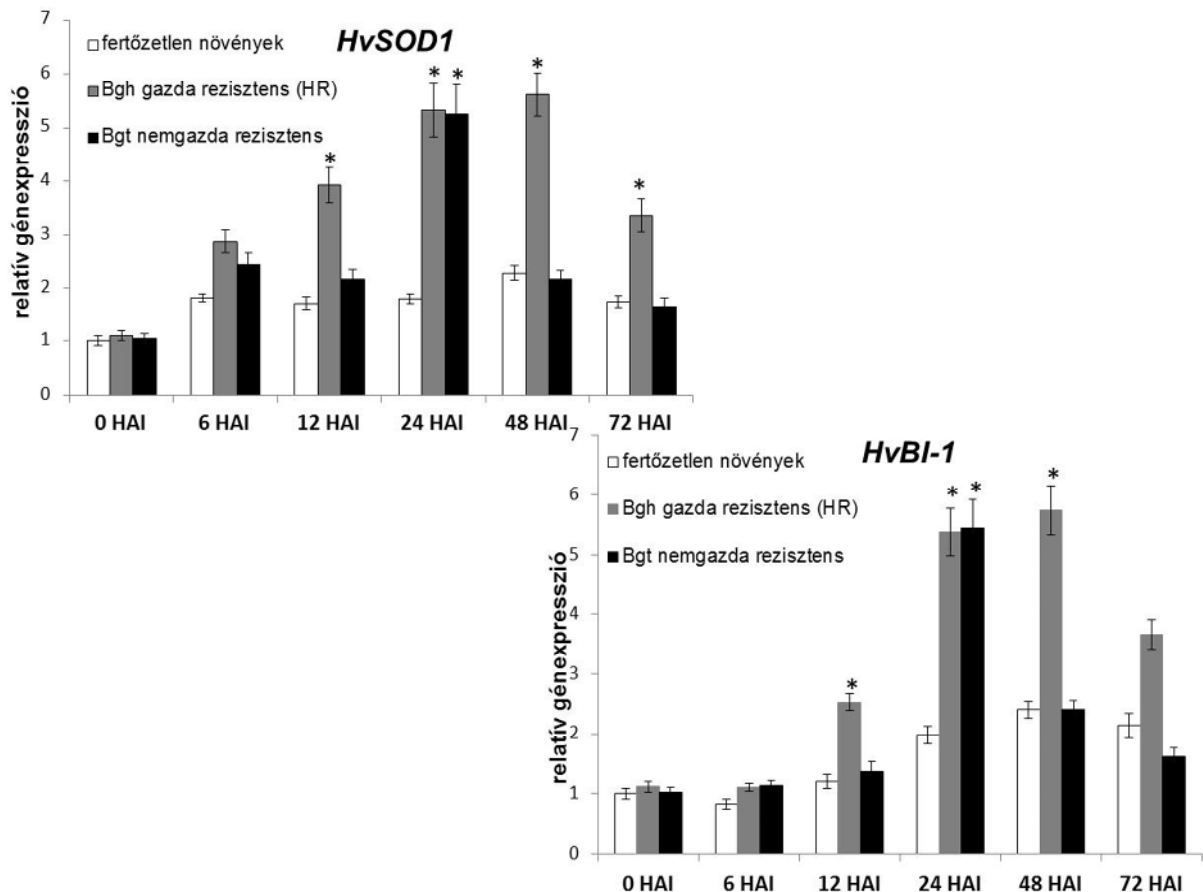
A szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) korai felhalmozódása a búzalisztharmattal szemben tünetmentes nemgazda rezisztenciát mutató árpában fokozott NADPH-oxidáz enzimaktivitással és jellegzetes génexpressziós változásokkal jár együtt

Korábbi kutatások szerint a szuperoxid-termelésben szerepet játszó NADPH-oxidáz enzimek fontos komponensei a növényi rezisztencia válaszoknak, többek között a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) és árpa lisztharmat-fertőzésekkel szembeni rezisztenciájában is (Berrocal-Lobo et al., 2010; Proels et al., 2010). Kíváncsiak voltunk arra, hogy árpában a búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciánál megfigyelhető korai szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) felhalmozódáshoz milyen mértékben járul hozzá a növényi NADPH-oxidáz enzimaktivitás? Fertőzetlen és lisztharmattal inokulált árpában (cv. Ingrid Mla12) mértük a NADPH-oxidáz enzimaktivitást a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztencia és az árpalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh) szembeni HR-típusú (lokális sejt/szövethalál) gazda rezisztencia során. Eredményeink szerint a NADPH-oxidáz enzimaktivitás változása jól követi a szuperoxid-felhalmozódás mintázatát. A lisztharmat-inokuláció után 1 nappal a NADPH-oxidáz aktivitás a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztencia során kb. háromszor akkora volt, mint a Bgh-val szembeni, HR-rel együtt járó gazda rezisztenciánál és a fertőzetlen kontroll növényekben. Ugyanakkor az inokuláció után 2 nappal a NADPH-oxidáz aktivitás már hasonlóan nagy volt mindkét rezisztencia típusnál, a fertőzetlen kontroll növényekhez képest (26. ábra).



26. ábra: Az árpa (*Hordeum vulgare* cv. Ingrid Mla12) búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciájának markere a patogenezishez köthető szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) termelésben közreműködő NADPH-oxidáz enzim aktivitásának korai indukciója (1 nappal az inokuláció után, 1 DAI) az inokulált levelekben. „Bgh gazda rezisztens (HR)” = az árpának (cv. Ingrid Mla12) az árpalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh) szembeni HR-típusú (lokális nekrotikus léziókkal járó) gazda rezisztenciája. * és ** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) a fertőzetlen mintákhoz képest.

Az árpának a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciájánál megfigyelhető – a NADPH-oxidáz aktivitással kapcsolatos korai szuperoxid-felhalmozódáshoz köthető – génextpressziós változások jellemzéséhez olyan gének kifejeződését követtük nyomon, amelyek a szuperoxid-szintet, ill. a növényi sejthalált szabályozzák (szuperoxid-dizmutáz, *HvSOD1* és BAX inhibitor-1, *HvBI-1*). Mindkét gén esetében a tünetmentes nemgazda rezisztenciát mutató levelekben a Bgt-inokuláció után 24 órával (24 HAI) az expresszió átmenetileg megemelkedett – ugyanabban az időpontban, amikor a fokozott szuperoxid-felhalmozódás és NADPH-oxidáz aktivitás is észlelhető. A Bgh-val szembeni, HR-rel együtt járó gazda rezisztenciánál a fokozott *HvSOD1* és *HvBI-1* expresszió már 12 HAI-nál észlelhető volt, míg 24 HAI-nál a génextpresszió ugyanolyan nagy volt, mint a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciánál. Érdekes viszont, hogy a Bgh-val szembeni, HR-rel együtt járó gazda rezisztenciánál a fokozott *HvSOD1* és *HvBI-1* expresszió a későbbi időpontokban (48 és 72 HAI) is megmaradt, ellentétben a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciával, ahol a génextpresszió a fertőzetlen kontroll szintjére szorult vissza (**27. ábra**).



27. ábra: Az árpa (*Hordeum vulgare* cv. Ingrid Mla12) búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciájának markere egy szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) felhalmozódást, ill. sejthalált szabályozó gén (szuperoxid dizmutáz, *HvSOD1* és BAX inhibitor-1, *HvBI-1*) korai, tranzienst indukciója (az inokuláció után 24 órával, 24 HAI) az inokulált levelekben, kvantitatív RT-PCR-rel mérve. „Bgh gazda rezisztens (HR)” = az árpának (cv. Ingrid Mla12) az árpalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh) szembeni HR-típusú (lokális nekrotikus léziókkal járó) gazda rezisztenciája. * = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) a fertőzetlen mintákhoz képest.

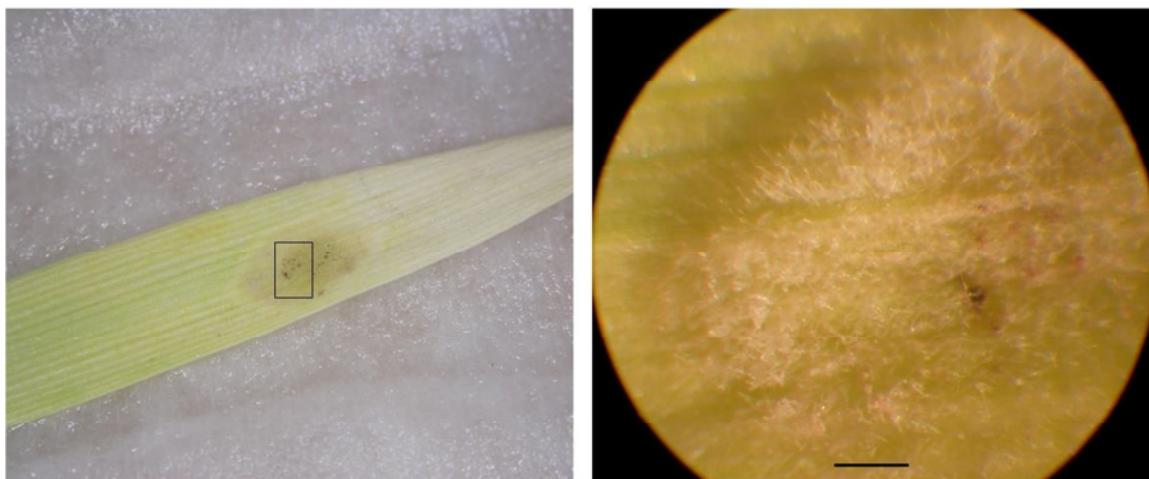
A szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) felhalmozódás gátlása árpában visszaszorítja a búzalisztharmattal szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciát

Ha a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) valóban hozzájárul az árpának a búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciájához, akkor feltételezhető, hogy a szuperoxid-felhalmozódás *in planta* gátlása legalább részben visszaszorítja ezt a típusú rezisztenciát. Korábbi kutatások szerint az árpának a saját lisztharmatával (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh) szembeni, ROS (H_2O_2) kezelésekkal kiváltott tünetmentes gazda rezisztenciája antioxidáns enzimekkel (szuperoxid-dizmutáz, SOD és kataláz, CAT) visszaszorítható (Hafez és Király, 2003). Saját eredményeink szerint dohányban (*N. tabacum*) a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) elleni tünetmentes (extrém) gazda rezisztencia szintén visszaszorítható a növények antioxidáns (SOD + CAT) kezelésével (Király et al., 2021; ld. előző fejezet). Mindezek alapján feltételeztük, hogy a fent leírt kísérleti megközelítés (SOD és CAT egyidejű infiltrálása az inokulált árpa levelekbe, közvetlenül az inokuláció után) képes csökkenteni vagy visszaszorítani az árpának a búzalisztharmattal (Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciáját, többek között a szuperoxid-felhalmozódás gátlása miatt. Meglepetésünkre azonban a SOD és CAT kezelés szemmel láthatóan nem befolyásolta az árpának a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciáját, legalábbis a makroszkopikus fogékonysági tünetek (a gombatelepek növekedésével kialakuló lisztharmat) nem jelentek meg (adatok nem közölve). Ugyanaz a SOD és CAT kezelés viszont jelentősen csökkentette a szuperoxid felhalmozódását (ld. 24. ábra).

Annak bizonyítására, hogy a szuperoxid-felhalmozódás *in planta* gátlása valóban képes visszaszorítani az árpának a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciáját, a lisztharmattal (Bgt) inokulált árpát egy rövid hő-előkezelésnek (hő-sokk) vetettük alá (a levelek bemártása 49 °C-os vízbe 45 mp-re, az inokuláció előtt 30 perccel). Korábbi kutatásokból ugyanis ismert, hogy az említett hő-sokknak kitett cv. Ingrid árpában a ROS (szuperoxid és H_2O_2) felhalmozódás csökkenését az árpalisztharmattal (Bgh) szembeni tünetmentes és HR-típusú gazda rezisztencia visszaszorulása (részleges fogékonyság kialakulása) követi (Barna et al., 2003b, 2014; Künstler et al., 2018). Ezen eredmények alapján feltételeztük, hogy egy ugyanilyen hő-sokk legalább részben visszaszorítja az árpának a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciáját. A hő-sokk azonban önmagában, hasonlóan a SOD és CAT kezeléshez (ld. fent), nem volt képes ezt a nemgazda rezisztenciát makroszkopikus szinten visszaszorítani (azaz nem jelentek meg a lisztharmatos tünetek) (adatok nem közölve). Ugyanakkor a kombinált hő-sokk és antioxidáns (SOD + CAT) kezelés hatására az árpa Bgt-vel szembeni tünetmentes

nemgazda rezisztenciája láthatóan visszaszorult, ugyanis a kezelt és inokulált leveleken gyenge lisztharmatos tünetek jelentek meg (**28. ábra**). A lisztharmattal borított levélrészeken HR-típusú, lokális nekrotikus léziók is kialakultak, ami feltehetően a kórokozó behatolás egyes pontjai körüli korlátozott lisztharmat-terjedésre utal. Mindez arra enged következtetni, hogy az árpa Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciáját a kombinált hő-sokk és antioxidáns (SOD + CAT) kezelés csak részben tudta visszaszorítani (28. ábra). Annak bizonyítására, hogy az árpán megjelenő gyenge lisztharmatos tüneteket valóban a Bgt fertőzése okozta, az árpa levelekről izolált lisztharmat telepekkel (micélium és konídiumok) Bgt-re fogékony búzanövényeket fertőztünk vissza, amelyeken szabad szemmel látható lisztharmatos tünetek alakultak ki (adatok nem közölve). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a szuperoxid-felhalmozódás gátlása – legalább részben – szerepet játszik az árpa Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciájának visszaszorításában (azaz a részleges fogékonyság kialakulásában).

Bgt – a nemgazda rezisztencia részleges visszaszorulása



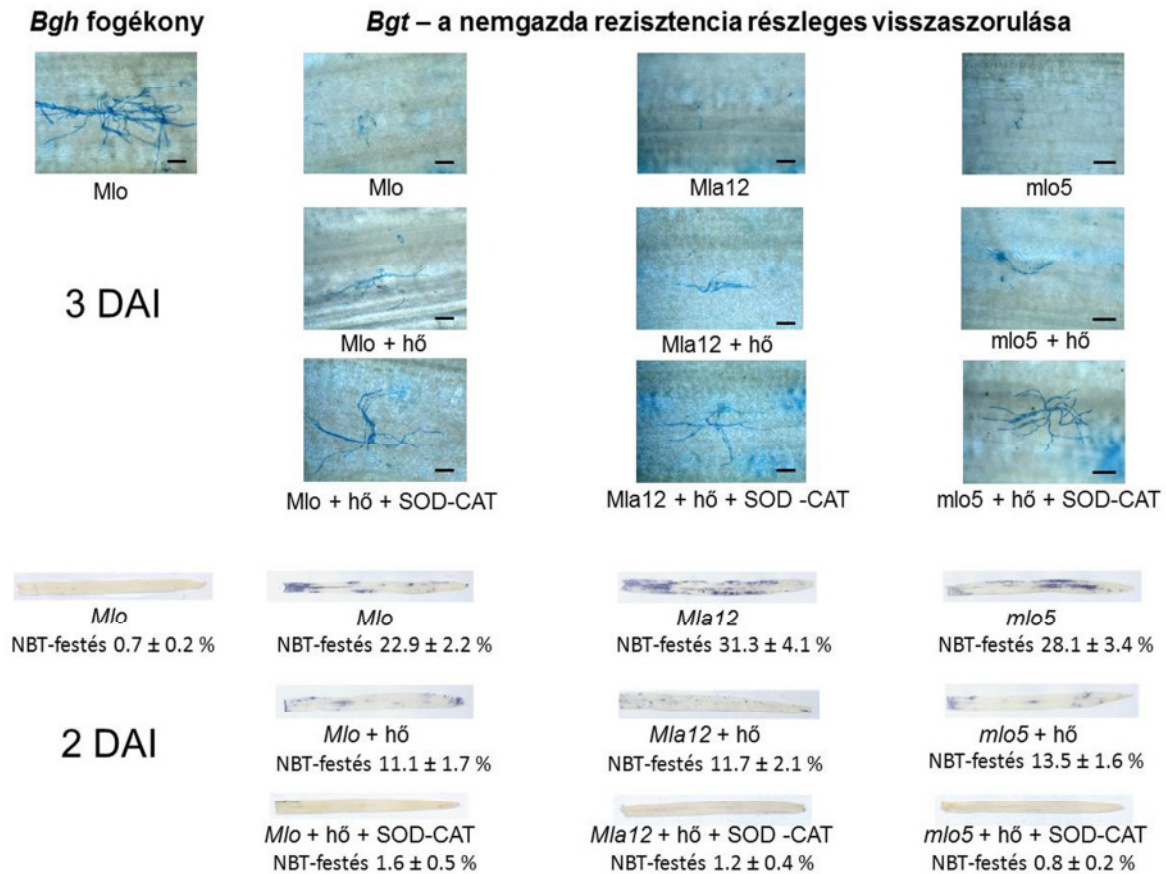
7 DAI

28. ábra: Az árpa (*Hordeum vulgare* cv. Ingrid Mla12) búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciája kombinált hő-sokk és antioxidáns (szuperoxid-dizmutáz, SOD és kataláz, CAT) kezelés hatására részlegesen visszaszorul. Gyenge lisztharmatos tünetek és HR-típusú, lokális nekrotikus léziók megjelenése az inokuláció után 7 nappal (7 DAI). A baloldali képen négyszöggel jelölt terület mikroszkópos felvétele látható a jobboldali képen. „-” = 100 µm. A hő-sokk kezelés (a levelek bemártása 49 °C-os vízbe 45 mp-re) az inokuláció előtt 30 perccel, míg a levelek infiltrálása antioxidáns enzimekkel (SOD [2500 U/ml] és CAT [5000 U/ml]) közvetlenül a Bgt-inokuláció után történt.

A **29. ábra** a kombinált hő-sokk és antioxidáns (SOD + CAT) kezelésnek a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciára gyakorolt hatását mutatja be a cv. Ingrid árpa három, közel izogén vonalában (Mlo, Mla12 és mlo5). A hő-sokknak kitett növények leveleiben – mindhárom árpa vonal esetén – a Bgt micéliumainak növekedése kismértékben, de egyértelműen fokozódott, a kezeletlen (nemgazda rezisztens) kontrollokhöz képest. Hangsúlyozandó ugyanakkor, hogy a hő-sokkal előkezelt növények

infiltrálása antioxidánsokkal (SOD + CAT) tovább fokozta a micélium-növekedést, ami a szuperoxidnak a nemgazda rezisztenciában játszott szerepére utal. Mindezt megerősíti, hogy az árpa Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciájának visszaszorítása a hő-sokk, ill. antioxidáns (SOD + CAT) kezelésekkel mindig együtt járt a szuperoxid-felhalmozódás csökkenésével (ld. **29. ábra alsó része**).

Eredményeink szerint tehát árpában a szuperoxid korai (az inokuláció után 1 nappal) felhalmozódása ténylegesen szerepet játszik a búzalisztharmattal szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciában.



29. ábra: Felső ábrarész: Az árpa (*Hordeum vulgare* cv. Ingrid) búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciája kombinált hő-sokk és antioxidáns (szuperoxid-dizmutáz, SOD és kataláz, CAT) kezelés hatására részlegesen visszaszorul – a hő-sokk által előidézett rezisztencia-csökkenés az antioxidáns kezelések hatására tovább fokozódik (a tünetmentes nemgazda rezisztencia még jobban visszaszorul). A Bgt terjedése a kezelt és fertőzött levelekben az inokuláció után 3 nappal (3 DAI) a cv. Ingrid árpa különböző, ún. közel-izogén vonalaiban (Mlo, Mla12, mlo5). A bal felső képen a gazda fogékonyaság pozitív kontrollja az árpalisztharmat (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh) terjedése vad típusú cv. Ingrid (Mlo) árpán. Alsó ábrarész: A Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztencia hő-sokk és antioxidáns kezelés általi visszaszorulása a cv. Ingrid árpa különböző közel-izogén vonalaiban (Mlo, Mla12, mlo5) együtt jár a szuperoxid (O_2^-) felhalmozódás csökkenésével. A szuperoxidot NBT (nitroblue-tetrazolium-klorid) szövetfestéssel detektáltuk. A szuperoxid felhalmozódás kvantifikálásához az NBT-vel festett levélfelület % van megadva. A hő-sokk kezelés (a levelek bemártása 49 °C-os vízbe 45 mp-re) az inokuláció előtt 30 perccel, míg a levelek infiltrálása antioxidáns enzimekkel (SOD [2500 U/ml] és CAT [5000 U/ml]) közvetlenül a Bgt-inokuláció után történt. A mikroszkópos felvételeken a gomba struktúrákat Pelikan Blue festéssel hívtuk elő. „-” = 50 µm.

A paprika lisztharmattal (*Leveillula taurica*) szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciája – a szuperoxid (O₂⁻) felhalmozódásának meghatározó szerepe

Kutatásaink során tisztáztuk, hogy a reaktív oxigénszármazékok (ROS) – elsősorban a szuperoxid (O₂⁻) – korai felhalmozódásának meghatározó szerepe van a gyors és tünetmentes betegség ellenállóság kialakulásában, egyes növényi vírusok valamint biotróf (a fertőzéskor élő növényi sejtekből táplálkozó) gombakórokozók – elsősorban lisztharmatok és rozsdák – fertőzésekor egyaránt. Ezen eredmények alapján a továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy a cseresznyepaprikában (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme* cv. Szentesi) megfigyelt, oltással átvihető tünetmentes lisztharmat rezisztenciához mennyiben járul hozzá a szuperoxid felhalmozódás és az ezzel összefüggő védekezési folyamatok?

A cseresznyepaprika (cv. Szentesi) oltással átvihető lisztharmat rezisztenciájának általános jellemzése

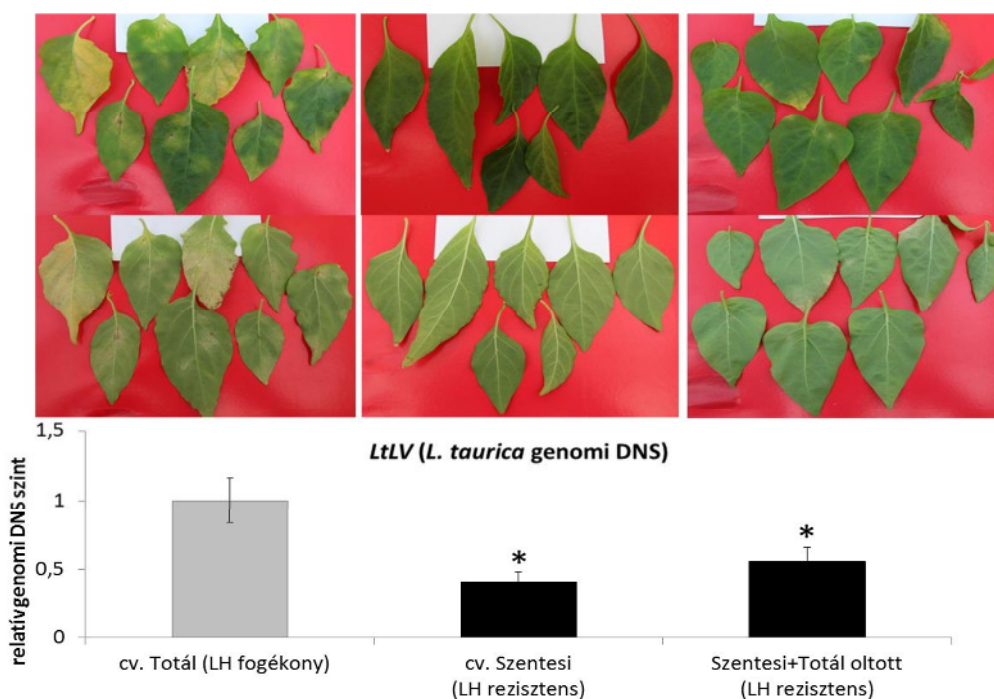
Az üvegházi körülmények között végzett előzetes provokációs kísérleteink eredményei arra utaltak, hogy egy hazai cseresznyepaprika fajta (*C. annuum* var. *cerasiforme* cv. Szentesi) a lisztharmattal (*Leveillula taurica*) szemben tünetmentes rezisztenciát mutat, amely oltással átvihető.

Üvegházban, illetve fóliasátorban történő termesztés során az étkezési paprika (*C. annuum*) fajták általában igen fogékonyak a lisztharmatra (Glits és Folk, 2000). Saját üvegházi kísérleteinkben a teljesen kifejlett, saját gyökerű cv. Totál étkezési paprika valamennyi egyede a lisztharmat (*L. taurica*) fertőzés tipikus tüneteit mutatta (klorotikus foltok a levelek színén, ezekkel átellenben lisztharmat telepek a levelek fonákján). Ugyanakkor a lisztharmat ellenálló cv. Szentesi cseresznyepaprika alanyra oltott fogékony cv. Totál étkezési paprikán (Szentesi+Totál) alig jelentkeztek látható tünetek: csak az alsó, szenescens levelek felületének maximum 30%-án észleltünk enyhe klorózist, ill. lisztharmatos telepeket. Ezekben az oltott paprikákban (Szentesi+Totál) a bogyótermés mérete, ill. mennyisége hasonló volt, mint az egészséges kontroll, saját gyökerű cv. Totál étkezési paprikában. Megfigyeléseink szerint a saját gyökerű cv. Szentesi cseresznyepaprika egyedek több mint 95 %-a nem mutatott szabad szemmel látható lisztharmatos tüneteket és más tünetet sem, ami a lisztharmattal (*L. taurica*) szembeni tünetmentes rezisztenciára utalt (ld. Albert et al., 2017).

A cseresznyepaprika (cv. Szentesi) oltással átvihető lisztharmat-rezisztenciája együtt jár a kórokozó (*L. taurica*) jelentős mértékű gátlásával

A cseresznyepaprikának (cv. Szentesi) a lisztharmattal szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciáját kontrollált laboratóriumi körülmények között (növénynevelő kamrában) is igazoltuk. A fent említett paprika növényeket egy dél-alföldi (Szentes) fóliasátorból származó paprikalisztharmat (*L. taurica*) izolátummal inokuláltuk. 45 nappal a lisztharmat inokuláció után a saját gyökerű cv. Totál növények egységesen a tipikus betegség tüneteket (lisztharmat, ill. klorózis) mutatták, a cv. Szentesi egyedek nem mutattak látható tüneteket, míg az oltott növények (Szentesi+Totál) alsó, szeneszcens levelein csak ritkán előforduló, enyhe lisztharmatos tüneteket észleltünk, hasonlóan az üvegházi provokációs kísérletekhez (30. ábra).

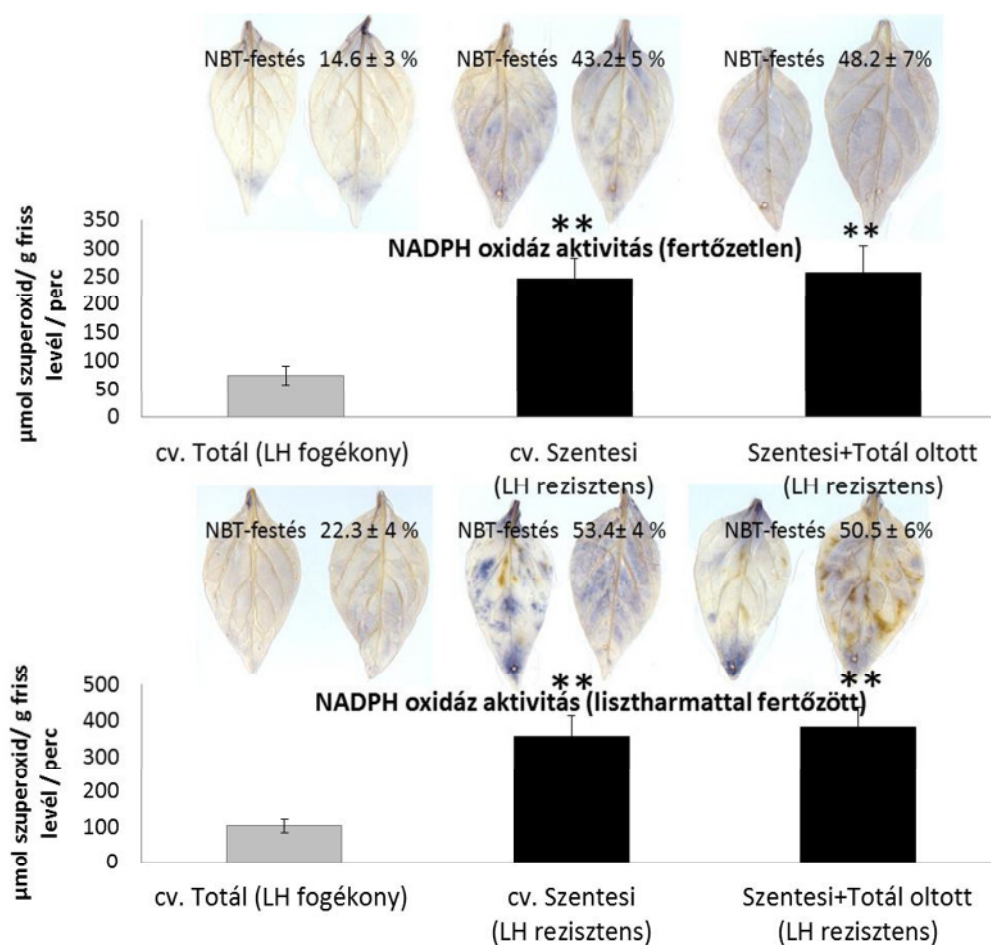
Kíváncsiak voltunk arra is, hogy paprikában a lisztharmatos tünetek hiánya együtt jár-e a kórokozó jelentős visszaszorulásával (azaz valódi rezisztenciával állunk-e szemben)? A kórokozó (*L. taurica*) felhalmozódását qPCR-rel mértük. A lisztharmat patogenezis előrehaladott szakaszában (45 nappal az inokuláció után) a *L. taurica* genomi DNS szintje (a gomba biomassza) szignifikánsan (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 (30. ábra). A kapott eredmények alapján a cv. Szentesi cseresznyepaprika valóban rezisztens a lisztharmat (*L. taurica*) fertőzésre és ez a típusú rezisztencia kertészeti oltással átvihető egy étkezési paprika fajtára (cv. Totál).



30. ábra: A cv. Szentesi cseresznyepaprika (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme*) lisztharmattal (*Leveillula taurica*, LH) szembeni rezisztenciája oltással átvihető: a cv. Szentesi cseresznyepaprikára oltott, eredetileg fogékony cv. Totál étkezési paprikában (Szentesi+Totál) lisztharmat rezisztencia indukálódik. Felső ábrarész: A lisztharmat fertőzés tipikus tünetei paprika leveleken, 45 nappal az inokuláció után. Felső képek: klorotikus foltok a levél színén; alsó képek: a klorotikus foltokkal átellenben lisztharmat telepek a levél fonákján. Baloldali, középső és jobboldali képek: lisztharmatra fogékony (saját gyökerű cv. Totál) és rezisztens (saját gyökerű cv. Szentesi és oltott Szentesi+Totál) paprika levelei. Alsó ábrarész: A paprikalisztharmat (*L. taurica*) felhalmozódását kvantitatív PCR-rel követtük nyomon 45 nappal az inokuláció után, egy *L. taurica*-ra specifikus ITS szekvencia (*LtLV*) detektálásával (relatív genomi DNS-szint). * = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) a fogékony (cv. Totál) mintákhoz képest.

A szuperoxid (O_2^-) felhalmozódás és a NADPH-oxidáz aktivitás szerepe a cseresznyepaprika (cv. Szentesi) oltással átvihető lisztharmat rezisztenciájában

Tisztázni kívántuk, hogy a cseresznyepaprikában (cv. Szentesi) megfigyelt, oltással átvihető tünetmentes lisztharmat (*L. taurica*) rezisztenciához mennyiben járul hozzá egy a növényi betegség ellenállóságban meghatározó ROS, a szuperoxid (O_2^-) felhalmozódása? A szuperoxid felhalmozódását egészséges (fertőzetlen) és lisztharmattal fertőzött paprika levelekben követtük nyomon (45 nappal az inokuláció után), nitroblue-tetrazolium-kloridos (NBT) szövetfestéssel. A fertőzetlen növényeknél a lisztharmat-fogékony cv. Totál levelekben elhanyagolható mennyiségű szuperoxid termelődött, míg a lisztharmat-rezisztens paprikákban (saját gyökerű cv. Szentesi és Szentesi+Totál oltványok) szignifikánsan nagyobb (több mint kétszer akkora) szuperoxid-felhalmozódást tudunk kimutatni (**31. ábra felső része**). A lisztharmat-inokulációt követően 45 nappal a szuperoxid mennyisége valamennyi növénynél emelkedett: a fogékony cv. Totál levelekben azonban továbbra is lényegesen alacsonyabb volt a szuperoxid-szint, mint a rezisztens paprikák leveleiben (**31. ábra alsó része**). Az eredmények alapján a szuperoxid-felhalmozódás a cseresznyepaprika (cv. Szentesi) oltással átvihető tünetmentes lisztharmat rezisztenciájának markere és feltehetően meghatározó komponense.



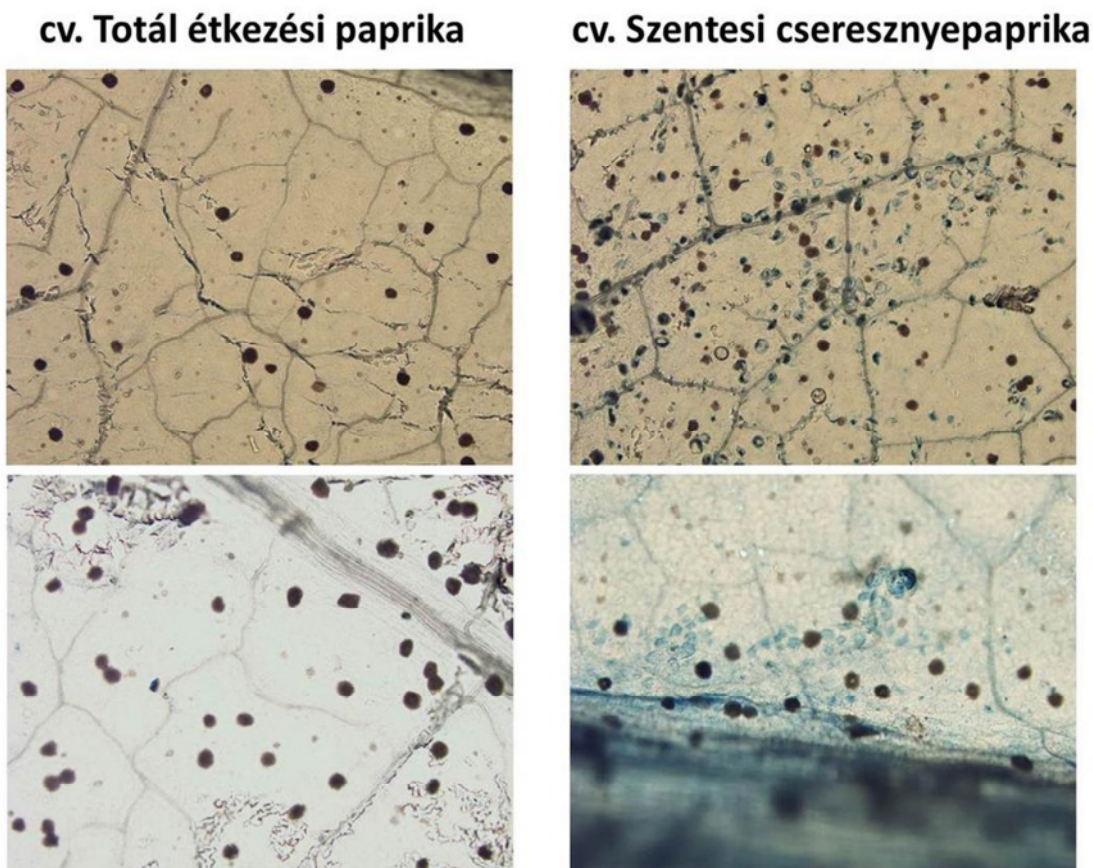
31. ábra: A cv. Szentesi cseresznyepaprika (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme*) lizstharlattal (*Leveillula taurica*, LH) szembeni, oltással átvihető rezisztenciájának markere a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$)-felhalmozódás és a fokozott NADPH-oxidáz enzimaktivitás, a fertőzetlen (felső ábrarész) és lizstharlattal fertőzött (alsó ábrarész) növényekben (45 nappal az inokuláció után). Grafikonok feletti képek: szuperoxid-felhalmozódás kimutatása fertőzetlen és lizstharlattal fertőzött paprika levelekben, nitroblue-tetrazolium-klorid (NBT) festéssel. A szuperoxid felhalmozódás kvantifikálásához az NBT-vel festett levélfelület % van megadva. Baloldali, középső és jobboldali képek: lizsthartra fogékony (saját gyökerű cv. Totál) és rezisztens (saját gyökerű cv. Szentesi és oltott Szentesi+Totál) paprika levelei. Grafikonok: NADPH-oxidáz enzimaktivitás fertőzetlen és lizstharlattal fertőzött paprika levelekben. ** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,01$) a fogékony (cv. Totál) mintákhoz képest.

Mivel növényekben a betegség rezisztenciával kapcsolatos szuperoxid termelés elsősorban a NADPH-oxidáz enzim működéséhez köthető (Pogány et al., 2009; Marino et al., 2012; Kadota et al., 2015), feltételeztük, hogy a cseresznyepaprika (cv. Szentesi) oltással átvihető tünetmentes lizsthartra rezisztenciájánál megfigyelt fokozott szuperoxid-felhalmozódás is a növényi NADPH-oxidáz aktivitás következménye lehet. A hipotézis igazolásához a NADPH-oxidáz enzimaktivitást egészséges (fertőzetlen) és lizstharlattal fertőzött paprika levelekben követtük nyomon (45 nappal az inokuláció után). A fertőzetlen növényeknél a lizsthartra-fogékony cv. Totál levelekben viszonylag kis NADPH-oxidáz aktivitást detektáltunk, míg a lizsthartra rezisztens paprikákban (saját gyökerű cv. Szentesi és Szentesi+Totál oltványok) az enzimaktivitás szignifikánsan nagyobb volt (közel háromszor akkora) (**31. ábra felső része**). A lizsthartra-inokuláció után 45 nappal a NADPH-oxidáz enzimaktivitás valamennyi növényenél jelentős mértékben emelkedett: a fogékony cv. Totál levelekben azonban továbbra is lényegesen alacsonyabb volt az enzimaktivitás, mint a rezisztens paprikák leveleiben (**31. ábra alsó része**). Eredményeink szerint a cseresznyepaprika (cv. Szentesi) oltással átvihető tünetmentes lizsthartra rezisztenciája során a fokozott szuperoxid-felhalmozódás jól korrelál a NADPH-oxidáz enzimaktivitással. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a NADPH-oxidáz segítségével termelődő szuperoxid meghatározó komponense ennek a rezisztencia típusnak.

A spontán sejtelhalások és a patogenezissel kapcsolatos, ill. sejthalál szabályozó gének szerepe a cseresznyepaprika (cv. Szentesi) oltással átvihető lizsthartra-rezisztenciájában

Magasabb rendű növényekben a ROS szokásosnál nagyobb mértékű termelődése hozzájárulhat egy későbbi fertőzéssel szembeni rezisztenciához, ennek egyik jele, hogy az érzékenyített szövetekben mikroléziók („mikro-HR”), azaz egyes növényi sejtek spontán elhalása alakul ki (Alvarez et al., 1998; Alvarez, 2000). Mivel a lizsthartra ellenálló cv. Szentesi cseresznyepaprika már fertőzés nélkül is nagy mennyiségű szuperoxidot termel (ld. 31. ábra), kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a jelenség együtt jár-e a fokozott mértékű spontán sejtelhalással? Fertőzetlen paprikák leveleit Tripán-kékkel festettük, amely növényekben specifikusan az elhalt sejtekhez kötődik. A lizsthartra rezisztens paprika (saját gyökerű cv. Szentesi) leveleiben a spontán sejtelhalás mértéke (sűrűsége) jóval nagyobb volt, mint a fogékony saját gyökerű cv. Totál növényekben, és a sejtelhalás elsősorban az erek környékén volt nyilvánvaló (**32. ábra**). A cv. Szentesi levelekben a

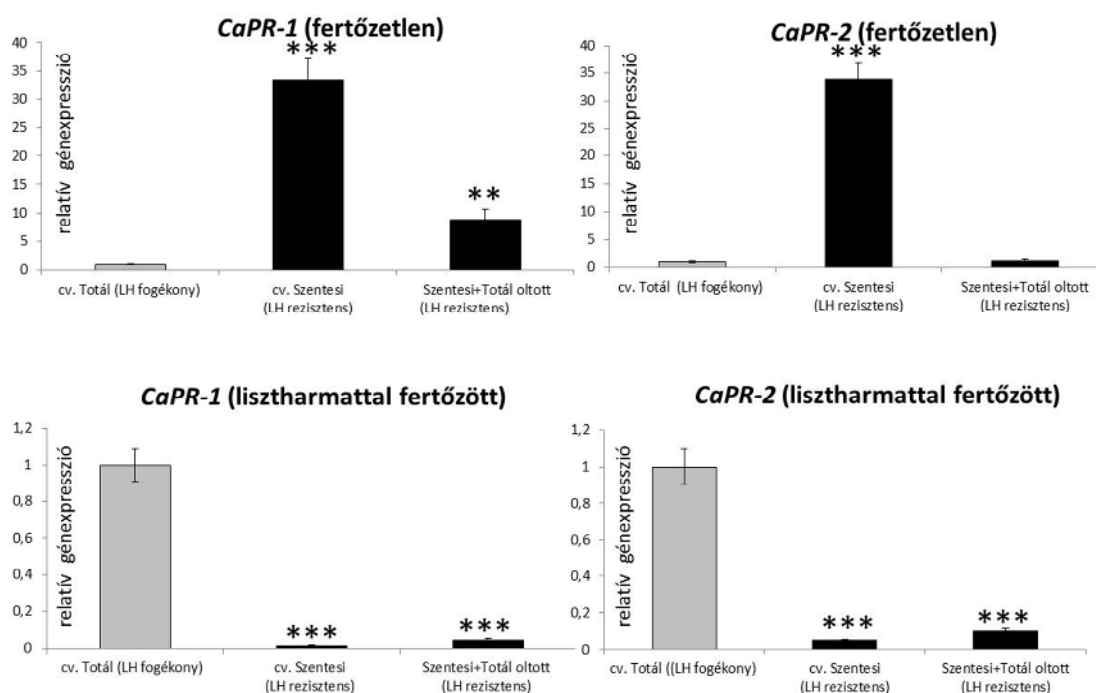
fokozott spontán sejtelhalással együtt sűrűbben előforduló, szintén az erek mentén koncentrálódó barna foltokat is észleltünk. Mindez feltételezhetően a fajta nagy kalciumtartalmának (Lantos, 2011) következménye és az egyes sejtek vakuólumaiban felhalmozódó kalcium-oxalát kristályok jelenlétére utal (Weryszko-Chmielewska és Michałojć, 2009) (32. ábra).



32. ábra: A cv. Szentesi cseresznyepaprika (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme*) lisztharmattal (*Leveillula taurica*) szembeni, oltással átvihető rezisztenciáját a fokozott mértékű spontán sejtelhalás is jelezheti. Spontán sejtelhalás lisztharmatra fogékony (saját gyökerű cv. Totál) és rezisztens (saját gyökerű cv. Szentesi) paprika fertőzetlen leveleiben. Az elhalt sejteket Tripán kék-festés segítségével hívtuk elő. A sötétbarna foltok valószínűleg az egyes sejtek vakuólumaiban felhalmozódó kalcium-oxalát kristályok jelenlétére utalnak (ld. Weryszko-Chmielewska és Michałojć, 2009).

A cseresznyepaprikában (cv. Szentesi) megfigyelt, oltással átvihető tünetmentes lisztharmat rezisztencia mechanizmusának jobb megértéséhez két, ún. patogenezissel kapcsolatos (*PR*) védekezési gén expresszióját is nyomon követtük egészséges (fertőzetlen) és lisztharmattal fertőzött paprika levelekben (45 nappal az inokuláció után). A növényi fertőzések során termelt ROS ugyanis többek között a *PR* géneket, ill. fehérjéket is aktiválja, amely további védekezési folyamatokhoz és betegségrezisztenciához vezethet (Van Loon et al., 2006; Torres, 2010; Lehmann et al., 2015). A vizsgálatokhoz a *CaPR-1* és *CaPR-2* gént választottuk, mivel ismert, hogy ezek a védekezési gének szerepet játszanak egyes baktérium- és oomicéta kórokozókkal szembeni ellenálló képességben (Sarowar et al., 2005; Silvar et al., 2008). Fertőzetlen növényekben a

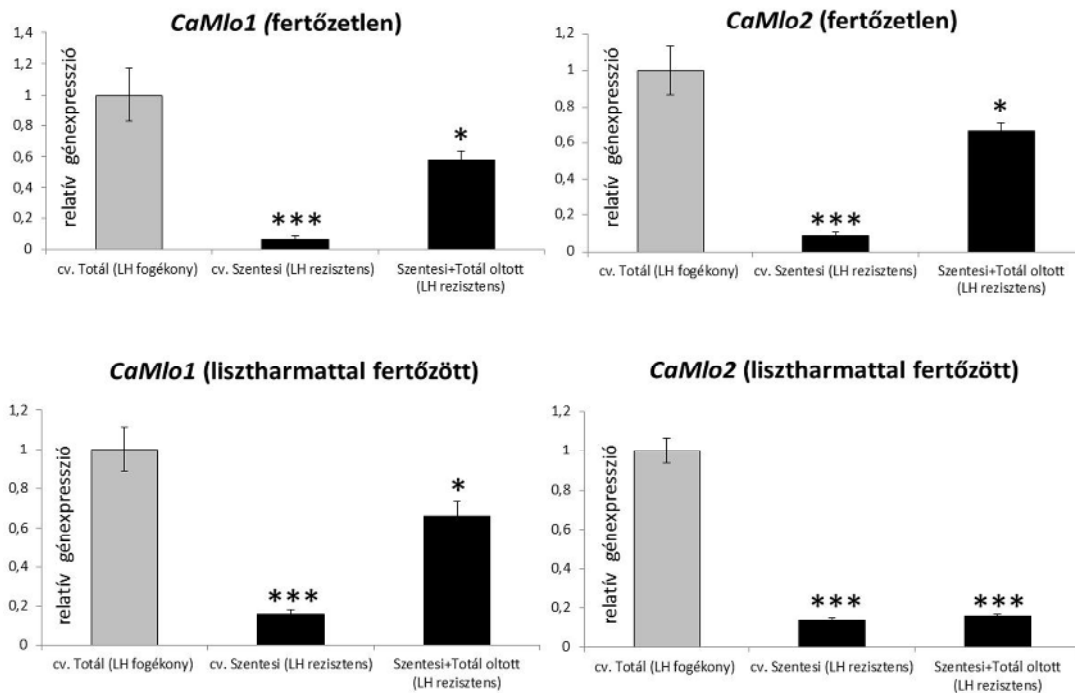
CaPR-1 expressziója a lisztharmat-ellenálló paprikákban többszörösen nagyobb volt, mint a fogékony cv. Totál növényekben. Ugyanakkor a *CaPR-1* kifejeződése a lisztharmat rezisztens, saját gyökerű cv. Szentesi cseresznyepaprikában volt messze a legnagyobb, és ennél jóval kisebb expressziót detektáltunk a szintén lisztharmat ellenálló, cv. Szentesi cseresznyepaprikára oltott cv. Totál paprikákban (Szentesi+Totál) (33. ábra). A *CaPR-2* fokozott kifejeződése viszont csak részben korrelált a rezisztenciával, ugyanis csak a saját gyökerű cv. Szentesi cseresznyepaprikában volt detektálható, míg az oltott (Szentesi+Totál) és saját gyökerű cv. Totál étkezési paprikában nem (33. ábra). Érdekes azonban, hogy a lisztharmattal fertőzött paprikákban (45 nappal az inokuláció után) a *PR* gének expressziós mintázata gyakorlatilag pont fordított volt, mint a fertőzetlen növényekben, mivel a saját gyökerű cv. Totál paprikában a rendkívül nagy *CaPR-1* és *CaPR-2* expresszió a lisztharmat fogékonysággal korrelált, míg a rezisztens növényekben (saját gyökerű cv. Szentesi és oltott Szentesi+Totál) alig volt kimutatható a gének kifejeződése (33. ábra).



33. ábra: A cv. Szentesi cseresznyepaprika (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme*) lisztharmattal (*Leveillula taurica*, LH) szembeni, oltással átvihető rezisztenciájának markere a *CaPR-1* és *CaPR-2* gén fokozott kifejeződése (kvantitatív RT-PCR-rel mérve) a fertőzetlen növényekben (felső ábrarész) de nem a lisztharmattal fertőzött paprikában (alsó ábrarész) (45 nappal az inokuláció után). Saját gyökerű cv. Szentesi és Szentesi+Totál oltott: lisztharmat rezisztens paprika; saját gyökerű cv. Totál: lisztharmat fogékony paprika. ** és *** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,01$ és $p \leq 0,001$) a fogékony (cv. Totál) mintákhoz képest.

Eredményeink szerint a lisztharmat ellenálló cv. Szentesi cseresznyepaprika leveleiben már fertőzés nélkül is a szokásosnál jóval intenzívebb a spontán sejtelhalás mértéke (ld. 32. ábra). Elképzelhető, hogy a cv. Szentesi makroszkopikusan tünetmentes lisztharmat rezisztenciájában szerepet játszik a sejtelhalást szabályozó *Mlo* gén(ek) csökkent mértékű működése is, hasonlóan pl. a lisztharmat rezisztens *mlo* mutáns

árpavonalakhoz, amelyek szintén nagymértékű spontán sejtelhalást mutatnak (Wolter et al., 1993; Büschges et al., 1997). Fertőzetlen és lisztharmat fertőzött (45 nappal az inokuláció után) paprikákban kísértük figyelemmel a két ismert *Mlo* gén, a *CaMlo1* és *CaMlo2* (Zheng et al., 2013a) aktivitását. Fertőzetlen növényekben mindkét gén kifejeződése jóval kisebb volt a lisztharmat ellenálló paprikákban, mint a fogékony cv. Totál étkezési paprikában, viszont a saját gyökerű cv. Szentesi cseresznyepaprikában volt messze a legkisebb, ennél nagyobb (de a cv. Totál-ban mértnél kisebb) expressziót detektáltunk a szintén lisztharmat rezisztens cv. Szentesi cseresznyepaprikára oltott cv. Totál étkezési paprikában (Szentesi+Totál) (34. ábra). Lisztharmat fertőzés hatására a két *Mlo* gén expressziós profilja lényegében nem változott, kivéve az *CaMlo2* gént, ahol a génkifejeződés a fogékony cv. Totál-hoz képest mindkét rezisztens paprikában (saját gyökerű cv. Szentesi és oltott Szentesi+Totál) igen alacsony szintre esett vissza (34. ábra). Ezek szerint paprikában az *Mlo* gének expressziója a lisztharmat rezisztenciával fordítottan arányos és ez elsősorban a *CaMlo2* génnél szembetűnő.



34. ábra: A cv. Szentesi cseresznyepaprika (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme*) lisztharmattal (*Leveillula taurica*, LH) szembeni, oltással átvihető rezisztenciájának markere a *CaMlo1* és *CaMlo2* gén csökkent mértékű kifejeződése (kvantitatív RT-PCR-rel mérve) a fertőzetlen (felső ábrarész) és lisztharmattal fertőzött (alsó ábrarész) növényekben egyaránt (45 nappal az inokuláció után). Saját gyökerű cv. Szentesi és Szentesi+Totál oltott: lisztharmat rezisztens paprika; saját gyökerű cv. Totál: lisztharmat fogékony paprika. * és *** = szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,001$) a fogékony (cv. Totál) mintákhoz képest.

Eredményeink szerint a cv. Szentesi cseresznyepaprika oltással átvihető, tünetmentes lisztharmat rezisztenciájában meghatározó szerepe van a NADPH-oxidáz enzimaktivitással összefüggő fokozott szuperoxid felhalmozódásnak. A rezisztenciát jól jelzi továbbá a szokásosnál nagyobb mértékű spontán sejtelhalás valamint egyes védekezési gének (*CaPR-1* és *CaPR-2*) fokozott indukciója és két sejtelhalást szabályozó gén (*CaMlo1* és *CaMlo2*) expressziójának visszaszorulása.

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A növényi vírusfertőzésekkel szembeni hiperszenzitív reakcióban (HR) a rezisztencia és a sejt/szövethalál egymástól függetlenül öröklődhet

A karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által *Nicotiana edwardsonii*-ban kiváltott HR – a HR-t alkotó rezisztencia és sejt/szövethalál genetikailag független

Kétféle kísérleti megközelítéssel bizonyítottuk, hogy a karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által kiváltott hiperszenzitív reakció (HR) esetében a HR-t alkotó rezisztencia és sejt/szövethalál (nekrózis) genetikailag szétválasztható.

Egyrészt a *Nicotiana glutinosa*-nak a CaMV W260-ra adott nem-nekrotikus rezisztenciája HR-rá alakult, amikor ezeket a növényeket a *N. clevelandii*-val kereszteztük, amely a CaMV W260 vírus fertőzésére szisztemikus nekrozissal reagál. Normál környezeti körülmények között a *N. glutinosa* lokális klorotikus léziókat képez a CaMV W260-val történő inokuláció után (Schuelz és Wintermantel, 1993). A *N. glutinosa* és *N. clevelandii* keresztezéséből származó, kolhicin-kezelt növények (*N. edwardsonii* var. Columbia) azonban a CaMV W260-ra HR-típusú rezisztenciával (lokális nekrotikus léziók) reagáltak – mindez arra utal, hogy egy *N. clevelandii*-ből származó faktor (gén) járul hozzá a (lokális) sejt/szövethalál kialakításához. A növényi vírus rezisztenciának – így a CaMV-vel szembeni ellenálló képességnek is – több olyan típusa is van, amely nem HR formájában nyilvánul meg (tehát nem függ a HR-típusú sejt/szövethaláltól) (Callaway et al., 1996; Bendahmane et al., 1999; Hajimorad és Hill, 2001; Rui et al., 2017; Ross et al., 2021). Eredményeink rámutatnak arra, hogy pl. a *N. glutinosa* és a CaMV W260 interakciójából kialakuló rezisztencia (lokális klorotikus léziók) hasonlít a HR-hez (ugyanúgy gátolja a kórokozót), de a HR-re jellemző sejt/szövethalált eredményező komponens nélkül működik.

Egy másik kísérleti megközelítés alapján kimutattuk, hogy *N. edwardsonii* var. Columbia és a *N. clevelandii* keresztezéséből származó F₂ populációban a rezisztencia és a sejt/szövethalál egymástól függetlenül szegregálódott. Az F₂ növények négy különböző fenotípust mutattak: 1/ rezisztens, HR-típusú nekrotikus léziók, 2/ rezisztens, lokális klorotikus léziók, 3/ fogékony, szisztemikus nekrozis és 4/ fogékony, szisztemikus mozaik – erre a jelenségre leginkább az adhat magyarázatot, ha a rezisztenciát, ill. sejt/szövethalált meghatározó gének egymástól függetlenek. A *N. edwardsonii* var. Columbia (n = 36) és a *N. clevelandii* (n = 24) keresztezésének genetikai komplexitása miatt elképzelhető, hogy az F₂ populációban a rezisztenciát és a sejt/szövethalál szegregációját egész kromoszómák elvesztése is befolyásolhatja. Korábban kimutattuk, hogy CaMV W260 fertőzésére adott sejt/szövethalál egygénés tulajdonság, amit a *N. clevelandii*-ből származó recesszív *ccd1* (*CaMV cell death*) gén határoz meg (Király et al., 1999; Cawly et al., 2005). Ennek

megfelelően azok az F₂ növények, amelyek nem mutattak lokális vagy szisztemikus sejthalált, feltehetően nem örökölték két kópiát a *ccd1* gént hordozó kromoszómából. Ugyanakkor a CaMV W260-ra fogékony F₂ növények nem örökölték a vírus ellen hatásos rezisztencia gént hordozó kromoszómát. Kutatásaink során sikerült igazolnunk, hogy a *N. edwardsonii* var. Columbia-ban a CaMV W260-al szembeni rezisztencia a *N. glutinosa* szülőből származó egygénés, domináns (feltehetően szemidomináns) tulajdonság. Ismert, hogy a *N. glutinosa* több vírus rezisztencia gént is hordoz. Klasszikus genetikai módszerekkel már több, mint 80 éve kimutatták, hogy a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) ellen ható (HR-t kiváltó) *N* rezisztencia gén a *N. glutinosa*-ból származik (Holmes, 1938). Azóta tisztázták azt is, hogy legalább 67 további vírusfaj vált ki rezisztenciát a *N. glutinosa*-ban, ugyanakkor képes megfertőzni a *N. clevelandii*-t, hasonlóan a CaMV W260-hoz (ld. Schoelz et al., 2006). További kutatások feladata lesz tisztázni a *N. glutinosa*-ból származó, CaMV W260-al szembeni HR nélküli rezisztencia pontos genetikai hátterét.

A *N. glutinosa*-ból származó CaMV rezisztencia jellemzéséhez hasonló stratégiát alkalmaztunk ahhoz, amit közel 100 éve használtak először a TMV elleni *N* rezisztencia gén klasszikus genetikai jellemzéséhez (Clausen és Goodspeed, 1925). Az *N* gént *N. glutinosa*-ból (n = 12) keresztezéssel a *N. tabacum* cv. Purpurea-ba (n = 24) vitték át, a folyamat eredménye egy interspecifikus hibrid, a *N. digluta* (n = 36) lett. Ezeket a növényeket (*N. digluta*) aztán a TMV-re fogékony dohánnyal (*N. tabacum* cv. Purpurea) keresztezték, és TMV fertőzésre valamennyi F₁ egyed HR-t adott. A TMV rezisztencia egygénés, domináns jellegét úgy bizonyították, hogy az F₁ növényeket beltenyésztették, ill. visszakeresztették a fogékony *N. tabacum* cv. Purpurea-val (ld. Dunigan et al., 1987). A saját kísérleteinkben a *N. edwardsonii* var. Columbia interspecifikus hibridet (n = 36) a *N. glutinosa* (n = 12) és a *N. clevelandii* (n = 24) keresztezéséből állítottuk elő, majd a Columbia növényeket a CaMV W260-ra fogékony *N. clevelandii*-vel kereszteztük és szinte az összes F₁ utód HR-típusú rezisztenciát adott. A CaMV-vel szembeni rezisztencia öröklődését az F₂ utódokban, (ill. a fogékony *N. clevelandii*-vel visszakeresztett F₁ növények utódaiban, ld. Cole et al., 2001) követtük nyomon. Amerikai kutatási partnerünk (J. Schoelz és munkatársai) tisztázták azt is, hogy az F₂ utódokban az *N* gén (és a TMV rezisztencia) öröklődése is követhető volt, ami arra utal, hogy a keresztezéseinkben több gén is képes egymástól függetlenül szegregálódni (Cole et al., 2001).

A CaMV W260 által kiváltott HR-t alkotó rezisztencia és sejt/szövethalál (nekrózis) 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 nekrozist, míg a másikban (*N. bigelovii*) lokális klorozist és szisztemikus mozaikot vált ki. Ezt az eredményt támasztja alá, hogy a *N. edwardsonii* és *N. bigelovii* keresztezéséből kapott F₁ növények a CaMV W260-ra rezisztensek voltak, de a *ccd1* gén által meghatározott sejt/szövethalál visszaszorult, a HR helyett lokális klorotikus léziók fejlődtek ki, ami a *N. bigelovii*-ből származó domináns allél (*CCDI*) jelenlétére utal

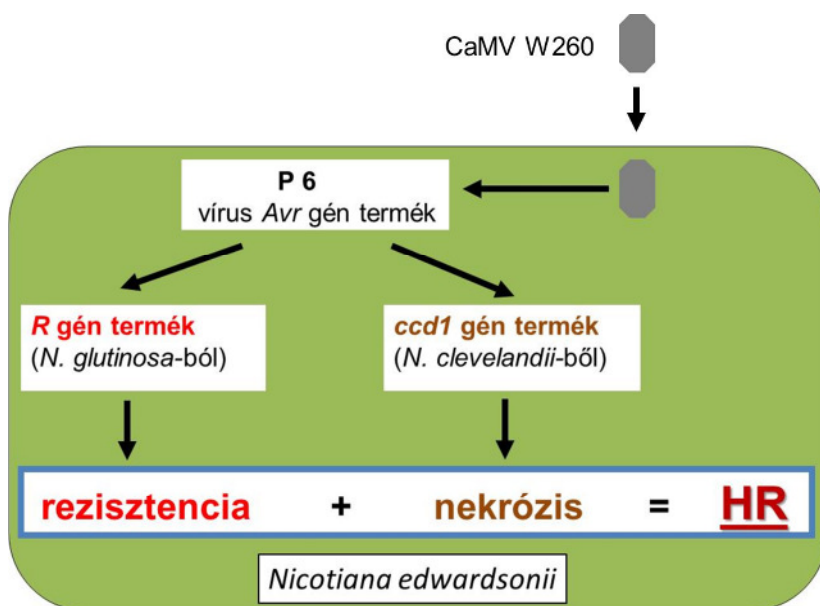
(Cawly et al., 2005). A fentiek alapján, amennyiben a vírusfertőzésekre adott HR két komponense (rezisztencia és sejthalál) genetikailag valóban szétválasztható, akkor a rezisztencia egy sejthalál gátló gén jelenlétében nem jár együtt HR-típusú sejt/szövetállal. Ezt igazolták a lúdfű (*A. thaliana*) *dnd1* (*defence no death*) mutánsának segítségével (Takahashi et al., 2012). Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) ellen ható RCY rezisztencia gént hordozó *dnd1* mutáns növényekben ugyanis a HR-sejthalál visszaszorult, de a rezisztencia továbbra is ugyanúgy működött, mint a vad típusban.

A HR-t alkotó rezisztencia és sejthalál teljesen független, eltérő gének által meghatározott, öröklődését baktériumos fertőzéseknél is igazolták (Gassmann, 2005). Egyes lúdfű (*A. thaliana*) vonalakban a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 baktérium HR-t, míg más növényvonalakban HR-sejthalál nélküli, tünetmentes rezisztenciát képes kiváltani. Két rezisztens, de eltérő fenotípusú (tünetmentes rezisztencia, ill. HR) lúdfű vonalat keresztezve tisztázták, hogy a rezisztenciát a domináns *RPS6* gén, míg a sejthalált a recesszív *hed1* lokusz határozza meg, a két gén egyidejű működése pedig HR-t (rezisztencia és sejthalál) eredményez (Gassmann et al., 2005; Kim et al., 2009).

A HR-t alkotó rezisztencia és sejt/szövetállal független öröklődésének lehetséges modellje a karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által fertőzött *Nicotiana edwardsonii*-ban

Kutatásaink célja a CaMV W260 által kiváltott HR-t alkotó rezisztencia és sejt/szövetállal genetikai hátterének feltárása volt, elsősorban a gazdanövény(ek) oldaláról. Ugyanakkor régóta ismert, hogy a CaMV P6 fehérjéjét kódoló vírus gén felelős a rezisztencia kiváltásáért, a P6 tehát a CaMV effektoraként működik (Daubert et al., 1984). A P6 gén terméke *N. edwardsonii*-ban HR-t (Schoelz és Shepherd, 1988; Palanichelvam et al., 2000), *N. glutinosa*-ban lokális klorotikus léziókkal kísért rezisztenciát (Schoelz és Wintermantel 1993), a *N. clevelandii*-ben pedig szisztemikus nekrozist képes kiváltani (Király et al., 1999; Palanichelvam et al., 2000). Ennek megfelelően a CaMV és egyes *Nicotiana* fajok közötti kórokozó-gazda kapcsolat egy sajátos „gén-génnel szembeni” (*gene for gene*) rendszerben értelmezhető (35. ábra). Ebben a modellben a HR-t egy vírus avirulencia (effektor) gén, a CaMV P6 és két gazdanövény gén fehérjetermékének interakciója váltja ki. A két növényi gén egyike a sejthalál (*ccd1*), a másik viszont a rezisztencia kialakításáért felel.

Hangsúlyozandó, hogy az általunk bemutatott rezisztencia modell a sejthalál kialakulását a növényi védekezési folyamatok (rezisztencia) mellé helyezi (35. ábra), míg a legtöbb hasonló modell azt feltételezi, hogy – legalább részben – a sejthalál indukálja a növényi védekezést (azaz a rezisztencia a sejthalál következménye) (Dangl et al., 1996; Ryals et al., 1996).



35. ábra: A vírusfertőzéssel szembeni hiperszenzitív reakciót (HR) alkotó rezisztencia és nekrosis (sejt/szövethalál) független öröklődésének (genetikai szétválasztásának) lehetséges modellje *Nicotiana edwardsonii* fajhibridben. A karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) W260 törzse által kiváltott HR során a rezisztenciát (R) egy a *N. glutinosa*-ból származó gén, míg a nekrozist a *N. clevelandii*-ből származó *ccd1* (*CaMV cell death 1*) gén fehérjeterméke határozza meg. A HR-t közvetlenül az váltja ki, hogy a CaMV W260 avirulencia (*Avr*) génjének terméke (P6 effektor) interakcióba lép a *N. edwardsonii*-ban működő rezisztencia és nekrosis (sejt/szövethalál) gén termékével (Cole et al., 2001 és Cawly et al., 2005 nyomán).

Ugyanakkor az utóbbi évtizedek kutatásai alapján feltételezhető, hogy a kórokozó (vírus) rezisztencia legtöbb esetében a sejthalál inkább a – kevésbé hatékonyan működő – rezisztencia következménye (Brown et al., 1966; Király et al., 1972; Bendahmane et al., 1999; Cooley et al., 2000; Kachroo et al., 2000; Sekine et al., 2008; Künstler et al., 2016). Egy ilyen modellel magyarázható több vírus rezisztencia gén (*Rx*, *HRT* és *RCY1*) működése is: ezek szerint az *Rx* gének normál vagy fokozott expressziója a burgonya X vírussal (*Potato virus X*, PVX) szemben tünetmentes extrém rezisztenciát vált ki, míg egy gyengébb promotor által irányított kisebb mértékű génexpresszió HR-t eredményez (Bendahmane et al., 1999, 2000). Hasonlóképpen a *HRT*, ill. *RCY1* rezisztencia gént hordozó lúdfű (*A. thaliana*) növények HR-típusú ellenálló képességet mutatnak a tarlórépa göndörödés vírus (*Turnip crinkle virus*, TCV) és uborka mozaik vírus *Cucumber mosaic virus*, CMV) fertőzésével szemben (Cooley et al., 2000; Sekine et al., 2008). Ugyanakkor a *HRT* vagy *RCY1* gént túltermelő transzgenikus növényekben a vírusfertőzésre nem alakul ki HR, hanem tünetmentes (extrém) rezisztencia, feltehetően azért, mert ilyenkor a növények rendkívül gyorsan reagálnak a TCV, ill. CMV fertőzésére (Cooley et al., 2000; Sekine et al., 2008). Ez a rezisztencia modell a növényi betegség ellenállóság különböző erősségű fokozatait a legerősebb (leghatékonyabb) tünetmentes, extrém rezisztenciától az egy-két sejtes (mikro) HR-en át a makroszkopikus HR-ig értelmezi (Bendahmane et al., 1999; Cooley et al., 2000). Saját kísérleteinkben a CaMV W260 által a *N. edwardsonii* var. Columbia és *N. clevelandii* keresztezéséből származó F₂ populációban, ill. a *N. glutinosa*-ban kiváltott nem-nekrotikus rezisztencia klorotikus lokális léziókkal jár együtt és a vírust csak részben gátolja, ezek alapján tehát inkább a CaMV által kiváltott HR-hez hasonlít,

mint a tünetmentes extrém rezisztenciához. Eredményeink szerint ezt a CaMV által kiváltott nem-nekrotikus (klorotikus léziókkal járó) ellenálló képességet egy sejtthalált meghatározó gén (*ccd1*) jelenlétében HR-típusú rezisztenciává tudtuk konvertálni.

A fentiek alapján tehát sikerült kimutatnunk, hogy a CaMV W260 által kiváltott HR-típusú rezisztencia esetében a HR-t alkotó rezisztencia és sejt/szövetthalál (nekrózis) genetikailag szétválasztható és kombinálható, valóban függetlenül öröklődő tulajdonságok.

A növényi védekezés fokozása – eltérő hatások a vírusfertőzésekkel szembeni hiperszenzitív reakciót (HR) alkotó rezisztenciára és nekrozisra (sejt/szövetthalálra)

Szalicilsav és glutation hatása a HR-re – eltérő mértékben fokozódhat az antioxidáns védelem (csökkenő HR-nekrozis) és a vírus rezisztencia

A hiperszenzitív reakció (HR) a növényi rezisztencia egyik leginkább tanulmányozott formája, amelyben a kórokozó gátlását a behatolás helyén programozott sejt/szövetthalál kíséri (Künstler et al., 2016; Balint-Kurti, 2019). Ugyanakkor a HR-t alkotó rezisztencia és lokalizált sejt/szövetthalál (nekrózis) sokszor egymástól független folyamatok eredménye lehet pl. vírusfertőzésekénél is, mivel a nekrotikus tünetek visszaszorulása nem mindig van szinkronban a kórokozó gátlásával (Mandadi és Scholthof, 2013; Künstler et al., 2016).

Eredményeink szerint az általunk létrehozott interspecifikus hibrid, a *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia növényekben (ld. előző rész) a vírusfertőzésre adott HR-léziók mérete láthatóan kisebb volt, mint az ugyanazon szülőktől származó (és 2 pár kromozómával kevesebbet hordozó) hibridben (*N. edwardsonii*). Ezt először a CaMV W260 fertőzésénél észleltük, de a Columbia növényekben ennél sokkal nagyobb mértékben szorult vissza a HR-típusú nekrozis a TMV és a TNV (dohány nekrozis vírus, *Tobacco necrosis virus*) fertőzését követően. A HR-nekrotizáció felületének jelentős csökkenése TNV fertőzésnél együtt járt a vírus titer hasonló mértékű (kb. 75%-os) visszaesésével, míg a TMV fertőzésénél a vírusszint a HR-tüneteknél (50%-os csökkenés) jóval kisebb mértékben (csak kb. 20%-al) csökkent.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a vírusfertőzött *N. edwardsonii* var. Columbia-ban tapasztalt kisebb mértékű HR-tünetek nem feltétlenül jelentik a vírus felhalmozódás hasonló mértékű gátlását (a rezisztencia hasonló mértékű növekedését), ez nyilván az adott vírus által a gazdában kiváltott reakciók függvénye is. Az eredeti *N. edwardsonii*-t és a *N. edwardsonii* var. Columbia-t két, egymástól rendszertani szempontból távol álló vírus kórokozóval fertőztük, a TNV-vel, ill. TMV-vel, amelyek az említett gazdanövényekben más jellegű rezisztenciát okoznak. A TNV a legtöbb növényben – így a *Nicotiana* nemzetség tagjaiban is – egy HR-típusú nemgazda-rezisztenciát okoz, TNV általi szisztemikus fertőzés (fogékonyság) igen ritkán fordul elő (ld. pl. Adhab et al., 2019), bár a vírus *Nicotiana benthamiana*-ban szisztemikus nekrotizist, míg lúdfüben (*Arabidopsis thaliana*) tünetmentes szisztemikus fertőzést okozhat (Molnár et al., 1997; Bacsó et al., 2016). A TMV ezzel szemben mindkét *N. edwardsonii*

fajhibridben egy olyan, HR-típusú gazda-rezisztenciát vált ki, amelyet a jól ismert *N* rezisztencia gén határoz meg (Christie, 1969; Cole et al., 2004). Egy ilyen típusú – az adott gazdanövény fajtára, ill. kórokozó izolátumra specifikus – rezisztencia rövid távon (a patogenezis kezdetén) hatásosabb, és erősebb lehet, mint a széles spektrumú nemgazda-rezisztencia, mivel egy kórokozó effektor és egy gazda rezisztencia gén termékének felismerési reakciója váltja ki (ld. Pruitt et al., 2021) – ez lehet az egyik lehetséges oka annak, hogy az eredeti *N. edwardsonii*-hoz képest a *N. edwardsonii* var. Columbia a TMV fertőzést (az első 5 napon belül) kevésbé képes gátolni (a rezisztenciát tovább fokozni), mint a nemgazda-rezisztenciát kiváltó TNV fertőzését.

A *N. edwardsonii* var. Columbia növények már vírusfertőzés nélkül, de a TNV és TMV fertőzés utáni 1-3 napon belül is sokkal nagyobb koncentrációban tartalmaztak kötött (glikozilált), ill. szabad szalicilsavat, ill. jóval erősebben expresszálták a vírusrezisztencia markerének számító *NgPR-1* gént, mint az *N. edwardsonii*, ami az emelt szintű TMV- és TNV-rezisztencia egyik oka lehet. A TNV, ill. TMV inokuláció után a Columbia növényekben hasonló mértékben – többszörösére – nőtt mind a szabad, mind a kötött szalicilsav szintje, bár TMV fertőzésnél a kisebb mértékű HR-tünetek nem jártak együtt a vírus titer hasonló mértékű gátlásával. A szalicilsav (SA) az egyik legfontosabb, növényi védekezéssel kapcsolatos hormon, amely kiemelt szerepet játszik elsősorban a biotróf kórokozók (így a vírusokkal) szembeni rezisztenciában (ld. pl. Vlot et al., 2009). Vírus rezisztens növényekben a fertőzést követően jelentősen megnő a szabad SA szintje, amely aktivál egyes szalicilsav glikozil-transzferáz izoenzimeket, ennek nyomán felhalmozódik a növényben a kötött SA (Enyedi és Raskin, 1993; Fu és Dong 2013). A kötött SA biológiai szerepe nem teljesen tisztázott, de a növényi vakuólumokban tárolt inaktív (kötött) SA aktív (szabad) formává hidrolizálható, amely a sejt többi részébe is eljuthat (Vaca et al., 2017). A *N. edwardsonii* var. Columbia hibridben található nagy mennyiségű kötött SA jelentősen hozzájárulhat a vírus rezisztenciához, mivel a kötött formából a szabad SA a növényben kb. 2 óra alatt kialakul (Hennig et al., 1993), míg TMV fertőzésnél a SA *de novo* szintézise kb. egy napot vesz igénybe (Malamy et al., 1990). Ugyanakkor az SA a kórokozó rezisztencia mellett fontos az abiotikus stresszel (pl. növényi sejt/szövetelhalás) szembeni védekezésben is (Horváth et al., 2007; Liu et al., 2022). Az SA-nak az abiotikus stressz védelemben játszott szerepét támasztja alá, hogy szalicilsavat felhalmozni képtelen dohányban a TMV-vel szembeni rezisztencia sérülése, ill. a fokozott HR-nekrotizáció mellett az antioxidáns kapacitás is erősen visszaszorul (Király et al., 2002). A SA tehát képes indukálni egyes antioxidánsokat, de az ún. patogenezissel kapcsolatos (PR) fehérjéket is (Ward et al., 1991; Delaney et al., 1994; Van Loon et al., 2006). Eredményeink szerint a *N. edwardsonii* var. Columbia-ban az *NgPR-1* gén konstitutívan expresszálódik, ami megerősíti az SA szerepét a TNV-vel, ill. TMV-vel szembeni rezisztenciában és egybevágh a korábbi eredménnyel, amely szerint az *NgPR-1* fehérje a fertőzetlen (egészséges) Columbia növényekben is nagy mennyiségben termelődik (Cole et al., 2004). A patogenezis korai szakaszában (a fertőzés után 1-2 napon belül) a PR gének fokozott expressziója a SA által irányított rezisztencia markere (Van Loon et al., 2006; Gullner et al., 2017b; Klessig et al., 2018), míg a kórfolyamat későbbi szakaszában (pl. TMV fertőzés után 5-7 nappal) a sikertelen rezisztenciát és az azt kísérő abiotikus stresszt (fokozott szöveti nekrozist) jelzi (Delaney et al., 1994; Gullner et al., 2017b).

Eredményeink alapján a Columbia hibridben a fokozott SA termelés és *NgPR-1* expresszió nemcsak a fokozott vírus rezisztenciát, hanem elsősorban az abiotikus stressz gátlását (kisebb mértékű HR-nekrotizáció) jelzi. Ezek szerint a *N. edwardsonii* var. Columbia-ban a szalicilsav és a PR gének által meghatározott növényi védekezés hasonló mértékben indukálódik akkor is, ha a HR-típusú lokális nekrosis visszaszorulása nem jár együtt a vírus rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával.

Újabb kísérleti eredményeink szerint a *N. edwardsonii* var. Columbia fokozott TMV rezisztenciájához hozzájárulhat a vírusfertőzés során indukált emelt szintű glutation (GSH) tartalom is (Király et al., 2023, bírálat alatt). Ezek szerint ezekben a növényekben a szokásosnál nagyobb SA tartalom a GSH-val együttműködve képes fokozni a TMV-vel szembeni HR-típusú rezisztenciát. Korábbi kutatások szerint az SA által irányított növényi betegség rezisztencia pozitívan korrelál a nagy GSH tartalommal. A növény szalicilsav szintjének növelése a GSH felhalmozódását is eredményezi és fordítva, ami végső soron fokozott ellenálló képességhez vezet többféle kórokozóval (vírus, baktérium, gomba) szemben (Fodor et al., 1997; Király et al., 2002; Ghanta et al., 2011, 2014; Kovács et al., 2015; Künstler et al., 2019; Zhu et al., 2021).

Dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun) az optimális szulfát ellátottság (+S) – a szulfát hiányos (-S) állapothoz képest – a glutation tartalom növekedésével jár együtt (ld. Király et al., 2012). Eredményeink szerint ezekben a GSH felhalmozó (+S) növényekben fokozódik a TMV-vel szembeni (az *N* gén által meghatározott), HR-típusú rezisztencia, azonban a fertőzés előrehaladásával a HR-típusú nekrosis visszaszorulásánál a TMV felhalmozódás nagyobb mértékben csökken. A GSH a növényi stressz védelemben kettős hatást fejt ki: antioxidáns hatása (ROS eliminálás) révén fontos szerepet játszik pl. a sejt/szövetelhalás gátlásában (Noctor et al., 2012; Hasanuzzaman et al., 2017, 2019), de emellett a betegség rezisztencia fontos faktora, többek között vírusfertőzéseknél is (ld. fentebb). Úgy tűnik, hogy a cv. Samsun NN dohányban a TMV-vel szembeni HR során a GSH-nak elsősorban a rezisztenciát fokozó hatása a meghatározó. Korábbi kutatási eredmények fényében mindez nem meglepő. Az *N* gént nem tartalmazó, TMV-re fogékony Samsun dohányban az optimális szulfát ellátottság (+S) által megnövelt GSH tartalom rezisztenciát indukált (késve jelentkező szisztemikus mozaik és csökkent TMV titer) (Höller et al., 2010). Szalicilsav hiányos növényekben ugyanakkor a sérült HR-típusú TMV rezisztenciát a megnövelt GSH tartalom helyreállította (Künstler et al., 2019). A glutation bioszintézisben kulcsszerepet játszó *GSH1* és *GSH2* gén csendesítése pedig *N. benthamiana*-ban gátolta a TMV-vel és a PVX fertőzésével szembeni rezisztenciát (De et al., 2018; Zhu et al., 2021).

A TMV fertőzés első 24 órájában a PR-1 típusú védekezési marker fehérjéket kódoló dohány gének (*NtPR-1a*, *NtPR-1b*, *NtPR-1c* és *NtPRB-1b*) kifejeződése az inokulált levelekben jelentősen megnőtt, de elsősorban az optimális szulfát ellátottságú (+S) növényekben. Ismert, hogy az *NtPR-1a* fokozott expressziója TMV-re fogékony, de GSH-t felhalmozó (+S) Samsun dohányban is a rezisztencia indukálását jelzi (Höller et al., 2010). Eredményeink szerint az említett *PR-1* génekhez hasonlóan a +S dohányban a fokozott mértékű HR típusú rezisztenciát két másik védekezéssel kapcsolatos gén, egy ún. tau osztályú glutation-S-transzferáz fehérjét kódoló gén (*NtGSTTau1*), és egy szalicilsav-kötő kataláz gén (*NtCATSAB*) erőteljes kifejeződése is jelezte a TMV fertőzés első 24 órájában.

A növényi GST-k időben történő (korai) indukciója meghatározó szerepet játszhat a HR-típusú rezisztenciában elsősorban azért, hogy a GST-k méregtelenítő és – többek között a tau osztályú növényi GST enzimeknél – antioxidáns hatásuk által szabályozzák a lokális sejt/szövethalált (Levine et al., 1994; Fodor et al., 1997; Gullner et al., 2018). A dohányból izolált szalicilsav-kötő kataláz (NtCATSAB) pedig, antioxidáns hatása mellett, az SA-hoz kötődve többek között a szerzett rezisztenciát is indukálja (Chen et al., 1993).

Összefoglalva, eredményeink rámutatnak arra, hogy egyes vírusfertőzéseknél (TNV, TMV) az emelt szintű szalicilsav, optimális szulfát (glutation) ellátottság és a PR gének által meghatározott növényi védekezés jelentősen indukálódik függetlenül attól, hogy a HR-típusú lokális nekrosis visszaszorulása együtt jár-e a vírus rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával (a vírus titer hasonló mértékű csökkenésével). Más szóval a növényi védekező rendszer egyes elemeinek fokozott indukciója eltérően hathat a vírusfertőzés által kiváltott HR-t alkotó rezisztenciára és lokális sejt/szövethalálra.

Antioxidánsok hatása a HR-re – fokozott antioxidáns védelem (csökkenő HR-nekrosis) de változatlan vírus rezisztencia

A növényi antioxidáns kapacitást fokozó kezelések jelentősen visszaszorítják a vírusfertőzésre adott HR-típusú lokális nekrosist, de a rezisztencia lényegében nem változik (Farkas et al., 1960; Gullner et al., 1999; Pogány et al., 2004). Kíváncsiak voltunk arra, hogy ugyanez a jelenség megfigyelhető-e olyan, a TMV fertőzésére HR-rezisztenciát adó dohányban (*N. tabacum* cv. Xanthi NN) is, amely kis koncentrációjú (5-10 mM) hidrogén-peroxid (H_2O_2) előkezelést kapott? Eredményeink szerint, ha a TMV-re HR-t adó dohány leveleit egy nappal az inokuláció előtt viszonylag kis koncentrációjú hidrogén-peroxiddal (H_2O_2) kezeljük (permetezzük), az antioxidáns kapacitás fokozódása mellett a HR-nekrosist mutató levélfelület jelentősen csökken. Ugyanakkor ez a H_2O_2 által indukált tüneti rezisztencia (a nekrotikus tünetekkel szembeni „immunizálás”) nem jár együtt a kórokozó (TMV) gátlásával.

Növényekben a ROS, pl. a H_2O_2 , nagy koncentrációban történő felhalmozódása a kórokozó behatolás helyén („oxidatív robbanás”) többféle védekezési folyamatot is indukál, amelyek végeredménye gyakran a lokális sejt/szövethalállal kísért, HR-típusú rezisztencia (Doke és Ohashi 1988; Goodman és Novacky, 1994; Alvarez et al. 1998; Balint-Kurti, 2019; Lukan et al., 2020, 2023; Dalio et al., 2021). A ROS (oxidatív stressz) káros hatásait a növényekben termelődő enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok képesek ellensúlyozni (Eltner, 1982; Barna et al., 2003a; Foyer és Noctor, 2005). Halliwell és Gutteridge (2015) szerint az *in vivo* kialakuló oxidatív stresszt gyakran csak az antioxidánsok indukciója jelzi. A ROS, elsősorban a H_2O_2 , a növényi védekezésben kettős szerepet játszik, mivel nagy koncentrációban közvetlenül a gazdasejtek elhalását és egyben a behatoló kórokozó gátlását idézi elő, míg kisebb koncentrációban a szomszédos sejtekben antioxidáns és PR géneket aktivál (Levine et al., 1994; Chamnongpol et al., 1998; Wu et al., 1997; Pogány et al., 2009; Torres, 2010; Halliwell és Gutteridge, 2015).

Ismert, hogy a növényi antioxidáns kapacitás fokozásával járó egyes kezelések (pl. S-karvon vagy aszkorbinsav, emelt citokinin tartalom) visszaszorítják a vírusfertőzésre

adott HR-típusú lokális nekrozist, de a rezisztencia nem vagy alig változik (Farkas et al., 1960; Gullner et al., 1999; Pogány et al., 2004). Elsőként mutattuk ki, hogy a TMV-re HR-rel reagáló dohány leveleit kis koncentrációjú (5-10 mM) H_2O_2 -val előkezelve jelentősen csökken a HR-nekrozist mutató levélfelület, de nem a kórokozó (TMV) felhalmozódása, míg három antioxidáns enzim (kataláz /CAT/, gvajakol-peroxidáz, aszkorbát peroxidáz /APX/) aktivitása is fokozódik. A H_2O_2 -előkezelés hatására megnőtt antioxidáns kapacitást jelzi három, antioxidáns enzimet kódoló gén (*NtSOD*, *NtCAT*, és *NtAPX*) fokozott expressziója is. Két antioxidáns enzimmel (SOD és CAT) történő kezelés (közvetlenül a TMV-inokuláció után) a H_2O_2 -előkezeléshez hasonló módon csökkentette a HR-típusú nekrotizáció mértékét ami arra utal, hogy a H_2O_2 által indukált, „immunizálás” a növényi antioxidáns kapacitás fokozásán keresztül fejt ki hatását.

Eredményeink összhangban állnak azokkal a korábbi kutatásokkal, melyek szerint a viszonylag kis koncentrációjú (5-20 mM) hidrogén-peroxiddal előkezelt dohány és borsó fokozottan toleráns lesz többféle, nekrotikus tünetekkel járó abiotikus stresszre, javul a növények csírázása és növekedése valamint a növényi antioxidáns kapacitás is jelentősen emelkedik, elsősorban a CAT, APX és más antioxidáns enzimek nagyobb aktivitása miatt (Gechev et al., 2002; Barba-Espín et al., 2010). Ismert az is, hogy paprika termések kezelése 20 mM H_2O_2 -dal jelentősen javítja a termés eltarthatóságát (Hafez, 2010). A CAT és APX fokozott aktivitását észlelték olyan transzgenikus dohányban is, amely egy glükóz-oxidázt kódoló gomba gént fejez ki és ezáltal folyamatosan hidrogén-peroxidot termel; ezek a növények egyúttal fokozott hidegtűrést is mutattak (Maruthasalam et al., 2010). Hasonló eredmény, hogy egy búza oxalát-oxidázt kódoló gén kifejeződése transzgenikus dohányban szintén megnöveli több antioxidáns enzim aktivitását, és a növényekben a hidrogén-peroxid folyamatos termelése együtt járt a herbicid (paraquat) és nagy fényintenzitás által okozott oxidatív stressz fokozott tolerálásával (Wan et al., 2009). Az antioxidáns kapacitás fokozása által ható, H_2O_2 által indukált „immunizálás” növénykórokozó baktériumoknál is észlelhető: *Agrobacterium tumefaciens* és *Ralstonia solanacearum* sejtek kezelése igen kis koncentrációjú (250 μ M) H_2O_2 -dal a baktériumokban jelentősen megnövelte a CAT és peroxidáz aktivitást, javítva ezzel a kórokozók életképességét (Nakjarung et al., 2003; Flores-Cruz és Allen, 2011).

A H_2O_2 által indukált tüneti rezisztencia („immunizálás”) alapvetően abban különbözik a tipikus növényi betegség rezisztenciától, hogy a kórokozó által kiváltott lokális nekrotikus (HR) tüneteket mérsékeli, de maga a kórokozó nem gátlódik. Hangsúlyozandó viszont, hogy bár kis koncentrációban a H_2O_2 gátolhatja a növényi védekezési válaszok egy részét (a HR-típusú sejt/szövethalált), ez nem szükségszerűen jár együtt a nagyobb mértékű kórokozó-felhalmozódással. Vírusos, de baktériumos és gombás fertőzéseknél is, már több évtizede ismert, hogy a HR-t alkotó rezisztencia és sejtihal sok esetben egymástól független genetikai és élettani folyamatok eredménye (Bendahmane et al., 1999; Cole et al., 2001; Künstler et al., 2016; Balint-Kurti et al., 2019; Dalio et al., 2021). Eredményeink szerint hasonló jelenség figyelhető meg, amikor a TMV-re rezisztens (HR-t adó) dohányban a kis koncentrációjú H_2O_2 - vagy antioxidáns (SOD és CAT) kezelés hatására a HR-típusú nekrotikus tünetek visszaszorulnak, de a TMV titer nem változik. Kimutattuk továbbá, hogy dohányban a H_2O_2 által indukált tüneti rezisztencia („immunizálás”) HR-t kiváltó baktériumos (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*)

fertőzésnél is érvényesül, mivel a HR-nekrózis csökkenése mellett az *in planta* baktériumszám változatlan marad (Hafez et al., 2012). Korábbi kutatások mindezt megerősítik, ugyanis HR-t eredményező baktériumos fertőzéseknél az albumin-kezelés, ill. a citokinin túltermelése transzgenikus dohányban növeli az antioxidáns kapacitást és gátolja a HR-nekrózist, de a baktérium szaporodása nem változik (Király et al., 1977; Barna et al., 2008).

Saját kutatásaink alapján úgy tűnik, hogy a H₂O₂ által indukált tüneti rezisztenciában („immunizálás”) az antioxidánsok igen, de a szalicilsav felhalmozódása nem játszik szerepet. A kis koncentrációjú H₂O₂- vagy antioxidáns (SOD és CAT) kezelés hatására TMV fertőzött dohányban a csökkent HR-típusú nekrózis és változatlan TMV titer mellett a szabad és kötött szalicilsav szintje nem változott szignifikánsan (Hafez et al., 2012). Többek között ez különbözteti meg a H₂O₂ által indukált „immunizálás”-t a szalicilsav által irányított növényi betegség rezisztenciától (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994; Fodor et al., 1997; Lee et al., 2016; Klessig et al., 2018; Zhang és Li, 2019; Vlot et al., 2009, 2021). Az általunk leírt tüneti rezisztencia feltehetően a szokásoshoz képest változatlan szalicilsav szint miatt sem képes a (vírus) kórokozó gátlására.

A fentiek alapján TMV fertőzött dohányban a H₂O₂- vagy SOD és CAT kezeléssel megnövelt antioxidáns kapacitás hatására a HR-nekrózist mutató levélfelület csökken, de a vírus titer nem változik. Összefoglalva, eredményeink rámutatnak arra, hogy növényi védekező rendszer egyes elemeinek (szalicilsav, glutation, *PR* gének, antioxidáns kapacitás) fokozott indukciója eltérően hathat a vírusfertőzés által kiváltott HR-t alkotó rezisztenciára és lokális sejt/szövethalálra.

A hiperszenzitív nekrózissal (sejt/szövethalál) járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – különbségek a védekezési gének és antioxidánsok aktiválódásában

Feltételezhető, hogy a HR-típusú nekrózissal járó, ill. tünetmentes (extrém) vírus rezisztencia kialakulása mögött – legalább részben – eltérő növényi védekezési folyamatok állnak. Ezek szerint a gazdanövény megfelelő időben – korán – aktiválódó védekezési folyamatai tünetmentes (extrém) rezisztenciát (ER) eredményezhetnek a HR helyett (Bendahmane et al., 1999; Cooley et al., 2000; Sekine et al., 2008; Hernández et al., 2016; Künstler et al., 2016; Baebler et al. 2020). Eredményeink megerősítik ezt a koncepciót, mivel ugyanabban a dohány genotípusban (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) a PVX által kiváltott ER a vírusfertőzés után már 6 órával detektálható és 1 nap elteltével teljesen kifejlődik, míg a TMV által előidézett HR-típusú rezisztenciánál a vírusszint nem csökken, hanem a HR-nekrózis (lokális léziók) megjelenésével együtt (2. nap) tovább nő. A korai védekezés jelentőségét az ER vs. HR kialakulásában az is alátámasztja, hogy a PVX fertőzés után már 1-6 órával jelentkező szuperoxid felhalmozódás megelőzi az ER kialakulását (ld. Eredmények; Király et al., 2021), míg a TMV által kiváltott HR-nél a szuperoxid szint csak a vírusfertőzés után 6-10 órával emelkedik meg (Rossetti és Bonatti, 2001).

A TMV-vel szembeni HR típusú, és a PVX-szel szembeni tünetmentes (extrém) rezisztenciát (ER) Samsun NN Rx1 genotípusú dohányban összehasonlítva kimutattuk, hogy összességében az ún. patogenezissel kapcsolatos (PR), sejthalál-gátló, ill. ROS-szabályozó (antioxidáns) védekezési gének expressziója az ER során – a HR-hez képest – nem változik szignifikánsan. Mindez arra utal, hogy a növényi védekezési gének korai és tranziens indukciója jelezheti az extrém rezisztencia kialakulását. Ennek megfelelően három, védekezéssel kapcsolatos (PR) gén (*NtPR-1a*, *NtPRB-1b* és *NtGSTphi1*) alapvetően stressz markerként működött, mivel a PVX által kiváltott ER során, a HR-hez képest, alig indukálódtak. Korábbi kutatások szerint ugyanakkor az *NtPR-1a* és *NtPRB-1b* gének kifejeződése nemcsak a HR-típusú sejt/szövetthalál, hanem kifejezetten a vírusrezisztencia markere is lehet (Ward et al. 1991; Delaney et al., 1994; Höller et al. 2010; Király et al., 2012). Saját eredményeinkhez hasonlóan az *NtPR-1a* indukcióját az *Rx1* géntől függő, PVX által kiváltott tünetmentes ER során már mások is kimutatták, de csak a fertőzés után 1 nappal (Liu et al., 2010). Ugyanakkor ismert, hogy dohányban a glutation-S-transzferáz kódozó *NtGSTphi1* gén expressziója leginkább az erős HR-típusú sejt/szövetthalállal és nem a vírus (TMV) rezisztenciával jár együtt (Künstler et al., 2019). Mindez nem meglepő annak fényében, hogy *N. benthamiana*-ban a homológ *NbGSTphi1* fokozott indukcióját először nekrozissal járó kompatibilis gombás fertőzéseknél figyelték meg (Dean et al., 2005).

A programozott sejthalál (PCD) gátlásában szerepet játszó *BAX inhibitor-1* (*NtBI-1*) gén expressziója az egészséges növényekhez viszonyítva a HR esetén (TMV fertőzés) többször akkora, mint a PVX által kiváltott tünetmentes ER-nél, ami a PCD-nek a HR-típusú sejt/szövetthalálban játszott szerepét jelzi (ld. pl. Watanabe és Lam, 2009). Érdekes viszont, hogy a PVX-inokulált levelekben az *NtBI-1* indukciója csak a vírusfertőzés első 6 órájában észlelhető, megelőzve az ER kialakulását, de a szuperoxid felhalmozódással párhuzamosan (ld. Eredmények; Király et al., 2021). Hasonló expressziós mintázatot figyeltünk meg a homológ *HvBI-1* génnél árpyában, a búza liztharmat (*B. graminis* f. sp. *tritici*) fertőzésére adott tünetmentes nemgazda rezisztenciánál (ld. Eredmények; Künstler et al., 2018). Eredményeink alapján az *NtBI-1* mind a PCD gátlásában, mind a PVX és TMV rezisztenciában szerepet játszhat, összhangban azzal, amit *N. benthamiana*-ban figyeltünk meg, ahol a homológ *NbBI-1* gén csendesítése fokozta a PVX és a burgonya Y vírus (*Potato virus Y*, PVY) szisztemikus felhalmozódását (Gaguancela et al., 2016). Egy alternatív-oxidázt és egy katalázt kódozó gén (*NtAOX1-2* és *NtCat1*) expressziója a HR (TMV fertőzés) során szintén sokkal nagyobb mértékben nőtt, mint az ER (PVX fertőzés) esetén. Az alternatív oxidázok a mitokondriumokban és kloroplastiszokban csökkentik a ROS felhalmozódását abiotikus stressz és kórokozó fertőzés esetén egyaránt, és részt vesznek a vírusokkal (pl. TMV) szembeni lokális és szisztemikus rezisztencia kialakításában (Király et al., 2008; Hanqing et al., 2010; Zhu et al., 2015). Az *NtCat1* gén a H₂O₂-lebontó kataláz enzimet termeli, többek között a TMV által kiváltott HR-típusú sejt/szövetthalál kialakulásával párhuzamosan (Dorey et al., 1998; Yi et al., 2003; Künstler et al., 2007a). Eredményeink szerint, a *NbBI-1*-hez hasonlóan, ennek a két ROS-szabályozó géneknek (*NtAOX1-2* és *NtCat1*) a korai, tranziens indukciója jelzi az extrém rezisztencia kialakulását, míg a PVX gátlás kezdetétől (a fertőzés 6. órája után) a

génexpresszió fokozatosan csökken, ami a korai ROS (szuperoxid) felhalmozódásnak az ER-ben játszott szerepére utal (ld. Eredmények; Király et al., 2021).

A TMV-vel szembeni HR típusú, és a PVX-szel szembeni tünetmentes (extrém) rezisztencia során egyes növényi antioxidánsok felhalmozódását, ill. aktivitását is figyelemmel kísértük. A HR (TMV fertőzés) során a glutation szintje (különösen a redukált glutation /GSH/ esetében) és a glutation működésében szerepet játszó két antioxidáns hatású enzim, a glutation reduktáz (GR) és a glutation-S-transzferáz (GST) aktivitása 4 nappal a TMV fertőzés után jelentősen megnőtt, összhangban a HR-típusú nekrotikus léziók kifejlődésével. Ugyanakkor az ER (PVX fertőzés) alatt a GSH szint, ill. GR és GST aktivitás lényegében nem változott. Növényi kórokozó fertőzéseknél a glutationnak két alapvető szerepe van. Antioxidáns hatása miatt, többek között a TMV által kiváltott HR-típusú rezisztenciánál, gátolja a sejt/szövetelhalált, párhuzamosan a fokozódó GR és GST aktivitással (Farkas et al., 1960; Fodor et al. 1997; Künstler et al., 2019). A glutation azonban jelátvivőként a betegség rezisztenciában is fontos funkciót tölt be, mivel az *in planta* glutation szint mesterséges fokozása inkompatibilis (pl. HR) és kompatibilis növény-vírus interakciók során egyaránt a tünetek és a vírus titer gátlását eredményezi (Gullner et al., 1999; Zechmann et al., 2007; Höller et al., 2010; Király et al., 2012; Künstler et al., 2019). Annak ellenére, hogy eredményeink szerint a PVX által kiváltott tünetmentes ER-nél a glutation szint a fertőzés után 4 nappal nem nőtt (alacsony maradt), elképzelhető, hogy a patogenezis korai szakaszában a glutation felhalmozódása hozzájárul az ER-hez. Ismert ugyanis, hogy *N. benthamiana*-ban a glutation bioszintézis géneinek (*GSH1* és *GSH2*) csendesítése, és ezáltal a glutation felhalmozódás gátlása, fokozza a PVX és TMV replikációját, azaz csökkenti a vírus rezisztenciát (De et al., 2018; Zhu et al., 2021).

Eredményeinket – miszerint a növényi védekezés (védekezési gének) korai, gyors aktiválása hozzájárulhat a PVX-szel szembeni tünetmentes, extrém rezisztencia kialakulásához – több más kutatás is megerősíti. Burgonyában a PVY^{NTN} fertőzésével szembeni korai növényi válaszok transzkriptomikai felmérését végezték el egy extrém rezisztens (cv. Santé) és egy fogékony (cv. Igor) fajtában (Baebler et al., 2009). Az ER során sokkal több védekezési gén expressziója változott meg már a vírusfertőzés után fél órával, míg a fogékony cv. Igor hasonló reakciókat csak jóval később, a fertőzés után 12 órával mutatott (Baebler et al., 2009). A szerzők szerint az ER során a fogékony válaszhoz képest észlelhető jóval gyorsabb kórokozó felismerés és jelátvitel biztosíthatja a hatékonyabb védekezést, amit többek között egyes védekezési (*PR*) gének fokozott expressziója, antimikrobiális vegyületek (alkaloidok), hormonok (brassinoszteroidok), a lignin és proteináz inhibitorok bioszintézise valamint a poliamin védekezési utak aktiválódása jelez (Baebler et al., 2009, 2020). Ismert az is, hogy az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) fertőzésével szemben extrém rezisztens uborkában a fertőzés után 18 nappal (a patogenezis igen késői fázisában) csak 9 gén mutat expresszió változást, míg a fogékony növényekben ugyanekkor több, mint 1600 gén kifejeződése módosul, ami arra utal, hogy a CMV-vel szembeni tünetmentes ER során a védekezési reakciók a vírusfertőzés utáni korai időpontokban indukálódnak (Šubr et al., 2020).

A fent tárgyalt kutatási eredményekkel összhangban saját kísérleteinkben kimutattuk, hogy egyes védekezési (*PR*, sejthalál-gátló, ill. antioxidáns) gének korai

indukciója a PVX fertőzésével szembeni extrém rezisztenciát már a vírusfertőzés első 6 óráján belül – az ER kialakulása előtt – megbízhatóan jelzi.

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

A ROS gátlása és a ROS-felhalmozódás időzítése – hatás a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) által kiváltott HR-t alkotó sejt/szövethalálra és rezisztenciára

Az *N* gén által meghatározott, HR-típusú TMV-rezisztencia magas hőmérsékleten (28 °C felett) sérül: nem alakul ki HR-típusú nekrozis és a gazdanövény a vírusfertőzésre fogékony lesz (Samuel, 1931). Eredményeink szerint a HR-típusú TMV-rezisztencia 30 °C-on történő visszaszorulásának egyik kiváltó oka a ROS – elsősorban a szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) – felhalmozódás, valamint a szuperoxid termelésben meghatározó NADPH-oxidáz enzimaktivitás, ill. génexpresszió (*NtRBOHD*) jelentős mértékű csökkenése. Dohánylevelekben a ROS ($O_2^{\bullet-}$ és H_2O_2) szinteket mérve azt tapasztaltuk, hogy 30 °C-on a szuperoxid-felhalmozódás jelentős mértékben, kb. a felére, esett vissza (a 20 °C-on tartott növényekhez képest), mind a TMV-inokulált, mind a kontroll („mock”) inokulált mintákban. Ugyanakkor a H_2O_2 szintje nem változott jelentősen. A ROS – elsősorban a szuperoxid – meghatározó szerepére a TMV által kiváltott HR-ben (sejt/szövethalál és rezisztencia) többek között azok a kutatások is utalnak, amelyek szerint a növényi védekezés korai szakaszában az antioxidáns enzimaktivitás, ill. génexpresszió átmenetileg visszaszorul (Fodor et al., 1997; Dorey et al., 1998; Mittler et al., 1998; Yi et al., 1999; Künstler et al., 2007a).

A dohánylevelek szuperoxid-szintjének 30 °C-on észlelt jelentős visszaesését több olyan élettani hatás is okozhatja, amely magas hőmérsékleten fokozottan érvényesülhet. A szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) egy meglehetősen instabil kémiai csoport, amely rövid életidejű (felezési ideje kb. 1-4 μ s) és terjedése is korlátozott (30 nm) (Mittler, 2017; Poór, 2020), de ennek ellenére több molekulával is reagálhat *in vivo* (Halliwell, 2006). A szuperoxidból és nitrogén-monoxidból (NO^{\bullet}) peroxinitrit ($ONOO^-$) keletkezik, amiről kimutatták, hogy nem járul hozzá a baktériumos fertőzés által kiváltott HR-típusú növényi sejthalálhoz (Delledonne et al., 2001) – ez lehet az egyik lehetséges magyarázata annak, hogy magas hőmérsékleten a TMV nem képes HR-típusú nekrotikus léziókat okozni még egy genetikailag rezisztens gazdanövényen sem. Nem kizárható az sem, hogy magas hőmérsékleten (30 °C-on) a szuperoxid spontán és/vagy SOD által katalizált átalakulása (dizmutációja) hidrogén-peroxiddá szintén hozzájárul a szuperoxid szint visszaeséséhez, bár eredményeink szerint 30 °C-on a kontroll-, ill. TMV-inokulált dohánylevelekben – a H_2O_2 mennyiségéhez hasonlóan – a SOD enzimaktivitás és génexpresszió nem változott szignifikánsan a 20 °C-on tartott növényekhez képest (Király et al., 2008).

A magas hőmérséklet további hatása lehet még a kórokozó felismerésben/rezisztenciában is szerepet játszó, a ROS (szuperoxid) termeléséért felelős növényi enzimek – többek között a NADPH-oxidázok – aktivitásának csökkenése (Lamb és Dixon, 1997; Torres és Dangl, 2005; Hu et al., 2020). Eredményeink szerint a 30 °C-on tartott (HR-típusú rezisztenciát nem mutató) dohányban a NADPH-oxidáz enzimaktivitás és egy kórokozó rezisztenciában szerepet játszó NADPH-oxidáz gén (*NtRBOHD*) expressziója jelentősen kisebb volt, mint a normál hőmérsékleten (20 °C) tartott növényekben, mind a TMV-fertőzött, mind a kontroll inokulált („mock”) mintákban. Az *NtRBOHD* által kódolt enzimfehérjének a rezisztenciában játszott funkciójára elsőként azok a kísérletek mutattak rá, amelyek szerint kórokozó elicitorral (kriptogein) kezelt növényekben az *NtRBOHD* részt vesz a ROS (szuperoxid) termelésben (Simon-Plas et al., 2002). Feltételezhető, hogy saját kísérleteinkben a TMV-fertőzött dohányban 30 °C-on megfigyelt, vírus fogékonysággal együtt járó kisebb szuperoxid szint oka (legalább részben) a csökkent mértékű NADPH-oxidáz enzimaktivitás és *NtRBOHD* génexpresszió. Egy NADPH-oxidázt szabályozó fehérjének (*Rac1*) a hibás (mutáns) formáját túltermelő, TMV-rezisztens (*NN* genotípusú) dohányban a HR késve jelenik meg, a lokális nekrotikus léziók kisebbek és lényegesen kevesebb ROS (szuperoxid és hidrogén-peroxid) termelődik (Moeder et al., 2005), ami arra utal, hogy a NADPH-oxidáz aktivitás gátlása valóban oka lehet a vírus rezisztencia csökkenésének. Ezt támasztják alá azok az újabb kísérletek, melyek szerint burgonyában az *StRBOHD* gén csendesítésének hatására a burgonya Y vírussal (*Potato virus Y*, PVY) szembeni rezisztencia sérül – a nagyobb számú HR-lézió megjelenése együtt jár a vírus fokozott terjedésével és replikációjával (Lukan et al., 2020). A TMV-vel fertőzött, sérült rezisztenciájú dohányban általunk 30 °C-on észlelt, jelentősen gátolt NADPH-oxidáz aktivitásnak egyik oka lehet többek között a kalcium (Ca^{2+}) felhalmozódás hiánya, amely egyik előfeltétele a NADPH-oxidázok hatékony ROS (szuperoxid) termelésének (Marcec és Tanaka, 2022). Az *RBOHD* NADPH-oxidáz enzimfehérje aktivitását a betegség rezisztencia kialakítása során a kalcium részben közvetlenül, részben pedig közvetetten szabályozhatja, Ca^{2+} -függő kinázok (a NADPH-oxidáz foszforilálása) révén (Dubiella et al., 2013; Kadota et al., 2015). Elképzelhető, hogy TMV-fertőzött dohányban az *NtRBOHD*-től függő NADPH-oxidáz aktivitás sérülését részben a Ca^{2+} -függő kináz működés hiánya vagy akár az *RBOHD*-t negatívan reguláló receptor-kináz (*PBL13*) túltermelődése okozza (Lee et al., 2020).

Eredményeink szerint a HR-típusú TMV-rezisztencia magas hőmérsékleten (30 °C) történő visszaszorulásának egyik oka a ROS – elsősorban a szuperoxid, és a H_2O_2 – felhalmozódásának csökkenése lehet. Ugyanakkor, bár a TMV-inokulált dohánylevelekben HR-típusú nekrozist tudtunk előidézni még 30 °C-on is, ha a leveleket a vírus inokuláció után 3 nappal szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) és H_2O_2 -képző ágensekkel (riboflavin / metionin, glükóz / glükóz-oxidáz, H_2O_2) kezeltük, a vírusrezisztencia így sem alakult ki: a 30 °C-on tartott növényekben a TMV titer egyformán magas volt, függetlenül a HR-nekrozis meglététől vagy hiányától. Mindez megerősíti, hogy a növényi vírusfertőzésekkel szembeni HR során a rezisztencia és a sejt/szövethalál sok esetben egymástól független genetikai és élettani folyamatok eredménye (Bendahmane et al., 1999; Cole et al., 2001; Künstler et al., 2016; Balint-Kurti et al., 2019; Dalio et al., 2021), és arra utal, hogy az *N* rezisztenciagént

hordozó dohányban a TMV titer inkább a hőmérséklettől és nem a HR-típusú nekrotikus tünetektől függ.

Eredményeink azonban rámutatnak arra is, hogy dohányban a TMV-vel szembeni gyors és hatékony (tünetmentes) rezisztencia kialakításában meghatározó szerepet játszik a ROS felhalmozódás megfelelő – korai – időzítése. Hatékony, tünetmentes rezisztenciát tudunk indukálni genetikailag fogékony (*mn* genotípusú) dohányban, ha a ROS (szuperoxid, ill. H_2O_2) felhalmozódás előidézése a vírusfertőzés utáni korai időpontokban (2 órával) történt, míg a fertőzés utáni későbbi időpontokban (3 nappal) adott ROS-kezeléseknél a HR-típusú nekrotikus léziók megjelenése nem jár együtt a vírusrezisztenciával (ld. fentebb). Korábbi kutatásokból ismert, hogy lizstharatra (*B. graminis* f. sp. *hordei* A6) fogékony árpában (*Mlo* genotípus) rezisztencia indukálható, ha a növényeket 50 mM H_2O_2 -dal vagy ROS-képző ágensekkel kezelik (Hafez és Király, 2003). Tünetmentes rezisztencia alakult ki, ha a ROS-kezelés az inokuláció után korán (1 nappal) történt, de HR-típusú lokális léziók (sejt/szövethalál) jelentek meg, ha a ROS-kezelés az inokuláció után később (3 nappal) lett időzítve. Hasonló jelenséget (tünetmentes rezisztencia indukálása korai ROS-kezelésre, és HR megjelenése későbbi ROS-kezelésre) tapasztaltak egyéb gomba- és baktérium kórokozókkal fertőzött árpában és más növényekben is (El-Zahaby et al., 2004). A fertőzött növény jól időzített (korai) ROS termelésének szerepe a hatékony (gyors és lehetőleg tünetmentes) rezisztencia kialakításában vírusfertőzések esetében is valószínűsíthető. Ismert, hogy a ROS, elsősorban a szuperoxid és a belőle képződő H_2O_2 , viszonylag korai felhalmozódása (az inokuláció után 6-10 órával) kíséri dohányban a TMV-vel szembeni HR-típusú rezisztenciát (Doke és Ohashi, 1988; Rossetti és Bonatti, 2001) és szójában a szója mozaik vírussal (*Soybean mosaic virus*, SMV) szembeni tünetmentes, extrém rezisztenciát is (Rui et al., 2017). A ROS felhalmozódásnak a vírus replikáció gátlásában játszott általános szerepére mutat rá, hogy uborka mozaik vírussal (*Cucumber mosaic virus*, CMV) szisztemikusan fertőzött dohányban a mozaikos levelek vírusmentes, ún. zöld szigeteiben sokkal nagyobb mennyiségű szuperoxid akkumulálódik, mint a szomszédos sárga levélszektorokban, amelyek a CMV-re fogékonyak (Shang et al., 2010). Összefoglalva, kísérleti eredményeink szerint a vírusfertőzött növényben 1/ a megfelelően időzített, korai (a fertőzés után pár órával) ROS-felhalmozódás szükséges a tünetmentes rezisztencia kialakításához, 2/ a későn időzített ROS-felhalmozódás hatására kialakuló HR-típusú, lokális nekrotikus tünetek nem feltétlenül jelzik a vírus rezisztencia meglétét, mivel önmagukban nem elégségesek a rezisztencia kialakításához.

A ROS-felhalmozódás szerepe a burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) által kiváltott tünetmentes, extrém rezisztenciában (ER)

Kimutattuk, hogy dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) a növényi vírus rezisztenciában meghatározó szerepet játszó ROS, a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) NADPH-oxidáz aktivitáshoz köthető korai felhalmozódása (1-6 órán belül) megelőzi a burgonya X vírussal (*Potato virus X*, PVX) szembeni tünetmentes, extrém rezisztenciát (ER), amely csak a

fertőzés utáni 6. órától alakul ki. Ezek szerint a PVX által kiváltott ER során a szuperoxid felhalmozódás lehet a vírusgátlás egyik kiváltó oka.

A ROS, elsősorban a szuperoxid, szerepe a makroszkopikus tünetekkel járó növényi vírus rezisztenciában évtizedek óta ismert. Az *NN* genotípusú, TMV-rezisztens dohányban az inokulált levelek védekezési reakciói nemcsak a HR-típusú lokális nekrotikus léziók megjelenésében nyilvánulnak meg, hanem többek között a NADPH-oxidáz aktivitástól függő szuperoxid felhalmozódásban is, ami a NADPH-oxidázok által generált szuperoxidnak a HR-típusú vírus rezisztenciában játszott szerepére utal (Doke és Ohashi, 1988). Ha ugyanez a dohány genotípus (*NN*, amely az *N* rezisztencia gént hordozza) túltermeli egy NADPH-oxidázt szabályozó rizs fehérje hibás formáját (*DN-OsRac1*), akkor a HR-rel együtt járó ROS termelés (szuperoxid és H_2O_2) jelentősen visszaszorul és a TMV-vel fertőzött növényekben a HR késve jelenik meg, ill. a HR-léziók a szokásosnál kisebbek lesznek (Moeder et al., 2005). Valószínűsíthető, hogy ezekben a ROS-hiányos növényekben a TMV rezisztencia (azaz vírusgátlás) is visszaszorul, ami arra utalhat, hogy a NADPH-oxidázok által irányított szuperoxid felhalmozódás szabályozása a vírus rezisztencia egyik fontos komponense. Ezt támasztja alá az a saját eredményünk, amely szerint *NN* genotípusú dohányban a HR-típusú TMV-rezisztencia 30 °C-on történő visszaszorulása együtt jár a ROS (elsősorban a szuperoxid) felhalmozódás, valamint a szuperoxid termelésben meghatározó NADPH-oxidáz enzimaktivitás, ill. génexpresszió (*NtRBOHD*) jelentős mértékű csökkenésével (ld. előző fejezet; Király et al., 2008). Újabb eredmények szerint burgonyában a PVY-al szembeni, *Ny-1* gén által irányított, HR-típusú rezisztenciánál az *StRBOHD* gén csendesítése a vírus fokozott replikációját és terjedését eredményezi (Lukan et al., 2020). Érdekes, hogy az *StRBOHD* expresszió kifejezetten a PVY-fertőzés által kiváltott HR-típusú nekrotikus léziók határzónájában indukálódik, amiből arra lehet következtetni, hogy a ROS (szuperoxid) felhalmozódás a vírus rezisztenciát a sejthaláltól függetlenül válthatja ki (Lukan et al., 2020; 2023). Ennek megfelelően a szuperoxidnak a növényi vírus rezisztenciában (vírus gátlásban) játszott közvetlen szerepére mutat rá Shang et al. (2010) eredménye: uborka mozaik vírusra (CMV) fogékony dohányban a szisztemikusan fertőzött, mozaikos levelek vírusmentes, ún. zöld szigeteiben sokkal nagyobb mennyiségű szuperoxid detektálható, mint a CMV-t tartalmazó szomszédos sárga levélszektorokban.

A fenti eredmények rámutatnak arra, hogy a HR-típusú sejt/szövethalál nem minden esetben szükséges a ROS (szuperoxid) által irányított, vírusfertőzések által kiváltott növényi védekezéshez (rezisztenciához). Ezek szerint a ROS felhalmozódás a makroszkopikusan tünetmentes (HR nélküli) extrém vírus rezisztenciában (ER) is szerepet játszhat, ahogy azt elsőként Bendahmane és munkatársai (1999) feltételezték. Azóta ismertté vált, hogy a szója mozaik vírus (SMV) SC15 törzsével szembeni, a szója *Rsc15* lókusza által meghatározott ER-t a szuperoxidból is keletkező H_2O_2 korai felhalmozódása (a fertőzés utáni 6-12 óra között) kíséri (Rui et al., 2017). Egy paradicsom vonalnak ('VFNT') a paradicsom tarkulós mozaik vírusra (*Tomato mottle mosaic virus*) adott extrém rezisztenciájához ugyanakkor a növények eleve nagy poliamin tartalma is hozzájárulhat (Nagai et al., 2020) feltehetően úgy, ahogy azt pl. a TMV által okozott HR-típusú rezisztenciánál már korábban kimutatták: a poliamin felhalmozódás poliamin-oxidáz aktivitás révén intenzív H_2O_2 termelést vált ki (Yoda et al., 2003). A ROS, elsősorban a

szuperoxid és H_2O_2 , szerepet játszhat a potexvírusokkal szembeni rezisztencia válaszokban (Mathioudakis et al., 2013), de kifejezetten az *Rx1* gén által irányított, PVX-fertőzésre kialakuló extrém rezisztenciában is. Ezt valószínűsíti, hogy egy kukoricából származó NADPH-oxidáz szabályozó fehérje (ZmRop1) túltermeltetése PVX-re fogékony *N. benthamiana*-ban sikeresen gátolta a vírusfertőzést (Cao et al., 2012). Egy újabb kutatás szerint dohányban az *Rx1* gén aktiválása a PVX effektor (vírus köpenyfehérje) tranzienst kifejeztetésével a H_2O_2 1-2 órán belüli markáns felhalmozódásához vezetett (Knip et al., 2019). Mindez egybevág saját eredményeinkkel, amely szerint az *Rx1* gént hordozó dohányban a PVX fertőzés által kiváltott tényleges (*bona fide*) extrém rezisztencia során a szuperoxid az inokulált levelekben a fertőzés kezdete után már 1 órával felhalmozódik, párhuzamosan a NADPH-oxidáz aktivitás fokozódásával.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy a ROS (pl. a szuperoxid és a hidroxilgyök /OH \cdot /) ténylegesen hozzájárulnak a PVX-szel szembeni tünetmentes extrém rezisztenciához. A PVX-szel fertőzött *Rx1* dohányban az *in planta* ROS (szuperoxid) szintet antioxidáns (SOD és CAT) kezelésekkel csökkentettük, ill. az *in planta* ROS (OH \cdot) termelést a ferritin túltermelésével (ferritin túltermelő és *Rx1* dohány keresztezésével) gátolni tudtuk. Mindkét kísérleti megközelítés a PVX-szel szembeni extrém rezisztencia részleges gátlásához és HR-típusú lokális nekrotikus tünetek megjelenéséhez vezetett. Ezeket az eredményeinket megerősítik azok a saját kutatásaink is, amelyek szerint árpaiban az árpa liztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztencia SOD és CAT kezelésekkel részlegesen visszaszorítható és mindez együtt jár a szuperoxid szint jelentős csökkenésével és a HR-típusú lokális tünetek kialakulásával (ld. Eremények; Küntler et al., 2018). A ferritin túltermelés szerepe az extrém PVX rezisztencia visszaszorításában feltehetően azzal magyarázható, hogy ez a növényi fehérje megkötni és raktározni képes a OH \cdot -t generáló intercelluláris vasat (Fe $^{2+}$). Ez a folyamat OH \cdot hiányt eredményez, ami hozzájárul a növényi sejtek oxidatív stresszel szembeni védelméhez (Deák et al., 1999; Van Wuytswinkel et al., 1999; Ravet et al., 2009; Zang et al., 2017). Úgy tűnik, hogy PVX fertőzés során a megfelelő növényi OH \cdot koncentráció hiánya a vírus replikációt is fokozza, ami a fertőzés után 1-2 napon belül az extrém vírus rezisztencia (ER) átmeneti (tranzienst) visszaesését és a HR megjelenését eredményezi. Egy ER-t mutató, de kallóz-hiányos burgonyafajtában (cv. Santé) a PVY titer hasonló átmeneti emelkedést mutatott, de a fertőzés után későbbi időpontban (7 nappal) és makroszkopikus HR-tünetek nélkül (Dobnik et al., 2013; Baebler et al., 2020), ami arra utal, hogy az ER gátlásának dinamikája (sebessége) befolyásolhatja a HR kialakulását.

A ROS (szuperoxid) felhalmozódásnak a PVX-szel szembeni, *Rx1* gén által meghatározott extrém rezisztenciában játszott tényleges szerepére utal az az eredményünk is, hogy a PVX-fertőzött, fogékony dohány kezelése (az inokuláció után 2 órával) egy szuperoxid-generáló kémiai ágenssel (riboflavin/metionin) HR-szerű tüneteket és a vírus titer csökkenését okozza. Úgy tűnik, hogy a PVX-re fogékony dohányban a nagy mennyiségű *in planta* szuperoxid (ROS) nem képes tünetmentes, extrém rezisztenciát indukálni, de a vírus replikációját részlegesen gátolja, ami az ER-nél kevésbé hatékony HR-típusú rezisztenciához (lokális sejt/szövetállal kísért patogén gátlás) vezet (ld. Bendahmane et al., 1999). Korábbi kutatások szerint vírusfertőzött növényekben a korai ROS felhalmozódás általában a gyorsan kialakuló, tünetmentes rezisztencia egyik

kísérőjelensége. A szója mozaik vírussal (SMV) szembeni ER a H_2O_2 korai felhalmozódásával jár együtt, a fertőzés után már 6-12 órával (Rui et al., 2017). Saját kutatásaink szerint tünetmentes rezisztencia indukálható TMV-re fogékony dohányban, ha külső kezelésekkel ROS (szuperoxid, ill. H_2O_2) felhalmozódását idézzük elő a vírusfertőzés utáni korai időpontban (2 órával), míg a fertőzés után jóval később (3 nappal) adott ROS-kezeléseknél a HR-típusú nekrotikus léziók megjelenése nem eredményez vírus rezisztenciát (ld. Eredmények; Király et al., 2008; Bacsó et al., 2011). Kísérleteink során kimutattuk, hogy dohányban a PVX elleni ER-t a NADPH-oxidáz aktivitással összefüggő korai ROS (szuperoxid) felhalmozódás már a fertőzés utáni 1-6. órában előrejelzi, míg ismert, hogy a TMV-által kiváltott HR-rezisztenciánál a szuperoxid csak a fertőzés után később (6-10 órával) akkumulálódik (Rossetti and Bonatti 2001). Ezek szerint a tünetmentes (pl. extrém) vírus rezisztencia egy gyorsan kialakuló, hatékony növényi védekezési válasz, míg a rezisztencia lassabb, későbbi aktiválása HR-t eredményezhet. Ezt bizonyítja, hogy a PVX köpenyfehérjéjének (a vírus effektorának) túltermelése az *Rx1* rezisztencia gént hordozó dohányban HR-típusú sejt/szövethalált vált ki, tehát az *Rx1* gén által meghatározott extrém rezisztencia (ER) olyan gyors (a vírus olyan hamar gátlódik), hogy nincs idő a HR kiváltására (Bendahmane et al., 1999). A tünetmentes ER-nek a HR-rel szembeni korábbi, gyorsabb aktiválásával összhangban az ER genetikailag episztatikus a HR-rel szemben, amit több növény-vírus kapcsolatban is kimutattak (pl. PVX-dohány és PVY-burgonya) (Bendahmane et al., 1999; Valkonen et al., 1994; Szajko et al., 2018). Mindezt alátámasztja, hogy egyes HR-rezisztenciát kiváltó *R* gének (pl. *Arabidopsis*-ban a *HRT* vagy uborkában az *RCY1*) túltermelése tünetmentes ER-t eredményez a tarlórépa göndörödés vírus (*Turnip crinkle virus*, TCV), ill. uborka mozaik vírus *Cucumber mosaic virus*, CMV) fertőzésével szemben (Cooley et al., 2000; Sekine et al., 2008).

Összefoglalva, eredményeink bizonyítják a ROS (szuperoxid és OH^{\cdot}) korai felhalmozódásának tényleges szerepét a PVX replikációjának gátlásában a tünetmentes, extrém rezisztencia során és megerősítik azokat a korábbi eredményeket, amelyek szerint a vírusfertőzések által kiváltott, sejt/szövethalállal járó HR – a tünetmentes ER-hez képest – egy lassabban kialakuló, később aktiválódó rezisztencia válasz.

Tünetmentes nemgazda rezisztencia biotróf gombakórokozókkal (pl. liztharmat) szemben – a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) korai felhalmozódásának szerepe

A szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) felhalmozódás dinamikáját hasonlítottuk össze biotróf és hemibiotróf kórokozók fertőzött növényekben, alapvetően háromféle típusú növény-kórokozó kapcsolatban, amelyek 1/ fogékonysággal, 2/ tünetmentes (ún. I. típusú) nemgazda rezisztenciával vagy 3/ sejt/szövethalállal (lokális nekrotikus léziók) kísért, HR-típusú gazda rezisztenciával járnak. Az inokulált levelekben a szuperoxid felhalmozódása a tünetmentes nemgazda rezisztencia során mindig hamarabb jelentkezett, mint a HR-típusú gazda rezisztenciánál, míg a fogékony növény-kórokozó kapcsolatokban a vizsgált, viszonylag korai időpontokban (fertőzés után 2-4 nap) sosem detektáltunk jelentősebb szuperoxid felhalmozódást. Eredményeink arra utalnak, hogy a szuperoxid korai

felhalmozódása döntő tényező lehet a tünetmentes nemgazda rezisztencia kialakításában, a lassabban kifejlődő HR-típusú gazda rezisztenciával szemben. Mindezt azok a korábbi kutatások is alátámasztják, amelyek szerint egy adott növényfaj által mutatott nemgazda- vagy gazda rezisztencia több esetében is (ld. a 3. táblázatban szereplő növény-kórokozó kapcsolatokat) a kórokozó gátlásának időzítése jól korrelál az általunk detektált szuperoxid felhalmozódással (Niks, 1983; Hückelhoven et al., 1999; Vleeshouwers et al., 2000; Neu et al., 2003; Trujillo et al., 2004a; Bolton et al., 2008; Hoffmann et al., 2008). Ugyanakkor a *Puccinia hordei* által búzában kiváltott tünetmentes nemgazda rezisztenciánál a kórokozó gátlás és a szuperoxid felhalmozódás közötti korreláció kevésbé szorosnak tűnik, mivel a rezisztencia az inokuláció után már 2 napon belül kialakul (Niks, 1983), míg a szuperoxid akkumulációját csak 3 napon belül észleltük. Elképzelhető, hogy ebben a nemgazda-kórokozó kapcsolatban a szuperoxid termelés egy másodlagos hatás; viszont az sem kizárható, hogy kísérleteinkben használt búzafajta (cv. MV-Emma) nemgazda rezisztenciája a szokásosnál lassabban, de a szuperoxid felhalmozódással összhangban alakul ki.

A szuperoxid az első olyan ROS, amelynek bizonyították a vírus- baktérium- és oomicéta kórokozókkal szembeni HR-típusú gazda rezisztenciában betöltött szerepét (Doke, 1983a, b; Doke és Ohashi, 1988; Ádám et al., 1989). Ismert továbbá, hogy biotróf vagy hemibiotróf kórokozókkal (lisztharmatok, rozsdák, baktériumok) szemben tünetmentes gazdarezisztencia indukálható viszonylag korán (a fertőzés 1-3. napján), ha a növényeket ROS-képző ágensekkel kezelik, míg a ROS-kezelések későbbi alkalmazása HR-típusú gazdarezisztenciát eredményez (Hafez és Király, 2003; El-Zahaby et al., 2004). Saját kutatásaink szerint tünetmentes gazda rezisztencia váltható ki dohány mozaik vírussal (TMV) szemben, ha a fogékony dohánynövényeket szuperoxid-generáló riboflavin/metionin oldattal kezeljük a vírus inokuláció utáni korai időpontban (2 órával) (ld. Eredmények; Bacsó et al., 2011). Ugyanakkor bizonyítottuk a szuperoxid korai felhalmozódásának tényleges szerepét a burgonya X vírussal (PVX) szembeni tünetmentes (extrém) gazda rezisztenciában (ld. Eredmények; Király et al., 2021). A szuperoxidnak a növények tünetmentes gazda rezisztenciájában játszott közvetlen szerepére mutat rá Shang et al. (2010) eredménye is: uborka mozaik vírusra (CMV) fogékony dohányban a szisztemikusan fertőzött, mozaikos levelek vírusmentes, ún. zöld szigeteiben a vírus hiánya nagy mennyiségű szuperoxid felhalmozódással jár együtt. Ezzel összhangban sikerült kimutatnunk, hogy a cseresznyepaprika (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme*) lisztharmattal (*Leveillula taurica*) szembeni, tünetmentes, oltással átvihető gazda rezisztenciája a szuperoxid konstitutív termelésével jár együtt, már a fertőzetlen növényekben is (ld. Eredmények; Albert et al., 2017). A fent említett adatok, ill. saját eredményeink (a tünetmentes nemgazda rezisztenciát korai szuperoxid felhalmozódás kísérli) arra utalnak, hogy a szuperoxid a gyors, hatékony és tünetmentes rezisztencia indukálásában meghatározó szerepet játszik, feltehetően a kórokozók gátlása/elölése és/vagy a védekezési jelátvitelben való részvétel által.

Eredményeink szerint az árpában a búzalisztharmattal (*B. graminis* f. sp. *tritici*, Bgt) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztencia során detektált korai szuperoxid felhalmozódás (a fertőzés 1. napján, 1 DAI) az inokulált levelek mezofill sejteinek kloroplasztiszaiban lokalizálódik, míg ugyanebben az időpontban az árpalisztharmattal (*B.*

graminis f. sp. *hordei*, Bgh) szembeni HR-típusú gazda rezisztenciánál nem észleltünk szuperoxid felhalmozódást a mezofill kloroplasztiszokban. Érdekes, hogy az árpa Bgh-val szembeni tünetmentes gazda rezisztenciája szintén hasonlóan korrelál a fertőzési helyekhez közeli mezofill kloroplasztiszokban megfigyelhető korai (1 DAI) szuperoxid akkumulációval (Hückelhoven és Kogel, 1998). Bár nem zárható ki, hogy ez a kloroplasztiszokhoz köthető szuperoxid termelés antimikrobiális hatású, az is elképzelhető, hogy egy viszonylag korai, ROS (szuperoxid) által kiváltott, kloroplasztiszokhoz köthető jelátvitel az árpa lisztharmat-fertőzésekkel szembeni tünetmentes rezisztenciájának egyik fő jellemzője. A kloroplasztiszokban megfigyelhető ROS felhalmozódásnak a kórokozó fertőzésekkel szembeni korai rezisztencia válaszokban játszott meghatározó szerepére mutatnak rá Großkinsky és munkatársai (2012) eredményei: ezek szerint a baktérium-fertőzés által kiváltott gazda rezisztenciánál a kloroplasztiszokban is detektálható szuperoxid és H₂O₂ felhalmozódás már a HR-tünetek kialakulása előtt jelentkezik és az antioxidáns kapacitás megemelkedésével jár együtt. Zabala et al. (2015) szerint a baktérium-fertőzés (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) által kiváltott tünetmentes nemgazda rezisztenciánál a kloroplasztiszok ROS felhalmozódása a fertőzés után igen korán, már 5-6 órával észlelhető. Ugyanakkor ismert, hogy fogékonyság esetén a baktérium- és vírus kórokozók kloroplasztiszokba juttatott effektorai gátolják a fotoszintetikus elektron transzportot, ami a fertőzésnek ebben a korai szakaszában csökkenő ROS termeléshez vezet (ld. pl. Abbink et al., 2002; Manfre et al., 2011; Balasubramaniam et al., 2014; Kong et al. 2014; Bobik és Burch-Smith, 2015; Kuźniak és Kopczewski, 2020). A rezisztenciát kiváltó növény-kórokozó kapcsolatokban viszont a kloroplasztiszokban kialakuló ROS (szuperoxid és H₂O₂) szignál a szuperoxid-termelő, sejtmembránhoz kötött NADPH-oxidázok aktiválásával az apoplastba, onnan pedig a szomszédos sejtekbe is eljuthat, hozzájárulva így a sejthalállal járó- vagy tünetmentes rezisztencia kialakulásához (ld. pl. Zurbruggen et al., 2010). Érdekes, hogy a lisztharmattal (Bgt, ill. Bgh) szemben tünetmentes nemgazda rezisztenciát mutató árpában és búzában a szuperoxid felhalmozódása a kórokozó támadási helyétől távolabb levő néhány epidermisz sejt plazmamembránjában/sejtfalában is detektálható, ami a szuperoxidnak a makroszkopikusan tünetmentes (I. típusú) nemgazda rezisztenciát kiváltó jelátvitelben játszott szerepére utal (Trujillo et al., 2004a). Elképzelhető, hogy a Bgt-vel szemben nemgazda rezisztens árpában a mezofill kloroplasztiszokban általunk detektált erőteljes szuperoxid felhalmozódás felelős a Trujillo és munkatársai (2004a) által leírt, epidermisz-eredetű, gyengébb jelek felerősítéséért, ill. továbbításáért.

Kísérleteink alapján a NADPH-oxidáz enzimaktivitás változása az idő függvényében jól követi a szuperoxid korai vs. késői felhalmozódását a Bgt-vel szemben tünetmentes nemgazda rezisztenciát, ill. a Bgh-val szemben HR-típusú gazda rezisztenciát mutató árpa növényekben. Mindez arra utal, hogy az említett rezisztenciaválaszok során keletkező szuperoxid jelentős része a NADPH-oxidázok katalízisével jön létre. A (hemi)biotróf kórokozók elleni sikeres védekezés során elsősorban ezek a növényi sejtmembránhoz kötött enzimek (NADPH-oxidázok) felelősek a szuperoxid termeléséért (ld. pl. Doke és Ohashi, 1988; Levine et al., 1994; Berrocal-Lobo et al., 2010; Proels et al., 2010; Pereira Torres et al., 2017; Xiao et al., 2017; Lee et al., 2020; Pruitt et al., 2021; Marcec és Tanaka, 2022). Saját kutatásainkban igazoltuk, hogy dohányban a szuperoxid

NADPH-oxidáz aktivitáshoz köthető korai felhalmozódása (1-6 órán belül) megelőzi a burgonya X vírussal (PVX) szembeni tünetmentes, extrém (gazda) rezisztenciát, míg a dohány mozaik vírussal (TMV) szembeni HR-típusú gazda rezisztencia visszaszorulása magas hőmérsékleten (30 °C-on) együtt jár a NADPH-oxidáz aktivitás jelentős mértékű csökkenésével (ld. Eredmények, Király et al., 2008, 2021). A NADPH-oxidázok nemgazda rezisztenciában játszott szerepére utal, hogy *N. benthamiana*-ban két NADPH-oxidázt kódoló gén (*NbRBOHA* és *NbRBOHB*) csendesítése a ROS (szuperoxid és H₂O₂) szint visszaeséséhez és a *Phytophthora infestans*-szal szembeni, HR-rel kísért nemgazda rezisztencia gyengüléséhez vezetett (Yoshioka et al., 2003). Hasonló eredményeket kaptak dohányban, ahol a Rac1 fehérje hibás, mutáns formájának túlermelése tönkretette a NADPH-oxidáz aktivitás szabályozását, egyúttal visszaszorult a *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 baktériummal szembeni HR-típusú nemgazda rezisztencia (Moeder et al., 2005). An et al. (2017) eredményei szerint lúdfűben (*A. thaliana*) a baktériumos fertőzésekkel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciát hiszton acetiltranszferázt kódoló (ún. *Elongator*) gének is szabályozzák részben úgy, hogy egy NADPH-oxidáz gén (*AtRBOHD*) expresszióját és a ROS akkumulációt fokozzák. Az árpa NADPH-oxidázt kódoló génei közül a betegség rezisztencia kialakításában eddig csak a *HvRBOHF2* szerepét igazolták, melynek működése a Bgh-val szembeni gazda rezisztenciánál a kórokozó behatolás epidermiszben történő gátlásához szükséges (Proels et al., 2010; Pereira Torres et al., 2017). Az *HvRBOHF2* expressziója azonban a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztencia, ill. a Bgh-val szembeni HR-típusú gazda rezisztencia során lényegében alig változik (nem bemutatott saját adatok; Hüchelhoven et al., 2001). Elképzelhető, hogy 1/ ezekben az esetekben a NADPH-oxidáz aktivitás szabályozása nem a transzkripció szintjén történik vagy 2/ a liztharmatokkal szembeni tünetmentes nemgazda rezisztencia, ill. HR-típusú gazda rezisztencia során a fokozott NADPH-oxidáz aktivitásért az árpában azonosított további 5 db *HvRBOH* gén (Lightfoot et al., 2008) valamelyike felelős.

Kutatásaink során árpában a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciára és az azt kísérő, NADPH-oxidáz aktivitáshoz köthető korai szuperoxid felhalmozódásra specifikus génexpressziós változásokat is azonosítottunk. A nemgazda rezisztens levelekben az inokuláció után 24 órával (a szuperoxid felhalmozódással és fokozott NADPH-oxidáz aktivitással egyidőben) egy szuperoxid-dizmutázt és egy sejtthál szabályozó fehérjét (BAX inhibitor-1) kódoló gén (*HvSOD1* és *HvBI-1*) expressziója átmenetileg (tranziensen) megemelkedett. A Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztencia során a ROS szint és sejtthál visszaszorításáért felelős gének expressziójának gyors, tranziens emelkedése a gyors és hatékony növényi védekezést jelezheti, amely a kórokozót rövid időn belül gátolhatja (elölheti), így e gének további működésére feltehetően már nincs szükség. Ugyanakkor a Bgh-val szembeni HR-típusú gazda rezisztenciánál a *HvSOD1* és *HvBI-1* nagymértékű expressziója a fertőzés utáni későbbi időpontokban (24, 48 és 72 óra) végig megmaradt, ami feltehetően a HR-re jellemző lassabb védekezési válaszokat jelzi, amely mellett a patogén korlátozott mértékben, de még szaporodik, mielőtt végleg kialakul a rezisztencia. A *HvBI-1* esetében a fent leírt génexpressziós változásokat más árpafajták és egy másik Bgt rassz kapcsolatában, szemikvantitatív RT-PCR módszert használva már korábban leírták (Hüchelhoven et al.,

2001; Eichmann et al., 2004). Saját kísérleteinkben az Ingrid árpafajtában és a jóval érzékenyebb RT-qPCR módszer segítségével ezeket az eredményeket meg tudtuk erősíteni. Hangsúlyozandó viszont, hogy elsőként mutattuk ki egy SOD gén (*HvSOD1*) tranzienst indukcióját az árpa Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciájában. Ismert, hogy a *HvSOD1* csendesítése lényegében nem befolyásolja a Bgh fertőzés folyamatát, de a ROS felhalmozódást kiváltó herbicid stressznek kitett növényekben intenzívebb levél nekrozist eredményez (Lightfoot et al., 2017). Ezek szerint a *HvSOD1* által kódolt CuZn-SOD enzimfehérjének fő funkciója a citoszol redox egyensúlyának fenntartása lehet – feltehetően ez magyarázza a Bgh-val szembeni HR-típusú gazda rezisztenciánál általunk megfigyelt fokozott *HvSOD1* expressziót.

Eredményeink rámutatnak a szuperoxidnak a tünetmentes (I. típusú) nemgazda rezisztenciában játszott tényleges szerepére. Részben saját korábbi eredményeink alapján ismert, hogy árpában egy rövid ideig tartó hő-sokk (49 °C 45 s) részlegesen képes visszaszorítani a Bgh-val szembeni tünetmentes és HR-típusú gazda rezisztenciát, párhuzamosan a szuperoxid akkumuláció gátlásával (Barna et al., 2014; Künstler et al., 2018). Sikerteljes kimutatnunk, hogy ugyanez a hő-sokk a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciát (és a szuperoxid felhalmozódást) is képes részlegesen gátolni a cv. Ingrid árpa három, közel izogén vonalában (Mlo, Mla12 és mlo5). A hő-sokk és antioxidáns (SOD és CAT) kezelések együttes hatására a Bgt-vel inokulált árpában tovább fokozódott a gomba növekedése és sporulációja (bár a tünetmentes nemgazda rezisztenciát nem sikerült teljes mértékben gátolni) és tovább csökkent a szuperoxid mennyisége is. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a hő-sokk a ROS (szuperoxid) felhalmozódást feltehetően az antioxidánsok (ROS-eliminálás) indukálásával képes gátolni. Barna és munkatársai (2014) kimutatták, hogy a hő-sokknak kitett árpában a H₂O₂ szint kismértékű visszaesése együtt jár a fokozott kataláz enzimaktivitással. Hő-stressz hatására növényekben a kezdeti fokozott ROS termelés először a hő-sokk faktorokat aktiválja, amelyek az antioxidáns gének expresszióját indukálva járulnak hozzá a ROS szint csökkenéséhez és a hőstresszel szembeni tolerancia kialakulásához (ld. pl. Driedonks et al., 2015; Li et al., 2021; Medina et al., 2021). Részben saját kutatásaink szerint tartós hőhatásnak (30 °C) kitett dohányban a dohány mozaik vírussal (TMV) szembeni rezisztencia megszűnése az antioxidáns (pl. dehidroaszkorbát-reduktáz) enzimaktivitás fokozódásának és a szuperoxid termelés csökkenésének is köszönhető (ld. Eredmények; Király et al., 2008). A fenti adatok alapján úgy tűnik, hogy a hő-stressznek (hő-sokknak) kitett növények a betegség rezisztenciát (pl. a tünetmentes nemgazda rezisztenciát) többek között a ROS termelés csökkentésével és a ROS felhalmozódás antioxidánsok útján történő gátlásával tudják visszaszorítani.

A ROS (szuperoxid) mellett ugyanakkor más biokémiai faktorok is szerepet játszhatnak az árpa Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciájának kialakításában. A sejthalál gátlásért felelős *HvBI-1* gén túltermelése (és fokozott expressziója) árpa epidermisz sejtekben képes a Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztencia részleges visszaszorítására, még a fertőzés kezdeti stádiumában (a liztharmat által megkísérelt behatolás fázisában) (Eichmann et al., 2004). Az árpa-Bgt kapcsolatban kialakuló tünetmentes nemgazda rezisztenciában egy transzmembrán receptor-szerű kináz fehérje (*HvLEMK1*) is központi szerepet játszhat, mivel a *HvLEMK1* gén csendesítése a liztharmat gomba korlátozott terjedéséhez és sporulációjához vezetett (Rajaraman et al.,

2016), hasonlóan ahhoz, amit saját kísérleteinkben hősokk és antioxidáns (SOD és CAT) kezelések együttes hatására kaptunk a Bgt-vel inokulált árpában.

Összefoglalva, eredményeink szerint a fertőzés utáni korai/késői szuperoxid felhalmozódás meghatározó szerepet játszik a tünetmentes (I. típusú) nemgazda-, vs. a lassabban kialakuló HR-típusú gazda rezisztencia indukálásában, többféle (hemi)biotróf kórokozó fertőzésénél. Árpában a búzalisztharmattal (*B. graminis* f. sp. *tritici*) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciában a szuperoxid korai felhalmozódása (a fertőzés 1. napján) az inokulált levelek mezofill sejtjeinek kloroplasztiszaiban lokalizálódik és fokozott NADPH-oxidáz aktivitással valamint a szuperoxid szintet, ill. sejtthálát szabályozó gének tranziens indukációjával jár együtt. A Bgt-vel szembeni tünetmentes nemgazda rezisztencia részleges gátlása hő-sokk és antioxidáns kezelésekkel arra utal, hogy árpában a szuperoxid korai felhalmozódása ténylegesen szerepet játszik a búzalisztharmattal szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciában.

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

Sikerült kimutatnunk, hogy a cv. Szentesi cseresznyepaprika (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme*) oltással átvihető, tünetmentes (HR nélküli) lisztharmat rezisztenciája mesterséges fertőzésnél, laboratóriumi körülmények közötti is hatásos. A rezisztencia a cv. Szentesi alanyra oltott cv. Totál étkezési paprikában (Szentesi+Totál) is megnyilvánult. Lisztharmatok ellen hatásos, oltással átvihető rezisztenciát eddig csak uborkában és dinnyében írtak le, ahol egyes oltványok a *Podosphaera xanthii* által okozott lisztharmatos tünetekkel szemben bizonyultak ellenállónak (Sakata et al., 2006; Kousik et al., 2018). Kísérleteinkben hasonló jelenséget tapasztaltunk paprikában, ahol azonban nemcsak a lisztharmatos tünetek, de a kórokozó (*Leveillula taurica*) felhalmozódásának gátlását is sikerült kimutatnunk.

A lisztharmat rezisztens paprikákban (saját gyökerű cv. Szentesi és oltott Szentesi+Totál) a fogékony növényekhez (cv. Totál) képest a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) intenzív felhalmozódását figyeltük meg, ami jól korrelált a növényi betegség rezisztenciával összefüggő szuperoxid termelésért elsősorban felelős NADPH-oxidáz enzimaktivitással. Korábbi kutatásaink alapján a lisztharmat fogékony cv. Totál étkezési paprika akkor is rezisztenssé válik és már fertőzetlenül is a szokásosnál jóval nagyobb mennyiségű szuperoxidot termel, ha a cv. Szentesi mellett más ellenálló cseresznyepaprika alanyokra (cv. Kalocsai A, Kalocsai M, Garai fehér') van oltva (Albert et al., 2013). Ismert továbbá, hogy kék fénynek kitett sárgadinnyében lisztharmattal (*P. xanthii*) szembeni tolerancia idézhető elő és ilyenkor már a fertőzetlen növényekben fokozódik – egyes védekezéshez köthető másodlagos anyagcseretermékek (fenolok, flavonoidok, lignin) mellett – a szuperoxid felhalmozódása is (Jing et al., 2018). A NADPH-oxidáztól függő szuperoxid termelés lisztharmat rezisztenciában játszott szerepére utal több korábbi eredmény is. El-Zahaby és munkatársai (2004) szerint árpalevelekben szuperoxidot képző ágensekkel történő kezelésre rezisztencia alakul ki az árpa lisztharmattal (*Blumeria graminis* f. sp.

hordei) szemben. Az árpa saját lisztharmatával szembeni penetrációs (behatolási) rezisztenciájához nélkülözhetetlen egy NADPH-oxidáz-gén (*HvRBOHF2*) működése (Proels et al., 2010; Pereira Torres et al., 2017). Ugyanakkor saját kutatásaink szerint a NADPH-oxidáz függő szuperoxid termelés fontos szerepet játszik az árpa búzalisztharmattal (*B. graminis* f. sp. *tritici*) szembeni, tünetmentes nemgazda-rezisztenciájában is (ld. Eredmények, Künstler et al., 2018). Az általunk paprikában megfigyelt, oltással átvihető lisztharmat rezisztencia szintén tünetmentes, mivel nem jár együtt HR-típusú nekrotikus léziók kialakulásával. A NADPH-oxidáz aktivitással összefüggő szuperoxid felhalmozódás a baktériumos fertőzésekkel szembeni tünetmentes nemgazda-rezisztenciát is meghatározza: lúdfűben (*A. thaliana*) ezt a rezisztenciát hiszton acetiltranszferázt kódoló (ún. *Elongator*) gének is szabályozzák többek között úgy, hogy fokozzák egy NADPH-oxidáz gén (*AtRBOHD*) expresszióját és a szuperoxid akkumulációt. (An et al., 2017).

Eredményeink szerint a lisztharmat rezisztens cv. Szentesi cseresznyepaprika fertőzetlen leveleiben jóval intenzívebb volt a spontán sejtelhalás, mint a lisztharmatra fogékony cv. Totál egyedekben. Régóta ismert, hogy kétszikű növényekben a nagy szalicilsav- és ROS tartalom a szerzett betegség rezisztencia indukálásához járulhat hozzá oly módon, hogy az „érzékenyített” szövetekben ún. mikroléziókat („mikro-HR”), azaz egy-egy növényi sejt spontán elhalását idézi elő (Alvarez et al., 1998; Alvarez, 2000). Mivel a lisztharmat-ellenálló cv. Szentesi cseresznyepaprikában a szuperoxid és a szabad szalicilsav szintje már fertőzés nélkül is jóval magasabb a szokásosnál (ld. Eredmények; Albert et al., 2016), így várható volt, hogy az egészséges levelekben a spontán sejtelhalás is fokozott mértékű. Érdekes, hogy a cv. Szentesi levelekben az erek mentén koncentrálnódó barna foltok sűrűsége is jóval nagyobb volt, ami arra utalhat, hogy ennek a cseresznyepaprika fajtának a nagy kalciumtartalma miatt (Lantos, 2011) az egyes sejtek vakuólumaiban kalcium-oxalát kristályok halmozódnak fel. Korábbi kutatások szerint kalcium-tartalmú levéltrágya készítményekkel kezelt étkezési paprika leveleiben, elsősorban a mezofill sejtekben, jelentős mértékű a barna foltokként észlelhető kalcium-oxalát-kristályok felhalmozódása (Weryszko-Chmielewska és Michałojć, 2009). Kalciummal előkezelt szójában a ROS (szuperoxid, hidrogén-peroxid, hidroxil gyök) fokozott felhalmozódásával együtt a *Sclerotinia sclerotiorum* fertőzésével szembeni tolerancia is nőtt (Arfaoui et al., 2018). Ezek szerint növényekben a kalcium fokozhatja a ROS termelést, ugyanakkor a ROS is befolyásolhatja a kalcium felhalmozódás erősségét (Marcec és Tanaka, 2022). A betegség rezisztencia kialakulásakor az RBOHD NADPH-oxidáz enzimfehérje aktivitását a kalcium részben közvetlenül (ún. EF fehérjemotívumokhoz való kötődéssel), részben pedig közvetetten szabályozhatja, Ca^{2+} -függő kinázok (a NADPH-oxidáz foszforilálása) segítségével (Dubilla et al., 2013; Kadota et al., 2015). Egy Ca^{2+} -függő kináz (CPK5) lúdfűben (*A. thaliana*) már egy kórokozó baktérium (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) sejtfal komponenseinek hatására is aktiválódik és foszforilálja az RBOHD fehérjét, a folyamat eredménye a szuperoxid- és szalicilsav felhalmozódás és a baktériumos fertőzéssel szembeni rezisztencia (Dubilla et al., 2013). Elképzelhető, hogy a cv. Szentesi cseresznyepaprikában a lisztharmat rezisztencia egyik oka a Ca^{2+} -függő kinázok fokozott aktivitása, míg a cv. Totál

lisztharmat fogékonyságához egy NADPH-oxidázokat negatívan reguláló receptor-kináz (PBL13) (Lee et al., 2020) túltermelődése is hozzájárulhat.

Kimutattuk, hogy lisztharmat ellenálló, fertőzetlen (egészséges) paprikákban (saját gyökerű cv. Szentesi és oltott Szentesi+Totál) egy patogenezissel kapcsolatos gén (*CaPR-1*) expressziója a rezisztencia markere, míg a *CaPR-2* fokozott expressziója csak a saját gyökerű cv. Szentesi cseresznyepaprikában detektálható. Az *in planta* termelt szuperoxid hidrogén-peroxiddá alakul és többek között a PR géneket, ill. fehérjéket is aktiválhatja, amely további védekezési reakciókhoz és végül kórokozó rezisztenciához vezet (ld. pl. Van Loon et al., 2006; Torres, 2010; Lehmann et al., 2015). A *CaPR-1* gén egy bázikus PR-1 fehérjét kódol, és fokozott mértékben kifejeződik a paprika *Phytophthora capsici* oomicétával szembeni rezisztenciája során (Silvar et al., 2008). Ugyanakkor a *CaPR-1* túltermeltetése dohányban fokozza az oomicéta- és baktérium fertőzésekkel szembeni toleranciát (Sarowar et al., 2005). A *PR-1* gének az árpa lisztharmattal (*B. graminis* f. sp. *hordei*) szembeni behatolási (penetrációs) rezisztenciájához is hozzájárulhatnak; ezt árpa epidermisz sejtekben a *HvPR-1b* gén csendesítésével igazolták (Schultheiss et al., 2003). A PR-1 fehérje a kórokozó gombákat többféle élettani, biokémiai mechanizmus segítségével gátolhatja, pl. védekezési szignál peptidként működhet vagy a gombasejtfalban levő szterolokat köti meg (Breen et al., 2017). Régóta ismert, hogy a bázikus PR-1 fehérje lóbabban (*Vicia faba*) akadályozza az *Uromyces fabae* rozsdá hifáinak differenciálódását (Rauscher et al., 1999). A *CaPR-1* gén által kódolt bázikus PR-1 fehérje hasonló funkciót tölthet be a paprika lisztharmattal szembeni rezisztenciájában, ugyanis a két kórokozó (*U. fabae* és *L. taurica*) közös vonása, hogy a gázcsere nyílásokon keresztül hatolnak be a fertőzött levelekbe.

Paprikában a *CaPR-2* gén egy bázikus β -1,3-glukanázt kódol, amely a gomba- ill. oomicéta-sejtfalakban a β -1,3-glukán tartalmú vegyületeket hidrolizálja (ld. pl. Van Loon et al., 2006). Ugyanakkor a *P. capsici* fertőzését követő *CaPR-2*-indukció csak néhány rezisztens paprikafajtában észlelhető és a génexpresszió jelentősen megnő a fogékony gazda-kórokozó kapcsolatokban is (Silvar et al., 2008). Ez egybevág saját eredményeinkkel, mivel a paprika lisztharmat patogenezisének előrehaladott szakaszában (45 nappal a fertőzés után) a nagymértékű *CaPR-1* és *CaPR-2* expressziót a lisztharmat fogékonyság során – és nem a rezisztenciánál – észleltük. Hasonló jelenséget kimutattak más gazda-kórokozó kapcsolatokban is: *Bipolaris sorokiniana*-val vagy a gomba tenyészet szűrletével fertőzött, ill. kezelt árpában a *HvPR-1b* génexpresszió szintén a fogékonysággal korrelált (Király et al., 2002a; Schultheiss et al., 2003). A *PR-1b* transzkriptumok, ill. fehérje erőteljes felhalmozódását tapasztalták különféle kórokozó gombákkal (*Drechslera teres*, *Magnaporthe grisea*, *B. sorokiniana*) fertőzött fogékony árpában és rizsben is (Reiss és Bryngelsson, 1996; Manandhar et al., 1999). Mindezek alapján paprikában a PR gének expressziója a lisztharmattal szembeni rezisztenciának akár markere, de funkcionális komponense is lehet, viszont a patogenezis előrehaladott szakaszában már feltehetően nincs szerepe a védekezés fenntartásában.

Kísérleteink alapján fertőzetlen és lisztharmattal fertőzött paprikában egyaránt, a lisztharmat rezisztencia markerének tekinthető két, sejthalált szabályozó és lisztharmat fogékonyságot meghatározó gén (*CaMlo1* és *CaMlo2*) csökkent mértékű expressziója is. Ugyanakkor a *CaMlo1* expressziója, ill. annak hiánya a paprika lisztharmat

fogékonyságának, ill. rezisztenciájának kevésbé fontos eleme lehet, mivel lizstharatos fertőzéskor a rezisztens oltott növényekben (Szentesi+Totál) a *CaMlo1* expressziója sokkal kevésbé szorult vissza, mint a *CaMlo2* transzkripciója. Ezt valószínűsíti az is, hogy Zheng et al. (2013a) szerint a *CaMlo1* transzkripciója a lizstharattal fertőzött, fogékony paprikában jóval lassabban indukálódik, mint a *CaMlo2* gén kifejeződése, ráadásul önmagában a *CaMlo2* túltermeltetése már képes fokozni a lizstharattal (*L. taurica*) szembeni fogékonyságot paradicsomban. Az *Mlo* gént elsőként árpában azonosították és terméke egy olyan transzmembrán fehérje, amelyet a tünetmentes (HR-nélküli) lizstharat rezisztencia, ill. a növényi sejthalál negatív regulátorának tekintenek (Büsches et al., 1997). Az *Mlo* gén árpán kívül több más növényben is megtalálható (Consonni et al., 2006; Humphry et al., 2006; Bai et al., 2008; Wang et al., 2014; Acevedo-Garcia et al., 2017; Li et al., 2022a; Sulima és Zhukov, 2022), így többek között paprikában is (Zheng et al., 2013a; Acevedo-Garcia et al., 2014). Az *mlo*-rezisztenciát mutató (MLO-hiányos mutáns) növényekben a lizstharat által megtámadott, de ellenálló epidermisz sejt ún. papillákat (sejtfal-vastagodásokat) képez (Koga et al., 1990; Hüchelhoven et al., 1999). Az *mlo* genotípusú, mutáns növények további jellegzetessége a levél mezofill szövetében kialakuló spontán sejtelhalások (Wolter et al., 1993; Piffanelli et al., 2002), amelyet mi a lizstharat rezisztens cv. Szentesi cseresznyepaprikában is észleltünk. Elképzelhető, hogy a lizstharat rezisztens paprikában (saját gyökerű cv. Szentesi és oltott Szentesi+Totál) általunk megfigyelt csökkent mértékű *CaMlo1* és *CaMlo2* génexpressziót egy olyan *mlo* mutáció(k) okozza, mint árpában az *mlo-11*, amely a lizstharat rezisztencia mellett jelentősen gátolt *Mlo* transzkripciót és fehérjeszintézist eredményez (Piffanelli et al., 2004).

Kutatásaink szerint a cv. Szentesi cseresznyepaprikában az oltással átvihető lizstharat rezisztencia egyik közvetlen biokémiai oka a NADPH-oxidáz által termelt szuperoxid felhalmozódása lehet. A kertészeti oltás során a szuperoxid felhalmozódás tulajdonsága – a rezisztenciával együtt – egy ismeretlen jelátviteli mechanizmus segítségével az eredetileg fogékony ráoltott paprika növénybe továbbítódik, és ott stabilan megnyilvánul. Elképzelhető, hogy maguk a ROS csoportok – pl. a szuperoxid – az oltással átvihető lizstharat rezisztencia jelátvivői. Ismert ugyan, hogy a ROS csoportok rendkívül érzékenyek a – pl. antioxidánsok hatására történő – lebomlásra (Halliwell és Gutteridge, 2015; Mittler, 2017; Poór, 2020). Ennek ellenére többen is kimutatták, hogy a növényeket érő abiotikus stresszek során egy sejtről-sejtre terjedő (autopropagatív), gyorsan szisztemizálódó (akár 8,5 cm/perc sebességű), és NADPH-oxidáztól függő ROS felhalmozódási hullám alakul ki (Miller et al., 2009; Mittler et al., 2011, 2022; Gilroy et al., 2014; Fichman és Mittler, 2021). Ez a NADPH-oxidáz-függő ROS hullám tehát nem a ROS diffúzióját jelenti, hanem a szomszédos sejtekben a „ROS érzékelés, termelés, transzport” állapot tovaterjedését (Mittler et al., 2022), azaz egy adott sejt aktiválja a plazmamembránhoz kötődő NADPH-oxidázokat, majd a képződő szuperoxidból az apoplastban keletkező H₂O₂ eljut a következő sejtig, ahol azt a megfelelő receptor érzékeli, és a folyamat kezdődik előlről. A növényi betegség rezisztencia, ill. a védekezési válaszok kialakulása és azok – pl. oltással történő – átvitele során is igen valószínű az abiotikus stressz során megfigyelthez hasonló „ROS-hullámok” működése. Régóta ismert, hogy növényi szövetekben a ROS-felhalmozódás stimulálása a távoli, kezeletlen növényi

részekben is fokozott ROS-termelést, egysejtes elhalásokat („mikro-HR”) és betegség ellenállóságot indukál (Alvarez et al., 1998; Park et al., 1998; Fodor et al., 2001; Dubiella et al., 2013). Ugyanakkor a növényi betegségrezisztencia oltással történő átvitelében a ROS mellett a floémában terjedő egyéb jelátviteli mechanizmusok is részt vehetnek, amelyek irányító molekulái pl. növényi mRNS-ek, géncsendesítést indukáló kis RNS-ek, védekezéssel kapcsolatos fehérjék, hormonok is lehetnek (Golecki et al., 1998; Lough és Lucas, 2006; Park et al., 2007; Kehr és Buhtz 2008; Guan és Zhao 2012; Warschefsky et al. 2016; Spanò et al., 2020; Couttolenc-Brenis et al., 2021; Li et al., 2022b). Egyes vírusfertőzéseknel az oltással átvihető rezisztenciában igazolták, ill. valószínűsíthető a vírus eredetű kis interferáló RNS-ek (siRNS) jelátviteli szerepe is (ld. pl. Zhao és Song, 2014; Spanò et al., 2017; Chen et al., 2020).

Paprikában, ill. más termesztett növényekben a jövő kutatásai tisztázhatják az oltással átvihető (tünetmentes) betegség rezisztencia pontos genetikai/biokémiai jelátviteli mechanizmusát, így többek között a megfelelően időzített (korai) ROS akkumuláció, ill. ROS hullámok szerepét is.

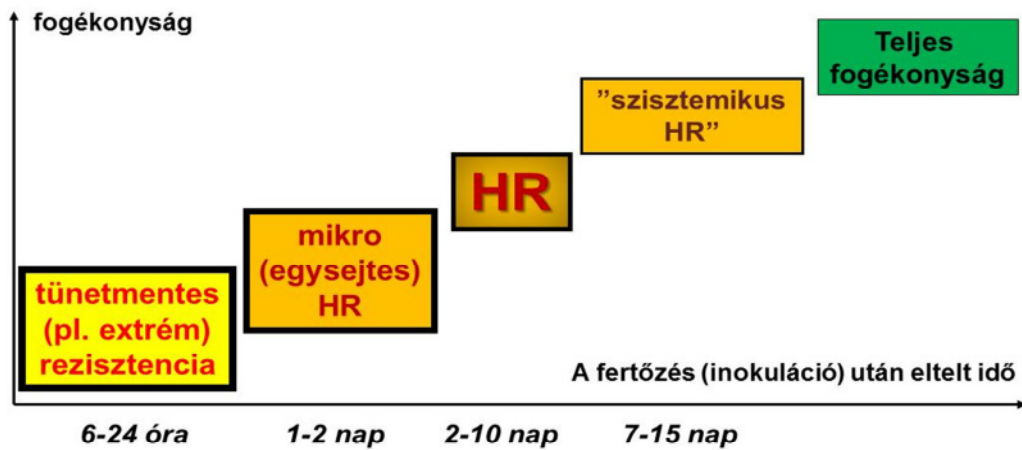
Tünetmentes (extrém) rezisztenciától a HR-típusú rezisztencián át a szisztemikus HR-ig – a növényi védekezés fokozatai és a jól időzített/késői ROS felhalmozódás

Régóta ismert, hogy a ROS (H_2O_2) túltermelő transzgenikus növények többféle kórokozó (baktérium és gomba) fertőzésére is fokozottan rezisztensek lehetnek (ld. pl. Chamnongpol et al., 1998; Wu et al., 1995; Lee et al., 2002; Walz et al., 2008; Knecht et al., 2010). Ezek szerint a (transzgenikus) gazdanövény által már a fertőzés kezdetén, időben termelt ROS-nak meghatározó szerepe lehet a patogének gátlásában, ill. előlásában. Saját kutatásaink szerint a paprika oltással átvihető, tünetmentes liztharmat rezisztenciájában is meghatározó szerepe van a szuperoxid fokozott felhalmozódásának, amely már a fertőzeten, egészséges növényekben is észlelhető (ld. Eredmények; Albert et al., 2017). Liztharmatra és egyéb gomba- és baktérium kórokozókra fogékony árpában és más gazdanövényekben is rezisztencia indukálható, ha a növényeket ROS-képző ágensekkel kezelik (Hafez és Király, 2003; El-Zahaby et al., 2004). Ha a ROS-kezelés az inokuláció után korán (pl. 1 nappal) történt, tünetmentes rezisztencia alakult ki, míg HR-típusú lokális léziók (sejt/szövethalál) jelentek meg, ha a ROS-kezelés az inokuláció után később (2-3 nappal) lett időzítve. Saját kutatásaink szerint a búzaliztharmat és más biotróf kórokozók által árpában kiváltott tünetmentes, nemgazda rezisztenciában is ténylegesen szerepet játszik a szuperoxid korai felhalmozódása (ld. Eredmények; Küntler et al., 2018). A fertőzött növény jól időzített (korai) ROS termelésének hozzájárulása a hatékony (gyors és tünetmentes) rezisztenciához vírusfertőzéseknel is valószínűsíthető. A ROS, elsősorban a szuperoxid és a belőle képződő H_2O_2 , viszonylag korai (az inokuláció után 6-10 órával észlelhető) felhalmozódásának meghatározó szerepe van a növényi vírusokkal szembeni HR-típusú rezisztenciában (Doke és Ohashi, 1988; Rossetti és Bonatti, 2001). Növényekben azonban a vírus rezisztencia sok esetben a HR-re jellemző sejt/szövethalál nélkül is hatékony lehet, ilyen az ún. extrém rezisztencia (ER), amely nemcsak

tünetmentes, hanem a kórokozó replikációját/terjedését is szinte teljes mértékben gátolja. Ismert, hogy egyes növényi vírus rezisztencia gének fokozott expressziója a HR-típusú vírusrezisztenciát erősíti, mivel így kisebb, ill. hamarabb megjelenő nekrotikus léziók („mikro-HR”) vagy – még nagyobb/korai génexpressziónál – tünetmentes (extrém) rezisztencia alakul ki (Bendahmane et al., 2000; Cooley et al., 2000; Sekine et al., 2008). Ezek szerint a tünetmentes rezisztencia (ER) a tünetes (HR-típusú) vírus rezisztenciánál gyorsabban alakul ki, azaz a kórokozó gátlása az ER-nél hamarabb történik, mint a HR-nél. Ennek az egyik oka a ROS (pl. szuperoxid) korai felhalmozódása lehet, ahogyan ezt Bendahmane és munkatársai (1999) már több, mint 20 éve feltételezték. Eredményeink bizonyították a ROS (szuperoxid és OH[•]) korai felhalmozódásának tényleges szerepét a burgonya X vírussal (PVX) szembeni tünetmentes, extrém rezisztenciában (ld. Eredmények; Király et al., 2021).

Ha a korai ROS felhalmozódás a növényi betegség rezisztencia meghatározó tényezője, akkor a patogenezis előrehaladott szakaszában észlelhető, gyakran intenzív ROS termelés feltehetően azt tükrözi, hogy a gazdanövény későn, de már sikertelenül próbálkozik a rezisztenciát indukálni. Egy hemibiotróf gombával, a *Bipolaris sorokiniana*-val fertőzött, fogékony árpában a nekrotikus foltok körüli egészséges sejtek kloroplasztiszaiban nagy mennyiségű szuperoxid detektálható (Schäfer et al., 2004). Ugyanakkor a szilvahimlő vírusra (*Plum pox virus*, PPV) fogékony kajsziabarack szisztémikusan fertőzött, erősen klorotikus leveleiben észlelhető H₂O₂ felhalmozódás („ROS robbanás”) (Díaz-Vivancos et al., 2006; Hernández et al., 2006) is arra utalhat, hogy a gazdanövény későn és sikertelenül próbálja a szisztémikus szövetekben a rezisztenciát indukálni. Feltehetően ehhez hasonló folyamat játszódik le CMV-vel szisztémikusan fertőzött dohányban is, ahol a mozaikos levelek vírusmentes, ún. zöld szigeteiben nagy mennyiségű szuperoxid akkumulálódik (Shang et al., 2010).

A fentiek alapján a növényi védekezés különböző fokozatai írhatók le – ez a védekezési spektrum a tünetmentes (extrém) rezisztenciától a HR-típusú rezisztencián (mikro/makroszkopikus HR) át a szisztémikus HR-ig, ill. a teljes fogékonyságig terjed. A kórokozó rezisztencia hatékonysága elsősorban a gazdanövény reakciójának sebességétől függ: a növény gyors védekezése – többek között a jól időzített ROS felhalmozódás – biztosítja a korai kórokozó gátlást, mielőtt még bármilyen tünet (pl. HR) megjelenik (**36. ábra**). A kórokozó behatolás helyén és azzal egy időben (korán) jelentkező lokális, gyors ROS felhalmozódásnak tehát meghatározó szerepe lehet a hatékony (makroszkopikusan tünetmentes, mellékhatások nélküli) betegség rezisztencia kialakításában, míg a patogenezis előrehaladott szakaszában gyakran észlelhető szisztémikus „ROS robbanás” és nekrotikus tünetek – legalábbis részben – a gazdanövény megkésített és általában sikertelen védekezését is jelzik (Hernández et al., 2016; Künstler et al., 2016).



A rezisztencia hatékonysága (sebessége)	rendkívül nagy	igen nagy	nagy	alacsony	nulla
A ROS felhalmozódás időzítése	1-12 óra	6-12 óra	6-48 óra	5-15 nap	-

36. ábra: A növényi védekezés különböző fokozatai egy leegyszerűsített sémában - védekezési spektrum a tünetmentes (extrém) rezisztenciától a HR-típusú rezisztencián (mikro- és makroszkopikus HR /hiperszenzitív reakció/) át a szisztémikus HR-ig, ill. a teljes fogékonyságig. A kórokozó rezisztencia hatékonysága elsősorban a gazdanövény védekezésének időzítésétől, ill. sebességétől függ: a növény rendkívül gyors védekezése – többek között a jól időzített ROS felhalmozódás – biztosítja a korai kórokozó gátlást, mielőtt még bármilyen tünet (pl. HR) megjelenik (rendkívül kis fogékonyság), míg a gazdanövény védekezésének szinte teljes hiánya fogékonyságot eredményez. A HR különböző fokozatainál észlelhető sejt/szövethalál a megkésett védekezési reakciók mellékhatásai is lehetnek (Bendahmane et al., 1999 és Künstler et al., 2016 nyomán).

ÖSSZEFOGLALÁS

1/ Kutatásaink elsőként bizonyították, hogy egyes gazda-kórokozó kapcsolatokban a növényi vírusfertőzések által indukált HR-t alkotó rezisztencia és sejthalál eltérő gének által meghatározott, egymástól teljesen függetlenül öröklődő tulajdonságok. Kétféle kísérleti megközelítéssel is 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 nekrotizist 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 pedig kimutattuk, hogy a CaMV-rezisztens *N. edwardsonii* var. Columbia és a fogékony *N. clevelandii* keresztezéséből származó F₂ populációban a rezisztencia és a sejt/szövethalál egymástól függetlenül szegregálódik. Az F₂ növények négy különböző fenotípust mutattak: 1/ rezisztens, HR-típusú nekrotikus léziók, 2/ rezisztens, lokális klorotikus léziók, 3/ fogékony, szisztemikus nekrotizis 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 (nekrózis) genetikai függetlenségét bizonyítja az is, hogy eredményeink szerint a CaMV W260 okozta lokális (HR-típusú) és szisztemikus nekrotizis (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 nekrotizist, míg a másikban (*N. bigelovii*) lokális klorozist és szisztemikus mozaikot vált ki.

2/ Kimutattuk, hogy a növényi védekező rendszer egyes elemeinek fokozott indukciója eltérően hat a vírusfertőzés által kiváltott HR-t alkotó rezisztenciára és lokális nekrotizisra, mivel a HR-típusú nekrotizis 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 nekrotizis 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 nekrotizis visszaszorulásával összhangban csökken (az eredeti *N. edwardsonii*-hoz képest), addig TMV fertőzésnél a HR-típusú nekrotizis 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 (egyres 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 (H₂O₂) 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.

3/ Kimutattuk, hogy ugyanabban a dohány genotípusban (*N. tabacum* cv. Samsun NN Rx1) a HR-rel járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia során 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 mértékben vagy – a *PR* gének, az *NtGSTphi1* és *NtBI-1* esetén – kb. egy nagyságrenddel kisebb mértékben indukálódott, mint a lokális nekrotikus léziókkal járó HR-nél (TMV fertőzés).

A PVX-szel (ER) és TMV-vel (HR) fertőzött dohányokban két, a glutation (GSH) működésében szerepet játszó és a növényi vírushatások elleni védekezésében részt vevő, antioxidáns hatású enzim (glutation reduktáz, GR és glutation-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 kimutattuk, hogy a PVX fertőzés által kiváltott tünetmentes extrém rezisztencia (ER) során ezek a védekezési folyamatok vagy korán, ill. átmenetileg indukálódnak vagy alig detektálhatók, összhangban az ER rendkívül korai (a vírushatás utáni 6. órától) kialakulásával

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

Eredményeink szerint dohányban (*N. tabacum* cv. Xanthi NN) a HR-típusú TMV-rezisztencia magas hőmérsékleten (30 °C) történő visszaszorulásának egyik oka a ROS – elsősorban a szuperoxid (O₂⁻) – felhalmozódásának csökkenése lehet. Ugyanakkor, ha a 30 °C-on tartott növények TMV-inokulált leveleit az inokuláció után 3 nappal szuperoxidot

($O_2^{\cdot-}$) 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. Kimutattuk viszont, hogy fogékony dohányban *N. tabacum* cv. Samsun nn) a TMV-vel szemben hatékony, tünetmentes rezisztencia alakítható ki, ha a ROS (szuperoxid, 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 visszaszorulásához 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 visszaszorította a PVX replikációját, és így szintén egy HR-típusú rezisztenciához vezetett.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy a fertőzött növényben a 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.

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

A szuperoxid 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 szuperoxid-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 kloroplasztiszaiban akkumulálódott.

A szuperoxid korai felhalmozódása a búzalisztharmattal szemben tünetmentes nemgazda rezisztenciát mutató árpában fokozott NADPH-oxidáz enzimaktivitással és jellegzetes génexpressziós változásokkal járt együtt: egy szuperoxid-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 szuperoxid-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 szuperoxid-felhalmozódásnak a tünetmentes nemgazda rezisztenciában játszott meghatározó szerepét jelzi.

6/ 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 (a gomba biomassza) szignifikánsan (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 szuperoxid-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 lisztharmat-rezisztens paprikákban (saját gyökerű cv. Szentesi és Szentesi+Totál oltványok) szignifikánsan nagyobb (több mint kétszer akkora) szuperoxid-felhalmozódást és NADPH-oxidáz aktivitást detektáltunk.

Kimutattuk, hogy a cv. Szentesi cseresznyepaprika lisztharmattal szembeni, oltással átvihető rezisztenciájának markere a *CaPR-1* és *CaPR-2* gén fokozott kifejeződése, de csak a fertőzetlen növényekben, ahol a szokásosnál jóval intenzívebb a spontán sejtelhalás mértéke is. A sejtelhalást szabályozó *Mlo* gének (*CaMlo1* és *CaMlo2*) expressziója (fertőzetlen, ill. inokulált növényeknél is) a lisztharmat rezisztenciával fordítottan arányos volt.

A cv. Szentesi cseresznyepaprika oltással átvihető, tünetmentes lisztharmat rezisztenciájában tehát meghatározó szerepe van a NADPH-oxidáz enzimaktivitással összefüggő fokozott szuperoxid felhalmozódásnak. A rezisztenciát jól jelzi továbbá a szokásosnál nagyobb mértékű spontán sejtelhalás valamint egyes védekezési gének (*CaPR-1* és *CaPR-2*) fokozott indukciója és két sejtelhalást szabályozó gén (*CaMlo1* és *CaMlo2*) expressziójának visszaszorulása.

Eredményeink szerint a növényi vírusfertőzéseknél a hiperszenzitív reakciót (HR) alkotó rezisztencia és sejt/szövethalál 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 termelődés elsősorban a növényi sejthalálért 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 $/OH/$) 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

Abbink, T E., Peart, J.R., Mos, T.N., Baulcombe, D.C., Bol, J.F., Linthorst, H.J. 2002. Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants. *Virology* 295, 307-319.

Abd El Rahman, T., El Oirdi, M., Gonzalez-Lamothe, R., Bouarab, K. 2012. Necrotrophic pathogens use the salicylic acid signaling pathway to promote disease development in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 1584-1593.

Able, A.J. 2003. Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* 221, 137-143.

Acevedo-Garcia, J., Kusch, S., Panstruga, R. 2014. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist* 204, 273-281.

Acevedo-Garcia, J., Spencer, D., Thieron, H., Reinstädler, A., Hammond-Kosack, K.E., Phillips, A.L., and Panstruga, R. 2017. *mlo*-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. *Plant Biotechnol. J.* 15, 367-378.

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.

Agarwal, P., Dabi, M., More, P., Patel, K., Jana, K., Agarwal, P.K. 2016. Improved shoot regeneration, salinity tolerance and reduced fungal susceptibility in transgenic tobacco constitutively expressing PR-10a gene. *Front. Plant Sci.* 7, 217.

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.

Alazem, M., Tseng, K-C., Chang, W-C., Seo, J-K., Kim, K-H. 2018. Elements involved in the Rsv3-mediated extreme resistance against an avirulent strain of Soybean mosaic virus. *Viruses* 10, 581.

Albert, R., Király, L., Király, Z., Lantos, F., Künstler, A. 2013. A szuperoxid szabadgyök szerepe tünetmentes növényi betegség rezisztenciában. *Tudomány a vidék mindennapjaiban, Magyar Tudomány Ünnepe 2013. Konferencia [CD]* ISBN 978-963-306-245-6 pp. 2-7.

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.

Albert, R., Künstler, A., Lantos, F., Király, L. 2016. Preformed defense responses in a powdery mildew-resistant Hungarian cherry pepper cultivar. *Review on Agriculture and Rural Development* 5, 5-12.

Al-Mawaali, Q.S., Al-Sadi, A.M., Khan, A.J., Al-Hasani, H.D. Deadman, M.K. 2012. Response of cucurbit rootstocks to *Pythium aphanidermatum*. *Crop Protection* 42, 64-68.

Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C.L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100, 224-233.

Alvarez, M.E. 2000. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44, 429-442.

Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.-J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773-784.

An, C., Wang, C., Mou, Z. 2017. The Arabidopsis Elongator complex is required for nonhost resistance against the bacterial pathogens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121. *New Phytol.* 214, 1245-1259.

Andersen, E.J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., Nepal, M.P. 2018. Disease Resistance Mechanisms in Plants. *Genes* 9, 339.

Anderson, E.J., Qiu, S.G., Schoelz, J.E. 1991. Genetic analysis of determinants of disease severity and virus concentration in Cauliflower mosaic virus. *Virology* 181, 647-655.

Arfaoui, A., El Hadramib, A., Daayf, F. 2018. Pre-treatment of soybean plants with calcium stimulates ROS responses and mitigates infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 122, 121-128.

Aver'yanov, A.A., Lapikova, V.P. 1988. Fungitoxicity mediated by active oxygen species in rice leaf diffusates. *Fiziologiya Rastanii* 35, 1142-1151.

Asai, S., Yoshioka, H. 2009. Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 619-629.

- 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 O₂- generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 34, 13-26.
- Ádám A.L., Nagy Z.Á., Kátay G, Mergenthaler, E., Viczián, O. 2018. Signals of systemic immunity in plants: Progress and open questions. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1146.
- 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.
- 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.
- Baebler, Š., Coll, A., Gruden, K. 2020. Plant molecular responses to Potato virus Y: A continuum of outcomes from sensitivity and tolerance to resistance. *Viruses* 12, 217.
- Baebler, Š., Krecic-Stres, H., Rotter, A., Kogovsek, P., Cankar, K., Kok, E.J., Gruden, K., Kovac, M., Zel, J., Pompe-Novak, M., Ravnikar, M. 2009. PVY NTN elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Mol. Plant Pathol.* 10, 263–275.
- Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N. F., Reinstädler, A., Lotti, C., de Giovanni, C., Ricciardi, L., Lindhout, P., Visser, R. G. F., Theres, K., and Panstruga, R. 2008. Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of Mlo function. *Mol. Plant-Microbe Interact* 21:30-39.
- Baker, C.J., Orlandi, E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 299–321.
- Balasubramaniam, M., Kim, B.S, Hutchens-Williams, H.M., Loesch-Fries, L.S. 2014. The photosystem II oxygen-evolving complex protein PsbP interacts with the coat protein of *Alfalfa mosaic virus* and inhibits virus replication. *Mol Plant-Microbe Interact.* 27, 1107-1118.
- Balázs, E., Barna, B., Király, Z. 1976. Effect of kinetin on lesion development and infection sites in Xanthi-nc tobacco infected by TMV: Single-cell local lesions. *Acta Phytopathol. Hung.* 11, 1-9.
- Balint-Kurti, P. 2019. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology* 20, 1163–1178.
- Barba-Espin, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M.J., Albacete, A., Faize, L., Faize, M., Pérez-Alfocea, F., Hernández, J.A. 2010. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant Cell Environ.* 33, 981-994.
- Barna, B., Ádám, A., Király, Z. 1993. Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* 80, 420-422.
- Barna, B., Fodor, J., Harrach, B., Pogány, M., Király, Z. 2012. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 59, 37-43.
- Barna, B., Fodor, J., Pogány, M., Király, Z. 2003a. Role of reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance. *Pest Manag. Sci.* 59, 459-464.
- Barna, B., Fodor, J., Preuss, J., Viczián, O., Harrach, B. 2003b. Induction of susceptibility to powdery mildew in *mlo*, *Mlg*, *Mla* and wild type barley lines. Second International Workshop on Molecular Phytopathology, Mechanisms of Disease Susceptibility, Rauischholzhausen, Germany, pp. 57–58.
- 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.
- Barna, B., Smigocki, A.C., Baker, J.C. 2008. Transgenic production of cytokinin suppresses bacterially induced hypersensitive response symptoms and increases antioxidative enzyme levels in *Nicotiana* spp. *Phytopathology* 98, 1242-1247.
- Bartling, D., Radzio, R., Steiner, U., Weiler, E.W. 1993. A glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular cloning and functional characterization.* *Eur. J. Biochem.* 216, 579-586.
- Baulcombe, D.C. 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8, 1833-1844.
- Baulcombe, D.C., Dean, C. 2014. Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6

- Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Svatoš, A., Schneider, B., Doubský, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, M., Molina, A., Schulze-Lefert, P. 2009. A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Nature* 323, 101-106.
- Bell, J.N., Ryder, T.B., Wingate, V.P.M., Bailey, J.A., Lamb, C.J. 1986. Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a compatible and an incompatible plant-pathogen interaction. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1615–1623.
- 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.
- Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K., Baulcombe, D.C. 2000. *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J.* 21, 73-81.
- Bent, A.F., Mackey, D. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 399-436.
- Bentham, A.R., De la Concepcion, J.C., Mukhi, N., Zdrzałek, R., Draeger, M., Gorenkin, D., Hughes, R.K., Banfield, M.J. 2020. A molecular roadmap to the plant immune system. *J Biol Chem.* 295, 14916-14935.
- Berrocal-Lobo, M., Stone, S., Yang, X., Antico, J., Callis, J., Ramonell, K.M., Somerville, S. 2010. ATL9, a RING zinc finger protein with E3 ubiquitin ligase activity implicated in chitin- and NADPH oxidase-mediated defense responses. *PLoS ONE* 5, e14426.
- Bilir, Ö., Göl, D., Hong, Y., McDowell, J.M., Tör, M. 2022. Small RNA-based plant protection against diseases. *Front. Plant Sci.* 13, 951097.
- Blackman, L.M., Hardham, A.R. 2008. Regulation of catalase activity and gene expression during *Phytophthora nicotianae* development and infection of tobacco. *Mol. Plant Pathol.* 9, 495–510.
- Bobik, K., Burch-Smith, T.M. 2015. Chloroplast signaling within, between and beyond cells. *Front. Plant Sci.* 6, 781.
- Bolton, M.D., Kolmer, J.A., Garvin, D.F. 2008. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Mol. Plant Pathol.* 9, 563–575.
- Bozsó, Z., Ott, P.G., Kecskés, M.L., Klement, Z. 1999. Effect of heat and cycloheximide treatment of tobacco on the ability of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrp/hrmA mutants to cause HR. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 215-223.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J. 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein - A novel, rapid defense response. *Cell* 70, 21-30.
- Breen, S., Williams, S.J., Outram, M., Kobe, B., Solomon, P.S. 2017. Emerging insights into the functions of pathogenesis-related protein 1. *Trends Plant Sci.* 22, 871-879.
- Brogue, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C.J., Broglie, R. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254, 1194-1197.
- Brown, J. F., Shipton, W. A., White, N. H. 1966. The relationship between hypersensitive tissue and resistance in wheat seedlings infected with *Puccinia graminis tritici*. *Annals of Applied Biology* 58, 279-290.
- Brown, J.K.M. 2015. Durable resistance of crops to disease: A Darwinian perspective. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 513-539.
- Burk, L. G. 1957. Overcoming seed dormancy in *Nicotiana*. *Agronomy J.* 49, 461.
- Büsches, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F., Schulze-Lefert, P. 1997. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88, 695-705.
- Caarls, L., Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M. 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front. Plant Sci.* 6, 170.
- Callaway, A., Liu, W., Andrianov, V., Stenzler, L., Zhao, J., Wettlaufer, S., Jayakumar, P., Howell, S.H. 1996. Characterization of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) resistance in virus-resistant ecotypes of *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 810-818.
- Cao Y, Shi Y, Li Y, Cheng Y, Zhou T, Fan Z. 2012 Possible involvement of maize Rop1 in the defence responses of plants to viral infection. *Mol. Plant Pathol.* 13, 732–743.
- Cawly, J., Cole, A. B., Király, L., Qiu, W., Schoelz, J. E. 2005. The plant gene *CCD1* selectively blocks cell death during the hypersensitive response to *Cauliflower mosaic virus* infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 212-219.
- Cecchini, N.M., Roychoudhry, S., Speed, D.J., Steffes, K., Tambe, A., Zodrow, K., Konstantinoff, K., Jung, H.W., Engle, N.L., Tschaplinski, T.J., Greenberg, J.T. 2019. Underground azelaic acid-conferred resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 32, 86-94.

- Cecchini, N.M., Steffes, K., Schlappi, M.R., Gifford, A.N., Greenberg, J.T. 2015. Arabidopsis AZI1 family proteins mediate signal mobilization for systemic defence priming. *Nature Communications* 6, 7658.
- Chamnonngpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W. 1998. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5818-5823.
- Chen, I.-H., Chiu, M.-H., Cheng, S.-F., Hsu, Y.-H., Tsai, C.H. 2013. The glutathione transferase of *Nicotiana benthamiana* NbGSTU4 plays a role in regulating the early replication of *Bamboo mosaic virus*. *New Phytologist* 199, 749–757.
- Chen, J., Zhang, J., Kong, M., Freeman, A., Chen, H., Liu, F. 2021. More stories to tell: NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENES1, a salicylic acid receptor. *Plant. Cell Environ.* 44, 1716–1727.
- Chen, J.-R., Ou, S.-L., Nieh, T.-I., Lu, C.-Y., Ku, H.-M. 2020. Molecular dissection of *Cucumis metuliferus* resistance against *Papaya Ringspot Virus* by grafting. *Plants* 9, 1666.
- Chen, L., Wang, W.S., Wang, T., Meng, X.F., Chen, T.T., Huang, X.X., Li, Y.J., Hou, B.K. 2019. Methyl salicylate glucosylation regulates plant defense signalling and systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 180, 2167–2181.
- Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D. 1993. Active oxygen species in the induction of plant acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262, 1883-1885.
- Cheng, F., Gao, M.; Lu, J., Huang, Y., Bie, Z. 2021. Spatial–temporal response of reactive oxygen species and salicylic acid suggest their interaction in pumpkin rootstock-induced chilling tolerance in watermelon plants. *Antioxidants* 10, 2024.
- 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*). *Baileya* 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.
- Clausen, R.E., Goodspeed, T.H. 1925. Interspecific hybridization in *Nicotiana*. II. A tetraploid *glutinosa-tabacum* hybrid, an experimental verification of Winge’s hypothesis. *Genetics* 10, 278-284.
- 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.
- Coll, N.S., Epple, P., Dangl, J.L. 2011. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation.* 18, 1247–1256.
- Coll, N.S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., van Breusegem, F., Dangl, J.L., Epple, P. 2010. *Arabidopsis* Type I metacaspases control cell death. *Science* 330, 1393–1397.
- Conrath, U., Beckers, G.J., Langenbach, C.J., Jaskiewicz, M.R. 2015. Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology* 53, 97–119.
- Consonni, C., Humphry, M.E., Hartmann, H.A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., Vogel, J., Lipka, V., Kemmerling, B., Schulze-Lefert, P., Sommerville, S.C., Panstruga, R. 2006. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat. Genet.* 38, 716-20.
- Cooley, M. B., Pathirana, S., Wu, H.-J., Kachroo, P., Klessig, D. F. 2000. Members of the *Arabidopsis* HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell* 12, 663-676.
- Couttolenc-Brenis, E., Carrión, G.; Villain, L., Ortega-Escalona, F., Mata-Rosas, M., Méndez-Bravo, A. 2021. Defense Response to *Hemileia vastatrix* in susceptible grafts onto resistant rootstock of *Coffea arabica* L. *Agronomy* 11, 1621.
- Crabill, E., Joe, A., Block, A., van Rooyen, J.M., Alfano, J.R. 2010. Plant immunity directly or indirectly restricts the injection of type III effectors by the *Pseudomonas syringae* type III secretion system. *Plant Physiol.* 154, 233–244.
- Cui, H., Tsuda, K., Parker, J.E. 2015. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 487-511.
- Cutt, J.R., Harpster, M.H., Dixon, D.C., Carr, J.P., Dunsmuir, P., Klessig, D.F. 1989. Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR1b gene. *Virology* 173, 89–97.

- Da Graça, J.V., Martin, M.M. 1976. An electron microscope study of the hypersensitive tobacco infected with tobacco mosaic virus at 32°C. *Physiol. Plant Pathol.* 8, 215-219.
- Dalio, R.J.D., Paschoal, D., Arena, G.D., Magalhães, D.M., Oliveira, T.S., Merfa, M.V., Maximo, H.J., Machado, M.A. 2021. Hypersensitive response: From NLR pathogen recognition to cell death response. *Ann. Appl. Biol.* 178, 268–280.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8, 1793-1807.
- Dangl, J.L., Horvath, D.M., Staskawicz, B.J. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341, 746-751.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., van Montagu, M., Inzé, D. van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 779-795.
- Daubert, S., Schoelz, J., Debaio, L., Shepherd, R.J. 1984. Expression of disease symptoms in Cauliflower mosaic virus genomic hybrids. *J. Mol. Appl. Genet.* 2, 537-547.
- De, S., Chavez-Calvillo, G., Wahlsten, M., Makkinen, K. 2018. Disruption of the methionine cycle and reduced cellular glutathione levels underlie potex–potyvirus synergism in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Pathol.* 19, 1820–1835.
- Dean, J.D., Goodwin, P.H., Hsiang, T. 2005. Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Colletotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and involvement of one in resistance. *J. Exp. Bot.* 56, 1525–1533.
- Dean, J.V., Shah, R.P., Mohammed, L.A. 2003. Formation and vacuolar localization of salicylic acid glucose conjugates in soybean cell suspension cultures. *Physiol. Plant.* 118, 328-336.
- 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.
- Diaz-Vivancos, P., Rubio, M., Mesonero, V., Periago, P.M., Ros Barceló, A., Martínez-Gómez, P., Hernández, J.A. 2006. The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *J. Exp. Bot.* 57, 3813-3824.
- Di Carli, M., Villani, M.E., Bianco, L., Lombardi, R., Perrotta, G., Benvenuto, E., Donini, M. 2010. Proteomic analysis of the plant-virus interaction in *Cucumber mosaic virus* (CMV) resistant transgenic tomato. *J. Proteome Res.* 9, 5684-5697.
- Ding, P., Ding, Y. 2020. Stories of salicylic acid: A plant defense hormone. *Trends Plant Sci.* 25, 549–565.
- Dixon, D.P., Edwards, R. 2009. Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 284, 21249–21256.
- Dixon, D.P., Hawkins, T., Hussey, P.J., Edwards, R. 2009. Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *J. Exp. Bot.* 60, 1207–1218.
- Dixon, D.P., Sellars, J.D., Edwards, R. 2011. The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. *Biochem. J.* 438, 63–70.
- Doke, N. 1983a. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal cell wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 23, 359-367.
- Doke, N. 1983b. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23, 345-357.
- Doke, N. 1985. NADPH-dependent O₂^{•-} generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 27, 311-322.
- Doke, N., Miura, Y. 1995. In-vitro activation of NADPH-dependent O₂^{•-} generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46, 17-28.
- Doke, N., Ohashi, Y. 1988. Involvement of an O₂^{•-} generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32, 163-175.

- Dorey, S., Baillieux, F., Saindrenan, P., Fritig, B., Kaufmann, S. 1998. Tobacco class I and II catalases are differentially expressed during elicitor-induced hypersensitive cell death and localized acquired resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 1102–1109.
- Driedonks, N., Xu, J., Peters, J.L., Park, S., Rieu, I. 2015. Multi-level interactions between heat shock factors, heat shock proteins, and the redox system regulate acclimation to heat. *Front. Plant Sci.* 6, 999.
- Dropkin, V. H. 1969. The necrotic reaction of tomato and other hosts resistant to *Meloidogyne*: Reversal by temperature. *Phytopathology* 59, 1632-1637.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komandera, E., Lassiga, R., Wittea, C.-P., Schulzeb, W.X., Romeis, T. 2013. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 8744-8749.
- Dunigan, D.D., Golemboski, D.B., Zaitlin, M. 1987. Analysis of the *N* gene of *Nicotiana*. In: *Plant Resistance to Viruses*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, U.K. pp. 120-135.
- Durner, J., Klessig, D.F. 1995. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 13-126.
- Durrant, W.E., Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185-209.
- Eichmann, R., Schultheiss, H., Kogel, K.-H., Hückelhoven, R. 2004. The barley apoptosis suppressor homologue Bax Inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 484-490.
- El-Zahaby, H.M., Gullner, G., Király, Z. 1995. Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in different host-pathogen interactions. *Phytopathology* 85:1225-1230.
- 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.
- Elstner E.F. 1982. Oxygen activation and oxygen-toxicity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 33, 73–96.
- Enyedi, A.J., Raskin, I. 1993. Induction of UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase activity in Tobacco mosaic virus-inoculated tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. *Plant Physiol.* 101, 1375–1380.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P. and Raskin, I. 1992. Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2480-2484.
- Farkas, G., Király, Z., Solymosi, F. 1960. Role of oxidative metabolism in the localization of plant viruses. *Virology* 12, 408–421.
- Fichman, Y., Mittler, R. 2021. A systemic whole-plant change in redox levels accompanies the rapid systemic response to wounding. *Plant Physiol.* 186, 4–8.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene for gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296.
- Flores-Cruz, Z., Allen, C. 2011. Necessity of OxyR for the hydrogen peroxide stress response and full virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6426-6432.
- Fodor, J., Gullner, G., Ádám, A.L., Barna, B., Kórmíves, T., Király, Z. 1997. Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid. *Plant Physiol.* 114, 1443-1451.
- Fodor, J., Hideg, É., Kecskés, A., Király, Z. 2001. In vivo detection of tobacco mosaic virus-induced local and systemic oxidative burst by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Plant and Cell Physiol.* 42, 775-779.
- Fox, A.R., Maistriaux, L.C., Chaumont, F. 2017. Toward understanding of the high number of plant aquaporin isoforms and multiple regulation mechanisms. *Plant Sci.* 264, 179–187.
- Foyer, C.H., Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866-1875.
- Fu, Z.Q., Dong, X. 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 839–863.
- Fürst, U., Zeng, Y., Albert, M., Witte, A.K., Fliegmann, J., Felix, G. 2020. Perception of *Agrobacterium tumefaciens* flagellin by FLS2XL confers resistance to crown gall disease. *Nat. Plants* 6, 22–27.
- 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.
- Gaguancela, O.A., Zúñiga, L.P., Arias, A.V., Halterman, D., Flores, F.J., Johansen, I.E., Wang, A., Yamaji, Y., Verchot, J. 2016. The IRE1/bZIP60 pathway and Bax Inhibitor 1 suppress systemic accumulation of Potyviruses and Potexviruses in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 29, 750–766.

- Gao, Q.M., Zhu, S., Kachroo, P., Kachroo, A. 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* 6, 228
- Gassmann, W. 2005. Natural variation in the *Arabidopsis* response to the avirulence gene *hopPsyA* uncouples the hypersensitive response from disease resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 1054-1060.
- Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inzé, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., Minkov, I. 2002. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 708-714.
- Ghanta S., Bhattacharyya D., Sinha R., Banerjee A., Chattopadhyay S. 2011. *Nicotiana tabacum* overexpressing γ -ECS exhibits biotic stress tolerance likely through NPR1-dependent salicylic acid-mediated pathway. *Planta* 233, 895-910.
- Ghanta, S., Datta, R., Bhattacharyya, D., Sinha, R., Kumar, D., Hazra, S., Mazumdar, A.B., Chattopadhyay, S. 2014. Multistep involvement of glutathione with salicylic acid and ethylene to combat environmental stress. *J. Plant Physiol.* 171, 940-950.
- Gianinazzi, S., Martin, C., Valée, J.-C. 1970. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270D:2383-2386.
- Gill, S.S., Gill, R., Trivedi, D.K., Anjum, N.A., Sharma, K.K., Ansari, M.W., Ansari, A.A., Johri, A.K., Prasad, R., Pereira, Varma, A., Tuteja, N. 2016. *Piriformospora indica*: potential and significance in plant stress tolerance. *Frontiers in Microbiology* 7, 332.
- Gill, S.S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909-930.
- Gill, U.S., Lee, S., Mysore, K.S. 2015. Host versus nonhost resistance: distinct wars with similar arsenals. *Phytopathology* 105, 580-587.
- Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W.G., Toyota, M., Devireddy, A.R., Mittler, R. 2014. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends Plant Sci.* 19, 623-630.
- Gland, A. 1981. Doubling chromosomes in interspecific hybrids by colchicine treatment. *Cruciferae Newsl.* 6, 20-22.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205-227.
- Glits, M., Folk, Gy. 2000. *Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda kiadó, Budapest.* 280 p.
- Golecki, B., Schulz, A., Carstens-Behrens, U., Kollmann, R. 1998. Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of Cucurbitaceae. *Planta* 206, 630-640.
- Goodman, R.N. 1972. Electrolyte leakage and membrane damage in relation to bacterial population, pH, and ammonia production in tobacco leaf tissue inoculated with *Pseudomonas pisi*. *Phytopathology* 62, 1327-1331.
- Goodman, R.N., Novacky, A.J. 1994. *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens.* APS Press, St. Paul, MN.
- Gouveia, B.C., Calil, I.P., Machado, J.P.B., Santos, A.A. Fontes, E.P.B. 2017. Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. *Front. Microbiol.* 7, 2139.
- Govrin, E.M., Levine, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10, 751-757.
- Görg, R., Hollricher, K., Schulze-Lefert, P. 1993. Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the *Mlg* resistance locus in barley. *Plant J.* 3, 857-866.
- Grant, M., Lamb, C. 2006. Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 414-420.
- Griffith, O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212.
- Groom, Q.J., Torres, M.A., Fordham-Skelton, A.P., Hammond-Kossack, K.E., Robinson, N.J., Jones, J.D.G. 1996. *RbohA*, a rice homologue of the mammalian *gp91phox* respiratory burst oxidase gene. *Plant J.* 10, 515-522.
- Großkinsky, D.K., Koffler, B.E., Roitsch, T., Maier, R., Zechmann, B. 2012. Compartment-specific antioxidative defense in *Arabidopsis* against virulent and avirulent *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology* 102, 662-673.
- Gruner, K., Esser, T., Acevedo-Garcia, J., Freh, M., Habig, M., Strugala, R., Stukenbrock, E., Schaffrath, U., Panstruga, R. 2020. Evidence for allele-specific levels of enhanced susceptibility of wheat *mlo* mutants to the hemibiotrophic fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* pv. *Triticum*. *Genes*, 11, 517.
- Guan, W., Zhao, X. 2012. Defense mechanisms involved in disease resistance of grafted vegetables. *HortScience* 47, 164-170.
- 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.

- Gullner, G., Juhász, C., Németh, A., Barna, B. 2017a. Reactions of tobacco genotypes with different antioxidant capacities to powdery mildew and *Tobacco mosaic virus* infections. *Plant Physiol. Biochem.* 119, 232–239.
- Gullner, G., Kőmíves, T. 2006. Defense reactions of infected plants: roles of glutathione and glutathione S-transferase enzymes. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 41, 3-10.
- 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.
- Gullner, G., Kőmíves, T., Király, L., Schröder, P. 2018. Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. *Front. Plant Sci.* 9, 1836.
- Gullner, G., Tóbiás, I., Fodor, J., Kőmíves, T. 1999. Elevation of glutathione level and activation of glutathione-related enzymes affect virus infection in tobacco. *Free Rad. Res.* 31, S155-161.
- Gullner, G., Zechmann, B., Künstler, A., Király, L. 2017b. The signaling roles of glutathione in plant disease resistance. In: M.A. Hossain, M.G. Mostofa, P. Diaz-Vivancos, D.J. Burritt, M. Fujita, L.-S.P. Tran (eds): *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*. Springer International Publishing AG, Switzerland pp. 331-357.
- Hafez, Y.M. 2010. Control of *Botrytis cinerea* by the resistance inducers benzothiadiazole (BTH) and hydrogen peroxide on white pepper fruits under postharvest storage. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 45, 13-29.
- Hafez, Y.M., Bacsó, R., Király, Z., Künstler, A., Király, L. 2012. Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of H₂O₂ suppresses necrotic disease symptoms. *Phytopathology*, 102, 848-856.
- Hafez, Y.M., Fodor, J., Király, Z. 2004. Establishment of acquired resistance confers reduced levels of superoxide and hydrogen-peroxide in TMV-infected tobacco leaves. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 39, 347-359.
- 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.
- Hajimorad, M.R., Hill, J.H. 2001. *Rsv1*-mediated resistance against *Soybean mosaic virus*-N is hypersensitive response-independent at inoculation site, but has the potential to initiate a hypersensitive response-like mechanism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 587-598.
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–322.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., New York, 944 p.
- Han, Y.I., Chaouch, S., Mhamdi, A., Queval, G., Zechmann, B., Noctor, G. 2013. Functional analysis of Arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H₂O₂ to activation of salicylic acid accumulation and signalling. *Antioxidants & Redox Signaling.* 18, 2106-2121.
- Hanquing, F., Kun, S., Mingquan, L., Hongyu, L., Xin, L., Yan, L., Yifeng, W. 2010. The expression, function and regulation of mitochondrial alternative oxidase under biotic stresses. *Mol. Plant Pathol.* 11, 429–440.
- Harrach, B.D., Baltruschat, H., Barna, B., Fodor, J., Kogel, K.H. 2013. The mutualistic fungus *Piriformospora indica* protects barley roots from a loss of antioxidant capacity caused by the necrotrophic pathogen *Fusarium culmorum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26, 599-605.
- 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.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Anee, T.I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J. Al, Fujita, M. 2019. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants* 8, 384.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T.I., Fujita, M. 2017. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 23, 249–268.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. 2004. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305, 855-858.
- Hatsugai, N., Yamada, K., Goto-Yamada, S., Hara-Nishimura, I. 2015. Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers Plant Sci.* 6, 234.
- He, Y., Zhu, Z., Yang, J., Ni, X., Zhu, B. 2009. Grafting increases the salt tolerance of tomato by improvement of photosynthesis and enhancement of antioxidant enzymes activity. *Environ. Exp. Bot.* 66, 270–278.
- Heath, M.C. 2000a. Advances in imaging the cell biology of plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 443–459.

- Heath, M.C. 2000b. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44, 321–334.
- Heath, M.C. 2000c. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 315-319.
- 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.
- Hernández, J.A., Barba-Espín, G., Díaz-Vivancos, P. 2017. Glutathione mediated biotic stress tolerance in plants. In: M. A. Hossain, M. G. Mostofa, P. D. Vivancos, D. J. Burritt, M. Fujita, L. S. P. Tran (eds): *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*. Springer International Publishing, pp. 309–329.
- Hernández, J.A., Díaz-Vivancos, P., Rubio, M., Olmos, E., Ros Barceló, A., Martínez-Gómez, P. 2006. Long-term plum pox virus infection produces an oxidative stress in a susceptible apricot, *Prunus armeniaca*, cultivar but not in a resistant cultivar. *Physiol. Plant.* 126, 140-152.
- 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.
- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., Holuigue, L. 2015. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front. Plant Sci.* 6, 171.
- Hoffmann, S., Gaspero, G.D., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Z., Testolin, R., Kozma, P. 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish Vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theor. Appl. Genet.* 116, 427-438.
- Holmes, F.O. 1929. Local lesions in tobacco mosaic. *Botanical Gazette* 87, 39-70.
- Holmes, F.O. 1938. Inheritance of resistance to tobacco mosaic virus disease in tobacco. *Phytopathology* 28, 553-561.
- Horváth, E., Szalai, G., Janda, T. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J. Plant Growth Regul.* 26, 290–300.
- Hou, Y., Zhai, Y., Feng, L., Karimi, H.Z., Rutter, B.D., Zeng, L., Choi, D.S., Zhang, B., Gu, W., Chen, X., Ye, W., Innes, R.W., Zhai, J., Ma, W. 2019. A *Phytophthora* effector suppresses trans-kingdom RNAi to promote disease susceptibility. *Cell Host Microbe* 25, 153-165.
- 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.
- Hu, C.-H., Wang, P.-Q., Zhang, P.-P., Nie, X.-M., Li, B.-B., Tai, L., Liu, W.-T., Li, W.-Q., Chen, K.-M. 2020. NADPH Oxidases: The vital performers and center hubs during plant growth and signaling. *Cells* 9, 437.
- Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R. 2006. *mlo*-based powdery mildew immunity: silver bullet or simply non-host resistance? *Mol Plant Pathol* 7, 605–610.
- Hückelhoven, R., Dechert, C., Kogel, K-H. 2003. Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of *mlo*-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 555-5560.
- Hückelhoven, R., Dechert, C., Trujillo, M., Kogel, K-H. 2001. Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* 47, 739-748.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C., Kogel, K-H. 1999. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with H₂O₂ but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* 119, 1251-1260.
- 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.
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schafer, W., Kogel, K-H., Felk, A., Maier, F.J. 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 16892–16897.
- Jarosch, B., Kogel, K-H., Schaffrath, U. 1999. The ambivalence of the barley *Mlo* locus: Mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* fsp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 508-514.
- Jing, X., Wang, H., Gong, B., Liu, S., Wei, M., Ai, X., Li, Y., Shi, Q. 2018. Secondary and sucrose metabolism regulated by different light quality combinations involved in melon tolerance to powdery mildew. *Plant Physiology and Biochemistry* 124, 77-87.
- Jones, A.M., Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.

- Jordan, C. M., Wakeman, R. J., DeVay, J. E. 1992. Toxicity of free riboflavine and methionine riboflavin solutions to *Phytophthora infestans* and the reduction of potato late blight disease. *Canad. J. Microbiol.* 38, 1108-1111.
- Jørgensen, J.H. 1992. Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63, 141-152.
- 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.
- Kachroo, P., Yoshioka, K., Shah, J., Dooner, H. K., Klessig, D. F. 2000. Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but *NPR1*, ethylene and jasmonate independent. *Plant Cell* 12, 677-690.
- Kadota, Y., Shirasu, K., Zipfel, C. 2015. Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant Cell Physiol.* 56, 1472–1480.
- Kámán-Tóth E, Dankó T, Gullner G, Bozsó Z, Palkovics L, Pogány M. 2019. Contribution of cell wall peroxidase- and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species to *Alternaria brassicicola*-induced oxidative burst in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Pathol.* 20, 485-499.
- Kehr, J., Buhtz, A. 2008. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J. Expt. Bot.* 59, 85–92.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C. 1998. A plant homologue of the neutrophyl NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* 10, 255-266.
- Kim, S.H., Kwon, S.I., Saha, D., Anyanwu, N.C., Gassmann, W. 2009. Resistance to the *Pseudomonas syringae* effector HopA1 is governed by the TIR-NBS-LRR Protein RPS6 and is enhanced by mutations in SRFR1. *Plant Physiol.* 150, 1723–1732.
- King, S.R., Davis, A.R., Liu, W., Levi, A. 2008. Grafting for disease resistance. *HortScience* 43, 1673–1676.
- Király, L., Albert, R., Zsember, 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., Kumar, J., Hückelhoven, R., Kogel, K.-H. 2002a. *mlo5*, a resistance gene effective against a biotrophic pathogen (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) confers enhanced susceptibility of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*). *Acta Biol. Szeged.* 46, 135-136.
- Király, L., Künstler, A., Höller, K., Fattering, 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.
- Király, L., Zechmann, B., Albert, R., Bacsó, R., Schwarczinger, I., Koložsváriné Nagy, J., Gullner, G., Hafez, Y.M., Künstler, A. 2023. Enhanced resistance to viruses, bacteria and abiotic stress in *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia is dependent on salicylic acid and correlates with high glutathione levels. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (***bírálat alatt***).
- Király, Z., Barna, B., Érsek, T. 1972. Hypersensitivity as a consequence, not the cause of plant resistance to infection. *Nature* 239, 456-458.
- Király, Z., Barna, B., Kecskés, A., Fodor, J. 2002b. 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.
- Király, Z., El-Zahaby, H., Galal, A., Abdou, S., Ádám, A., Barna, B., Klement, Z. 1993. Effect of oxy free radicals on plant pathogenic bacteria and fungi and on some plant diseases. In: Mózsik Gy, Emerit I, Fehér J, Matkovics B, Vincze Á (eds.): *Oxygen Free Radicals and Scavengers in the Natural Sciences*. Akad. Kiadó, Budapest, pp. 9-19.
- Király, Z., Hevesi, M., Klement, Z. 1977. Inhibition of bacterial multiplication in incompatible host-parasite relationships in the absence of the hypersensitive necrosis. *Acta Phytopathol. Hung.* 12, 247-256.
- 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.

- Klement, Z. 1982. Hypersensitivity. In: M.S. Mount, G.H. Lacy (eds): Phytopathogenic prokaryotes II. Academic Press, New York, pp. 149-177.
- Klement, Z., Bozsó, Z., Kecskés, M.L., Besenyi, E., Czelleng, A., Ott, P.G. 2003. Local early induced resistance of plants as the first line of defence against bacteria. *Pest Manag. Sci.* 59, 465-474.
- Klement, Z., Farkas, G.L., Lovrekovich, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54, 474-477.
- Klessig, D.F., Choi, H.W., Dempsey, D.A. 2018. Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. *Mol Plant Microbe Interact.* 31, 871-888.
- Knecht, K., Seyffarth, M., Desel, C., Thurau, T., Sherameti, I., Lou, B., Oelmüller, R., Cai, D. 2010. Expression of *BvGLP-1* encoding a germin-like protein from sugar beet in *Arabidopsis thaliana* leads to resistance against phytopathogenic fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 446-457.
- Knip, M., Richard, M.M.S., Oskam, L., van Engelen, H.T.D., Aalders, T., Takken, F.L.W. 2019. Activation of immune receptor Rx1 triggers distinct immune responses culminating in cell death after 4 hours. *Mol. Plant Pathol.* 20, 575-588.
- Kobayashi, Y., Fukuzawa, N., Hyodo, A., Kim, H., Mashiyama, S., Ogihara, T., Yoshioka, H., Matsuura, H., Masuta, C., Matsumura T., Takeshita, M. 2020. Role of salicylic acid glucosyltransferase in balancing growth and defence for optimum plant fitness. *Mol. Plant Pathol.* 21, 429-442.
- Koch, A., Kogel, K-H. 2014. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnol. J.* 12, 821-831.
- Koga, H., Bushnell, W.R., and Zeyen, R.J. 1990. Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Can. J. Bot.* 68, 2344-2352.
- Kong, L., Wu, J., Lu, L., Xu, Y., Zhou, X. 2014. Interaction between Rice stripe virus disease-specific protein and host PsbP enhances virus symptoms. *Mol. Plant* 7, 691-708.
- Kousik, C.S., Mandal, M., Hassell, R. 2018. Powdery mildew resistant rootstocks that impart tolerance to grafted susceptible watermelon scion seedlings. *Plant Disease* 102, 1290-1298.
- Kovacs, I., Durner, J., Lindermayr, C. 2015. Crosstalk between nitric oxide and glutathione is required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-dependent defense signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 208, 860-872.
- Kovtun, Y., Chiu, W-L., Tena, G., Sheen, J. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2940-2945.
- Kuč, J. 1982. Induced immunity to plant disease. *Bioscience* 32, 854-860.
- Kumar, J., Hüchelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S., Kogel, K.-H. 2001. A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology* 91, 127-133.
- Kusch, S., Panstruga, R. 2017. mlo-based resistance: an apparently universal “weapon” to defeat powdery mildew disease. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30, 179-189.
- Kuźniak, E., Kopczeński, T. 2020. The chloroplast reactive oxygen species-redox system in plant immunity and disease. *Front. Plant Sci.* 11, 572686.
- Künstler, A., Bacsó, R., Albert, R., Barna, B., Király, Z., Hafez, Y.M., Fodor, J., Schwarczinger, I., Király, L. 2018. Superoxide (O₂⁻) accumulation contributes to symptomless (type I) nonhost resistance of plants to biotrophic pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 128, 115-125.
- 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.
- 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., 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., Hafez, Y.M., Király, L. 2007a. 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. 2007b. Lipoygenase and glutathione peroxidase activity in tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic virus. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 42, 197-207.
- Lagrimini, L.M., Burkhart, W., Moyer, M., Rothstein, S. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7542-7546.

- Lamb, C., Dixon, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Lantos, F. 2011. A kalciumhiány kialakulásának és hiánytüneteinek vizsgálata a paprikatermesztésben. Doktori (Ph.D.) értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő. 118 p.
- Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I.H., Kunkel, B.N. 2006. The *Arabidopsis thaliana* *JASMONATE INSENSITIVE 1* gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 789-800.
- Lee, D., Lal, N.K., Lin, Z.J.D., Ma, S., Liu, J., Castro, B., Toruño, T., Dinesh-Kumar, S.P., Coaker G. 2020. Regulation of reactive oxygen species during plant immunity through phosphorylation and ubiquitination of RBOHD. *Nat. Commun.* 11, 1838.
- Lee, H., Raskin, I. 1998. Glucosylation of salicylic acid in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc. *Phytopathology* 88, 692–697.
- Lee, H., Raskin, I. 1999. Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* 274, 36637–36642.
- Lee, H.A., Lee, H.Y., Seo, E., Lee, J., Kim, S.B., Oh, S., Choi, E., Choi, E., Lee, S.E., Choi, D. 2017. Current understandings of plant nonhost resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30, 5-15.
- Lee, W.-S., Fu, S.-F., Li, Z., Murphy, A.M., Dobson, E.A., Garland, L., Chaluvadi, S.R., Lewsey, M.G., Nelson, R.S., Carr, J.P. 2016. Salicylic acid treatment and expression of an RNA-dependent RNA polymerase 1 transgene inhibit lethal symptoms and meristem invasion during tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biol.* 16, 15.
- Lee, Y.H., Yoon, I.S., Suh, S.C., Kim, H.I. 2002. Enhanced disease resistance in transgenic cabbage and tobacco expressing a glucose oxidase gene from *Aspergillus niger*. *Plant Cell Rep.* 20, 857-863.
- Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S.E., Metraux, J.-P. 2015. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112, 54–62.
- Leon, J., Lawton, M.A., Raskin, I. 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108, 1673-1678.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.
- Li, S., Lin, D., Zhang, Y., Deng, M., Chen, Y., Lv, B., Li, B., Lei, Y., Wang, Y., Zhao, L., Liang, Y., Liu, J., Chen, K., Liu, Z., Xiao, J., Qiu, J.-L., Gao, C. 2022a. Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. *Nature* 602, 455–460.
- Li, W., Chen, S., Liu, Y., Wang, L., Jiang, J., Zhao, S., Fang, W., Chen, F., Guan, Z. 2022b. Long-distance transport RNAs between rootstocks and scions and graft hybridization. *Planta* 255, 96.
- Li, Z., Tang, M., Hassan, M.J., Zhang, Y., Han, L., Peng, Y. 2021. Adaptability to high temperature and stay-green genotypes associated with variations in antioxidant, chlorophyll metabolism, and g-aminobutyric acid accumulation in creeping bentgrass species. *Front. Plant Sci.* 12, 750728.
- Lightfoot, D.J., Boettcher, A., Little, A., Shirley, N., Able, A.J. 2008. Identification and characterisation of barley (*Hordeum vulgare*) *respiratory burst oxidase homologue* family members. *Funct. Plant Biol.* 35, 347-359.
- Lightfoot, D.J., Mcgrann, G.R.D., Able, A.J. 2017. The role of a cytosolic superoxide dismutase in barley–pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology*, 18, 323–335.
- Lindbo, J.A., Dougherty, W.G. 2005. Plant pathology and RNAi: a brief history. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 191-204.
- 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.
- Liu, J., Elmore, J.M., Lin, Z.J.D., Coaker, G. 2011. A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell Host Microbe* 9, 137-146.
- Liu, J., Qiu, G., Liu, C., Li, H., Chen, X., Fu, Q., Lin, Y., Guo, B. 2022. Salicylic acid, a multifaceted hormone, combats abiotic stresses in plants. *Life* 12, 886.
- Liu, P.-P., Bhattacharjee, S., Klessig, D.F., Moffett, P. 2010. Systemic acquired resistance is induced by R gene-mediated responses independent of cell death. *Mol. Plant Pathol.* 11, 155–160.
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallóczy, Zs., Levine, B., Dinesh-Kumar, S.P. 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121, 567-577.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^(-ΔΔCT) method. *Methods* 25, 402–408.
- Lough, T.J., Lucas, W.J. 2006. Integrative plant biology: Role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 203–232.

- Louws, F.J., Rivard, C.L., Kubota, C. 2010. Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. *Sci. Hortic.* 127, 127–146.
- Lukan, T., Pompe-Novak, M., Baebler, Š., Tušek-Žnidarič, M., Kladnik, A., Križnik, M., Blejec, A., Zagorščak, M., Stare, K., Dušak, B., Coll, A., Pollmann, S., Morgiewicz, K., Hennig, J., Gruden, K. 2020. Precision transcriptomics of viral foci reveals the spatial regulation of immune-signaling genes and identifies RBOHD as an important player in the incompatible interaction between potato virus Y and potato. *Plant J.* 104:645–661.
- Lukan, T., Županič, A., Mahkovec Povalej, T., Brunkard, J.O., Kmetič, M., Juteršek, M., Baebler, Š., Gruden, K. 2023. Chloroplast redox state changes mark cell-to-cell signaling in the hypersensitive response. *New Phytol.* 237, 548-562.
- Luna, E., Bruce, T.J., Roberts, M.R., Flors, V., Ton, J. 2012. Next generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 158, 844–853.
- Lyngkjær, M.F., Carver, T.L.W. 2000. Conditioning of cellular defence responses to powdery mildew in cereal leaves by prior attack. *Mol. Plant Pathol.* 1, 41-49.
- 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.
- Manandhar, H.K., Mathur, S.B., Smedegaard-Petersen, V., Thordal-Christensen, H. 1999. Accumulation of transcripts of pathogenesis-related proteins and peroxidase in rice plants triggered by *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris sorokiniana* and u.v. light. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 55, 289-295.
- Mandadi, K.K., Scholthof, K-B.G. 2013. Plant immune responses against viruses: How does a virus cause disease? *Plant Cell* 25, 1489–1505.
- Manickam, R., Chen, J.-R., Sotelo-Cardona, P., Kenyon, L., Srinivasan, R. 2021. Evaluation of different bacterial wilt resistant eggplant rootstocks for grafting tomato. *Plants* 10, 75.
- Manohar, M., Tian, M., Moreau, M., Park, S.W., Choi, H.W., Fei, Z., Friso, G., Asif, M., Manosalva, P., von Dahl, C.C., Shi, K., Ma, S., Dinesh-Kumar, S.P., O'Doherty, I., Schroeder, F.C., van Wijk, K.J., Klessig, D.F. 2015. Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens, *Front. Plant Sci.* 5, 777.
- Manfre, A., Glenn, M., Nunez, A., Moreau, R. A., Dardick, C. 2011. Light quantity and photosystem function mediate host susceptibility to *Turnip mosaic* virus via a salicylic acid-independent mechanism. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 315–327.
- Marcec, M.J., Tanaka, K. 2022. Crosstalk between calcium and ROS signaling during Flg22-triggered immune response in *Arabidopsis* leaves. *Plants* 11, 14.
- Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. 2012. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.* 17, 9-15.
- Mateo, A., Funck, D., Muhlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P.M. Karpinski, S. 2006. Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *J. Exp. Bot.* 57, 1795-1807.
- 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.
- Maruthasalam, S., Liu, Y.L., Sun, C.M., Chen, P.Y., Yu, C.W., Lee, P.F., Lin, C.H. 2010. Constitutive expression of a fungal glucose oxidase gene in transgenic tobacco confers chilling tolerance through the activation of antioxidative defence system. *Plant Cell Rep.* 29, 1035-1048.
- Medina, E., Kim, S-H., Yun, M., Choi, W-G. 2021. Recapitulation of the function and role of ROS generated in response to heat stress in plants. *Plants* 10, 371.
- 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.
- 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.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M.A., Shulaev, V., Dangl, J., Mittler, R. 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* 2, ra45.
- Mittler, R. ROS are good. 2017. *Trends Plant Sci.* 22, 11–19.
- 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., Shulaev, V., Seskar, M., Lam, E. 1996. Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. *Plant Cell* 8, 1991-2001.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300-309.

- Mittler, R., Zandalinas, S.I., Fichman, Y., Van Breusegem, F. 2022. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 23, 663–679.
- Moeder, W., Yoshioka, K., Klessig, D.F. 2005. Involvement of the small GTPase Rac in the defense responses of tobacco to pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 116-124.
- Moissiard, G., Voinnet, O. 2004. Viral suppression of RNA silencing. *Mol. Plant Pathol.* 5, 71-82.
- Molitor, A., Zajic, D., Voll, L.M., Pons, K., Hnemann, J., Samans, B., Kogel, K-H., Waller, F. 2011. Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and *Piriformospora indica*-mediated systemic induced resistance to powdery mildew. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 1427–1439.
- Molnár, A., Havelda, Z., Dalmay, T., Szutorisz, H., Burgyán, J. 1997. Complete nucleotide sequence of tobacco necrosis virus strain D^H and genes required for RNA replication and virus movement. *J. Gen. Virol.* 78, 1235-1239.
- Morel, F., Doussiere, J., Vignais P. V. 1991. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.* 201, 523-546.
- Morel, J.B., Dangl, J.L. 1997. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* 4, 671-683.
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935–944.
- Mudge, K., Janick, J., Scofield, S., Goldschmidt, E.E. 2009. A history of grafting. *Hortic. Rev.* 35, 437–493.
- Mur, L.A., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., Prats, E. 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* 59, 501–520.
- Murphy, A.M., Zhou, T., Carr, J.P. 2020. An update on salicylic acid biosynthesis, its induction and potential exploitation by plant viruses. *Curr. Opin. Virol.* 42, 8–17.
- Mysore, K.S., Ryu, C-M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* 9, 97-104.
- Nagai, A., Bezerra Torres, P., Lembo Duarte, L.M., Rodrigues Chaves, A.L., Ferreira Macedo, A., Segal Floh, E.I., de Oliveira, L.F., Zuccarelli, R., Cursino dos Santos, D.Y.A. 2020. Signaling pathway played by salicylic acid, gentisic acid, nitric oxide, polyamines and non-enzymatic antioxidants in compatible and incompatible *Solanum*-tomato mottle mosaic virus interactions. *Plant Science* 290, 110274.
- Nakjarung, K., Mongkolsuk, S., Vattanaviboon, P. 2003. The oxyR from *Agrobacterium tumefaciens*: evaluation of its role in the regulation of catalase and peroxide responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 41-47.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., Jones, J.D.G. 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* 135, 1113–1128.
- Neu, C., Keller, B., Feuillet, C. 2003. Cytological and molecular analysis of the *Hordeum vulgare*-*Puccinia triticina* nonhost interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16, 626–633.
- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessman, H., and Ryals, J. 1995. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.* 8, 227-233.
- Newman, M-A., Sundelin, T., Nielsen, J.T., Erbs, G. 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* 4, 139.
- Niks, R.E. 1983. Haustorium formation by *Puccinia hordei* in leaves of hypersensitive, partially resistant, and nonhost plant genotypes. *Phytopathology* 73, 64-66.
- Ngou, B.P.M., Ahn, H.K., Ding, P., Jones, J.D.G. 2021. Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* 592, 110–115.
- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., Niu, D. 2017. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and NPR1-dependent signaling pathway and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 8, 238.
- Niks, R.E., Marcel, T.C. 2009. Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? *New Phytologist* 182, 817–828.
- Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, C.H. 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* 35, 454–484.
- Ott, P.G., Klement, Z., Nagy, I., Ádám, A.L. 2003. Lanthanum inhibits programmed cell death but not resistance in the tobacco - *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* incompatible interaction. In: N.S. Iacobellis et al. (eds): *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Kluwer Academic Publishers, pp. 335-344.

- Palanichelvam, K., Cole, A.B., Shababi, M., Schoelz, J.E. 2000. Agroinfiltration of *Cauliflower mosaic virus* gene VI elicits hypersensitive response in *Nicotiana* species. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 1275-1279.
- Pallas, J.A., Paiva, N.L., Lamb, C., Dixon, R.A. 1996. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *Plant J.* 10, 281-293.
- Pandey, S.P., Somssich, I.E. 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol.* 150, 1648-1655.
- Park C.-J., Kim K.-J., Shin R., Park J.M., Shiny-C., Peak K-H. 2004. Pathogenesis related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J.* 37, 186-198.
- Park, H., Miura, Y., Kawakita, K., Yoshioka, H., Doke, N. 1998. Physiological mechanisms of a sub-systemic oxidative burst triggered by elicitor-induced local oxidative burst in potato tuber slices. *Plant Physiol.* 126, 1281-1290.
- Park, S-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D.F. 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318, 113-116.
- Pastori, G.M., Foyer, C.H. 2002. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated control. *Plant Physiology*, 129, 460-468.
- 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.
- Peng, M., Kuć, J. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82, 696-699.
- Peng, Y., van Wersch, R., Zhang, Y. 2018. Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31, 403-409.
- Pereira Torres, D., Proels, R.K., Schempp, H., Hüchelhoven, R. 2017. Silencing of *RBOHF2* causes leaf age-dependent accelerated senescence, salicylic acid accumulation, and powdery mildew resistance in barley. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30, 906-918.
- Perez-Bueno, M.L., Rahoutei, J., Sajani, C., Garcia-Luque, I., Baron, M. 2004. Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II under biotec stress: Studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomics* 4, 418-425.
- Peterhänsel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R., Schulze-Lefert, P. 1997. Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *Plant Cell* 9, 13497-1409.
- Pieterse, C.M., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C., Bakker, P.A. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52, 347-375.
- Piffanelli, P., Ramsay, L., Waugh, R., Benabdelmouna, A., D'Hont, A., Hollricher, K., Jorgensen, J.H., Schulze-Lefert, P., Panstruga, R. 2004. A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew. *Nature* 430, 887-891.
- Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Schaffrath, U., Collins, N., Panstruga, R., Schulze-Lefert, P. 2002. The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol.* 129, 1076-1085.
- Pogány, M., Koehl, J., Heiser, I., Elstner, E.F., Barna, B. 2004. Juvenility of tobacco induced by cytokinin gene introduction decreases susceptibility to *Tobacco necrosis virus* and confers tolerance to oxidative stress. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65, 39-47.
- 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.
- Poór, P. 2020. Effects of salicylic acid on the metabolism of mitochondrial reactive oxygen species in plants. *Biomolecules* 10, 341.
- 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.
- Pruitt, R.N., Gust, A.A., Nürnberger, T. 2021. Plant immunity unified. *Nat. Plants* 7, 382-383.
- Rajaraman, J., Douchkov, D., Hensel, G., Stefanato, F.L., Gordon, A., Ereful, N., Caldararu, O.F., Petrescu, A-J., Kumlehn, J., Boyd, L.A., Schweizer, P. 2016. An LRR/malectin receptor-like kinase mediates resistance to non-adapted and adapted powdery mildew fungi in barley and wheat. *Front. Plant Sci.* 7, 1836.
- Rajarammohan, S. 2021. Redefining plant-necrotroph interactions: The thin line between hemibiotrophs and necrotrophs. *Front. Microbiol.* 12, 673518.
- Rahoutei, J., García-Luque, I., Barón, M. 2000. Inhibition of photosynthesis by viral infection: effect on PSII structure and function. *Physiol. Plant.* 110, 286-292.

- 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.
- Schulze-Lefert, P., Panstruga, R. 2011. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends Plant Sci.* 16, 117-125.
- Segal, A.W. 2008. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 604-618.
- Sekine, K.T., Kawakami, S., Hase, S., Kubota, M., Ichinose, Y., Shah, J., Kang, H.G., Klessig, D.F., Takahashi, H. 2008. High level expression of a virus resistance gene, RCY1, confers extreme resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 1398-1407.
- Senthil-Kumar, M., Mysore, K.S. 2013. Nonhost resistance against bacterial pathogens: retrospectives and prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 407-427.
- Seo, J.K., Kwon, S.J., Cho, W.K., Choi, H.S., Kim, K.H. 2014. Type 2C protein phosphatase is a key regulator of antiviral extreme resistance limiting virus spread. *Sci. Rep.* 4, 5905.
- Shang, J., Xi, D.-H., Yuan, S., Xu, F., Xu, M.-Y., Qi, H.-L., Wang, S.-D., Huang, Q.-R., Wen, L., Lin, H.-H. 2010. Difference of physiological characters in dark green islands and yellow leaf tissue of *Cucumber mosaic virus* (CMV)-infected *Nicotiana tabacum* leaves. *Z. Naturforsch.* 65c, 73-78.
- Sheikh, A.H., Raghuram, B., Lippold, L.E., Scheel, D., Lee, J., Sinha, A.K. 2014. Agroinfiltration by cytokinin-producing *Agrobacterium* sp. strain GV3101 primes defense responses in *Nicotiana tabacum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27, 1175-1185.
- Shopova, E., Mihailova, B., Todorova, D., Sergiev, I., Stoimenova, E. 2020. Systemic acquired resistance induced by compatible and incompatible Tomato Mosaic Viruses effectively controls bacterial spot and speck diseases in tomato. *Agriculture* 10, 302.
- Shu, S., Gao, P., Li, L., Yuan, Y., Sun, J., Guo, S. 2016. Abscisic acid-induced H₂O₂ accumulation enhances antioxidant capacity in pumpkin-grafted cucumber leaves under Ca(NO₃)₂ stress. *Front. Plant Sci.* 7, 1489.
- 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.
- Simon-Plas, F., Elmayan, T., Blein, J.P. 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* 31, 137-147.
- Smith, I.K. 1985. Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol.* 79, 1044-1047.
- Soh, H.C., Park, A.R., Park, S., Back, K., Yoon, J.B., Park, H.G., Kim, Y.S. 2012. Comparative analysis of pathogenesis-related protein 10 (*PR10*) genes between fungal resistant and susceptible peppers. *Eur. J. Plant Pathol.* 132, 37-48.
- Song, J.T. 2006. Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, *AtSGT1*, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. *Molec. Cells* 22, 233-238.
- Song, J.T., Koo, Y.J., Seo, H.S., Kim, M.C., Choi, Y.D., Kim, J.H. 2008. Overexpression of *AtSGT1*, an *Arabidopsis* salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry* 69, 1128-1134.
- Spanò, R., Ferrara, M., Gallitelli, D., Mascia, T. 2020. The role of grafting in the resistance of tomato to viruses. *Plants* 9, 1042.
- Spanò, R., Gallitelli, D., Mascia, T. 2017. Grafting to manage infections of top stunting and necrogenic strains of cucumber mosaic virus in tomato. *Annals of Applied Biology* 171, 393-404.
- Spanu, P.D., Panstruga, R. 2017. Editorial: biotrophic plant-microbe interactions. *Front. Plant Sci.* 8, 192.
- Spoel, S.H., Dong, X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 89-100.
- Spoel, S.H., Johnson, J.S., Dong, X. 2007. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 18842-18847.
- Srivastava, M.K., Dwivedi, U.N. 1998. Salicylic acid modulates glutathione metabolism in pea seedlings. *J. Plant Physiol.* 153, 409-414.
- Stakman, E.C. 1915. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. Agricult. Res.* 4, 193-199.
- Strobel, N.E., Kuć, J. 1995. Chemical and biological inducers of systemic resistance to pathogens protect cucumber and tobacco plants from damage caused by paraquat and cupric chloride. *Phytopathology* 85, 1306-1310.
- Stroud, E.A., Jayaraman, J., Templeton, M.D., Rikkerink, E.H.A. 2022. Comparison of the pathway structures influencing the temporal response of salicylate and jasmonate defence hormones in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 13, 952301.

- Sulima, A.S., Zhukov, V.A. 2022. War and Peas: Molecular bases of resistance to powdery mildew in pea (*Pisum sativum* L.) and other legumes. *Plants* 11, 339.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A., Mittler, R. 2011. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 691-699.
- Šubr, Z.; Predajna, L.; Šoltys, K.; Bokor, B.; Budiš, J.; Glasa, M. 2020. Comparative transcriptome analysis of two cucumber cultivars with different sensitivity to Cucumber mosaic virus infection. *Pathogens* 9, 145.
- Sziráki, I., Balázs, E., Király, Z. 1980. Role of different stresses in inducing systemic acquired resistance to TMV and increasing cytokinin level in tobacco. *Physiol. Plant Pathol.* 16, 277-284.
- Szittyá, Gy., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas Á., Lakatos, L., Bánfalvi, Zs., Burgyán, J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J.* 22, 633-640.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X. 2008. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321, 952-956.
- Takahashi, H., Kai, A., Yamashita, M., Ando, S., Sekine, K-T., Kanayama, Y., Tomita, H. 2012. Cyclic nucleotide-gated ion channel-mediated cell death may not be critical for *R* gene-conferred resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 79, 40-48.
- Tang, Y., Liu, Q., Liu, Y., Zhang, L., Ding, W. 2017. Overexpression of *NtPR-Q* up-regulates multiple defense-related genes in *Nicotiana tabacum* and enhances plant resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Front. Plant Sci.* 8, 1963.
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A.K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Roitsch, T., Mueller, M.J. 2003. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J* 34, 363-375.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11, 1187-1194.
- Torres, M.A. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiol. Plant.* 138, 414-429.
- Torres, M.A., Dangl, J. L. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 397-403.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., Jones, J.D. 2002. *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 517-522.
- Torres, M.A., Jones, J.D., Dangl, J.L. 2005. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Gen.* 37, 1130-1134.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141, 373-378.
- Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. 1998. Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (*gp91^{phox}*). *Plant J.* 14, 365-370.
- 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.
- Trujillo, M., Kogel, K.-H., Hüchelhoven, R. 2004a. Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the nonhost interaction of barley and wheat with inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 304-312.
- Trujillo, M., Troeger, M., Niks, R.E., Kogel, K.-H., Hüchelhoven, R. 2004b. Mechanistic and genetic overlap of barley host and non-host resistance to *Blumeria graminis*. *Molecular Plant Pathology* 5, 389-396.
- Tsuda, K., Katagiri, F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 459-465.
- Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B.N., Anand, A., Mysore, K.S., Bender, C.L. 2007. The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:955-965.
- Urbanek Krajnc, A., Kristl, J., Ivancic, A. 2011 Application of salicylic acid induces antioxidant defense responses in the phloem of *Picea abies* and inhibits colonization by *Ips typographus*. *Forest Ecology and Management* 261, 416-426.
- Vaca, E., Behrens, C., Theccanat, T., Choe, J.-Y., Dean, J. V. 2017. Mechanistic differences in the uptake of salicylic acid glucose conjugates by vacuolar membrane-enriched vesicles isolated from *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 161, 322-338.

- Vanacker, H., Carver, T.L.W., Foyer, C.H. 1998. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology* 117, 1103–1114.
- Van den Boogaart, T., Lomonosoff, G., Davies, J. 1998. Can we explain RNA-mediated virus resistance by homology-dependent gene silencing? *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:717-723.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162.
- Van Loon, L.C., Van Kammen, A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. ‘Samsun’ and ‘Samsun NN’. II. Changes in protein constitution after infection with TMV. *Virology* 40, 199-201.
- Van Wuytswinkel, O., Vansuyt, G., Grignon, N., Fourcroy, P., Briat, J.-F. 1998. Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *Plant J.* 17, 93–97.
- Várallyai, É., Giczey, G., Burgyán, J. 2012. Virus-induced gene silencing of *Mlo* genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. *Arch. Virol.* 157, 1345–1350.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessman, H., Ryals, J.A. 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6, 959-965.
- Veselova, S., Nuzhnaya, T., Burkhanova, G., Rummyantsev, S., Maksimov, I. 2021. Reactive oxygen species in host plant are required for an early defense response against attack of *Stagonospora nodorum* Berk. necrotrophic effectors SnTox. *Plants* 10, 1586.
- Vigers, A.J., Wiedemann, S., Roberts, W.K., Legrand, M., Selitrennikoff, C.P., Fritig, B. 1992. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Sci.* 83, 155-161.
- Vleeshouwers, V.G., van Dooijeweert, W., Govers, F., Kamoun, S., Colon, L.T. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210, 853-864.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., Klessig, D.F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 177–206.
- Vlot, A.C., Sales, J.H., Lenk, M., Bauer, K., Brambilla, A., Sommer, A., Chen, Y., Wenig, M., Nayem, S. 2021. Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytol.* 229, 1234-1250.
- Vulić, T., Oparnica, C., Djordjević, B., Kuzmanović, S., Starović, M., Ford, E., Tosić, M. 2013. Plum sectorial resistance to *Plum pox virus* is graft transmissible. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 48, 219-225.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., Mauch, F. 2002. Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* 49, 515–532.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hüchelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P., Kogel, K.H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13386-13391.
- Waller, F., Mukherjee, K., Deshmukh, S.D., Achatz, B., Sharma, M., Schafer, P., Kogel, K.H. 2008. Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related *Sebacinales* species. *Journal of Plant Physiology* 165, 60–70.
- Wallis, C.M. Wallingford, A.K., Chen, J. 2013. Grapevine rootstock effects on scion sap phenolic levels, resistance to *Xylella fastidiosa* infection, and progression of Pierce’s disease. *Frontiers Plant Sci.* 4, Article 502.
- Walz, A., Zingen-Sell, I., Loeffler, M., Sauer, M. 2008. Expression of an oxalate oxidase gene in tomato and severity of disease caused by *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathol.* 57, 453-458.
- Wan, X., Tan, J., Lu, S., Lin, C., Hu, Y., Guo, Z. 2009. Increased tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco expressing a wheat oxalate oxidase gene via induction of antioxidant enzymes is mediated by H₂O₂. *Physiol Plant.* 136, 30-44.
- Wang, M-B., Masuta, C., Smith, N.A., Shimura, H. 2012a. RNA silencing and plant viral diseases. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 1275–1285.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., Qiu, J.L. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnol.* 32, 947–951.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P., Ryals, J.A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- Ward, H. M. 1902. On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust, *Puccinia dispersa* (Erikss.). *Ann. Bot.* 16, 233-315.

- Warschefsky, E.J., Klein, L.L., Frank, M.H., Chitwood, D.H., Londo, J.P., von Wettberg, E.J.B. Miller, A.J. 2016. Rootstocks: Diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes. *Trends Plant Sci.* 21, 418-437.
- Watanabe, N., Lam, E. 2009. Bax inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3149-3167.
- Wei, G.P., Yang, L.F., Zhu, Y.L., Chen, G. 2009. Changes in oxidative damage, antioxidant enzyme activities and polyamine contents in leaves of grafted and non-grafted eggplant seedlings under stress by excess of calcium nitrate. *Sci. Hort.* 120, 443-451.
- Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C.H., Schmelzer, E., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Smedegaard-Pedersen, V., Thordal-Christensen, H. 1998. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* 36, 101-112.
- Weryszko-Chmielewska, E., Michałojć, Z. 2009. Anatomical features of leaves of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fed with calcium using foliar nutrition. *Acta Agrobotanica* 62, 155-164.
- White, R.F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99, 410-412.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562-71.
- Wolter, M., Hollricher, K., Salamini, F., Schulze-Lefert, P. 1993. The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defense mimic phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 239, 122-128.
- Wright, K.M., Duncan, G.H., Pradel, K.S., Carr, F., Wood, S., Oparka, K.J., Santa Cruz, S. 2000. Analysis of the *N* gene hypersensitive response induced by a fluorescently tagged Tobacco mosaic virus. *Plant Physiol.* 123, 1375-1386.
- Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., León, J., Fitzsimmons, K.C., Levine, E.B., Raskin, I., Shah, D.M. 1997. Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol.* 115, 427-435.
- Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Levine, E.B., Fitzsimmons, K.C., Shah, D.M. 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 7, 1357-1368.
- Wutscher, H.K. 1979. Citrus rootstocks. *Hortic. Rev.* 1, 237-269.
- 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.
- Xiao, X-o., Lin, W., Li, K., Li, W., Gao, X., Lv, L. 2017. Early burst of reactive oxygen species positively regulates resistance of eggplant against bacterial wilt. *J Phytopathol.* 165, 652-661.
- Xiong, Q., Ye, W., Choi, D., Wong, J., Qiao, Y., Tao, K., Wang, Y., Ma, W. 2014. *Phytophthora* suppressor of RNA silencing 2 is a conserved RXLR effector that promotes infection in soybean and *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 27, 1379-1389.
- Yao, J., Huot, B., Foune, C., Doddapaneni, H., Enyedi A. 2007. Expression of a β -glucosidase gene results in increased accumulation of salicylic acid in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc NN genotype. *Plant Cell Rep.* 26, 291-301.
- Yeom, S-I., Baek, H-K., Oh, S-K., Kang, W-H., Lee, S.J., Lee, J.M., Seo, E., Rose, J.K.C., Kim, B-D., Choi D. 2011. Use of a secretion trap screen in pepper following *Phytophthora capsici* infection reveals novel functions of secreted plant proteins in modulating cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 671-684.
- 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.
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D., Doke, N. 2003. *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15, 706-718.
- Yu, I.C., Parker, J., Bent, A.F. 1998. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7819-7824.
- Yuan, M., Jiang, Z., Bi, G., Nomura, K., Liu, M., Wang, Y., Cai, B., Zhou, J.M., He, S.Y., Xin, X.F. 2021. Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature.* 592, 105-109.
- Zabala, M.T., Littlejohn, G., Jayaraman, S., Studholme, D., Bailey, T., Lawson, T., Tillich, M., Licht, D., Bölter, B., Delfino, L., Truman, W., Mansfield, J., Smirnov, N., Grant, M. 2015. Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. *Nature Plants* 1, 15074.
- Zang, X., Geng, X., Wang, F., Liu, Z., Zhang, L., Zhao, Y., Tian, X., Ni, Z., Yao, Y., Xin, M., Hu, Z., Sun, Q., Peng, H. 2017. Overexpression of wheat ferritin gene *TaFER-5B* enhances tolerance to heat stress and other abiotic stresses associated with the ROS scavenging. *BMC Plant Biol.* 17, 14.

- Zavaliev, R., Levy, A., Gera, A., Epel, B.L. 2013. Subcellular dynamics and role of *Arabidopsis* β -1,3-glucanases in cell-to-cell movement of tobamoviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26, 1016–1030.
- Zechmann, B. 2020. Subcellular roles of glutathione in mediating plant defense during biotic stress. *Plants* 9, 1067.
- Zechmann, B., Zellnig, G., Urbanek-Krajnc, A., Müller, M. 2007. Artificial elevation of glutathione affects symptom development in ZYMV-infected *Cucurbita pepo* L. plants. *Arch. Virol.* 152, 747–762.
- Zhang, Y., Li, X. 2019. Salicylic acid: Biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 50, 29–36.
- Zhang, Z., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H. 1995. Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus, *Plant J.* 8, 139–145.
- Zhao D., Song, G. 2014. Rootstock-to-scion transfer of transgene-derived small interfering RNAs and their effect on virus resistance in nontransgenic sweet cherry. *Plant Biotechnology Journal* 12, 1319–1328.
- Zheng, X., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P., Fu, Z. Q., Klessig, D., He, S.Y., Dong, X. 2012. Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* 11, 587–596.
- 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.
- Zhu, F., Deng, X.G., Xu, F., Jian, W., Peng, X.J., Zhu, T., Xi, D.H., Lin, H.H. 2015. Mitochondrial alternative oxidase is involved in both compatible and incompatible host-virus combinations in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Science* 239, 26–35.
- Zhu, F., Zhang, Q.P., Che, Y.P., Zhu, P.X., Zhang Q.Q., Ji, Z.L. 2021. Glutathione contributes to resistance responses to TMV through a differential modulation of salicylic acid and reactive oxygen species. *Mol. Plant Pathol.* 22, 1668–1687.
- Zipfel C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., Boller, T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428, 764–767.
- Zurbriggen, M.D., Carrillo, N., Hajirezaei, M-R. 2010. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? *Plant Signal. Behav.* 4, 393–396.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Köszönöm egykori osztályvezetőmnek, Dr. Süle Sándornak (†), hogy osztályán (NÖVI Biotechnológiai Osztály) kezdhettem 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 segítettek 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 lisztharmat 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.