

**Tobamovírusokkal fertőzött *Solanaceae* növényekben
meginduló védekezési reakciók biokémiai
mechanizmusai**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Juhász Csilla

Témavezető: Dr. Gullner Gábor

Eötvös Lóránd Kutatási Hálózat
Agrártudományi Kutatóközpont
Növényvédelmi Intézet
Budapest

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2021

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1. A paprika jellemzése	8
2.2. A tobamovírusok jellemzése	8
2.3. A vírusfertőzött növények rezisztencia mechanizmusa	13
2.3.1. A növényi hormonok szerepe a növény-vírus kölcsönhatásban	14
2.3.2. A kórfolyamathoz kapcsolt (PR) fehérjék jellemzése.....	16
2.3.3. A lipoxigenázok szerepe fertőzött növényekben	18
2.3.4. Az oxilipinek szerepe fertőzött növényekben	20
2.3.5. A WRKY transzkripciós faktorok	22
2.3.6. A védekezési gének redox szabályozása fertőzött növényekben.....	26
3. Célkitűzések.....	27
4. Anyagok és módszerek	29
4.1. Növények és vírusok.....	29
4.2. Hidrogén-peroxid kimutatása diamino-benzidinnel.....	29
4.3. A lipoxigenáz enzimaktivitás mérése	30
4.4. Növények hormonkezelése	30
4.5. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE).....	30
4.6. Vírus köpenyfehérje kimutatása Western blottal.....	31
4.7. Új paprika lipoxigenáz gének klónozása és szekvenálása	32
4.8. Génexpressziós (RT-PCR) vizsgálatok a vírusfertőzött paprika levelekben	33
4.9. A génexpressziós változások vizsgálata valós idejű RT-qPCR -rel.....	34
4.10. Redox hatású vegyületek hatása a <i>WRKY</i> gének expressziójára	34
4.11. A paprika <i>WRKY2</i> gént kifejező dohány vizsgálata	35
4.12. Bioinformatikai módszerek	36
4.13. Statisztikai módszerek.....	37
5. Eredmények.....	38

5.1. Az ObPV és PMMoV fertőzések tünetei.....	38
5.2. A hidrogén-peroxid kimutatása fertőzött levelekben	39
5.3. A PMMoV köpenyfehérje kimutatása Western blot módszerrel.....	40
5.4. A vírusreplikáció nyomon követése PCR módszerrel	41
5.5. A kórfolyamathoz kapcsolt (PR) fehérjéket kódoló gének kifejeződése	42
5.6. A lipoxigenázok (LOX) szerepe ObPV- és PMMoV-fertőzött paprikában	45
5.6.1. A paprika <i>LOX</i> géncsalád új tagjainak azonosítása	45
5.6.2. A <i>LOX</i> gének aktiválódása ObPV és PMMoV fertőzött levelekben.....	48
5.6.3. Lipoxigenáz gének aktiválódása hormonkezelt levelekben	51
5.6.4. A <i>LOX</i> enzimaktivitás mérése hormonkezelt levelekben	54
5.6.5. A paprika <i>LOX</i> gének promóter szekvenciájának az elemzése	55
5.7. A vírusfertőzések hatása az oxilipin metabolizmus génjeire	57
5.8. Vírusfertőzések hatása a hormonok bioszintézisében szerepet játszó génekre	60
5.9. Vírusfertőzések hatása a paprika <i>CCD1</i> gén expressziójára	63
5.10. A <i>WRKY</i> transzkripció faktorok vizsgálata vírusfertőzött paprikában	65
5.10.1. Egy új paprika <i>WRKY</i> gén azonosítása	66
5.10.2. Szalicilsav hatása a <i>WRKY70</i> gén kifejeződésére.....	67
5.10.3. Tobamovírus fertőzések hatása paprika <i>WRKY</i> gének kifejeződésére	68
5.10.4. Paprika <i>WRKY</i> gének promótereinek jellemzése	70
5.10.5. A paprika <i>WRKY2</i> gént tranziens módon kifejező dohány létrehozása	72
5.10.6. A <i>WRKY2</i> gént tranziens módon kifejező dohány fertőzése TMV-vel.....	75
5.10.7. Redox-aktív anyagok hatása a <i>WRKY</i> gének expressziójára.....	81
6. Az eredmények értékelése	83
7. Köszönetnyilvánítás.....	95
8. Irodalomjegyzék.....	96
9. Összefoglalás	120
10. Függelék.....	122

Rövidítések jegyzéke

ABA	abszcizinsav
APS	ammónium-perszulfát
ACC	1-amino-ciklopropán-1-karboxilsav
AOC	allénoxid-cikláz
AOS	allénoxid-szintetáz
bp	bázispár
CCD	karotinoid hasító dioxigenáz (carotenoid cleavage dioxygenase)
cDNS	RNS-ről szintetizált, komplementer DNS (complementary DNA)
CMV	Uborka mozaik vírus (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CP	köpenyfehérje (coat protein)
DAB	3,3'-diamino-benzidin
DES	diviniléter-szintetáz
dpi	a fertőzést követő napok száma (days post inoculation)
EMSA	elektroforetikus mobilitás teszt (electrophoretic mobility shift assay)
EST	expresszáldó szekvencia szakasz, rövid cDNS (expressed sequence tag)
hpi	a fertőzést követő órák száma (hours post inoculation)
HPL	hidroperoxid-liáz
HR	hiperszenzitív reakció
ICS	izokorizmát-szintetáz (isochorismate synthase)
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
LOX	lipoxigenáz
mRNS	hírvivő RNS (messenger RNA)

NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, USA
NCED	9- <i>cis</i> -epoxikarotinoid dioxigenáz (9- <i>cis</i> -epoxycarotenoid dioxygenase)
nt	nukleotid
ObPV	Óbuda paprika vírus (<i>Obuda pepper virus</i>)
OTC	L-2-oxo-4-thiazolidin-karboxilsav
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PAL	fenilalanin ammónia liáz (phenylalanine ammonia lyase)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PMMoV	Paprika enyhe tarkulás vírus (<i>Pepper mild mottle virus</i>)
PR-fehérje	kórfolyamathoz kapcsolt (pathogenesis-related) fehérje
RT-qPCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative real-time PCR)
ROS	reaktív oxigén származékok (reactive oxygen species)
TC	rövid DNS szekvenciákból <i>in silico</i> összeállított, feltételezett szekvencia (tentative consensus)
TEMED	tetrametiletilén-diamin
TGIP	The Gene Index Project (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/)
TMV	Dohány mozaik vírus (<i>Tobacco mosaic virus</i>)
UTR	nem-transzlálódó, fehérjeszintézist nem kódoló génszakasz (untranslated region)
WRKY	triptofán (W)-arginin (R)-lizin (K)-tirozin (Y) aminosav motívum

1. Bevezetés

A korszerű növényvédelmi kutatások egyik fő célja az olyan mezőgazdasági eljárások kifejlesztése, amelyekkel lényegesen csökkenthető a káros mellékhatásokat okozó szintetikus kémiai növényvédőszer felhasználása. Egy lehetséges út ennek eléréséhez a kórokozókkal szemben rezisztens növények mezőgazdasági használata. Kiemelt kutatási területnek kell ezért tekinteni a növényi betegség-ellenállóság biokémiai, molekuláris mechanizmusainak vizsgálatát. Számos kórokozó által okozott betegség esetében nem is áll rendelkezésünkre hatékony növényvédőszer. Ezeknek a betegségeknek a leküzdésére csak a rezisztens növények nemesítése és használata jelenthet megoldást. Kutatómunkám alapvető célja ezért a mezőgazdasági szempontból jelentős hazai kultúrnövényeink valamint az őket károsító mikrobiális kórokozók között kialakuló kölcsönhatások molekuláris szintű vizsgálata volt.

A rezisztencia-mechanizmusok feltárásához szükséges a fertőzések hatására a növényekben aktiválódó védekezési folyamatok megismerése. A kórokozó felismerése után jelátviteli folyamatok indulnak meg a növényi sejtekben, amelyek aktiválják a sejtmagban található védekezési géneket. A védekezési gének aktiválódását egy bonyolult, többszintű rendszer szabályozza, amelyben döntő szerepet játszanak a transzkripciós faktor fehérjék, ill. a növényi védekezési hormonok. A mikrobiális kórokozók által okozott fertőzések hatására a növények gén-expressziós mintázata igen jelentősen megváltozik. A rezisztencia kialakulásában meghatározó a védekezési folyamatok aktiválódásának gyorsasága és erőssége.

Az Intézetünk (ATK, Növényvédelmi Intézet) korábbi tudományos eredményeire alapozva a védekezési folyamatok közül az alábbi részterületek kutatására összpontosítottam:

a) A vírusfertőzött növényi sejtekben meginduló enzimikus lipid peroxidáció lehetséges szerepe a rezisztenciában. A vírusfertőzések esetén, a növényi sejteken belüli membrán-lipidek szerkezete alapvetően befolyásolja a kórokozó replikációját, illetve felszaporodását. A lipid-peroxidáció jelensége, amely részben a lipoxigenáz enzimek katalízisével történik, sok esetben megfigyelhető rezisztens növényekben és szerepet játszik a kórokozó-felismerés után aktiválódó jelátviteli folyamatokban is. A lipoxigenáz

enzimek pontos szerepe a rezisztenciában azonban egyelőre ismeretlen, így további vizsgálatok szükségesek ennek jobb megismeréséhez.

b) A WRKY típusú transzkripciós faktorok szerepe a vírusokkal szembeni rezisztenciában: a kórokozót a növényi sejten belül felismerő rezisztencia-fehérjék szorosan együttműködnek egyes WRKY típusú transzkripciós faktorokkal. Ezek a növényi sejtokban elhelyezkedő fehérjék nagymértékben befolyásolják a védekezési gének átíródását, így a betegséggel szembeni rezisztencia kialakulását. Fontos tehát azonosítani azokat a WRKY transzkripciós faktorokat, amelyek a fertőzések hatására a rezisztens növényi vonalakban nagymértékben aktiválódnak, ill. a védekezési reakciók szabályozásában részt vesznek.

A rezisztencia-folyamatok biokémiai és molekuláris biológiai tanulmányozásához egy inkompatibilis és egy kompatibilis paprika (*Capsicum annuum* L.) - tobamovírus növény-kórokozó kapcsolatot választottam ki az Intézetünkben elért korábbi tudományos eredmények alapján. Az inkompatibilis és kompatibilis vírus-növény kapcsolatok esetében meginduló védekezési folyamatok összehasonlítása lehetőséget ad azoknak a folyamatoknak az azonosítására, amelyek csak az inkompatibilis kapcsolatban játszódnak le és így szerepük lehet a vírusokkal szembeni rezisztenciában. A paprika gazdaságilag fontos élelmiszer és fűszernövény hazánkban és világszerte is, valamint számos kórokozó vírus gazdanövénye. Egyes kiemelten fontos paprika gének jobb megismeréséhez funkcionális genomikai vizsgálatokat is végeztünk *Nicotiana benthamiana* növények segítségével, amelyeket szintén egy tobamovírussal, a Dohány mozaik vírussal (TMV) fertőztünk. A paprika genomot a kutatómunkám utolsó időszakában két kutatócsoport egymástól függetlenül teljesen megszekvenálta, ami még jelentős segítséget jelentett a munkámban. Erre a molekuláris genetikai adatbázisra építve a jövőben az egész paprika genomot átfogóan lehet majd vizsgálni a növény védekezési reakcióit.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A paprika jellemzése

A paprika (*Capsicum annuum* L.) a legrégebben házasított növények egyike a nyugati féltekén, és a legszélesebb körben termesztett fűszernövény a világon. A burgonyafélék (*Solanaceae*) családjába tartozik, lágyszárú, egyéves növény. Diploid, fakultatívan önbeporzó, közeli rokona a paradicsomnak, burgonyának, padlizsánnak, dohánynak és a petúniának. A legtöbb *Solanaceae* családba tartozó növénynek azonos a kromoszómaszáma ($n=12$) de a paprika genom mérete közel négyszer akkora, mint a paradicsomé. A teljes paprika genomot két kutatócsoport függetlenül megszekvenálta a közelmúltban. A 3,48 Gb méretű genomban mintegy 35000 fehérje kódoló gént azonosítottak, amelyek között 684 NB-LRR (nucleotide-binding and leucine-rich repeat) típusú rezisztencia-gént találtak (Kim és mtsai. 2014b, Qin és mtsai. 2014).

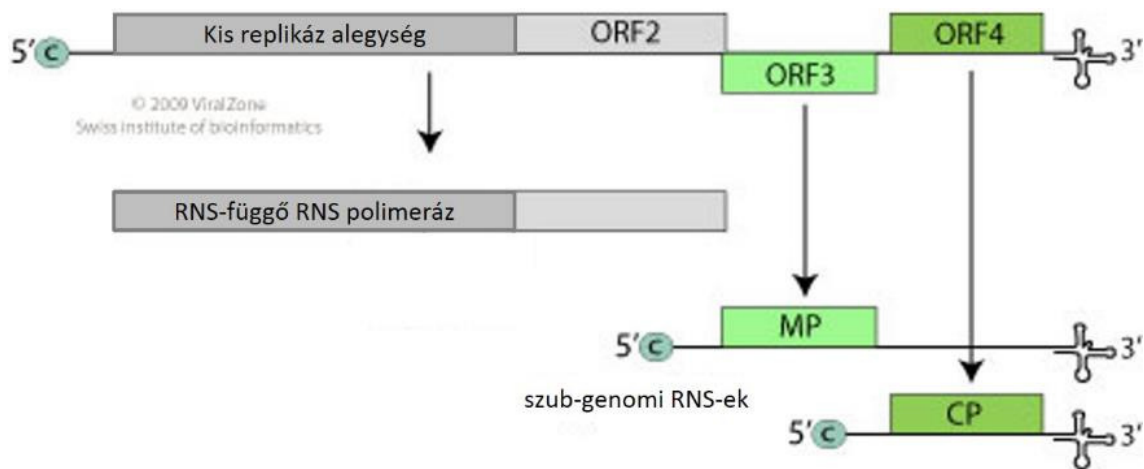
A paprika számos létfontosságú vitamint, ásványi anyagot, tápanyagot tartalmaz, melyek jótékony hatásúak az emberi egészségre. 2011-ben a világ 20 legjelentősebb paprikatermesztő országában 33,3 millió tonna paprikát termesztettek 3,8 millió hektáron. Az utóbbi évtizedben a világ paprika termesztése 40 %-kal növekedett (Kim és mtsai. 2014b).

Hazánkban a paprika termesztése közel háromszáz éves tradícióra nyúlik vissza. Leginkább a Dél-Alföldön, üvegházban és szabadföldön is egyaránt termesztik. Évente 150-170 ezer tonna termést takarítanak be (Lantos és mtsai. 2012).

2.2. A tobamovírusok jellemzése

A *Tobamovirus* nemzetségbe tartozó vírusok a *Nidovirales* rend tagjai. Pálcika alakú, merev, kb. 300 nm hosszú, helikális szimmetriájú vírusok. A tobamovírusok erősen immunogének. A fertőzött sejtekben zárványokat hoznak létre, melyek lehetnek kristályosak (a citoplazmában), szabálytalan alakúak vagy amorf X-testek. A legtöbb vírustörzs gazdanövényköre korlátozott, rovarvektor nélkül, mechanikailag vagy oltással terjednek. Izoelektromos pontjuk 3,16 - 4,64 pH értéknél van; hő inaktiválási pontjuk 80-95 °C (Kálmán, 2003).

A tobamovírusok genomja egyszerű felépítésű, a genetikai információt egy pozitív orientációjú, lineáris, egyszálú RNS molekula hordozza. A vírusgenom négy fehérjét kódol (1. ábra).



1. ábra. A tobamovírusok genomi szerkezete, a leolvasási keretek és a szub-genomi RNS-ek sematikus ábrázolása. ORF- nyílt leolvasási keret, MP- mozgási fehérje, CP- köpenyfehérje. Bővebb magyarázat a szövegben. Forrás: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/51.html

A genom első nyílt leolvasási kerete egy 126 kDa-os fehérjét kódol, ami metiltranszferáz és RNS helikáz aktivitású. Ugyanezen leolvasási keretben indul egy 183 kDa-os fehérje bioszintézise is, ami egy UAG stop kodon átugrással egy RNS-függő RNS polimeráz (RdRp) aktivitással rendelkező fehérjét kódol (Rozanov és mtsai. 1992, Lartey és mtsai. 1996). A 30 kDa-os mozgási fehérjének a vírus sejtről-sejtre történő terjedésében van szerepe (movement protein, MP) (1. ábra) (Salamon, 2006). A genom egyetlen strukturális fehérjét kódol, a 17,6 kDa-os köpenyfehérjét (coat protein, CP), melynek fő funkciója a vírus RNS védelme (Hull, 2002). A pozitív szálú policisztronos vírus RNS a növényi sejtek fehérjeszintetizáló rendszerét használva fordítódik le fehérjévé, mintha egy növényi mRNS volna. Mivel a növények transzlációs rendszere egy mRNS molekuláról csak egy leolvasási keretet képes lefordítani (csak monocisztronos RNS-t fordít le), ezért a vírus a replikációja során szub-genomi RNS-eket hoz létre, és ezekről termelődnek a mozgási- és köpenyfehérje molekulák (1. ábra).

A *Capsicum* fajokban a tobamovírusokkal szembeni rezisztenciát egy rezisztenciagén négy allélformája biztosítja (L¹ - L⁴, számozott sorrendben növekvő hatékonysággal) a 11. kromoszóma L lókuszában (Berzal-Herranz és mtsai. 1995, Elvira és

mtsai. 2008). A paprikát fertőző tobamovírusoknak viszont 4 patotípusa ismert (P_0 , P_1 , $P_{1,2}$, $P_{1,2,3}$) (Berzal-Herranz és mtsai. 1995). Ha az L^+ rezisztencia fokú paprikát bármelyik patotípussal fertőzzük, az fogékony gazda-parazita kapcsolatot eredményez. Az L^1 rezisztenciagén viszont rezisztenciát biztosít a P_0 patotípussal szemben, míg az L^2 gén a P_0 és a P_1 patotípusokkal szemben. Még teljesebb védelmet biztosít a *Capsicum chinense* fajból származó L^3 rezisztenciagén, amely a növényt ellenállóvá teszi a P_0 , P_1 és $P_{1,2}$ patotípusokkal szemben (Tóbiás és mtsai. 1989, Velasco és mtsai. 2002, Elvira és mtsai. 2008). Különösen ígéretes a *Capsicum chacoense* fajból származó L^4 rezisztenciagén átvitele természetett paprikafajtákba, mivel ez a gén minden vírus patotípussal szemben ellenállóságot biztosít (Kálmán, 2003).

A paprikát számos tobamovírus képes megfertőzni, és ezek a vírusok gazdaságilag jelentős károkat okozhatnak (Horváth és mtsai. 1986a, b és c; Rast 1988). Régóta ismert a P_0 patotípusú Dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) U_1 törzse által okozott fertőzés (Greenleaf és mtsai. 1964, Tóbiás és mtsai. 1982). Ugyancsak fontos kórokozó paprikán a $P_{1,2}$ patotípusú Paradicsom mozaik vírus (*Tomato mosaic virus*, ToMV) is (Pategas és mtsai. 1989). A paradicsomban található *Tm-1* gén visszaszorítja a ToMV replikációját (Motoyoshi és Oshima 1977), de a ToMV replikáz génjében történt mutáció miatt a vírus egy új törzse képessé vált a rezisztencia áttörésére (Meshi és mtsai. 1988). A fenti tobamovírusok mellett a $P_{1,2}$ illetve $P_{1,2,3}$ patotípusú Paprika enyhe tarkulás vírus (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) izolátumok okoznak jelentős károkat. A tobamovírusok genomjában könnyen kialakulhatnak mutációk, ha különböző hőmérsékleten, vagy különböző gazdanövényeken hosszú időn keresztül tartjuk fenn őket (Kálmán, 2003; Hull, 2014).

Dohány mozaik vírus (TMV)

A TMV a legkorábban azonosított és a legalaposabban vizsgált növényi vírus (Scholthof és mtsai. 2011). Elsőként Martinus Beijerinck ismerte fel 1898-ban, hogy a dohány mozaikos betegségét nem baktérium, hanem egy kisebb fertőző ágens okozza, amely sokszorozódásra képes a dohány szövetekben, és amelyet "vírus"-nak nevezett el (Beijerinck 1898). A TMV volt az első vírus, amelyet sikerült kristályosítani (Stanley

1935), és amelyet szintén elsőként vizsgáltak elektron-mikroszkóppal és röntgen-diffrakciós módszerrel is (Klug és mtsai. 1999).

A TMV teljes nukleotid szekvenciáját 1982-ben publikálták (Goelet és mtsai. 1982). A teljes RNS genom megszekvenálása egy 6395 bázispár hosszúságú szekvenciát eredményezett (GenBank NC_001367), amely legalább 4 nyílt leolvasási keretet tartalmaz (Goelet és mtsai. 1982, Okada 1999). Érdekes módon egy 126 és egy 183 kD-os fehérjét kódoló nyitott leolvasási nukleotid keretek teljesen átfednek, a nagyobb keret egy speciális "read-through" kodont tartalmaz (Okada 1999, Lewandowski és Dawson 2000). A 126 kD-os fehérje metil-transzferáz és helikáz doméneket tartalmaz (Lewandowski és Dawson 2000), míg a 183 kD-os fehérje ezen a két doménon kívül egy RNS-függő RNS-polimeráz domént is tartalmaz. Mindkét fehérje részt vesz a virális RNS replikációjában. Két további vírus fehérje két szub-genomi RNS-ről szintetizálódik. A TMV 30 kD-os fehérjéje a vírus sejtről-sejtre terjedését segíti elő (Beachy és Heinlein 2000), míg a negyedik TMV fehérje az RNS védelmét ellátó 17,6 kD-os köpenyfehérje, amelynek szerepe van a vírus hosszú távú mozgásában is (Okada 1999). Egy sikeresen megtisztított TMV RNS-polimeráz komplexben a 126 és 183 kD-os TMV fehérjék mellett egy a növényi gazdasejtből származó 56 kD-os fehérjét is kimutattak, amely az élesztő eIF-3 fehérje RNS-kötő aleggységéhez hasonlított (Osman és Buck 1997). A TMV a replikációjához számos más gazdanövény eredetű fehérjét is felhasznál (Ishibashi és mtsai. 2012).

A TMV különböző vonalai több mint 200 növényfajt képesek megfertőzni, beleértve a *Solanaceae* család legtöbb tagját (Whitham és mtsai. 1996). Rezisztens dohánynövényekben az *N* rezisztenciagén döntő szerepet játszik a TMV fertőzés felismerésében és a védekezési reakciók aktiválásában. A TMV fertőzés hatására hiperszenzitív reakció (HR) játszódik le, ami nekrotikus léziók megjelenésében nyilvánul meg a fertőzött leveleken. Az obligát biotróf vírus az elhalt növényi sejtekben és az azokkal szomszédos élő sejtekben is lokalizálódik, de nem képes a fertőzött levelekből a növény többi részébe eljutni (Whitham és mtsai. 1996, Wright és mtsai. 2000, Singh és mtsai. 2004). A TMV 126 kDa-os fehérjéjének helikáz doménje fontos szerepet játszik az *N* rezisztenciagén által meghatározott HR kiváltásában (Padgett és mtsai. 1997, Erickson és mtsai. 1999). Érdekes módon a köpenyfehérje mesterséges kifejeztetése fokozta a TMV rezisztenciát transzgenikus dohány növényekben (Abel és mtsai. 1986).

Paprika enyhe tarkulás vírus (PMMoV)

A Tobamovirus nemzetségbe tartozó Paprika enyhe tarkulás vírus (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) számos, különböző helyről izolált törzsének a nukleotid szekvenciáját meghatározták (Alonso és mtsai. 1991, Kirita és mtsai. 1997). A PMMoV egy pozitív egyszálú RNS vírus, a genom felépítése hasonló a TMV esetében leírtakhoz. A PMMoV jelentős gazdasági károkat okozhat a szabadföldi és üvegházban termesztett paprikában (Berzal-Herranz és mtsai. 1995, Beczner és mtsai. 1997). A PMMoV néhány egymással szoros kapcsolatban álló izolátuma képes áttörni az L^3 gén által biztosított rezisztenciát, amely nagyon hatékony a legtöbb tobamovírral szemben, és így ezek a PMMoV törzsek szisztemikus fertőzést okoznak (Tóbiás és mtsai. 1989, Velasco és mtsai. 2002, Elvira és mtsai. 2008). A PMMoV köpenyfehérje egyedül is képes kiváltani a paprika L^3 rezisztenciagén által okozott rezisztenciát (Berzal-Herranz és mtsai. 1995, Gilardi és mtsai. 1998). A PMMoV fertőzött leveleken általában gyenge klorotikus foltok figyelhetők meg, de sokszor semmilyen tünet nem tapasztalható. Azokon a leveleken, melyek a fertőzést követően fejlődnek ki pöttyözöttség, mozaikosság és pöndörödés figyelhető meg. A fertőzött növények satnyák lehetnek és a termés általában súlyosan deformálódott, foltos, ami súlyos gazdasági károkat okozhat (Beczner és mtsai. 1997, Velasco és mtsai. 2002, Elvira és mtsai. 2008).

Óbuda paprika vírus (ObPV)

A Magyarországon izolált Óbuda paprika vírus (*Obuda pepper virus*, ObPV) is egy pozitív, egyszálú RNS vírus, mely a Tobamovirus nemzetségbe tartozik (Csilléry és mtsai. 1983, Tóbiás és mtsai. 1982, 1989). Az ObPV nukleotid szekvenciáját két kutatócsoport is meghatározta (GenBank L11665 és NC_003852) (Padgett és Beachy 1993, Ikeda és mtsai. 1993). A vírus izolálása után nagy érdeklődést váltott ki, mivel a vírus át tudta törni a dohány N rezisztenciagén által biztosított rezisztenciát, ami a TMV-vel szemben hatásos (Csilléry és mtsai. 1983, Tóbiás és mtsai. 1982, 1989). A PMMoV-val ellentétben viszont az ObPV nem tudja áttörni az L^3 gén által biztosított rezisztenciát, mert a paprika védekező mechanizmusai a fertőzést követően gyorsan és hatékonyan aktiválódnak. Az ObPV fertőzés lokális nekrotikus léziók kialakulásához vezet (Csilléry és mtsai. 1983, Tóbiás és mtsai. 1982, 1989). A kórfolyamathoz kapcsolt fehérjék indukciója és etilén

felhalmozódás is megfigyelhető az ObPV fertőzött rezisztens paprika levelekben (Tóbiás és mtsai. 1989). A divinil-éter szintetáz gén expressziója is jelentősen megnőtt az ObPV-fertőzött paprika levelekben (Gullner és mtsai. 2010). Ugyanezekben a paprika növényekben a PMMoV fertőzés csak elhanyagolható hatással volt ezekre a metabolitokra és a génexpressziós szintekre (Tóbiás és mtsai. 1989, Gullner és mtsai. 2010).

2.3. A vírusfertőzött növények rezisztencia mechanizmusa

A patogén vírusokkal szemben kialakuló rezisztenciát a kórokozó időben való felismerése és a gyors, hatékony antivirális védekezés határozza meg. A késői és gyenge védekezési reakciók azonban fogékonyságot és betegséget eredményeznek. A növények egy kifinomult rendszert használnak a vírusok felismerésére, mely a sejten belüli rezisztencia fehérjéken (R-fehérjék) alapszik. A legtöbb R-fehérje tartalmaz nukleotid-kötő és leucinban gazdag ismétlődő (NB-LRR) szekvencia motívumokat, amelyek közvetítik a növényi kórokozókból származó különböző effektorok felismerését. A dohánynövényekben a tobamovírusokkal szembeni rezisztenciát a *Nicotiana glutinosa* fajból bevitt *N* gén biztosítja, amelyet 1994-ben szekvenáltak meg és kimutatták a fehérjeszekvencia hasonlóságát a *Drosophila* Toll-fehérjével, illetve az emlősökben található interleukin-1 receptor fehérjével (Whitham és mtsai. 1994). Amikor az R-fehérjék kórokozó vírust érzékelnek, akkor számos jelátviteli kaszkádot aktiválnak. A szignálok a sejtmagba továbbítódnak és előidézik a transzkripciós mintázat gyors és nagymértékű újraprogramozását. A transzkriptom újraprogramozását egy komplex, több rétegű hálózat szabályozza, amelyben fontos szerepet játszanak a transzkripciós faktorok, a védelemmel kapcsolatos növényi hormonok és a lipid származású oxilipinek (Bhattacharjee és mtsai. 2009, Mosblech és mtsai. 2009, Elmore és mtsai. 2011, Pieterse és mtsai. 2012). A rezisztenciához gyakran programozott sejthalál társul (HR) (Jones és Dangl 2006). Fontos megjegyezni, hogy a HR és a rezisztencia nem szükségszerűen jár együtt, genetikai és élettani/biokémiai bizonyítékok mutatják, hogy két különböző folyamatról van szó (Künstler és mtsai. 2016).

A fertőzött növények transzkripciós profiljának újraprogramozását, beleértve a védelmi gének aktiválódását, döntően a specifikus transzkripciós faktorok (DNS-kötő fehérjék) szabályozzák, amelyek nagyon gyorsan aktiválódnak vagy *de novo*

szintetizálódnak a fertőzést követően. A transzkripciós faktorok a gének átírását pozitívan és negatívan is szabályozhatják. A transzkripciós faktor fehérjék képesek kötődni specifikus nukleotid motívumokhoz számos célgén promóterében. Így a transzkripciós faktorok számos, a védelemmel kapcsolatos gén átíródását tudják egyszerre aktiválni vagy gátolni (Li és mtsai. 2004).

2.3.1. A növényi hormonok szerepe a növény-vírus kölcsönhatásban

A hormonok a biotikus és abiotikus stresszre adott növényi válasz finomhangolói. Különböző bonyolult hálózatok részei, melyek modulálják a különböző külső ingerekre, stresszhatásokra adott választ. Elsősorban négy hormon szabályozza a kórokozókkal szembeni növényi védekezési reakciókat: a szalicilsav, jázmonsav, az etilén és az abszcizinsav. A hormonok között antagonisztikus vagy szinergikus kapcsolat lehet, amelyek révén bizonyos hormonok elsőbbséget élveznek a többivel szemben egyedi körülmények között. A védelmi útvonalakat szabályozó szalicilsav, jázmonsav és etilén antagonista kölcsönhatásban vannak. A szalicilsav jelátviteli út indukciója represszálhatja a jázmonsav/etilén útvonalat az *NPR1* (Non-expressor of pathogenesis-related genes 1) és *WRKY70* géneken keresztül, míg az abszcizinsav útvonalat az *NPR1*-en vagy az azt követő elemeken keresztül. Ezzel szemben, a jázmonsav/etilén útvonal indukciója represszálja bizonyos, a szalicilsav útvonalat követő gének expresszióját a *MAPK4* (mitogén-aktivált protein-kináz 4) és *JIN2* géneken keresztül (Alazem és Lin 2015).

Szalicilsav

A szalicilsav (2-hidroxi-benzoésav) a növények által szintetizált fenolvegyület, mely számos mikrobiális kórokozóval fertőzött növény szöveteiben felhalmozódik, és elengedhetetlen a helyi és szisztémikus rezisztenciában. A szalicilsav bioszintézist és jelátvitelt az *R* gén terméke által felismert vírus effektor aktiválja, ami inkompatibilis kölcsönhatást eredményez. Az inkompatibilis kölcsönhatás aktiválása számos, a vírus terjedését limitáló eseményhez vezet a fertőzött területen, többek között a reaktív oxigénformák (ROS) és PR-ferhérjék felhalmozódása, a hiperszenzitív válasz indukálása, kallóz lerakódás, szöveti dezorganizáció, a kloroplasztisz méretének és alakjának

változása, sejtmag- és sejtmagvacska lebomlás és programozott sejthalál. A szalicilsav felelős a szisztémikusan szerzett rezisztencia kialakulásáért a disztális szövetekben, ami csökkenti a másodlagos támadások hatását (Vlot és mtsai. 2009, Alazem és Lin 2015).

Jázmonsav

A jázmonsav egy oxigenált zsírsav (oxilipin), mely elsősorban a nekrotróf kórokozók és rovarokkal szembeni rezisztenciában játszik szerepet (Thaler és mtsai. 2004). A közelmúltban kimutatták, hogy ha a *N. benthamiana*-t jázmonsavval vagy szalicilsavval kezelik, akkor fokozódik a TMV-vel szembeni rezisztencia, és a rezisztencia tovább fokozódik jázmonsavat követő szalicilsav előkezelés esetén (Zhu és mtsai. 2014). Azok a növények, melyekben károsodott a jázmonsav jelátviteli útvonal, nem képesek szalicilsav akkumulációra a levelekben vagy a phloemben, és fokozottan fogékonyak, míg a hibás szalicilsav reakcióút nem befolyásolja a jázmonsav szintet, viszont növeli a növények fogékonyságát (Zhu és mtsai. 2014). A jázmonsav modulálhatja a szalicilsav útvonal kezdeti résztvevőit, de az nem ismert, hogy a jázmonsav hogyan szabályozza a szalicilsav bioszintézist és a rezisztenciát kompatibilis kölcsönhatásokban.

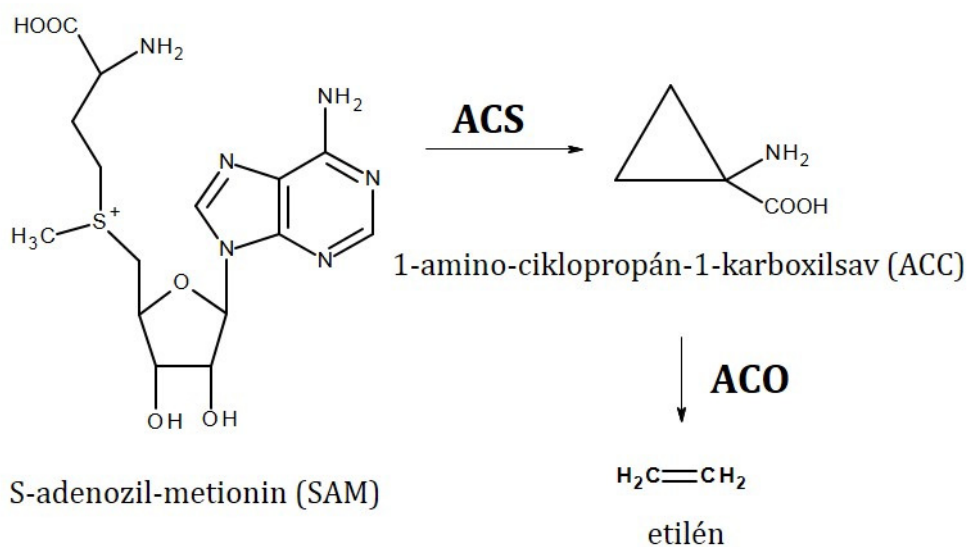
Etilén

Az etilén gáznemű növényi stressz hormon, melyről régóta tudjuk, hogy gyakori összetevője a vírusokkal szemben kialakuló növényi válaszoknak. Vírusfertőzött növényekben gyakran megfigyelték az etilén és ezzel párhuzamosan a kórfolyamathoz kapcsolt fehérjék indukcióját (Ohtsubo és mtsai. 1999, Tóbiás és mtsai. 1989). A megnövekedett etilén szint, amit az etilén receptorok érzékelnek, védekezési válaszokat vált ki a különböző védekezési gének expressziójának megváltoztatásával (Kim és mtsai. 2003).

Az etilén bioszintézise növényekben az S-adenozil-metioninból (SAM) indul ki, amelyet az 1-amino-ciklopropán-1-karboxilsav szintetáz enzim (ACS, E.C. 4.4.1.14) alakít át 1-amino-ciklopropán-1-karboxil-savvá (ACC), amely az etilén közvetlen metabolikus előanyaga (Van de Poel és Van Der Straeten 2014). Az etilén bioszintézis következő

lépésében egy oxidatív hasadás révén az ACC-ből etilén képződik, amely reakciót az 1-aminociklopropán-1-karboxilsav oxidáz enzim (ACO, E.C. 1.14.17.4) katalizálja (2. ábra).

Az ACS és ACO enzimeket kisebb géncsaládok kódolják növényekben. Paradicsomban öt ACO és kilenc ACS gént azonosítottak, amelyek különböző mértékben aktiválódnak különböző stresszhatásokra (Van de Poel és mtsai. 2012). A paprika genom közelmúltban elvégzett szekvenálása (Kim és mtsai. 2014b, Qin és mtsai. 2014) és a paprika gének annotálása után a GenBank-ban jelenleg 8 ACS és 32 ACO gén található (a pszeudogéneket nem számolva).



2. ábra. Az etilén bioszintézise növényekben, amelynek során az 1-aminociklopropán-1-karboxilsav szintetáz enzim (ACS) és az 1-aminociklopropán-1-karboxilsav oxidáz enzim (ACO) által katalizált reakciók játszanak döntő szerepet.

2.3.2. A kórfolyamathoz kapcsolt (PR) fehérjék jellemzése

Számos növényfajban megfigyelték, hogy a mikrobiális fertőzések tüneteinek megjelenésével párhuzamosan új fehérjék is megjelennek a fertőzött szövetekben, amelyeket a gazdanövény génjei kódolnak. Ezt a jelenséget először TMV-vel fertőzött hiperszenzitíven reagáló, rezisztens dohánylevelekben figyelték meg (van Loon és van Kammen 1970, Gianinazzi és mtsai. 1970). A kezdetben felismert vírus-indukálható fehérjéket alacsony pH-jú kivonópufferekkel lehetett jól kivonni a fertőzött levelekből. Később számos gomba- és baktérium-fertőzött növényi szövetekben is kimutattak ilyen

indukálható fehérjéket, amelyeket kórfolyamathoz kapcsolt (PR, pathogenesis-related) fehérjéknek neveztek el (Bol és mtsai. 1990, Van Loon és Van Strien 1999). Ezeket jelenleg 17 fehérjecsaládba sorolják (van Loon és mtsai. 2006). Szűkebb értelmezés szerint a PR-fehérjék nem mutathatóak ki fertőzésmentes növényekben, míg egyes kutatók fertőzések nélkül is kimutatható, de a fertőzések hatására indukálódó növényi fehérjéket (pl. a peroxidáz és fenilalanin-ammónia-liáz enzimeket) is PR-fehérjeként tartanak számon. A PR-fehérjék nemcsak a fertőzés helyén lokálisan, de az egész növényben szisztemikusan is indukálódhatnak, és feltételezhetően szerepet játszanak a szisztemikus szerzett rezisztencia (SAR, systemic acquired resistance) kialakulásában (van Loon és mtsai. 2006). A PR-fehérjék kódoló génjeinek a fertőzések hatására történő indukcióját számos vizsgálat kimutatta (Ward és mtsai. 1991, van Loon és mtsai. 2006).

A PR-1 fehérjecsalád tagjainak pontos funkciója nem ismert, de ennek ellenére gyakran vizsgálják a mennyiségüket, mivel hasznos rezisztencia-markerek, az inkompatibilis növény-kórokozó kapcsolatokban gyorsan és erőteljesen indukálódnak, míg a kompatibilis kapcsolatokban nem vagy csak kis mértékben indukálhatóak (Van Loon és Van Strien 1999). Más PR-fehérje család tagjai esetében gyakran kimutattak antimikrobiális aktivitást, amely arra utal, hogy ezek a fehérjék valóban részt vesznek a mikrobiális kórokozóval szembeni védekezésben. Az antimikrobiális hatás ezeknek a fehérjéknek a sejtfalbontó (kitináz illetve β -1,3-glükánáz) enzimaktivitása, RNS lebontó enzimaktivitása vagy direkt toxikussága következtében léphet fel. A PR-fehérjék általában jól indukálhatóak növényi védekezési hormonokkal, így szalicilsavval, jázmonsavval és etilénnel (Ward és mtsai. 1991, Yalpani és mtsai. 1991, Dong 1998). Fontos megjegyezni, hogy számos PR-fehérje mennyisége nemcsak fertőzések, de abiotikus stresszhatások, sebzés illetve öregedés (szeneszcencia) hatására is megemelkedhet a növényi szövetekben (van Loon és mtsai. 2006).

A paprika szövetekben is számos PR-fehérje illetve -kódoló gén aktiválódik fertőzés hatására. Egy bázikus PR-1 fehérjét kódoló gén indukcióját mutatták ki *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal fertőzött levelekben (inkompatibilis kölcsönhatás). Az etilén fontos szerepet játszott ebben az indukcióban (Kim és Hwang 2000). A paprika CaPR-4 fehérje kódoló génjét jelentősen indukálta az inkompatibilis TMV-P₀ törzzsel végzett fertőzés mind lokálisan, mind szisztemikusan. A gén jelentősen indukálódott metil-jazmonát, etilén és sebzés hatására is (Park és mtsai.

2001). A ribonukleáz aktivitást mutató CaPR-10 fehérjét kódoló gén expressziója fokozódott inkompatibilitást (rezisztenciát) eredményező TMV-P₀ fertőzés következtében. A fertőzés hatására a CaPR-10 fehérje foszforilálódott, ami valószínűleg módosítja az RNáz aktivitását (Park és mtsai. 2004). A PR fehérjék átfogó proteomikai elemzését is elvégezték kompatibilis és inkompatibilis PMMoV törzsekkel fertőzött, L³ rezisztenciagént tartalmazó *Capsicum chinense* növényekben. Az inkompatibilis kapcsolatban három PR fehérje indukálódott specifikus módon: egy bázikus PR-1 izoforma, egy savas jellegű β -1,3-glükanáz, és egy PR-5 (ozmotin-szerű) fehérje (Elvira és mtsai. 2008). A PR-gének expressziójának a szabályozását vizsgálva kimutatták, hogy a TMV-indukált *C. annuum* PR-gének indukciójában fontos szerepet játszik a CaBtf3 transzkripció faktor (Huh és mtsai. 2012).

2.3.3. A lipoxigenázok szerepe fertőzött növényekben

A lipoxigenázok (LOX) nem-hem vasat tartalmazó dioxigenáz enzimek, amelyek katalizálják a többszörösen telítetlen zsírsavak, leggyakrabban a linolsav és α -linolénsav peroxidációját molekuláris oxigén felhasználásával. A növényi fejlődésben és a stressz válaszokban különböző funkciót töltenek be (Siedow 1991, Porta és Rocha-Sosa 2002, Andreou és Feussner 2009). A magasabb rendű növényekben a LOX-okat kis géncsaládok kódolják. Az *Arabidopsis thaliana*, rizs, szőlő és uborka genomjában 6, 14, 18, illetve 23 LOX gént azonosítottak (Bannenberg és mtsai. 2009, Podolyan és mtsai. 2010, Liu és mtsai. 2011, Umate 2011). A növényi LOX izoenzimek általában két csoportra oszthatók, a 9-lipoxigenázokra (9-LOX, E.C. 1.13.11.58) és a 13-lipoxigenázokra (13-LOX, E.C. 1.13.11.12). A lipoxigenázok által katalizált reakciók terméke 9- vagy 13- zsírsav-hidroperoxid is lehet, attól függően, hogy 9- vagy 13-LOX katalizálta a reakciót (Siedow 1991). A 9- és 13-zsírsav-hidroperoxidokat legalább hét különböző növényi enzimcsalád alakíthatja tovább igen különböző szekezetű vegyületekké. Ezeket a zsírsav eredetű metabolitokat együttesen oxilipineknek nevezzük, a legismertebb közülük a jázmonsav, a hidroxizsírsavak, divinil-éterek és az illékony C₆ molekulatöredékek (La Camera és mtsai. 2004, Mosblech és mtsai. 2009). Számos LOX-eredetű oxilipin antimikrobiális vagy jelátviteli funkciókat lát el baktérium- és gombakórokozókkal fertőzött növényekben (Prost és mtsai. 2005, Mosblech és mtsai. 2009).

Kimutatták, hogy a LOX enzimek lényeges szerepet játszanak különféle mikrobiális kórokozókkal szembeni növényi védekezési reakciókban (Slusarenko 1996, Rancé és mtsai. 1998, Kolomiets és mtsai. 2000, Göbel és mtsai. 2001, Mène-Saffrané és mtsai. 2003, Hwang és Hwang 2010). A LOX-ok két védelmi funkciója már jól ismert: a) hozzájárulnak a hiperszenzitív sejtelhaláshoz és b) részt vesznek a biológiailag aktív oxilipinek bioszintézisében. A hiperszenzitív reakció jellemzői a jelentős zsírsav-hidroperoxid termelődés mellett a tipikus szöveti kiszáradás (Jalloul és mtsai. 2002, Montillet és mtsai. 2002).

Kevés adat áll rendelkezésünkre a LOX-ok és az oxilipinek szerepéről a vírussal fertőzött növényekben. A TMV fertőzés a mikroszomális foszfolipid-kötött zsírsavak gyors telítődéséhez, a LOX aktivitás növekedéséhez (Ruzicska és mtsai. 1983) valamint a divinil-éterek akkumulációjához vezetett (Weber és mtsai. 1999) dohánylevelekben. Kimutatták a 9-LOX által termelt zsírsav-hidroperoxidokat a TMV-vel fertőzött dohánylevelekben hőmérséklet-eltolási módszerrel (Montillet és mtsai. 2002). A LOX enzimaktivitás TMV-fertőzés által okozott jelentős megemelkedése gyorsabb és robusztusabb volt a rezisztens Xanthi-nc dohánylevelekben, mint a fogékony Samsun-nn fajtában (Künstler és mtsai. 2007). Az Uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) fertőzés öt *LOX* gén expressziójának fokozódásához vezetett *Arabidopsis thaliana* levelekben. Ezen kívül, a CMV fertőzés fokozta két, a jázmonsav bioszintézisben szerepet játszó gén kifejeződését is (La Camera és mtsai. 2009). A LOX aktivitás és az oxilipin anyagcsere elősegítette a szisztémikus nekrotizist kompatibilis növény-vírus kapcsolatokban (García-Marcos és mtsai. 2013).

Az intracelluláris membránok a vírusfertőzött növényi sejtekben lényegesek a vírus RNS replikációhoz. A vírus RNS szintézis hatékonyságát nagyban befolyásolja a növényi sejt belső membránjainak lipid összetétele, különösen a többszörösen telítetlen zsírsavak mennyisége (Lee és mtsai. 2001). A pozitív egyszálú RNS-vírusok replikációja a membránhoz kötött RNS replikációs komplexekben történik. Ezek a replikációs komplexek kapcsolatba hozhatók különböző intracelluláris organellek membránjával, de egy vírus általában egy bizonyos membránra szelektív (Lee és mtsai. 2001, Ishibashi és mtsai. 2012). A pozitív egyszálú RNS vírusok jelentős változásokat idéznek elő a membránokban annak érdekében, hogy védett, ún. virális replikációs zsebeket hozzanak létre. A vírus által indukált membránstruktúrák szükségesek, hogy megvédjék a kettős

szálú vírus RNS (dsRNS) közttermékeket, melyek aktiválhatják a vírus-indukálta géncsendesítést. A folyamat során lényegesen megváltozik a membrán lipid kettős réteg szerkezete, beleértve mind a fehérje, mind alipid szerkezeti alegységeket. A lipidek szerkezete módosítható a poláris fej csoporton vagy az acil-csoport összetételében: a lánchosszban vagy a telítettségben (Stapleford és Miller 2010). A LOX enzimek képesek peroxidálni a szabad és membránhoz kötött telítetlen zsírsavakat is (Chechetkin és mtsai. 2011, Nakashima és mtsai. 2011).

2.3.4. Az oxilipinek szerepe fertőzött növényekben

A LOX-katalizált reakciókban keletkező zsírsav-hidroperoxidok enzimatis reakciókon keresztül különböző, biológiailag aktív vegyületekké alakulnak át növényekben. A két különböző szerkezeti izomer csoport, a 9-hidroperoxi-zsírsavak illetve a 13-hidroperoxi-zsírsavak különböző enzimatis reakciókban alakulnak tovább. Ezen reakciók termékei többek között a jázmonsav ill. előanyagai, különböző illékony, bioaktív aldehyd és alkohol vegyületek, a divinil-éterek, valamint a hidrox- és epoxi-zsírsavak. A különböző abiotikus és biotikus stresszhatásoknak kitett növényekben a stressz jellegétől és a növénytől függően egyes oxilipinek különösen nagy mennyiségben felhalmozódnak és jellegzetes oxilipin összetétel alakul ki (Feussner és Wasternack 2002). Az oxilipinek fontos szerepet játszanak a növényi védekezési reakciókban és a rezisztencia kialakulásában egyrészt szignál-vegyületként, másrészt direkt antimikrobiális aktivitásuk következtében (Prost és mtsai. 2005). A legismertebb 13-hidroperoxi-zsírsav származék a jázmonsav, amelynek szerepe a sebzési reakciókban és a fertőzött növényekben induló jelátviteli folyamatokban alaposan feltárt. A jázmonsav több lépcsős bioszintézisének első enzimatis lépését az 13-allénoxid-szintetáz (13-AOS) enzim katalizálja (Blée 1998, Feussner és Wasternack 2002). Az AOS enzimek a citokróm P-450 enzimcsaládba tartoznak (CYP74A alcsalád). A 13-AOS enzim által termelt allénoxidot az allénoxid-cikláz (AOC) alakítja át a gyűrűs szerkezetű 12-oxofitodiénsavvá (12-OPDA), amely még több enzimatis lépésben alakul át jázmonsavvá. A jázmonsav több prekuzora is biológiailag aktív, így a jázmonsav metilésztere, valamint néhány előanyaga (pl. a 12-OPDA is). A 9-allénoxid-szintetáz (9-AOS) enzimek a 9-hidroperoxi-zsírsavakból labilis allén-epoxidokat képeznek, amelyek

nem enzimatis módon egy a jázmonsavhoz hasonló szerkezetű ciklopentenon jellegű molekulává, valamint ketol-származékokká alakulnak át. Ezeknek a vegyületeknek a szerepe növény-kórokozó kölcsönhatásokban nem ismert (Howe és Schillmiller 2002).

A jázmonsav mellett fontos oxilipin származékok a hidroperoxid-liázok (HPL) által katalizált reakcióban keletkező illékony töredékmolekulák. A 13-HPL enzimek a 13-hidroperoxi-zsírsavakat 6 szénatomos (C₆) aldehidekre és 12 szénatomos (C₁₂) oxosavakra hasítják (Blée 1998, Howe és Schillmiller 2002). Ezek a HPL enzimek az AOS enzimekhez hasonlóan a citokróm P-450 családba tartoznak (CYP74B alcsalád) (Feussner és Wasternack 2002). A C₆ aldehidek és a belőlük keletkező alkoholok illékony anyagok, a zöld levelek, virágok és termések illatának fontos komponensei. Kimutatták, hogy számos illékony oxilipin antibakteriális hatású, pl. a 2-(E)-hexenál már alacsony koncentrációban erősen gátolja a baktériumok szaporodását (Prost és mtsai. 2005). A 9-HPL enzimek a 9-hidroperoxi-zsírsav láncokat hasítják, és így pl. linolénsavból (3Z),(6Z)-nonadienál és 9-oxo-nonánsav keletkezik (CYP74C alcsalád). Ezeknek a 9 szénatomos aldehyd vegyületeknek a szerepe növény-kórokozó kölcsönhatásokban nem ismert (Blée 1998, Howe és Schillmiller 2002).

Fontos antimikrobiális hatású oxilipinek a divinil-éterek, amelyek a 9-hidroperoxi-zsírsavakból képződnek a 9-divinil-éter szintetáz (9-DES) enzim katalizálta reakcióban. Ezek az enzimek is a citokróm P-450 családba tartoznak (CYP74D alcsalád) (Weber és mtsai. 1999, Itoh és Howe 2001, Feussner és Wasternack 2002). *Phytophthora infestans* fertőzés és *P. infestans* elicitor kezelés hatására divinil-éterek halmozódtak fel burgonya levelekben (Weber és mtsai. 1999, Göbel és mtsai. 2001), illetve egy 9-DES gén kifejeződése erősen megnövekedett (Stumpe és mtsai. 2001). A gombafertőzés mellett kimutatták a divinil-éterek felhalmozódását TMV-fertőzött rezisztens dohánylevelekben is (Weber és mtsai. 1999). A 13-DES enzimek a 13-hidroperoxi-zsírsavakból szintén divinil-étereket képeznek, amelyeknek a szerepe növény-kórokozó kölcsönhatásokban még feltáratlan (Howe és Schillmiller 2002).

A zsírsav-hidroperoxidok a fenti, fontosabb reakcióutakon kívül más, kevésbé ismert enzimeknek is a szubsztrátjai (Feussner és Wasternack 2002). Így a *P. infestans* elicitorral kezelt burgonya sejtekben kimutatták a 9-hidroperoxi-zsírsavak trihidroxiszármazékainak a felhalmozódását is, amelyek antifungális hatásúak. A trihidroxiszármazékok keletkezését az epoxi-alkohol szintetáz enzim katalizálja (Göbel és mtsai.

2001, Howe és Schillmiller 2002). A glutation S-transzferáz (GST) enzim által katalizált redukció során a toxikus zsírsav-hidroperoxidokból a jóval kevésbé mérgező zsírsav-hidroxiidok keletkeznek. A reakció során a koszubsztrát redukált glutationból a glutation oxidált, diszulfid formája keletkezik (Bartling és mtsai. 1993). *P. infestans* elicitorral kezelt burgonya sejtekben kimutatták a 9-hidroxi-zsírsavak felhalmozódását (Göbel és mtsai. 2001).

Az oxilipinek szerepe kevésbé ismert a mikrobiális kórokozók által fertőzött paprikanövények védekezési reakcióiban. A *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal fertőzött, hiperszenzitiv reakcióval védekező paprika levelekben megemelkedett a C₆ aldehidek mennyisége, különösen a 2,4-hexadienál, az 1-hexanol és a 3-hexen-1-ol esetében (Buonaurio és Servili 1999). ObPV-fertőzött, rezisztens paprika levelekben igen erőteljesen indukálódott több *9-LOX* és a *9-DES* gén expressziója, míg a kompatibilis paprika-PMMoV kölcsönhatás során ezek a gének csak kismértékben aktiválódtak (Gullner és mtsai. 2010). Ugyanezekben a paprika-tobamovírus kölcsönhatásokban egy paprika *13-AOS* és egy *13-HPL* gén expressziója nem változott meg lényegesen egyik vírus esetében sem a fertőzött paprika levelekben a kontroll inokulált (mock-inokulált) levelekkel összehasonlítva (Gullner és mtsai. 2010).

2.3.5. A WRKY transzkripciós faktorok

Jelenleg ígéretes kutatási célpontok a növény-specifikus WRKY transzkripciós faktorok, mert részt vesznek a különböző kórokozó mikroorganizmusok elleni növényi védekezési reakciókban (Rushton és Somssich 1998, Eulgem és mtsai. 2000, Rushton és mtsai. 2010). Az első WRKY transzkripciós faktort édesburgonyából azonosították (Ishiguro és Nakamura 1994). A WRKY fehérjéket nagy (multi) géncsaládok kódolják növényekben. Az *Arabidopsis thaliana*, rizs, paradicsom és paprika genomjában 72, 102, 81 és 71 *WRKY* gént azonosítottak (Dong és mtsai. 2003, Wu és mtsai. 2005, Huang és mtsai. 2012, Kim és mtsai. 2014b, Diao és mtsai. 2016). A WRKY fehérjék jellegzetes és erősen konzervált szekvencia motívumokat tartalmaznak: a Trp-Arg-Lys-Tyr (WRKY) elemet a Cys₂-His₂ vagy Cys₂-HisCys cink-ujj motívum követi (ezek a motívumok együttesen alkotják a WRKY domént).

A WRKY fehérjéket három csoportba oszthatjuk a WRKY domének száma és a cink-ujj motívumok típusa szerint (Eulgem és mtsai. 2000). Az I. csoportba a két WRKY doménnel rendelkező fehérjék tartoznak. A legtöbb egy WRKY doménnel rendelkező fehérje a II. csoportba tartozik. Az I. és a II. csoportba tartozó fehérjék általában azonos típusú cink-ujj motívumot tartalmaznak, mely különbözik minden más típusú transzkripció faktorban található DNS kötésért felelős motívumtól. A III. csoport tagjainak WRKY doménjében a cink-ujjban általánosan előforduló Cys₂-His₂ motívumtól eltérően a Cys₂-HisCys motívum található (Pandey és Somssich 2009, Rushton és mtsai. 2010).

A fehérje C-terminálisán található WRKY domén biztosítja a DNS-hez történő kötődést, az N-terminális rész a kötődés affinitásáért és specifitásáért felel. Feltételezik, hogy az N-terminális bizonyos fehérje-fehérje kölcsönhatásokat is biztosít, ezzel erősítve a DNS kötés hatékonyságát más DNS-kötő fehérjékhez képest (Pandey és Somssich 2009, Rushton és mtsai. 2010). A cink-ujj motívum is részt vehet fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában (Eulgem és mtsai. 2000). A WRKY fehérjék leggyakrabban a sejtmagban lokalizáltak (Rushton és mtsai. 2010).

2.3.5.1. A WRKY transzkripció faktorok szerepe fertőzött növényekben

Egy átfogó elemzés kimutatta, hogy a 72 *AtWRKY* génből 49 gén kifejeződése szignifikáns módon megváltozott egy patogén baktériummal, a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avirulens törzsével fertőzött vagy szalicilsavval kezelt *Arabidopsis* növényekben (Dong és mtsai. 2003). Az utóbbi években számos laboratórium számolt be a WRKY transzkripció faktorok baktérium- és gomba patogénekkal szembeni védekezési reakciókban betöltött fontos szerepéről (Rushton és Somssich 1998, Eulgem és mtsai. 2000, Dong és mtsai. 2003, Rushton és mtsai. 2010). Egyedi *WRKY* géneket túltermelő transzgenikus növények gyakran mutatnak fokozott rezisztenciát bakteriális- és gombakórokozókkal szemben (Zheng és mtsai. 2007, Pandey és Somssich 2009, Meng és Wise 2012, Chen és mtsai. 2013b, Dang és mtsai. 2014).

A WRKY fehérjék specifikusan felismerik és kötődnek a célgén promóterében lévő W-box motívumhoz [szekvencia: (C/T)TGAC(C/T)] (Rushton és mtsai. 2010). Az először azonosított *WRKY* célgén promóter szekvenciák a kórfolyamathoz kapcsolt (PR) fehérjék

génjeihez tartoztak, beleértve a dohány I. osztály kitináz gént (*CHN50*) (Fukuda és Shinshi 1994) és a petrezselyem *PR-1* génjét (Rushton és mtsai. 1996). Később azt találták, hogy a WRKY-k közvetítik az *Arabidopsis NPR1* génjének szabályozását is (Yu és mtsai. 2001). Ez a gén alapvető szerepet játszik a szalicilsav által közvetített védekezési reakciókban (Dong 2004). A WRKY-k részt vesznek az etilén bioszintézisében is. *A. thaliana*-ban kimutatták, hogy a WRKY33 közvetlenül kötődik az *ACS2* és *ACS6* etilén bioszintézis gének promoterében lévő W-boxokhoz (Li és mtsai. 2012). Genomikai módszerekkel igazolták, hogy az *Arabidopsis* több WRKY faktora is fontos szabályozó szerepet játszik a szisztémikus szerzett rezisztencia kialakulásában (Wang és mtsai. 2006).

A WRKY-k közvetítenek az oxidációs stresszben és a fertőzött növények redox szabályozásban szerepet játszó gének expressziójában is. A paradicsomban kiváltott HR esetében megfigyelhető volt a célgének promoterében található WRKY-kötő W-boxok fokozott előfordulása, ami arra utal, hogy a WRKY-k a HR fontos szabályozó elemei (Etalo és mtsai. 2013). A baktérium-i módszerekkel igazolták, hogy az *Arabidopsis* ndukálható tioredoxin *TRXh5* gén expressziója megemelkedett a *WRKY6* gént túltermelő *Arabidopsis* növényekben (Laloi és mtsai. 2004). A gyapot *WRKY39* gén túltermeltetése *Nicotiana benthamiana*-ban megnövelte az oxidatív stresszel szembeni ellenállóképességet és az antioxidatív enzimek génjeinek (aszorbát-peroxidáz, kataláz, glutation-S-transzferáz és szuperoxid-diszmutáz) a transzkripcióját (Shi és mtsai. 2014). Több W-boxot azonosítottak a TMV-indukálható burgonya glutation S-transzferáz gén promoterében is (Martini és mtsai. 1993, Yang és Chen 2001). A WRKY-k részt vesznek a jázmonsav bioszintézis szabályozásában és a membrán lipidszerkezetét módosító reakciókban is (Rushton és mtsai. 2010).

A bakteriális és gomba kórokozókkal ellentétben sokkal kevesebbet tudunk a WRKY transzkripciós faktorok szerepéről és jelentőségéről a vírussal fertőzött növényekben (Chen és mtsai. 2013a). Egyes *WRKY* gének aktiválódását megvizsgálták TMV-fertőzött dohány növényekben (Yang és mtsai. 1999, Chen és Chen 2000, Liu és mtsai. 2004, van Verk és mtsai. 2008) és tobamovírussal fertőzött rezisztens paprikában (Park és mtsai. 2006, Oh és mtsai. 2008, Huh és mtsai. 2012).

2.3.5.2. A WRKY faktorok szerepe paprika-tobamovirus kölcsönhatásban

Az első paprika *WRKY* gént (*CaWRKY-a*) a *Capsicum annuum* Bugang fajtából izolálták RT-PCR (reverz transzkripció polimeráz láncreakció) módszerrel, degenerált primerek használatával, melyek a konzervált *WRKY* domént alkotó nukleotid motívumhoz kötődtek (Park és mtsai. 2006). A *CaWRKY-a* expressziója jelentősen megnövekedett TMV-P₀ fertőzött paprika levelekben 24 órával a fertőzést követően. Ez az inkompatibilis kölcsönhatás nekrotikus léziók megjelenéséhez vezetett az *L²* rezisztenciagén jelenlétének köszönhetően. Ezzel szemben, a *WRKY-a* transzkriptum nem volt kimutatható a fent említett paprika fajta és a TMV-P_{1,2} törzse között kialakuló kompatibilis kölcsönhatásban. A *CaWRKY-a* gyorsan aktiválódott exogén szalicilsav, etefon és metil-jazmonát kezelés hatására (2 órával a hormonkezelést követően). Elektroforetikus mobilitási kísérletek (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) kimutatták, hogy a rekombináns *WRKY-a* fehérje kötődik a TTGAC motívumot tartalmazó szintetikus oligonukleotidokhoz (Park és mtsai. 2006). Ezt a kötődést megszüntette a fémkelát képző EDTA, ami blokkolta a Zn ionokat, amelyek nélkülözhetetlenek a *WRKY* cink-ujj régió DNS kötéséhez (de Pater és mtsai. 1996). A *CaWRKY-a* fehérje a védekezési rendszer pozitív szabályozója, és kötődik a különböző *PR*-gének promotereiben található W-boxokhoz (Huh és mtsai. 2015).

A *CaWRKY-b* gén szintén indukálódott 12 órával a fertőzést követően a Bugang paprika fajta és a TMV P₀ patotipusa között kialakuló inkompatibilis kölcsönhatásban. A *CaWRKY-b* gyorsan aktiválódott szalicilsav hatására, míg az etefon és metil-jazmonát hatása elhanyagolható volt. A rekombináns *CaWRKY-b* fehérje kötődött a ribonukleáz kódoló, és feltételezhetően antivirális hatású *CaPR-10* promóterében található W-boxhoz (Park és mtsai. 2004). A *CaWRKY-b* gén csendesítése kevesebb lokális nekrotikus léziót, a *CaPR-1*, *CaPR-5* és *CaPR-10* gének csökkent expresszióját és a TMV megnövekedett akkumulációját okozta TMV-P₀ fertőzést követően. Ez a TMV-P₀-val szembeni sérült rezisztencia bizonyítja, hogy a *CaWRKY-b* a védelemhez kapcsolódó jelátviteli utak pozitív szabályozója paprikában (Lim és mtsai. 2011).

2.3.6. A védekezési gének redox szabályozása fertőzött növényekben

Számos fehérje funkciót és enzimaktivitását szabályozza az intracelluláris redox potenciál (Benoit és Auer 2011). A fertőzött növényekben lejátszódó védekezési folyamatok szabályozásában is nagy szerepet játszanak redox reakciók. A fertőzések hatására gyakran az oxigén részlegesen redukált, reaktív származékai halmozódnak fel, azaz oxidatív stressz zajlik le a fertőzött sejtekben, amelyek redox homeosztázisa ezáltal megváltozik. A fehérjék általában érzékenyek az oxidációra, különösen a cisztein és metionin aminosavak kénatomjai. A redox-szabályozásban így nagy szerepet játszanak a tiol vegyületek reaktív, könnyen oxidálódó szulfhidril (-SH) csoportjai (Winterbourn és Hampton 2008). Egyes oxidatív fehérje módosítások reverzibilisek, ami igen alkalmassá teszi ezeket a redox reakciókat a metabolikus folyamatok irányítására. Egy fontos ilyen reverzibilis folyamat az inter- és intramolekuláris diszulfid-hidak kialakulása fehérjékben (Cremers és Jakob 2013). Növényi szövetekben a kis molekulatömegű tripeptid glutation redukált (GSH) és oxidált (GSSG) formája is részt vesz redox típusú szabályozásban (Hacham és mtsai. 2014).

3. Célkitűzések

A munkánk alapvető célkitűzése az volt, hogy korszerű módszerekkel feltárjuk a paprika-tobamovírus kölcsönhatások során a fertőzött levelekben meginduló védekezési reakciókat, és ezen keresztül jobban megértsük a paprika vírus-rezisztenciájában szerepet játszó biokémiai folyamatokat. Ennek érdekében összehasonlítottuk egy kompatibilis és egy inkompatibilis paprika-tobamovírus kölcsönhatás során aktiválódó védekezési reakciókat. A vizsgálatokhoz egy paprika nemesítési vonalat és két tobamovírus törzset használtunk, hogy azonos genetikai háttér mellett tudjuk összehasonlítani a két különböző vírusfertőzés hatását. Ezeken a célkitűzéseken belül az irodalmi adatok és az intézeti előzetes eredmények alapján különösen két témakört vizsgáltunk, egyrészt a paprika lipoxigenáz (LOX) enzimek, másrészt a paprika WRKY-típusú transzkripciós faktor fehérjék szerepét a tobamovírusokkal szembeni ellenállóképességben. Ezeken a témakörökön belül elsősorban az alábbi kérdésekre kerestünk válaszokat:

Lipoxigenáz (LOX) témakör:

1. Hogyan replikálódik a két vizsgált tobamovírus a fertőzött paprika levelekben, illetve milyen mértékben indukálják az ismert rezisztencia-indikátor kórfolyamathoz-kapcsolt (PR) fehérjéket kódoló géneket?
2. Hogyan befolyásolja a két vizsgált tobamovírus a fertőzött paprika levelekben a különböző specifitású LOX izoenzimeket (9- és 13-LOX) kódoló *LOX* gének kifejeződését?
3. A legfontosabb növényi védekezési hormonok (szalicilsav, jázmonsav és etilén) hogyan befolyásolják a *LOX* gének expresszióját illetve, hogyan hatnak a LOX enzimaktivitásra?
4. Milyen mértékben változtatják meg a tobamovírus fertőzések a védekezési hormonok bioszintézisében szerepet játszó enzimeket kódoló gének aktivitását a fertőzött paprika levelekben?
5. Milyen szabályozó nukleotid motívumokat tartalmaznak a vizsgált paprika *LOX* gének promóter DNS szakaszai?

WRKY témakör:

6. Melyek azok a paprika *WRKY* gének, amelyek jelentősen indukálódnak az inkompatibilis paprika-tobamovírus kölcsönhatás során, míg az expressziójuk nem változik meg lényegesen a kompatibilis kölcsönhatás folyamán?
7. Hogyan hatnak a legfontosabb növényi védekezési hormonok az egyes *WRKY* gének expressziójára?
8. Milyen szabályozó nukleotid motívumokat tartalmaznak a vizsgált paprika *WRKY* gének promóter DNS szakaszai?
9. Egy kiválasztott *WRKY* gén tranziens túltermeltetése *Nicotiana benthamiana* tesztnövények leveleiben hogyan változtatja meg a Dohány mozaik vírus (TMV) fertőzés által okozott szisztémikus elhalást?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Növények és vírusok

Kísérleteinkhez a TL 1791 paprika (*Capsicum annum* L.) nemesítési vonalat használtuk, amely tartalmazza az L^3 rezisztenciagént. A paprika magokat Dr. Zatykó Lajostól kaptuk (Zöldségkutató Intézet, Budatétény). A magokat talajba ültettük, és a növényeket üvegházi körülmények között neveltük (18-23 °C; 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás; relatív páratartalom: 75-80 %), majd 55-65 napos korukban használtuk fel őket. A növények negyedik és ötödik valódi levelének egész felületét fertőztük az ObPV és PMMoV vírusszuszpenzióval. Konrollként kezeletlen és mock-fertőzött (vizes álfertőzés) növényeket is használtunk. Az ObPV-t Magyarországon (Csilléry és mtsai. 1983, Tóbiás és mtsai. 1982, 1989), míg a PMMoV-t Louisianában (Amerikai Egyesült Államok) izolálták (Greenleaf és mtsai. 1964, Tóbiás és mtsai. 1982, 1989). A fertőzésekhez (vírus inokulációhoz) karburundumot használtunk, amivel a levelek mechanikai sérülését fokoztuk. Minden kísérletben mock-inokulált (karburundummal és pufferral kezelt) leveleket használtunk kontrollként. A fertőzött és mock növényeket nevelőkamrában tartottuk 25 °C hőmérsékleten, 16/8 óra váltakozó fény/sötét megvilágítással.

További kísérletekhez *Nicotiana benthamiana* növényeket neveltünk üvegházi körülmények között hat hetes korukig. Ezeket a növényeket használtuk fel a paprika *WRKY2* gén tranziens kifejeztetésére (5.10.5. alfejezet). A transzgenikus és vad típusú növényeket TMV-vel fertőztük a harmadik, negyedik, ötödik karburundummal beszórt levélen. Minden esetben álfertőzést is végeztünk. A fertőzött és mock növényeket nevelőkamrában tartottuk 23 °C hőmérsékleten, 16/8 óra váltakozó fény/sötét megvilágítással.

4.2 Hidrogén-peroxid kimutatása diamino-benzidinnel

A levágott paprika leveleket 0,1 %-os 3,3'-diamino-benzidin oldattal telítettük vákuum segítségével, majd 3 órán át csapvízben inkubáltuk. Ezután szintelenítő oldattal mostuk a leveleket (etanol-kloroform 5:1, majd 0,15% triklórecetsav) egy éjszakán át, utána

friss szintelenítő oldattal mossuk további egy napig. Mosás után 50%-os glicerinenben fixáljuk a leveleket.

4.3. A lipoxigenáz enzimaktivitás mérése

A levél kivonatokat 0,5 g folyékony nitrogénben lefagyasztott és eldörzsölt paprika levélszövetből készítettük, melyet 2 ml 0,2 M citrát-foszfát extrakciós pufferben (pH=7,6) dörzsöltünk el, ami 0,5 % Triton-X detergenst és 1 % polivinil-pirrolidont tartalmazott. A szuszpenziót lecentrifugáltuk (10500 rpm, 15 perc, 4 °C), majd a felülúszót használtuk a mérésekhez. A spektrofotometriás enzimaktivitás mérést a már korábban leírtaknak megfelelően végeztük (Axelrod és mtsai. 1981). A méréseket két különböző pH értéken végeztük, 0,1 M citrát-foszfát pufferben (pH = 6,0) és 0,1 M bórsav-nátrium-tetraborát pufferben (pH = 9,0). A reakcióelegy 2,8 ml puffert, 120 µM linolsavat és 25 µl sejtmentes növényi kivonatot tartalmazott. Az extinkciót 234 nm-en monitoroztuk 3 percen keresztül. A kontroll méréseket linolsav nélkül végeztük.

4.4. Növények hormonkezelése

Kéthónapos paprika három középső levelét ecseteltük be 1 mM nátrium-szalicilát (NaSA), 1 mM metil-jazmonát (MeJA) és 5 mM 1-amino-ciklopropán-1-karboxilsav (ACC) oldattal. Kontrollként desztillált vizes kezelést alkalmaztunk. A kezelt és kontroll növényeket nevelőkamrában tartottuk 22 °C-on. A kezelést követő különböző időpontokban vettünk mintát RNS kivonás és LOX aktivitás mérés céljából.

4.5. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A növények negyedik, fertőzött leveléből, valamint a fertőzött zóna feletti, kezeletlen, szisztémikus levelekből fehérjét vontunk ki. Mintavétel a fertőzést követő 3., 6., 9., 15. és 20. napon történt. A levélszövetet (0,2 g) folyékony nitrogénben dörzsösmozsárban eldörzsöltük, majd 1 ml 1 M Tris-HCl pufferben (pH=6,8) szuszpendáltuk. A mintákhoz proteáz inhibitor koktélt adtunk (P9595, Sigma, St. Louis, MO, USA). A mintákat lecentrifugáltuk (13 000 rpm, 15 perc, 4 °C). A felülúszó 500 µl-es

aliquotjához azonos térfogatú mintapuffert (20% glicerin, 20% SDS, 2% merkaptóetanol) adtunk, vortexeltük, majd 95 °C-on 5 percig inkubáltuk. A fehérjetartalmat Bradford módszerrel határoztuk meg (Bradford 1976).

A fehérjéket molekulásúly szerint választottuk el egymástól denaturáló körülmények között. Az elektroforézishez függőleges elrendezésű omniPAGE mini (CVS10D, Cleaver, Rugby, UK) cellát és omniPAC MIDI (CS-300V, Cleaver, Rugby, UK) tápegységet használtunk. A futatást TRIS–glicin futtató pufferrel (144 g/l glicin, 30,3 g/l Tris, 0,1 % SDS, pH 8,8) végeztük. A gélek mérete 100 x 100 x 1 mm, mely 10 mm hosszú 5 %-os gyűjtő gélből, alatta pedig 12 %-os elválasztó gélből állt. A gélek összetétele az alábbi táblázatban látható.

	12 %-os elválasztó gél	5 %-os gyűjtő gél
desztillált víz	1,98 ml	2,04 ml
akrilamid (30%, 37,5:1)	2,4 ml	0,51 ml
Tris-HCl	1,5 ml (1,5M, pH 8,8)	0,375 ml (1 M, pH 6,8)
10% ammónium-perszulfát (APS)	60 µl	30 µl
10 % SDS	60 µl	30 µl
TEMED	2,4 µl	3 µl
végtérfogat:	6 ml	3 ml

Azonos fehérjekoncentrációjú mintákat vittünk fel a gélre, molekulásúly markernek ProSieve QuadColor protein markert (#00193837, Lonza, Bazel, Svájc) használtunk. A futtatást 30 percig 80 V feszültségen, majd 90-120 percig 120 V feszültségen végeztük.

Futtatás után a gélét fixáló oldatban (50 % metanol/10 % jégecet) áztattuk, majd festettük 0,1 % Coomassie R-250/40 % metanol/10 % jégecet összetételű oldattal. A gél színtelenítését 10 % metanol/7 % jégecet összetételű oldattal végeztük.

4.6. Vírus köpenyfehérje kimutatása Western blottal

A PAGE után a fehérjéket a gélből nitrocellulóz membránra (#162-0115, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) vittük át. Ehhez semi-dry blottolót (SD10, Cleaver, Rugby, UK) és omniPAC MIDI (CS-300V, Cleaver, Rugby, UK) tápegységet használtunk. A blottoló szendvicset a gyártó utasítási szerint készítettük el. A blottolás 10 V feszültséggel 120

percig tartott. A blotolást követően a membránt kétszer mostuk 5 percig desztillált vízzel. Az ObPV és PMMoV köpenyfehérje ellen nyúlban termeltetett elsődleges antitesteket Dr. Tóbiás Istvántól (ATK NÖVI) kaptuk. A fehérjék azonosítására kétféle módszert alkalmaztunk. Az első egy enzimátikus detektálás volt, amelynek során a membrán mosást követően blokkoló reagenssel (# 1 096 176, Roche, Bazel, Svájc) blokkoltuk a fehérjéket, kétszer 15 percig mostuk (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH = 7,5), az elsődleges ellenanyaggal 30 percig reagáltattuk, majd újabb mosási lépések következtek. A másodlagos ellenanyaggal (#170-6518, Goat Anti-Rabbit IgG-AP Conjugate, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 30 percig rázattuk, majd ismét mostuk. Az előhívást AP Conjugate Substrate Kittel (#170-6432, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) végeztük a gyártó utasításai szerint. A második eljárás során fluoreszcens fehérjedetektálást alkalmaztunk. A WesternDot 625 Goat Anti-Rabbit Western Blot Kit (#W10142, Life Technologies, Waltham, MA, USA) használatával a fehérjéket UV fényben detektáltuk. A kísérletet a gyártó utasításai szerint végeztük el.

4.7. Új paprika lipoxigenáz gének klónozása és szekvenálása

Új paprika *LOX* gének azonosításához nukleotid BLAST keresést végeztünk szója 13-*LOX* szekvenciával (GenBank J02795) a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) és a Gene Index Project (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi>) (Quackenbush és mtsai. 2001) paprika EST adatbázisban. A talált EST-eket *in silico* nagyobb tentatív konszenzus (TC) szekvenciákká alakítottuk. A TC szekvenciákat kísérletesen igazoltuk specifikus RT-PCR primer párok segítségével (F1. táblázat, Függelék), melyhez ObPV-fertőzött levelekből származó teljes RNS kivonatot használtunk. Az egymás után következő belső fragmenseket is amplifikáltuk specifikus primer párok használatával (F1. táblázat, Függelék). Egy másik módszerrel is azonosítottunk új géneket, erősen konzervált *LOX* nukleotid szegmensekre tervezett degenerált primereket (F1. táblázat, Függelék) használtunk. Az új *LOX* gén 3' végi szekvenciáját 3-RACE kittel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) azonosítottuk. A megfelelő méretű, előzőleg megtisztított PCR termékeket pGEM-T vektorba (Promega, Madison, WI, USA) vagy a CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, Vilnius, Litvánia) használatával pJET 1.2/blunt klónozó vektorba ligáltuk és kompetens *Escherichia coli* sejtekbe klónoztuk a szokásos módszerekkel. A PCR terméket tartalmazó

rekombináns plazmidokat High-Speed Plasmid Mini Kit-tel (Geneaid, Taipei, Taiwan) megtisztítottuk, majd szekvenáltattuk (Macrogen, Amsterdam, The Netherlands). Az új *LOX* szekvenciákat elhelyeztük a GenBank adatbázisban.

4.8. Génexpressziós (RT-PCR) vizsgálatok a vírusfertőzött paprika levelekben

A paprika levelekben zajló génexpressziós változásokat a reverz transzkripcióspolimeráz láncreakció (RT-PCR) módszerével vizsgáltuk. A vírusfertőzött és kontroll levelekből 100 mg-ot folyékony nitrogén segítségével dörzsmozsárban homogenizáltunk, majd az össz-RNS kivonást a Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, Sunnyvale, CA, USA) kit-tel végeztük el. A kivonást a készlethez mellékelt utasítás szerint végeztük. Az RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop (ND-1000) spektrofotométerrel ellenőriztük. A reverz transzkripció során 2,5 µg össz-RNS-ről cDNS-t írtunk át a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Litvánia) segítségével, a gyártó utasításai szerint. A reverz transzkripció során általában oligo (dT) primert használtunk, kivéve a vírus köpenyfehérje gének vizsgálatánál, ahol a köpenyfehérje génekre tervezett specifikus primer pár reverz primerét alkalmaztuk.

A PCR reakciókat egy ALS-1296 mintatartóval kiegészített PTC 200 DNA Engine (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) készülékkel végeztük el. A 20 µl térfogatú reakció elegy összetétele a következő volt: 0,5 U Taq-polimeráz (DreamTaq Green DNA Polymerase, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 2 µl reakció puffer (10X DreamTaq Buffer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 0,4 µl 10 mM dNTP keverék, 0,8 µl forward és reverz primer (5 µM), 1 µl templát cDNS, 14,9 µl RNáz mentes víz. A PCR program 3 perces denaturálási lépéssel indult, 94 °C-on. A denaturálást követően általában 25 ciklus következett, a következő hőmérsékleteken: 94 °C-on 45 másodperc, tapadási hőmérséklet (primer-függő) 45 másodperc, DNS szintézis 72 °C-on a PCR termék hosszától függő ideig (30-60 másodperc). A ciklusok végeztével a mintákat 10 percig 72 °C-on inkubáltuk, majd lehűtöttük. A szemikvantitatív PCR körülmények betartása miatt lehetőleg alacsony PCR ciklusszámot használtunk, hogy a vizsgált transzkriptumok kiindulási koncentrációinak aránya a különböző mintákban ne változzon jelentősen. A vizsgálatokkal párhuzamosan egy paprika aktin gén (GenBank AY572427) expresszióját is detektáltuk, mint konstitutív kontroll gént.

A PCR-t követően a reakciótermékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el egymástól. Az 1 %-os agaróz gél mérete 100 x 100 x 5 mm volt. Az elektroforézishez vízszintes elrendezésű MultiSUB Midi (Cleaver, Rugby, UK) cellát és omniPAC MIDI (CS-300V, Cleaver, Rugby, UK) tápegységet használtunk, az elválasztás 80-120 V feszültséggel történt. A PCR termékek megjelenítéséhez GelRed nukleinsav-festéket (Biotium, Hayward, CA, USA) használtunk.

4.9. A génexpressziós változások vizsgálata valós idejű RT-qPCR -rel

A génexpressziós változások számszerűsítéséhez valós idejű (real time) kvantitatív RT-PCR módszert használtunk. A mérésekhez a Kapa SYBR FAST qPCR Kitet (Kapa Biosystems) használtuk, a reakcióelegyeket a gyártó utasításai szerint állítottuk össze. A reverz transzkripció során szintetizált cDNS-eket 1: 10 arányban hígítottuk nukleáz mentes desztillált vízzel. A qPCR reakcióelegy 2,5 µl hígított paprika össz-cDNS-t, 0,75 - 0,75 µl 5 µM-os forward és reverz primer oldatot (F1. táblázat, Függelék), 3,5 µl desztillált vizet, valamint 7,5 µl iQ SYBR Green 2x Supermix elegyet (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) tartalmazott 15 µl végtérfogatban. Minden reakció esetében legalább három párhuzamos mérést végeztünk. A kvantitatív méréseket DNA Engine Opticon 2 (MJ Research, MA, USA) műszerrel végeztük. A reakció paraméterei a következők voltak: kezdeti denaturáció 95 °C-on 6 perc, majd 40 ciklusban 95 °C-os inkubáció 30 másodpercig, 50 °C-os inkubáció 30 másodpercig, majd 72 °C-os inkubáció 30 másodpercig, végül a SYBRGreen festék fluoreszcencia intenzitásának a mérése 84 °C-on 15 másodpercig. A PCR lefutását követően a termék specifikusságát olvadási görbe detektálásával ellenőriztük 55 °C-tól 90 °C-ig (0,2 °C 0,2 s⁻¹).

A PCR mérésekkel meghatározott CT értékekből kiszámítottuk az expresszió mértékét, az ún. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ módszerrel (Livak és Schmittgen 2001). Belső referenciának egy paprika aktin gént használtunk fel (GenBank AY572427).

4.10. Redox hatású vegyületek hatása a *WRKY* gének expressziójára

Megvizsgáltuk három paprika *WRKY* gén expressziós változásait redox hatású vegyületekkel történő kezelést követően. Kéthónapos paprikák leveleiből

levélkorongokat vágunk ki (átmérő: 12 mm), majd ezeket 10 mM hidrogén-peroxid, 2 mM L-2-oxo-4-thiazolidin-karboxilsav (OTC) és 1 mM GSH oldatok felszínére helyeztük Petri-csészékben. Kontroll kísérletben a levélkorongokat desztillált víz felszínére helyeztük. A kezelt és kontroll levélkorongokat állandó fényben inkubáltuk ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A levélkorongokból 6 és 24 óra után össz-RNS kivonást végeztünk, majd RT-PCR módszerrel, specifikus primer párok segítségével (F1. táblázat, Függelék) detektáltuk a gének transzkriptumainak mennyiségét.

4.11. A paprika *WRKY2* gént kifejező dohány vizsgálata

A paprika *WRKY2* gén funkciójának jobb megismeréséhez olyan tranziens módon transzformált *N. benthamiana* növényt hoztunk létre, mely ezt a gént fokozottan fejezi ki. Ehhez a Gateway rendszert alkalmaztuk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A Gateway rendszer lambda fág alapú helyspecifikus rekombinációt használ a szekvenciák átviteléhez olyan plazmidok között, melyek kompatibilis rekombinációs helyeket tartalmaznak (Earley és mtsai. 2006). A transzformált növények létrehozásának első lépéseként a *WRKY2* gén (GenBank: DQ402421) kódoló régióját (a stop kodonnal együtt) a specifikus *WRKY2*-OSP primer pár segítségével végzett PCR reakcióval felszorzoztuk, amelyhez templátként 5 mM nátrium-szaliciláttal kezelt paprika levelekből 2 nappal a kezelést követően készült cDNS-t használtunk:

WRKY2 5OSP: GGAGATAGAACCATGGCTGCTTCAAGTTTCTCAT

WRKY2 3 OSP: CCTCCGGATCCTCAGCAAAGCAATGACTCCATA

A PCR terméket 1%-os agaróz gélen elválasztottuk, megtisztítottuk, majd az így nyert DNS mintával újabb PCR reakciót hajtottunk végre egy olyan primer párral (3' és 5' uni attB1), amely specifikus adapter szekvenciákat tartalmazott, és ami ezért lehetővé tette azt, hogy a *WRKY2* gént egy expressziós vektorba építsük:

5 uni attB1: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATG

3 uni attB1: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCACCGCCTCCGGATC

A második PCR reakció termékét ismét 1%-os agaróz gélen választottuk el, megtisztítottuk. Így létrehoztuk az *attP* helyet hordozó WRKY2 szekvenciát, melyet az *attB* helyet tartalmazó Gateway pD0NR ZEO kiindulási vektorba ligáltuk a BP-reakció során (Earley et al. 2006). Ez a reakció az *attB* és *attP* helyek között zajlik. A reakciót a BP-klonáz enzim katalizálja, és létrejön a kiindulási vektor, mely a WRKY2-t és az *attL* helyet hordozta. Ebből a kiindulási vektorból a WRKY2 gént restriktív enzim hasítással az *attR* helyet tartalmazó pEarleyGate 100 vektorba klónoztuk az LR-reakció során. Az LR-reakció a kiindulási vektor *attL* helye és a cél vektor *attR* helye között történik, az LR-klonáz enzim katalizálja. Így létrejön az expressziós vektor. A sikeres klónozást követően a vektor plazmidot TOP10 *E. coli* törzsben felszaporítottuk. Az *E. coli* kolóniákban az M13 jelű primerpárral (F1. táblázat, Függelék) ellenőriztük a vektor felszaporodását, majd a vektort kiválasztott *E. coli* kolóniákból az *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsbe transzformáltuk elektroporációval. A baktériumban a WRKY2-OSP primerpárral ellenőriztük a transzgén jelenlétét. A WRKY2 gént tartalmazó vektort hordozó *A. tumefaciens* baktérium-szuszpenziót, valamint kontrollként az üres expressziós vektort hordozó *A. tumefaciens* szuszpenziót kifejlett *N. benthamiana* növények három középső levelébe injektáltuk (Vaghchhipawala et al. 2011). A növényeket nevelőkamrában tartottuk 23 °C hőmérsékleten, 16/8 óra váltakozó fény/sötét megvilágítással. A génexpressziós vizsgálatokhoz teljes RNS-t vontunk ki a transzformált levelekből 3, 4, 5, 6, 7 és 10 nappal a transzformációt követően. Külön kísérletekben a paprika WRKY2 génnel illetve az üres vektorral transzformált *N. benthamiana* dohánynövények három agroinfiltrált levelét TMV-vel inokuláltuk, majd adott időpontokban a levelekből össz-RNS kivonást végeztünk. Az össz-RNS minták segítségével különböző dohány gének expresszióját vizsgáltuk meg RT-PCR technika felhasználásával.

4.12. Bioinformatikai módszerek

A szekvencia kereséseket a National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank-jában és a Gene Index Project (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) (Quackenbush és mtsai. 2001) adatbázisaiban végeztük el. A szekvencia-hasonlósági kereséseket az NCBI adatbázis BLAST programjával végeztük el (Altschul és mtsai. 1997). A szekvencia egyeztetést és

összehasonlítást a ClustalW és Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa>) programokkal, míg a hasonlósági törzsfákat a MEGA6 programmal (Tamura és mtsai. 2013) készítettük el. A kloroplasztisz tranzit peptid (cTP) analíziseket a ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>) és TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) szoftverekkel végeztük (Emanuelsson és mtsai. 1999). A *cisz*-szabályozó elemek azonosítását a PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot és mtsai. 2002) és a PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) (Higo és mtsai. 1999) internetes adatbázisok segítségével végeztük el. A *9-LOX1*, *13-LOXa*, *9-LOXb*, *13-LOXc* és *9-LOXd* gének 1500 bp hosszúságú promóter szekvenciáit a közelmúltban megszekvenált paprika genom adatbázisok (Kim és mtsai. 2014b, Qin és mtsai. 2014) genomi DNS szekvenciáiból azonosítottuk (GenBank azonosítók: ASJU01043507, ASJU01002729, ASJV01087659, ASJU01002715, AYRZ01195616). A paprika *WRKY-a*, *WRKY2*, és *WRKY70* gének 1500 bp hosszúságú promóter szekvenciáit szintén a GenBank-ban található genomi DNS szekvenciákban azonosítottuk (GenBank azonosítók: ASJU01068120, ASJU01043977 és ASJU01022822). A promóter motívumok sematikus diagrammját az Illustrator for Biological Sequences (IBS) szoftverrel (Liu és mtsai. 2015) készítettük el.

4.13. Statisztikai módszerek

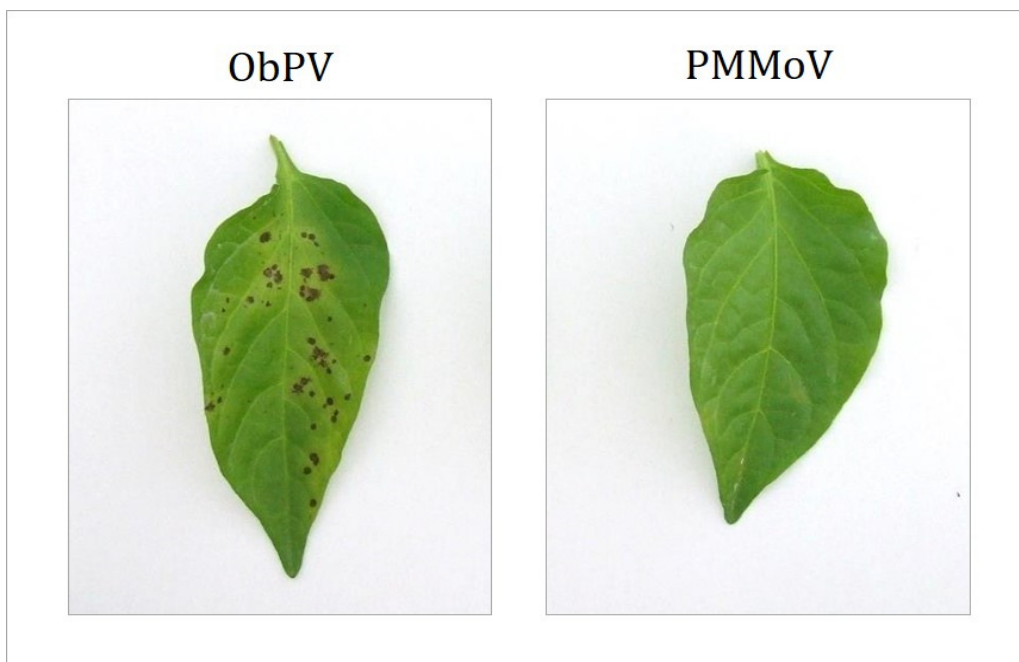
Minimum három biológiai ismétlés esetén végeztünk méréseket. A valós-idejű PCR ábrákon bemutatott értékek három független párhuzamos mérés eredményei voltak, a középértékeket Student-féle t-tesztel hasonlítottuk össze.

5. Eredmények

5.1. Az ObPV és PMMoV fertőzések tünetei

A kompatibilis és inkompatibilis növény-vírus kölcsönhatások összehasonlítására az *L³* rezisztenciagént hordozó TL 1791 paprika nemesítési vonalat mesterségesen fertőztük ObPV-vel (inkompatibilis kölcsönhatás) vagy PMMoV-vel (kompatibilis kölcsönhatás).

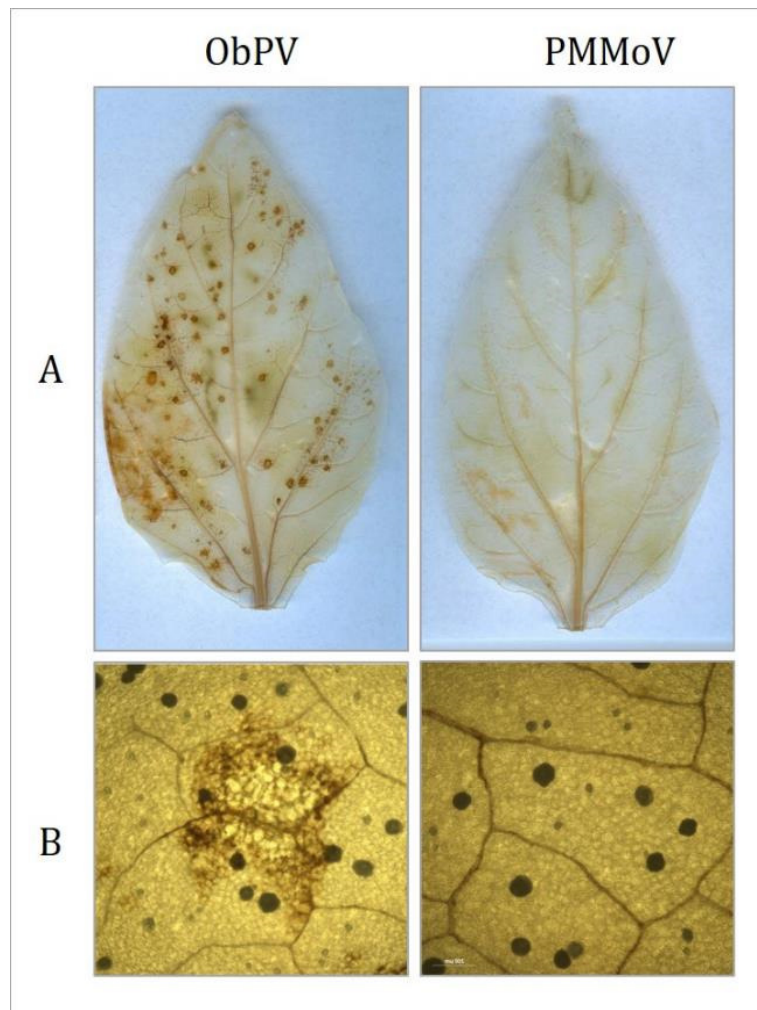
Az ObPV fertőzés hatására 3 nappal a fertőzést követően a leveleken nekrotikus léziók jelentek meg (3. ábra), mely megfelelt a korábban leírt eredményeknek (Csilléry és mtsai. 1983, Tóbiás és mtsai. 1989, Rys és mtsai. 2014). Hat-hét nappal a fertőzést követően a fertőzött levelek leestek a növényről. A PMMoV-fertőzött leveleken nem jelentek meg látható betegség-tünetek, vagy csak nagyon enyhe klorotikus foltok voltak megfigyelhetőek a korábbi megfigyeléseknek megfelelően (3. ábra) (Tóbiás és mtsai. 1989, Rys és mtsai. 2014).



3. ábra. Látható betegség-tünetek az ObPV és PMMoV fertőzött paprikaleveleken 5 nappal a fertőzést követően.

5.2. A hidrogén-peroxid kimutatása fertőzött levelekben

Számos növény-kórokozó kapcsolatban kimutatták a reaktív oxigén fajták (ROS) fokozott termelődését és felhalmozódását (Doke és Ohashi 1988, Allan és mtsai. 2001), így vírusfertőzött növényekben is (Hernández és mtsai. 2016). Az általunk vizsgált paprika-tobamovírus kapcsolatokban megvizsgáltuk a hidrogén-peroxid felhalmozódását. Az ObPV- és PMMoV-fertőzött levelekben a H_2O_2 felhalmozódását hisztokémiai festéssel mutattuk ki, amelyhez 3,3'-diamino-benzidint (DAB) használtunk.



4. ábra. Hidrogén-peroxid kimutatása 3,3'-diamino-benzidinnel (DAB) történő hisztokémiai festéssel az ObPV és PMMoV fertőzött paprika levelekben 3 nappal a fertőzést követően. A- szabadszemmel látható festődések, B- fénymikroszkóppal észlelt festődések (Zeiss Axioskop 2 plus).

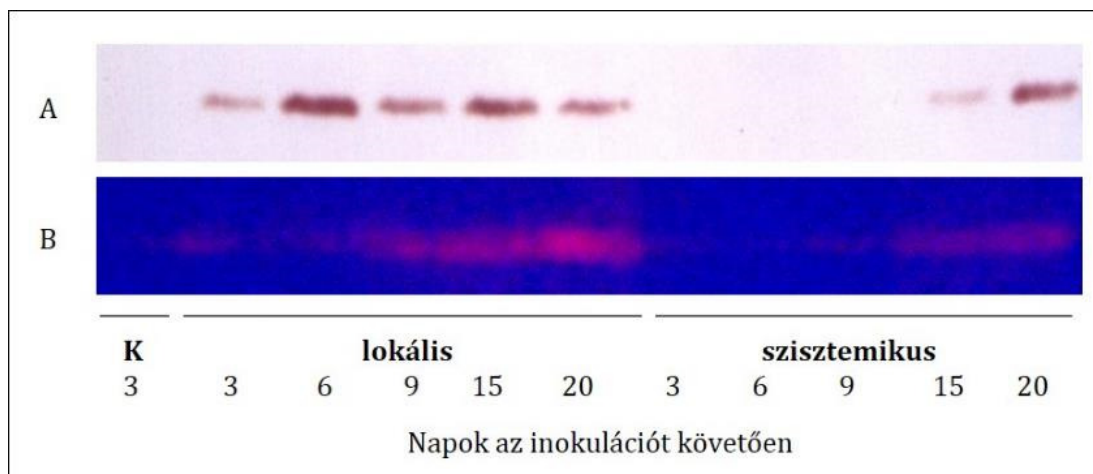
Ez a vegyület a H₂O₂-vel reagálva barna, oldhatatlan elszíneződést okoz a levélszövetekben, amely fénymikroszkóppal megfigyelhető (Ádám és mtsai. 1995).

Az ObPV fertőzött paprika levelekben erős festődést észleltünk 3 nappal a fertőzést követően (4. ábra). A kompatibilis PMMoV-paprika kapcsolatban nem volt megfigyelhető jelentős mennyiségű H₂O₂ felhalmozódása.

5.3. A PMMoV köpenyfehérje kimutatása Western blot módszerrel

A vírusfertőzés előrehaladásának mennyiségi jellemzésére először a vírus köpenyfehérje immunológiai kimutatását választottuk. A PMMoV köpenyfehérje felhalmozódását a fertőzött paprika levelekben Western blotolással követtük. A fertőzött levelekből össz-fehérje kivonást, majd a kivonatokkal fehérje gél-elektroforézist (PAGE) végeztünk. Az elektroforézist követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra blotoltuk, majd elsődleges és másodlagos antitesttel kezeltük. A PMMoV köpenyfehérje detektálására kétféle módszert is összehasonlítottunk. Az első esetben enzimátikus úton, egy alkalikus foszfatáz felhasználásával detektáltuk a PMMoV köpenyfehérjét. Ebben az esetben a köpenyfehérje a fertőzést követő harmadik naptól a kísérlet végéig, a 20. napig kimutatható az inokulált levélben (5. ábra). A fertőzött növények szisztemikus (felső, nem inokulált) leveleiben a fertőzést követő 15. naptól mutattuk ki a köpenyfehérje jelenlétét (5. ábra). A másik esetben a PMMoV köpenyfehérjét fluoreszcens festékekkel jelöltük. Ezzel a módszerrel a vírus felhalmozódás az inokulált levelekben hasonlóan detektálható, mint az enzimátikus detektálás esetén.

A szisztemikus fertőzött (nem inokulált) levelekben viszont érzékenyebbnek bizonyult a fluoreszcens jelölés, a köpenyfehérjét már 9 nappal a fertőzést követően sikerült kimutatni. A kísérlet végéig, a fertőzést követő 20. napig a PMMoV köpenyfehérje mennyisége növekedett az inokulált és szisztemikusan fertőzött levelekben is. Az ObPV köpenyfehérje immunológiai kimutatására szintén végeztünk kísérleteket, amelyek azonban eredménytelenek maradtak, feltehetően a rendelkezésre álló elsődleges antitest nem volt megfelelő.



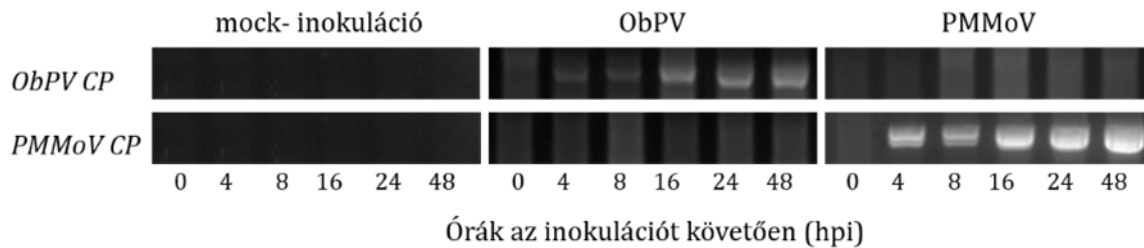
5. ábra. A PMMoV köpenyfehérje felhalmozódásának követése az alsó, inokulált (lokális) illetve a felső, nem inokulált (szisztemikus) paprika levelekben Western blot módszerrel és két különböző detektálással. A: enzimátikus detektálás, B: fluoreszcens detektálás.

5.4. A vírusreplikáció nyomon követése PCR módszerrel

Az ObPV és PMMoV replikációs sebességének nyomon követéséhez a virális köpenyfehérjéket kódoló gének expresszióját is megvizsgáltuk a fertőzött paprika levelekben. A fertőzött levelekből össz-RNS kivonást végeztünk, majd szemikvantitatív RT-PCR módszerrel, specifikus primer párok segítségével (F1. táblázat, Függelék) vizsgáltuk a gének kifejeződését. Az ObPV és PMMoV köpenyfehérjéket kódoló gének transzkripciója már 4 órával a fertőzést követően megfigyelhető volt, majd mindkét köpenyfehérje gén transzkriptumainak a mennyisége folyamatosan emelkedett a fertőzést követő 48 óráig (6. ábra).

Jól megfigyelhető volt az is, hogy a kompatibilis paprika-PMMoV kapcsolatban a PMMoV köpenyfehérje gén transzkriptumának mennyisége jelentősen nagyobb mértékben halmozódott fel, mint az inkompatibilis paprika-ObPV kölcsönhatásban az ObPV köpenyfehérje génterméke. A két vírus replikációja közötti különbség még jelentősebb, ha figyelembe vesszük, hogy a PCR ciklusok száma az ObPV vírus esetében 25, míg a PMMoV esetében csak 20 volt (6. ábra). Ezek az eredmények igazolták, hogy az ObPV csak jelentősen lassabban képes replikálódni az inokulált paprika levelekben, mint

a PMMoV, tehát a növény lényegesen nagyobb rezisztenciát mutat az ObPV-vel, mint a PMMoV-vel szemben.

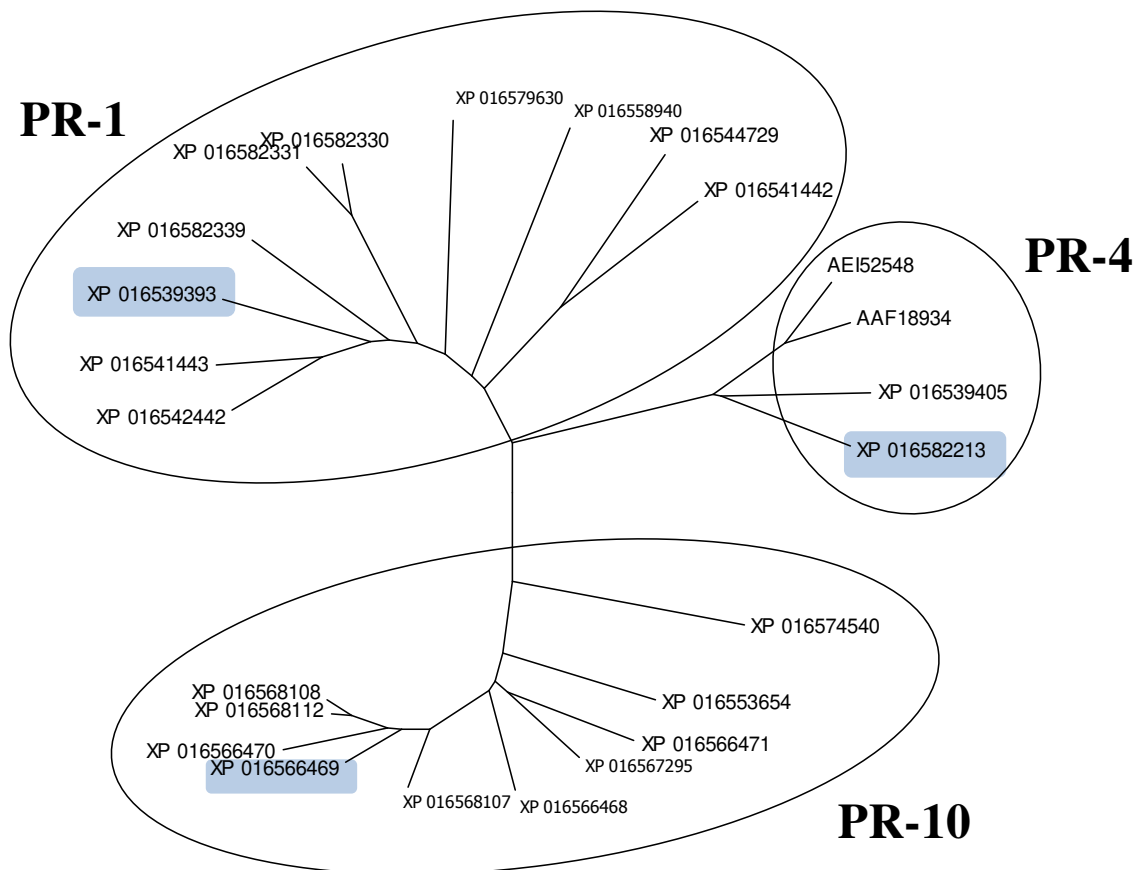


6. ábra. A vírusreplikáció nyomon követése az ObPV és PMMoV fertőzött paprika levelekben. A virális köpenyfehérjét (coat protein, CP) kódoló RNS mennyiségét szemi-quantitatív RT-PCR alkalmazásával detektáltuk. Specifikus primer párokat terveztünk mindkét vírus *CP* gén szekvenciáira (*ObPV-CP* és *PMMoV-CP*). A PCR vizsgálatokat 25 és 20 PCR ciklusszámmal végeztük az ObPV, illetve a PMMoV fertőzött, inokulált levelek esetében. A virális RNS-ek reverz transzkripciójához az oligoT primer helyett a *CP* gén specifikus primer párok reverz primereit használtuk fel. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

5. 5. A kórfolyamathoz kapcsolt (PR) fehérjéket kódoló gének kifejeződése

A növény-vírus kölcsönhatások jobb megismeréséhez jelentős információkat szolgáltat az ún. kórfolyamathoz kapcsolt (PR) fehérjéket kódoló gének expressziójának vizsgálata a vírusfertőzött növényekben (van Loon és mtsai. 2006). A teljes paprika genom közelmúltban történő megszekvenálása (Qin és mtsai. 2014) illetve a paprika gének azonosítása (annotálása) az NCBI GenBank-jában lehetővé tette, hogy azonosítsuk a vírusfertőzés szempontjából fontos *PR*-géneket. A korábbi irodalmi adatok alapján a PR-1, PR-4 és PR-10 fehérjék vizsgálata fontos információkat szolgáltatott a vírusfertőzött paprika növényekről (Kim és Hwang 2000, Park és mtsai. 2001 és 2004). Ezért az NCBI adatbázisában BLAST kereséssel azonosítottuk ezeket a paprika PR-fehérjéket kódoló géneket. A *PR*-gének által kódolt fehérje-szekvenciákat a Muscle programmal összehasonlítottuk, majd a ClustalW2-Phylogeny programmal szekvencia-hasonlósági törzsfát (dendogramot) állítottunk össze, amelyet MEGA6 programmal ábrázoltunk (7. ábra). A paprika genomban 10 *PR-1* gént, 4 *PR-4* gént és 10 *PR-10* gént azonosítottunk (7. ábra). Minden *PR* gén-csoportból 1 gént választottunk ki (7. ábra, kék színnel kiemelve) a korábbi irodalmi adatok alapján (Kim és Hwang 2000, Park és mtsai. 2001 és 2004),

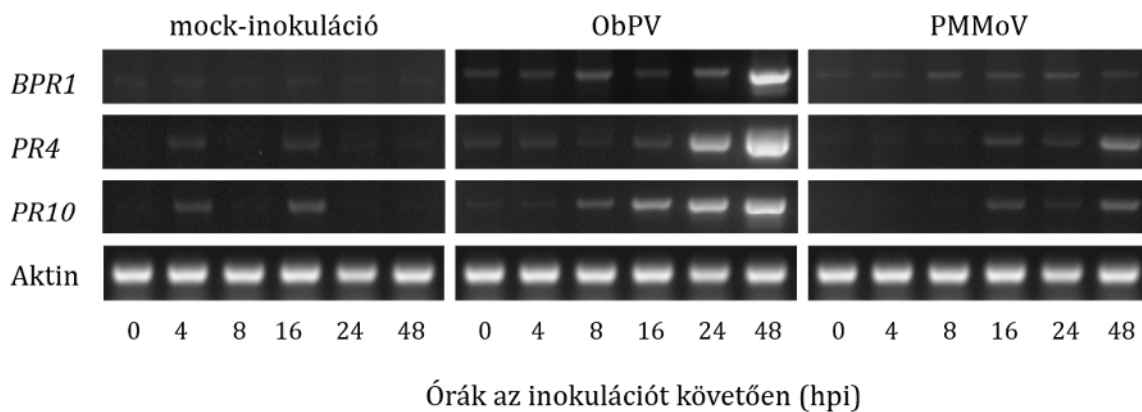
amelyekre specifikus primer párokat terveztünk (F1. táblázat, Függelék). Kiválasztottuk a patogén- és etilén-indukálható bázikus *PR-1* (*BPR-1*) gént (Kim és Hwang 2000), a TMV- P_0 indukálható *PR-4* gént (Park és mtsai. 2001) és a *PR-10* fehérjét kódoló gént, mely ribonukleáz aktivitást mutatott a TMV RNS-el szemben (Park és mtsai. 2004). A három gén által kódolt fehérjék GenBank-i azonosító számai sorrendben XP_016539393, XP_016582213 és XP_016566469 (7. ábra).



7. ábra. A paprika genomban található *PR-1*, *PR-4* és *PR-10* gének által kódolt fehérjék szekvenciáinak hasonlósági törzsfája. A fehérje szekvenciákat a GenBank-i azonosító számukkal jelöltük. Az ábrán kék színnel emeltük ki az értekezésben megvizsgált géneket.

Az ObPV és PMMoV-fertőzött paprika levelekből különböző időpontokban össz-RNS kivonást végeztünk, majd RT-PCR módszerrel vizsgáltuk meg a vírusfertőzések hatásait a három kiválasztott *PR* gén expressziójának a változásaira. Az ObPV fertőzés már korai időpontokban és igen jelentősen indukálta mindhárom vizsgált *PR* gén expresszióját (8. ábra). A leggyorsabb aktiválódás a *PR-10* gén esetén volt megfigyelhető, amely már 16

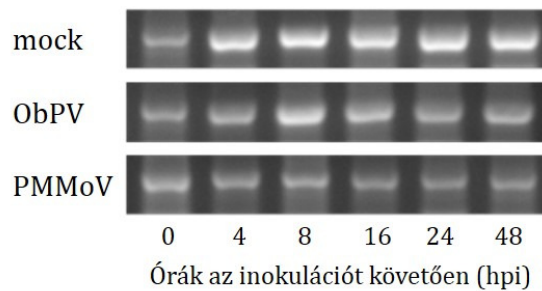
órával a fertőzést követően indukálódott, majd a gén-expresszió a fertőzést követő 48 óráig emelkedett. Az ObPV fertőzés a *PR-4* transzkriptumok igen nagymértékű felhalmozódásához vezetett 24 és 48 órával a fertőzést követően (8. ábra). A *BPR-1* gén esetén a transzkriptum mennyisége csak 48 órával az ObPV fertőzést követően növekedett meg jelentősen (8. ábra). A PMMoV és mock-fertőzés a vizsgált *PR* gének expresszióját csak elhanyagolható mértékben változtatta meg (8. ábra).



8. ábra. Három kórfolyamathoz kapcsolt (PR) fehérje kódoló géneinek a kifejeződése ObPV és PMMoV fertőzött (inokulált) paprika levelekben. A *BPR-1*, *PR-4* és *PR-10* génekre tervezett specifikus primer párokkal, szemi-quantitatív RT-PCR módszerrel detektáltuk a génexpressziós változásokat. Kontrollként mock-inokulált leveleket vizsgáltunk. Egy paprika aktin gén expresszióját is meghatároztuk konstitutív kontroll génként. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

A "klasszikus" PR fehérjék után megvizsgáltuk a szintén a kórfolyamathoz-kapcsolt fehérjék közé sorolható defenzin és tionin géneket kódoló gének expresszióját is. A magas cisztein (kén)-tartalmú defenzin és tionin fehérjék fontos szerepet töltenek be a gombákkal és baktériumokkal fertőzött növények védekezési reakcióiban (Broekaert és mtsai. 1995). Kevés ismeret áll viszont a rendelkezésünkre a vírusfertőzött növényekben betöltött szerepükről (Mitter és mtsai. 1998, Takahashi és mtsai. 2004, Kushwaha és mtsai. 2015). Ezért megvizsgáltuk egy defenzin és egy tionin fehérjét kódoló paprika gén expressziójának a változásait ObPV- és PMMoV-fertőzött paprikanövények leveleiben (GenBank AF442388 és AF112869). Érdekes módon az ObPV fertőzés hatására erőteljesen megemelkedett a defenzint kódoló gén expressziója már a fertőzést követő

igen korai időpontokban, míg a PMMoV fertőzés hatására csak egy jóval gyengébb és tranziens gén-aktiválódás volt megfigyelhető (9. ábra). A defenzin gén mellett a másik magas cisztein-tartalmú védekezési fehérjét, egy tionint kódoló gén expressziója is jelentősen megemelkedett az ObPV-, illetve a PMMoV-fertőzés hatására. A tionin gén esetében a génexpresszió mindkét vírusfertőzés esetében egyforma mértékben emelkedett meg a fertőzéseket követő 16. és 48. óra között, ami arra utalt, hogy ennek a génnek nincs szerepe a vírus-rezisztencia kialakulásában (nem mutatott eredmények).



9. ábra. Egy defenzin gén (GenBank AF442388) expressziójának aktiválódása ObPV és PMMoV-fertőzött (inokulált), illetve kontroll (mock-inokulált) paprikalevelekben, szemikvantitatív RT-PCR módszerrel vizsgálva. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

5.6. A lipoxigenázok (LOX) szerepe ObPV- és PMMoV-fertőzött paprikában

5.6.1. A paprika *LOX* géncsalád új tagjainak azonosítása

Ismert, hogy a magasabbrendű növényekben a *LOX* géneket kisebb géncsaládok kódolják (Feussner és Wasternack 2002, Gullner és mtsai. 2010). Kísérleteink kezdetekor csak egy paprika *LOX* gén (*9-CaLOX1*) volt megszekvenálva (GenBank FJ377708) (Hwang és Hwang, 2010), ezért először további paprika *LOX* gének azonosítását tűztük ki célul. A kezdeti kísérletekben nukleotid BLAST keresést végeztünk a GenBank és a The Gene Index Project (TGIP) expresszáldó szekvencia jel (expressed sequence tag, EST) adatbázisban a burgonya *9-LOX* és a szója *13-LOX* szekvenciák felhasználásával (GenBank U60202 és J02795). A nagyszámú EST szekvencia felhasználásával több lehetséges konszenzus (tentative consensus, TC) szekvenciát hoztunk létre *in silico*. Négy ilyen

hipotetikus konszenzus nukleotid szekvenciát igazoltunk kísérletesen RT-PCR-rel, specifikus primer párok segítségével (F1. táblázat, Függelék). Ilyen módon három paprika *LOX* gént teljes fehérje kódoló régiójának szekvenciáját, és egy további *LOX* gén részleges szekvenciáját meghatároztuk és a szekvenciákat a GenBankban elhelyeztük (GenBank JF304313, DQ473539, KC404864 és DQ473540).

Először egy új *13-LOX* gént klónoztunk, majd a MacroGen cég (Amsterdam, Hollandia) közreműködésével megszekvenáltattuk. A kapott 2816 bp hosszúságú cDNS egy nyílt leolvasási keretet tartalmazott, mely egy 898 aminosavból álló fehérjét kódol. Az új gént *CaLOX-a*-nak neveztük el (GenBank azonosító száma: JF304313). A *CaLOX-a* fehérje számított molekulatömege 101102 Dalton, elméleti pI értéke 5,92. A *CaLOX-a* nagyfokú hasonlóságot mutatott az ismert *13-LOX* enzimekkel. A protein BLAST keresés alapján a *CaLOX-a* a legnagyobb fokú azonosságot a burgonya kloroplasztikus *13-LOX*-szal (GenBank NP_001274843, 86% azonosság) és a *Nicotiana attenuata* *LOX2*-vel (AAP83137, 84% azonosság) mutatta. A *CaLOX-a* fehérjében megtalálhatók a tipikus *LOX* motívumok. A *CaLOX* szekvenciában az erősen konzerválódott, jellegzetes 38 aminosavból álló motívum, amely magában foglalja az 5 hisztidint (Steczko és mtsai. 1992) az 551-588. pozícióban található. A nem-hem vas atom kötéséért az 551., 561. és 748. pozícióban lévő hisztidinek, a 752. pozícióban lévő aszparagin és a 898. pozíciójú izoleucin játszik döntő szerepet (Minor és mtsai. 1996). A szerin-fenilalanin (SF) motívum a 613.-614. helyen jelzi a *CaLOX-a* enzim *13-LOX*-specifitását (Hornung és mtsai. 1999).

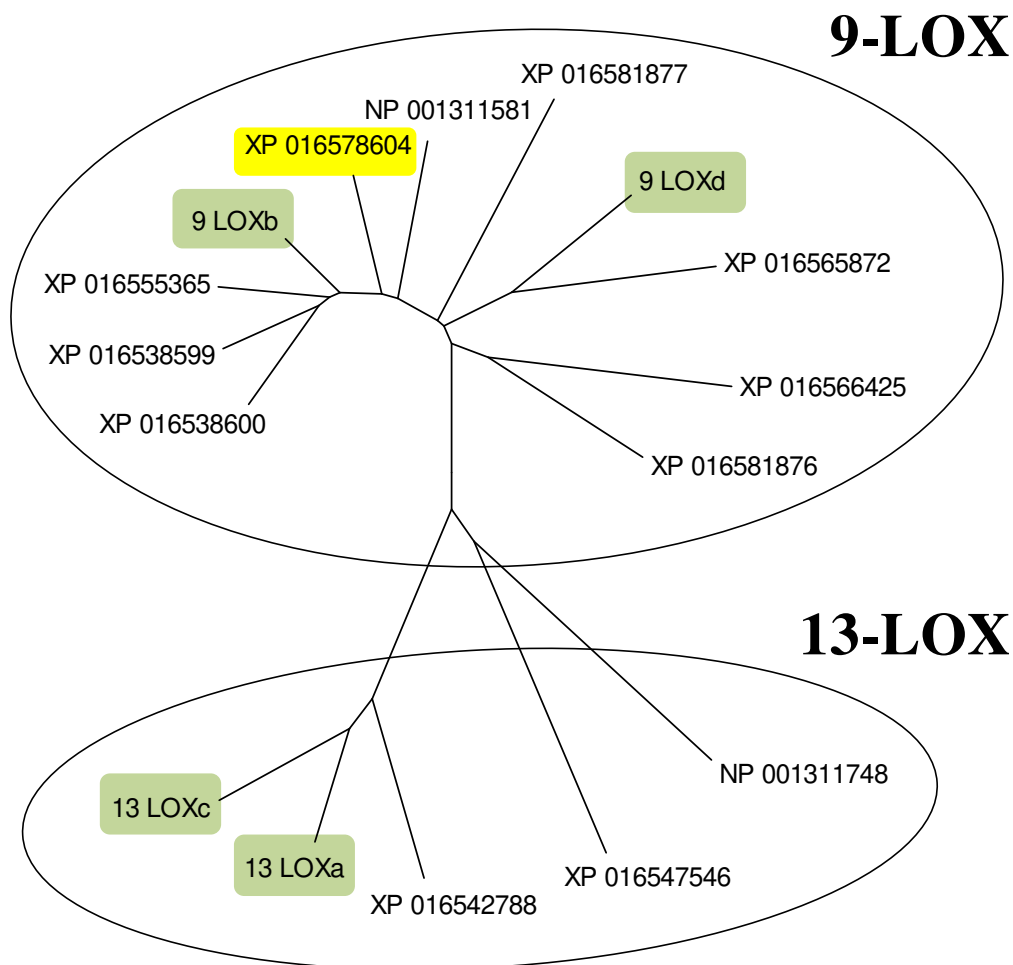
A kutatócsoportunk korábbi munkája során már azonosított és részlegesen megszekvenált két paprika *9-LOX* gént (Gullner és mtsai. 2010). A jelen munka során ezen két gén teljes fehérjekódoló szekvenciáját is meghatároztuk specifikus primer párok segítségével (F1. táblázat, Függelék). A specifikus primer párokat a paprika EST szekvenciák felhasználásával *in silico* összeállított konszenzus szekvenciák segítségével terveztük meg. A két teljesen megszekvenált paprika *9-LOX* gént *9-LOXb* és *9-LOXd*-nek neveztük el (GenBank DQ473539 és DQ473540).

Ezt követően egy másik paprika *13-LOX* gént is azonosítottunk a konzervatív *LOX* szekvencia-szakaszokra tervezett degenerált primerek segítségével (F1. táblázat, Függelék). Az így kapott részleges szekvenciát 3'-RACE módszerrel kiegészítettük a 3' irányban. A részleges *13-LOX* szekvenciát *13-LOXc*-nek neveztük el (GenBank KC404864). A teljes szekvenciát már nem kellett meghatároznunk, mivel a kísérleteink során

publikálták a paprika teljes transzkriptomának a szekvenálását (Ashrafi és mtsai. 2012), és így a gén teljes fehérje kódoló szekvenciája is elérhető volt (GenBank JW060937). A 13-*LOXc* teljes leolvasási kerete 2724 bp hosszúságú volt, amely egy 907 aminosav hosszúságú, 103 kD tömegű 13-*LOX* fehérjét kódolt, amelynek az elméleti pI értéke 6,00 volt. A 13-*LOXc* fehérje a legnagyobb, 83%-os szekvencia homológiát a burgonya kloroplasztiszban található 13-*LOX*-szal (GenBank XP_006354212) mutatta, de 79% hasonlóságot mutatott a *N. attenuata* *LOX2* szekvenciájával is. A 13-*LOXc* fehérje szekvencia tartalmazta a *LOX* fehérjékben igen konzervált 38 aminosav hosszúságú és 5 hisztidint tartalmazó motívumot (560-597. aminosavak), a nem-hem vas kötésében szerepet játszó tipikus aminosavakat (560, 570, 757, 761 és 907. aminosavak) és a 13-*LOX* specifitásra utaló SF aminosav motívumot is (622-623. aminosavak) (Hornung és mtsai. 1999).

Az általunk teljesen, ill. részben megszekvenált négy *LOX* gén által kódolt fehérjék sejten belüli elhelyezkedésének valószínűsítéséhez a világhálón elérhető ChloroP 1.1 és TargetP 1.1 programokat használtuk (lásd Anyagok és módszerek). Ezek a számítógépes predikciók azt mutatták, hogy a 13-*LOXa* és 13-*LOXc* fehérje szekvenciák a kloroplasztiszba irányító, N-terminális tranzit-peptideket tartalmaznak, és így feltehetően a kloroplasztiszokban lokalizálódnak. A két 9-*LOX* fehérje viszont a számítógépes predikció szerint a citoszólban helyezkedik el.

A kutatómunkánk ideje alatt két kutatócsoport is meghatározta független módon a paprika teljes genomszekvenciáját (Kim és mtsai. 2014b, Qin és mtsai. 2014), így a *LOX* szekvenciák is ismerté váltak. Az NCBI GenBank-jában jelenleg 16 fehérje-kódoló *LOX* gén található. Ezek mellett 7 *LOX* pszeudo-gén is megtalálható az adatbázisban. A 16 fehérje-kódoló gén által kódolt *LOX* fehérje szekvenciáját Muscle programmal összehasonlítottuk, majd a ClustalW2-Phylogeny programmal szekvencia-hasonlósági törzsfát (dendogramot) állítottunk össze, amelyet MEGA6 programmal ábrázoltunk (10. ábra). A szekvencia összehasonlítások szerint két jól elkülönülő csoportba sorolhatóak a paprika *LOX* fehérjék, amelyekből 11 darab 9-*LOX*, míg 5 darab 13-*LOX* specifitást mutatott a szekvencia-hasonlóságok alapján. A törzsfán zöld színnel kiemeltük az általunk megszekvenált *LOX* gének által kódolt fehérjéket.



10. ábra. A paprika genomában található lipoxigenáz (*LOX*) gének által kódolt fehérjék szekvenciáinak összehasonlító törzsfája. A *LOX* fehérjét az NCBI GenBank-jának azonosító számaival jelöltük, kivéve az általunk megszekvenált és elnevezett négy *LOX* fehérjét, amelyeket zöld színnel emeltünk ki. Az általunk részletesen vizsgált, de korábban már megszekvenált, 9-*LOX* fehérjét kódoló gént (Hwang és Hwang 2010) sárga színnel jelöltük. A *LOXa*, *LOXb*, *LOXc* és *LOXd* fehérjék GenBank-i azonosító számai sorrendben: ADZ73653, ABF19102, AGH61344 és ABF19103.

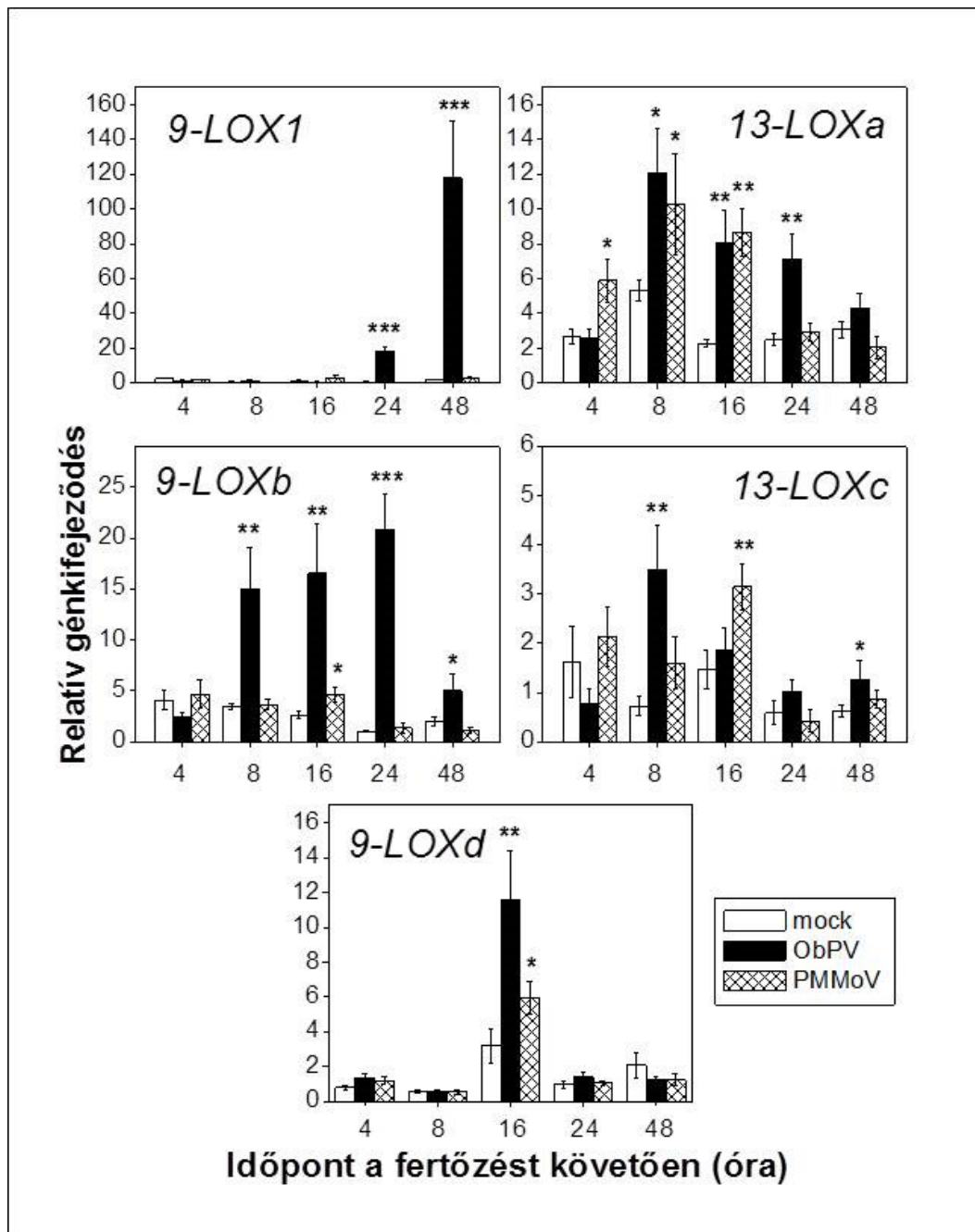
5.6.2. A *LOX* gének aktiválódása ObPV és PMMoV fertőzött levelekben

A kutatócsoportunk korábban már kimutatta három paprika 9-*LOX* gén aktivációját ObPV fertőzött levelekben szemikvantitatív RT-PCR segítségével (Gullner és mtsai. 2010). Jelen vizsgálataink során öt *LOX* gén expressziójának a változásait vizsgáltuk meg az ObPV és PMMoV fertőzött paprika levelekben (10. ábra). A vizsgálatokhoz kiválasztott öt paprika *LOX* gén a következő volt: 9-*LOX1* (GenBank FJ377708), 13-*LOXa*

(JF304313), *9-LOXb* (DQ473539), *13-LOXc* (KC404864) és *9-LOXd* (DQ473540). Ezek között szerepel az általunk teljesen vagy részben megszekvenált négy *LOX* gén (GenBank JF304313, DQ473539, KC404864 és DQ473540). A *9-LOX1* gént (GenBank FJ377708) már korábban megszekvenálták (Hwang és Hwang 2010). Az öt kiválasztott *LOX* gén expressziójának vizsgálatához minden génre specifikus primer párokat terveztünk (F1. táblázat, Függelék). Mivel a *LOX* gének fehérje-kódoló régióinak a szekvenciái gyakran igen hasonlóak, a primertervezés során olyan reverz primereket választottunk ki, amelyek a *LOX* cDNS kevésbé konzervatív, 3' át nem íródó régiójához (UTR) tapadnak, hogy ezzel is növeljük a primerek specificitását.

Az ObPV és PMMoV fertőzött valamint mock-inokulált levelekből össz-RNS kivonást végeztünk a fertőzést követő különböző korai időpontokban (4-48 órával a fertőzést követően) és az öt kiválasztott *LOX* gén kifejeződésének a változásait valósidejű RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk. Konstitutív kontroll génként egy paprika aktin gén (GenBank AY572427) expresszióját is mértük a *LOX* génekkel párhuzamosan.

Az ObPV fertőzés mind az öt *LOX* gént aktiválta, de az aktiválódás mértéke és annak időbeli alakulása nagymértékben különbözött az egyes gének között. A *9-LOX1* gén expressziója 24 órával a fertőzést követően kezdett növekedni, majd 48 órával a fertőzést követően már 118-szoros indukciót mértünk (11. ábra). A *13-LOXa* és a *13-LOXc* gének esetén 8 órával a fertőzést követően 12-, ill. 3,5-szeres növekedést tapasztaltunk, de a későbbi időpontokban a génexpresszió mindkét gén esetében lecsökkent (11. ábra). A *9-LOXb* gén expressziója szintén gyorsan és erősen indukálódott, és 8 órával a fertőzést követően 15-szörös növekedés volt tapasztalható, majd a génexpresszió tovább emelkedett a fertőzést követő 24. óráig. Ezzel ellentétben a *9-LOXd* gén expressziója 16 órával a fertőzést követően csak átmenetileg emelkedett meg (11. ábra). A PMMoV fertőzés nem változtatta meg jelentősen a *9-LOX1* expresszióját. A *9-LOXb* és *9-LOXd* gének esetében a PMMoV fertőzés sokkal gyengébb aktivációt okozott, mint az ObPV (11. ábra). A *13-LOXa* és *13-LOXc* gének esetében az expresszió alapvetően nem különbözött az ObPV és PMMoV fertőzött mintákban (11. ábra). Azonban a *13-LOXc* expressziójának időprofilja eltér az ObPV és a PMMoV fertőzések között. Az ObPV fertőzés esetén átmeneti expresszió fokozódás tapasztalható 8 órával a fertőzést követően, míg a PMMoV fertőzött levelekben egy hasonló átmeneti emelkedés csak 8 órával később figyelhető meg (11. ábra).

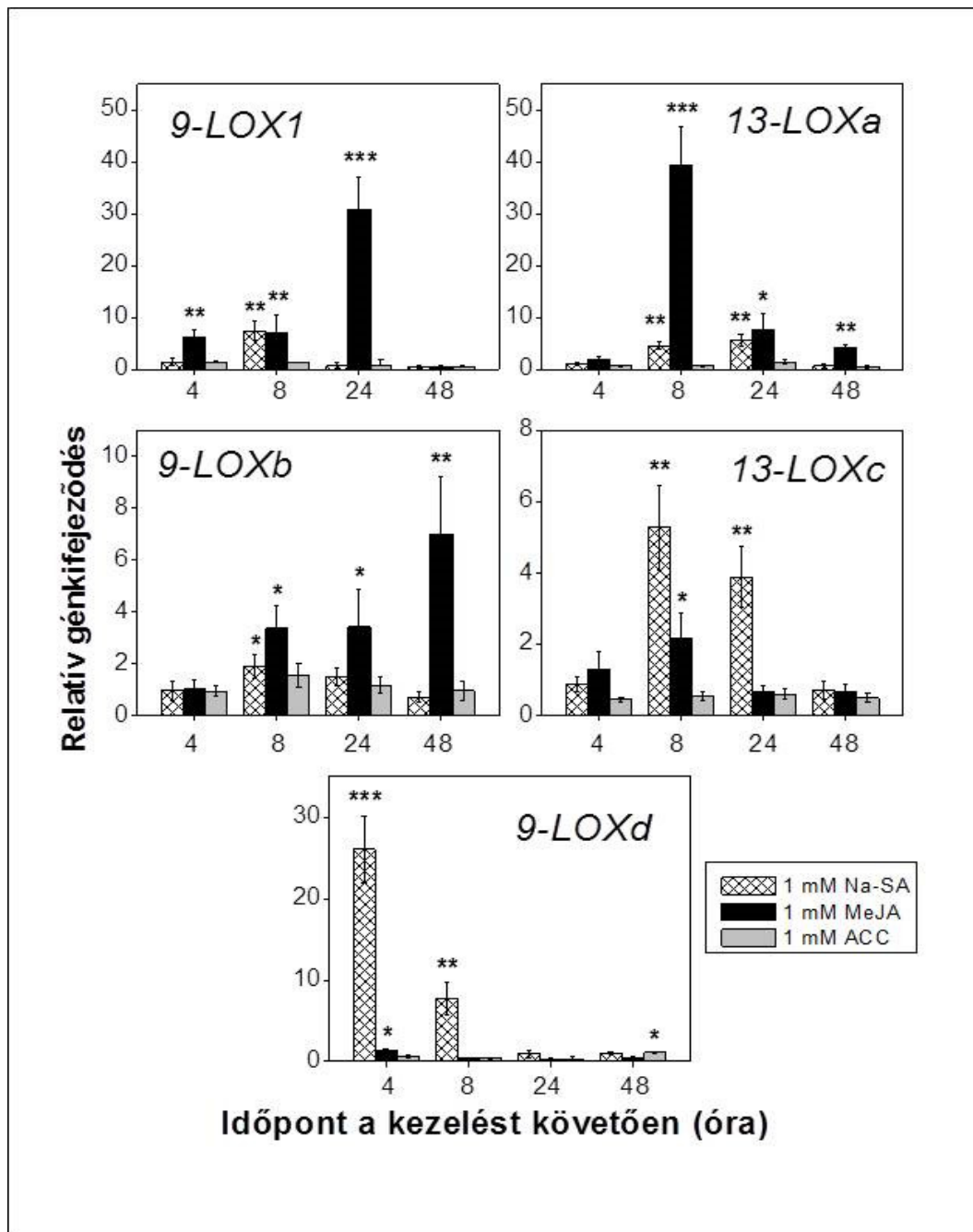


11. ábra. A paprika *9-LOX1* (GenBank FJ377708), *13-LOXa* (JF304313), *9-LOXb* (DQ473539), *13-LOXc* (KC404864) és *9-LOXd* (DQ473540) gének expressziós változásai ObPV és PMMoV fertőzést, valamint mock-inokulációt követően a fertőzött levelekben. A valós idejű RT-qPCR méréseket génspecifikus primer párokkal végeztük. Egy aktin gén kifejeződését mértük konstitutív kontrollként. Az ábrán mutatott értékek három független párhuzamos mérés eredményei, \pm standard hiba. Az ábra jelölései: * , ** és *** mutatják a szignifikáns eltéréseket a vírusinokulált és kontroll növények között P = 5%, 1% és 0,1% szinten a Student teszt szerint.

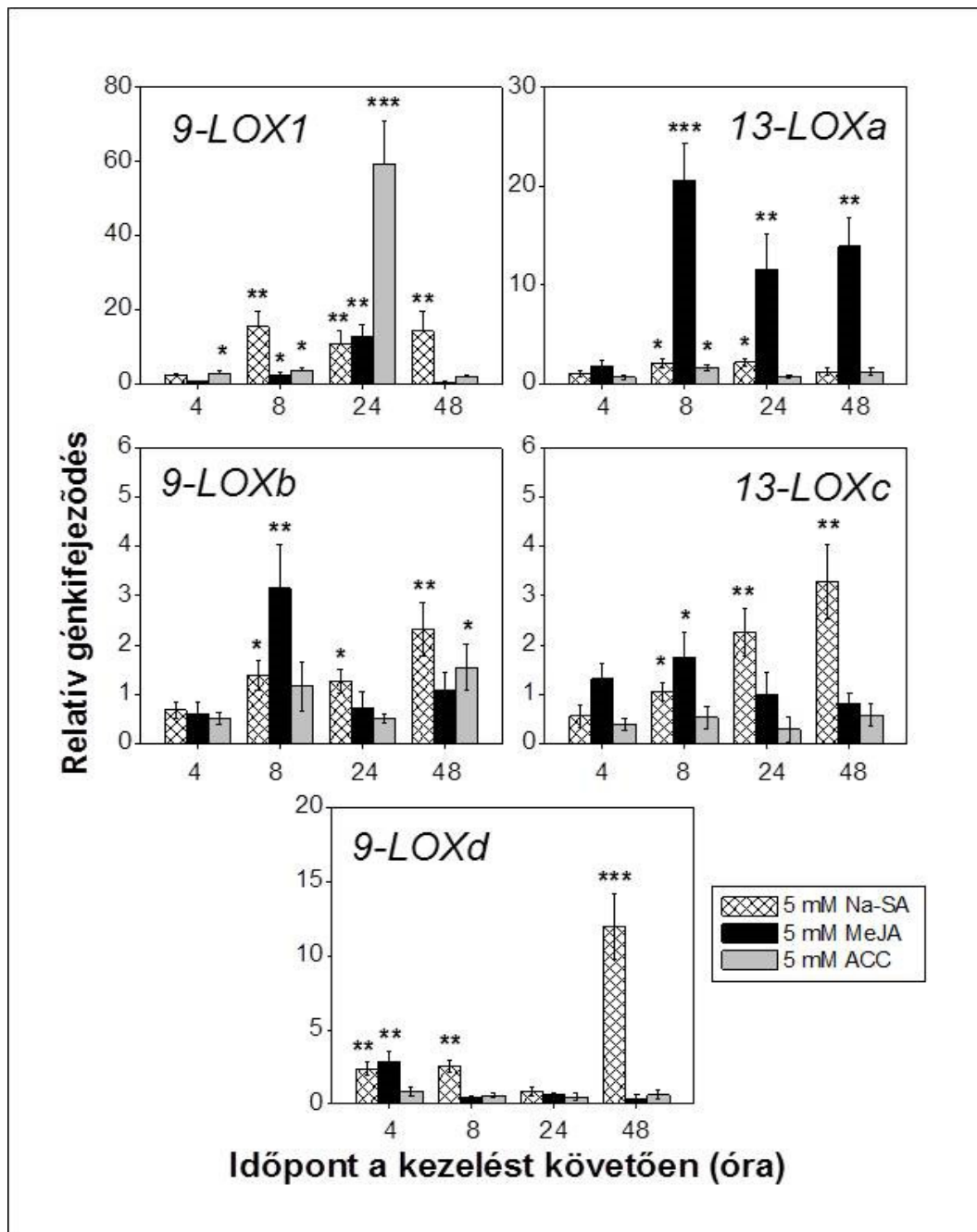
5.6.3. Lipoxigenáz gének aktiválódása hormonkezelt levelekben

A védekezéshez kapcsolódó növényi hormonok döntő szerepet játszanak a vírusok által kiváltott jelátviteli folyamatokban, amelyek aktiválják a növények védelmi mechanizmusait (Bari és Jones 2009, Alazem és Lin 2015). A hormonok szerepének jobb megismeréséhez az ObPV és PMMoV fertőzött paprika levelek védekezési reakcióiban megvizsgáltuk a *9-LOX1*, *13-LOXa*, *9-LOXb*, *13-LOXc* és *9-LOXd* gének expressziós profilját 1- és 5 mM-os nátrium-szaliciláttal, metil-jazmonáttal és 1-amino-ciklopropán-1-karboxilsavval (ACC, etilén prekursor) kezelt paprika levelekben. Teljes RNS-t vontunk ki a hormonkezelt és kontroll növényekből különböző időpontokban (4-48 órával a kezelést követően), majd a *LOX* génexpressziós szinteket valós idejű RT-qPCR technikával mértük.

A hormonkezelések nagyon különböző hatást gyakoroltak a *LOX* gének kifejeződésére (12-13. ábra). A nátrium-szalicilát és a metil-jazmonát indukálta mind az öt *LOX* gén expresszióját, de igen különböző mértékben. A nátrium-szalicilát kezelés a *9-LOX1*, *13-LOXa* és *13-LOXc* gének átmeneti aktiválódásához vezetett, míg a *9-LOXb* kifejeződésére csak kismértékben hatott. A legnagyobb hatást az 1 mM nátrium-szalicilát a *9-LOXd* expressziójára gyakorolta, ahol 26-szoros növekedést tapasztaltunk 4 órával a kezelést követően (12. ábra). Az 1 mM metil-jazmonát kezelés, az 5 mM MeJA kezeléshez hasonlóan, a legjelentősebb indukciót a *9-LOX1* és *13-LOXa* gének esetén váltotta ki, ahol 31- és 39-szeres növekedést mértünk. A *9-LOXb* gén expresszióját is jelentősen megnövelte a metil-jazmonát, míg a *13-LOXc* és *9-LOXd* csak kevésbé aktiválódott (12. és 13. ábra). Az 1 mM ACC kezelés nem indukálta jelentősebb mértékben a vizsgált *LOX* gének expresszióját (12. ábra). Az 5 mM ACC kezelés azonban fokozatosan növelte a *9-LOX1* gén transzkripció szintjét, 24 órával a kezelést követően 59-szeres növekedést mértünk (13. ábra). Ez alátámasztja egy korábbi kísérlet eredményeit (Hwang és Hwang 2010), amelyben kimutatták, hogy a *9-LOX1* gén erősen indukálódik etilén kezelés hatására. Az 5 mM ACC kezelés aktiválta a *13-LOXa* és *9-LOXb* géneket is, ugyanakkor a *13-LOXc* és a *9-LOXd* génekre nem volt hatással (13. ábra).



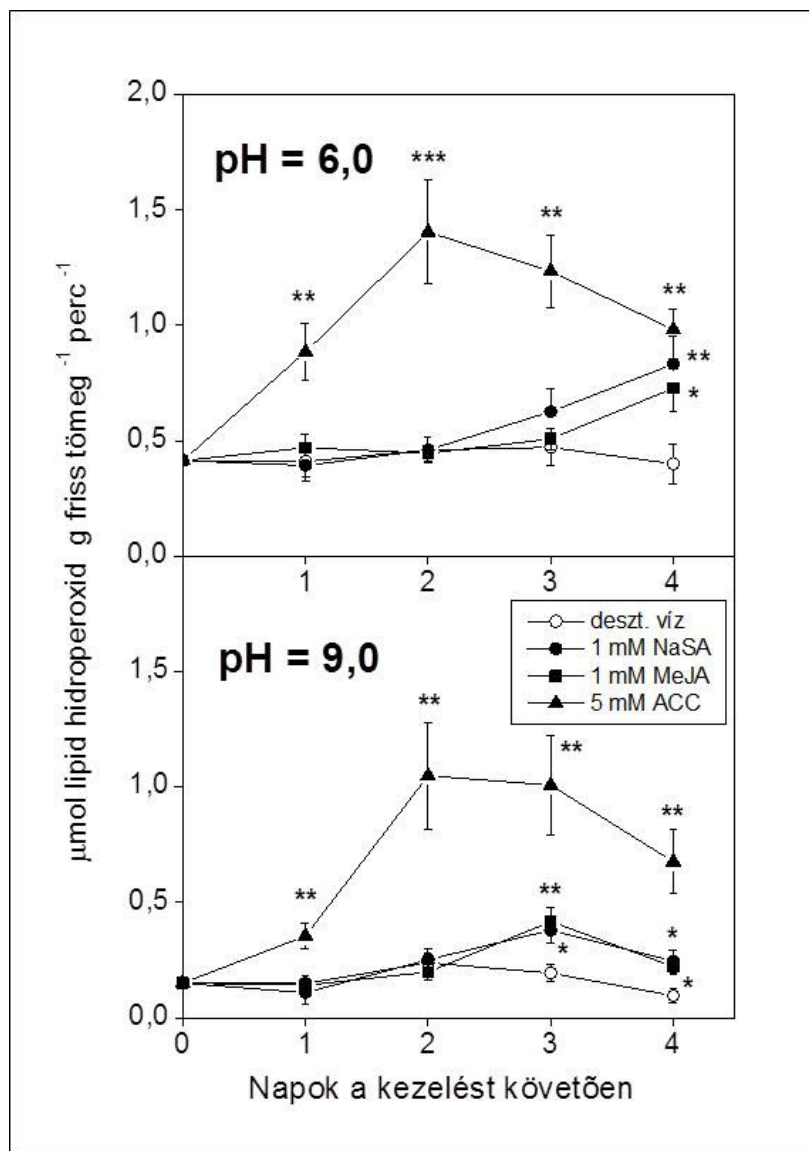
12. ábra. A paprika *9-LOX1* (GenBank FJ377708), *13-LOXa* (JF304313), *9-LOXb* (DQ473539), *13-LOXc* (KC404864) és *9-LOXd* (DQ473540) gének expressziós változásai 1 mM nátrium-szalicilát (Na-SA), 1 mM metil-jazmonát (MeJA) és 1 mM 1-amino-ciklopropán-1-karboxilsav (ACC) kezelést követően. A valós-idejű RT-qPCR méréseket génspecifikus primer párokkal végeztük. Egy aktin gén kifejeződését mértük konstitutív kontrollként. Az ábrán mutatott értékek három független párhuzamos mérés eredményei \pm standard hiba. Az ábra jelölései: *, ** és *** mutatják a szignifikáns eltéréseket a hormonkezelt és kontroll növények között P = 5%, 1% és 0,1% szinten a Student teszt szerint.



13. ábra. A paprika *9-LOX1* (GenBank FJ377708), *13-LOXa* (JF304313), *9-LOXb* (DQ473539), *13-LOXc* (KC404864) és *9-LOXd* (DQ473540) gének expressziós változásai 5 mM nátrium-szalicilát (Na-SA), 5 mM metil-jazmonát (MeJA) és 5 mM 1-amino-ciklopropán-1-karboxilsav (ACC) kezelést követően. A valós idejű RT-qPCR méréseket génspecifikus primer párokkal végeztük. Egy aktin gén kifejeződését mértük konstitutív kontrollként. Az ábrán mutatott értékek három független párhuzamos mérés eredményei \pm standard hiba. Az ábra jelölései: *, ** és *** mutatják a szignifikáns eltéréseket a hormonkezelt és kontroll növények között P = 5%, 1% és 0,1% szinten a Student teszt szerint.

5.6.4. A LOX enzimaktivitás mérése hormonkezelt levelekben

Annak érdekében, hogy többet megtudjunk a védekezési hormonok LOX anyagcserére gyakorolt hatásáról, meghatároztuk a teljes LOX enzimaktivitást 1 mM nátrium-szaliciláttal, 1 mM metil-jazmonáttal és 5 mM ACC-vel kezelt levelekben. A LOX aktivitásokat két különböző pH értéken mértük, mert a különböző LOX izoenzimeknek eltér a pH optimuma (Siedow 1991, Hornung és mtsai. 2008, Gullner és mtsai. 2010). Az 5 mM ACC kezelés gyors és jelentős LOX össz-aktivitás növekedéshez vezetett mindkét pH értéken (14. ábra), mely megfelel a korábban közölt eredményeknek (Levinsh 1992). Két nappal az 5 mM ACC kezelést követően a LOX aktivitás 3- és 4,4-szerese volt a kontroll levelekben mért aktivitásoknak pH=6,0 és pH=9,0 esetében (14. ábra). Az ACC-kezelt levelekben a LOX aktivitás a harmadik és negyedik napon lassan a kontroll szintjére csökkent. Az ACC-vel ellentétben a nátrium-szalicilát és a metil-jazmonát kezelés csak kései és gyenge LOX aktivitás-növekedést okozott (14. ábra). Hasonló eredményeket figyeltünk meg olyan levelekkel is, melyeket levágtunk a növényről és a levélnyeleket hormontartalmú oldatba állítottuk. Ebben az esetben is csak az 5 mM ACC kezelés eredményezett jelentős LOX aktivitás növekedést, az 1 mM nátrium-szalicilát és metil-jazmonát hatástalan volt (ezek az eredmények nincsenek bemutatva).



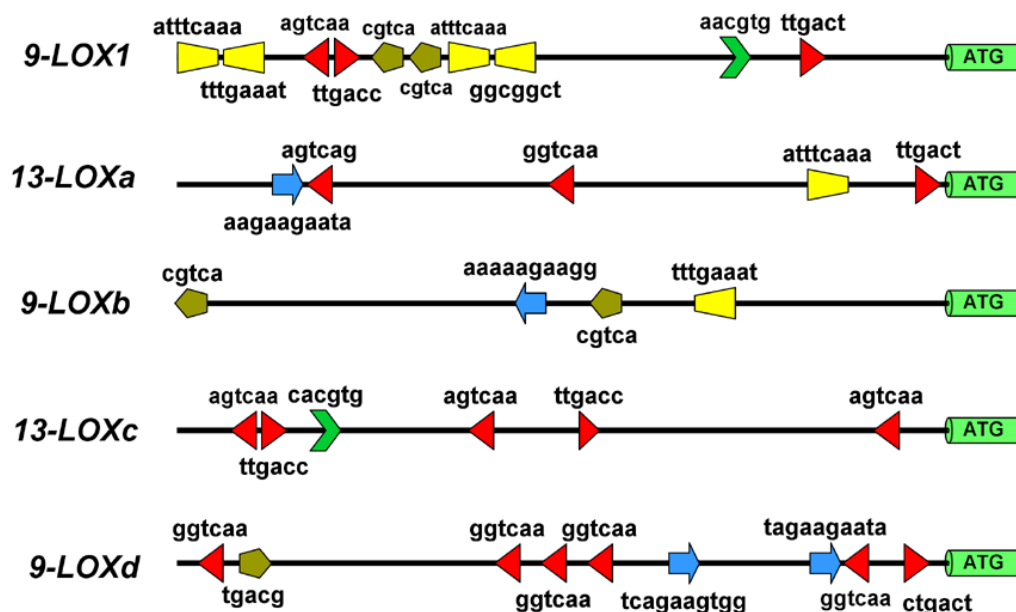
14. ábra. A lipoxigenáz (LOX) enzimaktivitás változásai paprika levelekben 1 mM nátrium-szalicilát (NaSA), 1 mM metil-jazmonát (MeJA) és 5 mM 1-aminociklopropán-1-karboxilsav oldatokkal történő beecsetelés hatására. Kontrollként desztillált vizes kezelést alkalmaztunk. A spektrofotometriás LOX össz-aktivitás mérések a paprikalevelek sejtmentes kivonataival két különböző pH értéken (pH=6,0 és 9,0) történtek. Az ábrán mutatott értékek három független párhuzamos mérés eredményei ± standard hiba. Az ábra jelölései: * , ** és *** mutatják a szignifikáns eltéréseket a hormonkezelt és kontroll növények között P = 5%, 1% és 0,1% szinten a Student teszt szerint.

5.6.5. A paprika *LOX* gén promóter szekvenciájának az elemzése

Annak érdekében, hogy feltárjuk az összefüggéseket a növényi hormonok *LOX* génekre gyakorolt hatása és a gének promóterében található, hormonokkal kapcsolatos

cis-szabályozó elemek között, *in silico* promóter elemzéseket végeztünk a PlantCARE és a PLACE programok segítségével. Megvizsgáltuk a már ismert promóter szabályozó elemek előfordulását a transzlációs start helyet megelőző 1500 bp hosszúságú nukleotid szakaszon a *9-LOX1*, *13-LOXa*, *9-LOXb*, *13-LOXc* és *9-LOXd* gének genomi DNS szekvenciájában. A promóter szekvenciák két paprika genom szekvenáló projekt adatbázisából származtak (Kim és mtsai. 2014b, Qin és mtsai. 2014). Mindegyik *LOX* gén promótere tartalmazott számos olyan *cis*-szabályozó elemet, amelyek részt vesznek a védekezési gének hormonális és patogén-indukált szabályozásában. Érdekes módon a *LOX* gének promótereiben megtalálható ERE motívumok száma korrelált a *LOX* gének ACC-indukálhatóságával. Az erősen ACC-indukálható *9-LOX1* gén (13. ábra) négy ERE motívumot tartalmaz, ezek közül három ATTTCAA típusú elem (Itzhaki és mtsai. 1994) míg a negyedik egy ún. GCC-doboz (AGCCGCC) (Ohme-Takagi és mtsai. 2000) (15. ábra). Egy ERE-t találtunk a gyengén ACC-indukálható *13-LOXa* és *9-LOXb* génekben, míg egyetlen sem a *13-LOXc* és *9-LOXd* génekben, melyek expresszióját nem befolyásolta az 5 mM ACC (13. és 15. ábra). Nem találtunk összefüggést a *LOX* gének nátrium-szalicilát és metil-jazmonát indukálhatósága és a velük kapcsolatos *cis*-szabályozó elemek között. A 10 bp TCA-típusú szalicilsav válaszért felelős motívumot (CCTTCTTTTT) (Goldsbrough és mtsai. 1993, Shah és Klessig 1996) a *9-LOXb* gén promóterében azonosítottuk (15. ábra). További TCA-típusú szalicilsav válaszért felelős motívumokat (Pastuglia és mtsai. 1997) azonosítottunk a *13-LOXa* (AAGAAGAATA) és *9-LOXd* gének (TCAGAAGTGG és TAGAAGAATA) promótereiben (15. ábra). A *9-LOXd* gén promóterében jelen levő két TCA-típusú motívum jelenléte összefüggésbe hozható ennek a génnek a korai és jelentős nátrium-szalicilát indukálhatóságával (12. ábra). Az *as-1*-szerű elem (TGACG), melyet három *LOX* gén promóterében is megtaláltunk (15. ábra), kapcsolatba hozható a szalicilsav (Lebel és mtsai. 1998, Strompen és mtsai. 1998) és a jázmonsav-indukálhatósággal is (Rouster és mtsai. 1997). Egy G-doboz elemet (CACGTG) és egy G-doboz-szerű szegmenst is (AACGTG) azonosítottunk a *13-LOXc* és *9-LOX1* promóterében. A G-dobozokat elsősorban a jázmonsav-indukálhatósággal hozták kapcsolatba (Memelink 2009) de más hormonokkal is összefüggésben lehetnek (Menkens és mtsai. 1995). Fontos megemlíteni, hogy számos kanonikus W-boxot (3-6 kópia) azonosítottunk négy *LOX* gén promóterében (15. ábra). Ezekről a (C/T)TGAC(C/T) motívumokról bizonyították, hogy patogén-indukálható *cis*-elemek, melyekhez a WRKY transzkripciós faktorok képesek

kötődni (Rushton és mtsai. 1996, Eulgem és Somssich 2007). Természetesen az összes rövid DNS-szakasz, amelyet mint feltételezett promóter elemet azonosítottunk, véletlenszerűen megjelenhet az egész genomban, ezért ezeknek a szabályozásban betöltött szerepét kísérletesen is igazolni kell majd későbbi kísérletekben.

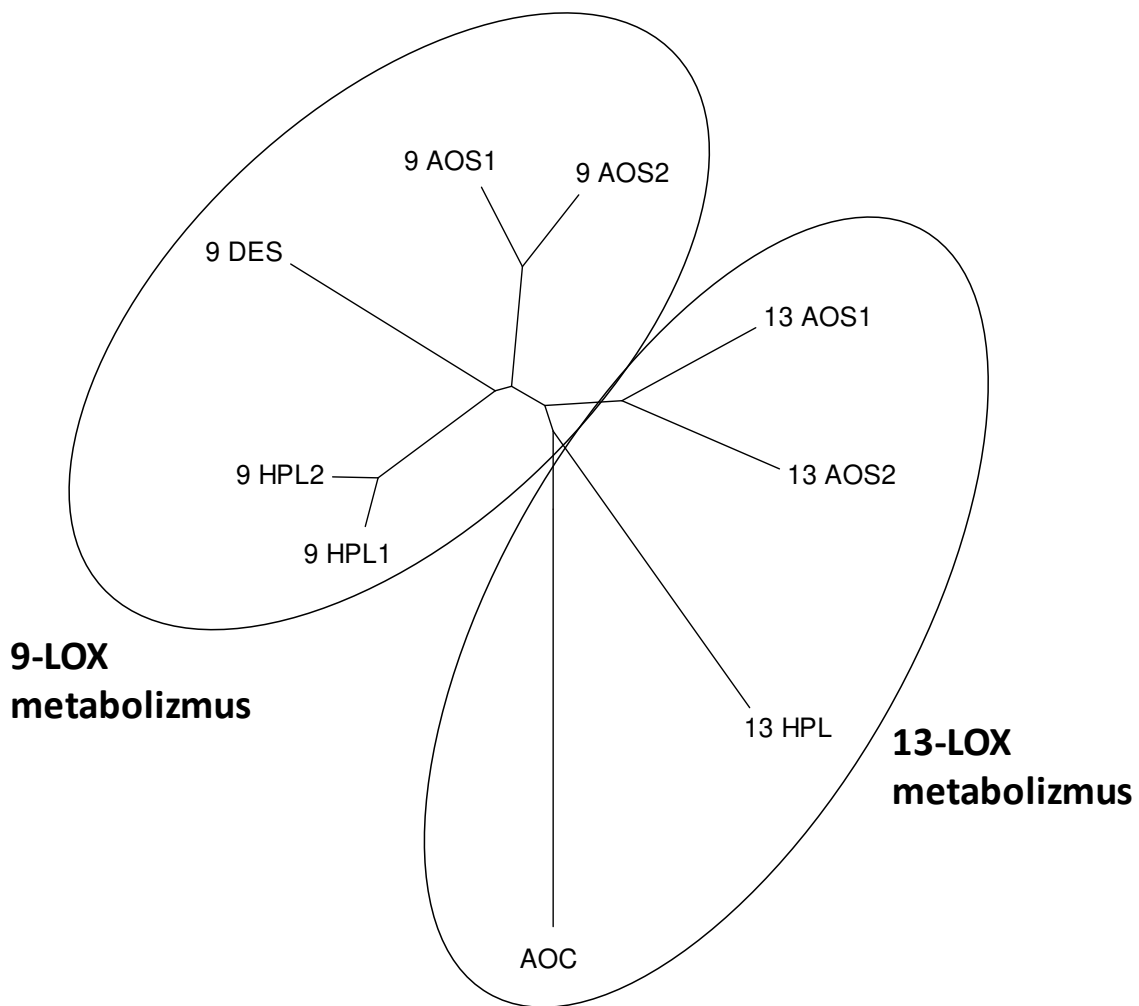


15. ábra. Öt paprika lipoxigenáz (LOX) gén promóterében azonosított, betegséggel- és hormonnal-kapcsolatos *cis*-szabályozó elemek sematikus ábrája. Az *in silico* analízishez az ATG start kodon előtt elhelyezkedő 1500 bázispár hosszúságú szakaszt választottuk ki. A promoter elemek jelölése a következő: sárga trapéz: etilén-válaszért felelős elem (ERE); piros háromszög: WRKY-kötő W-box; zöld ötszög: *as-1*-szerű elem; zöld nyílhegy: G-doboz és G-doboz szerű motívum; kék nyíl: szalicilsav-válaszért felelős TCA elem. Promóter motívumokat mindkét DNS szálon találtunk, amit a szimbólumok irányultsága jelez.

5.7. A vírusfertőzések hatása az oxilipin metabolizmus génjeire

A LOX enzimek által termelt zsírsav-hidroperoxidok több enzimatiszus reakcióúton is tovább alakulhatnak, és ezen reakciók során változatos szerkezetű, gyakran biológiailag aktív, antimikrobiális hatású vagy szignál-vegyületek, az ún. oxilipinek keletkeznek. A zsírsav-hidroperoxidok közvetlen továbbalakulását az eddigi vizsgálatok szerint főleg az AOS, DES és HPL enzimek katalizálják (Feussner és Wasternack 2002). Fontos még a jázmonsav bioszintézisében részt vevő AOC enzim szerepe is. Saját kísérleteink során arra kerestünk választ, hogy az ObPV és PMMoV fertőzések milyen oxilipin metabolikus utakat

aktiválnak a fertőzött paprika levelekben. Első lépésként feltérképeztük a paprikában található AOC, AOS, DES és HPL enzimeket.



16. ábra. A paprikában található allénoxid-cikláz (AOC), allénoxid-szintetáz (AOS), diviniléterszintetáz (DES) és hidroperoxid-liáz (HPL) enzimek aminosav szekvenciáinak összehasonlító törzsfája. A fehérjék GenBank-i azonosító számai: 13-AOS1, XP_016568681; 13-AOS2, XP_016548437; 9-AOS1, XP_016545806; 9-AOS2, XP_016545772; 13-HPL, NP_001311810; 9-DES, NP_001311513; 9-HPL-1, XP_016539693; 9-HPL2, XP_016539692; AOC, XP_016555194.

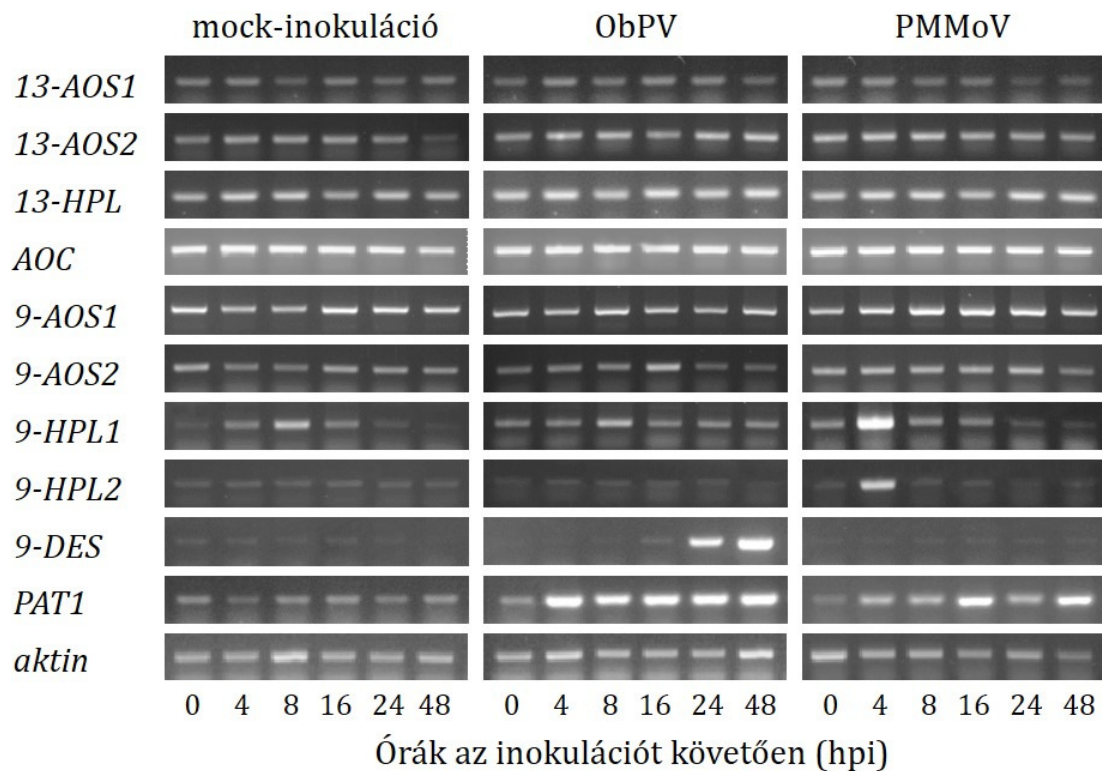
A GenBank-ban kilenc ilyen fehérjét azonosítottunk, amelyeknek a szekvencia-hasonlósági törzsfája a 16. ábrán látható. Jól láthatóan a fehérjeszekvenciák két csoportba tömörülnek aszerint, hogy a 9- vagy 13-hidroperoxi-zsírsavak metabolizmusában vesznek-e részt. A kutatócsoportunk korábbi RT-PCR eredményei szerint az ObPV fertőzés igen jelentősen indukálta a *9-DES* gént paprika levelekben, míg a *13-AOS1* és *13-*

HPL gének kifejeződését nem változtatta meg szignifikáns módon (Gullner et al. 2010). Jelenlegi munkánk során az oxilipin metabolizmusban szerepet játszó további gének kifejeződését szeretnénk megismerni. Mivel a munkánk kezdetekor még csak néhány gén volt ismert a 16. ábrán szereplő fehérjéket kódoló gének közül, a *9-AOS1* gént részben megszekvenáltuk és a szekvenciát a GenBank-ban elhelyeztük (GenBank-i azonosító száma KC404862) A teljes paprika genom időközben történt megszekvenálása (Kim és mtsai. 2014b, Qin és mtsai. 2014) következtében a további szekvenálások szükségtelessé váltak.

Ezután megvizsgáltuk az ObPV és PMMoV fertőzések hatását az oxilipinek képződésében szerepet játszó gének expressziójára. Korábban már vizsgálták a *13-AOS1*, *13-HPL* és *9-DES* gének szerepét ezekben a paprika-vírus kölcsönhatásokban (Gullner és mtsai. 2010), de a teljes összkép érdekében ezeket is újravizsgáltuk újonnan tervezett primer párokkal (F1. táblázat, Függelék). Az *13-AOS1*, *13-AOS2*, *13-HPL*, *AOC*, *9-AOS1* és *9-AOS2* gének expresszióját nem változtatta meg szignifikáns módon sem az ObPV, sem a PMMoV fertőzés (17. ábra).

A fenti hat génnel ellentétben a *9-DES* gén kifejeződése jelentősen indukálódott az ObPV-fertőzött paprika levelekben (17. ábra). Ezek az eredmények összhangban voltak a korábbi vizsgálatok eredményeivel (Gullner és mtsai. 2010). Érdekes módon a *9-HPL1* és *9-HPL2* gének expressziója igen jelentősen és gyorsan indukálódott a PMMoV-fertőzött levelekben, a hatás tranziens módon csak a fertőzést követő 4. órában volt megfigyelhető (17. ábra). Az oxilipin anyagcseréhez kapcsolódva megvizsgáltuk egy patatin-szerű lipáz enzimet kódoló gén expresszióját is (*PAT1*, GenBank-i kódja: HM231272, Kim és mtsai. 2014a). Ez az enzim szabad zsírsavakat hasít le foszfo- és galaktolipid molekulákról, amely zsírsavak a LOX enzimek szubsztrátumaként lipid-hidroperoxidokká, majd különböző oxilipinekké alakulhatnak (Matos és Pham-Thi 2009, Kim és mtsai. 2014a). Érdekes módon az ObPV-fertőzés erőteljesen és már igen korai időpontokban indukálta a *PAT1* gént (17. ábra), ami időben megelőzte a *LOX* gének expresszióját (11. ábra). A

PMMoV fertőzés szintén megnövelte a *PAT1* gén transzkript szintjét, de csak későbbi időpontokban, mint az ObPV esetében (17. ábra).



17. ábra. Az oxilipinek bioszintézisében részt vevő legfontosabb enzimeket kódoló gének kifejeződése ObPV és PMMoV fertőzött paprika levelekben. A génexpressziós változásokat specifikus primer párokkal, szemi-quantitatív RT-PCR módszerrel detektáltuk. Kontrollként mock-inokulált leveleket vizsgáltunk. Egy paprika aktin gén expresszióját is meghatároztuk konstitutív kontroll géneként. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

5.8. Vírusfertőzések hatása a hormonok bioszintézisében szerepet játszó génekre

Megvizsgáltuk több olyan gén expressziójának a változásait is paprika levelekben ObPV- és PMMoV fertőzés után, amelyek által kódolt fehérjék fontos szerepet játszanak különböző, a védekezési reakciók szabályozásában résztvevő növényi hormonok bioszintézisében. A génexpressziós változások vizsgálatához szemi-quantitatív RT-PCR módszert használtunk specifikus primer párok segítségével (F1. táblázat, Függelék). Elsőként a szalicilsav bioszintézis génjeit vizsgáltuk. A szalicilsav bioszintézis kétféle módon is végbemehet, egyrészt egy a fenil-alanin-ammónia liáz (PAL, E.C. 4.3.1.5) által

katalizált reakcióval induló bioszintetikus folyamatban (Kim és Hwang 2014), másrészt az izokorizmat-szintetáz (ICS, E.C. 5.4.4.2) részvételével zajló reakciósorozatban (Catinot és mtsai. 2008). A paprika genom megszekvenálása (Kim és mtsai. 2014b, Qin és mtsai. 2014) és a paprika gének annotálása után a GenBankban jelenleg 6 paprika *PAL* gén található (GenBank NM_001324603, XM_016699298, XM_016687267, XM_016718439, XM_016710142, XM_016687266), és ezekből eddig csak egy gén (*CaPAL1*, NM_001324603) szerepét vizsgálták meg növény-kórokozó kapcsolatokban (Kim és Hwang 2014). A jelenlegi vizsgálatok során három *PAL* gén expressziójának a változásait vizsgáltuk meg az ObPV és PMMoV fertőzött paprika levelekben RT-PCR technikával (használt oligonukleotid szekvenciák a F1. táblázatban). A három *PAL* gént a következőképpen jelöltük: *PAL1* (GenBank NM_001324603), *PAL2* (XM_016710142), *PAL3* (XM_016687267). A PCR vizsgálatok kimutatták, hogy az ObPV-inokuláció jelentősen aktiválta mindhárom *PAL* gén kifejeződését (18. ábra). Az ObPV-inokulált paprika levelekben a *PAL1* gén kifejeződése már 24 órával a fertőzés után megemelkedett, és az expresszió 48 óráig még tovább emelkedett (18. ábra). A *PAL2* és *PAL3* gének kifejeződése csak 48 órával az ObPV fertőzés után nőtt meg, különösen erősen a *PAL2* esetében (18. ábra). A három *PAL* gén expressziója azonban nem változott meg szignifikáns módon sem a PMMoV fertőzés, sem a mock-kontroll kezelés következtében (18. ábra). A *PAL* gének ObPV fertőzés hatására bekövetkező erőteljes aktiválódásával szemben a GenBank-ban található egyetlen paprika *ICS* gén (GenBank-i azonosító száma AY743431) kifejeződése nem változott meg jelentősen sem ObPV- sem PMMoV-fertőzés sem, a mock-kontroll inokuláció hatására (18. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az inkompatibilis paprika-ObPV kölcsönhatásban bekövetkező szalicilsav akkumulációban (Dziurka és mtsai. 2016) az egyes *PAL* izoenzimeknek lehet jelentősebb szerepe. Fontos megjegyezni, hogy a szalicilsav felhalmozódásban az általunk vizsgált gének mellett a többi *PAL* gén is szerepet játszhat, így további vizsgálatok szükségesek a kérdés végleges tisztázásához. A GenBank-i szekvencia adatok szerint az *ICS* gén ötféleképpen íródhat át transzkriptummá (XM_016722851, XM_016722852, XM_016722853, XM_016722854, XM_016722855), ami szintén tovább bonyolítja a kérdés tisztázását.

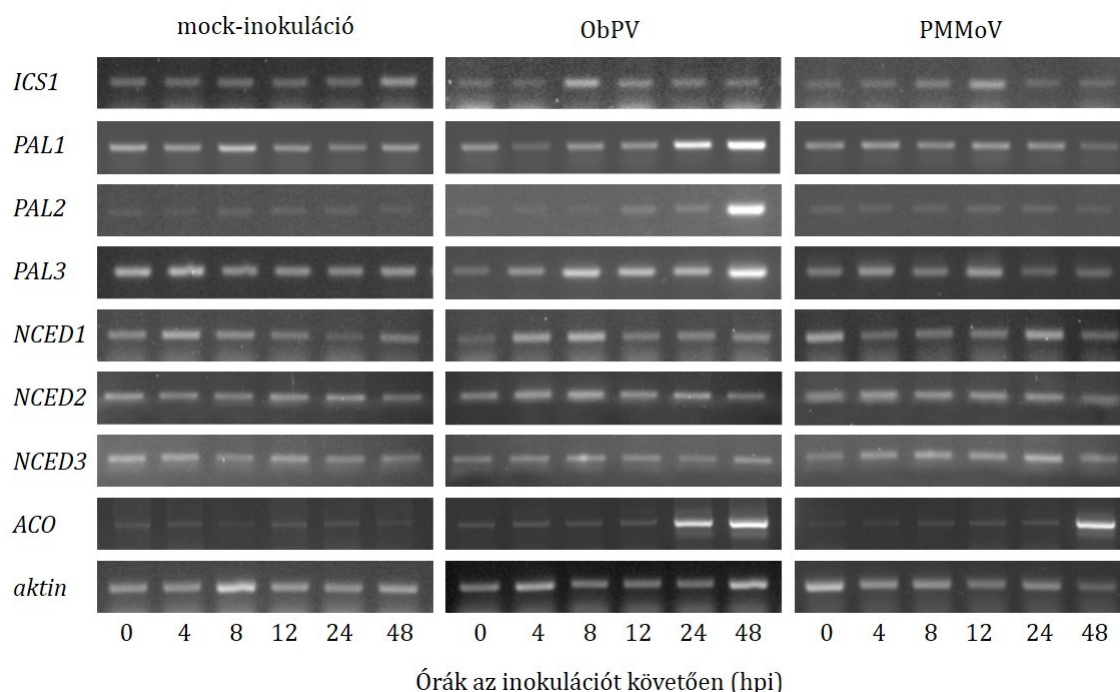
A kutatócsoportunk közlés alatt álló eredményei szerint az ObPV fertőzés jelentősen megnöveli a fertőzött levelekben az abszcizinsav (ABA) szinteket is (Dziurka

és mtsai. 2016). Abiotikus stresszhatások esetében kimutatták, hogy az ABA szint emelkedése növényi szövetekben gyakran a *de novo* ABA bioszintézis következménye (Qin és Zeevaart 1999, Gallé és mtsai. 2013, Horváth és mtsai. 2015). Az ABA bioszintézisének a sebesség-meghatározó lépése feltehetően a 9-*cisz*-epoxikarotinoidok hasítása. Ezt a reakciót a 9-*cisz*-epoxikarotinoid dioxigenáz (NCED, EC 1.13.11.51) enzimek katalizálják (Nambara és Marion-Poll 2005). Ezért megvizsgáltuk az ObPV és PMMoV fertőzött paprika levelekben az NCED enzimeket kódoló gének aktiválódását is. A GenBank-ban három valódi, fehérje-kódoló paprika *NCED* gén található (19. ábra) hasonlóan a paradicsomhoz (Horváth és mtsai. 2015), továbbá négy pszeudogén. Mindhárom valódi *NCED* génre specifikus primereket terveztünk és RT-PCR módszerrel megvizsgáltuk az expressziós változásait. Az *NCED* géneket a következőképpen jelöltük: *NCED1* (XM_016697078), *NCED2* (XM_016691094) és *NCED3* (XM_016719296). A vizsgálataink szerint sem az ObPV sem a PMMoV fertőzés nem változtatta meg szignifikáns módon egyik *NCED* gén kifejeződését sem (18. ábra), tehát az ABA bioszintézis szabályozásában ezen gének expressziójának változásai nem játszanak szerepet.

A szalicilsav és az ABA mellett az etilén is fontos szerepet játszik a vírusfertőzött növények védekezési folyamataiban (Knoester és mtsai. 2001, van Loon és mtsai. 2006, Alazem és Lin 2015). Az etilén nagymértékű és gyors felhalmozódását már kimutatták az ObPV-fertőzött paprika levelekben, míg a PMMoV-fertőzés hatására nem volt megfigyelhető szignifikáns etilén felhalmozódás (Tóbiás és mtsai. 1989).

A GenBank-ban végzett nukleotid szekvencia homológia vizsgálatokkal egy új, az etilén szintézisben szerepet játszó *ACO* gént azonosítottunk (GenBank-i azonosító száma: JW159100), amelynek segítségével specifikus primer párt terveztünk (F1. táblázat, Függelék). Az RT-PCR vizsgálataink kimutatták, hogy az *ACO* gén expressziója mind ObPV- mind PMMoV-fertőzés hatására jelentősen megemelkedett (18. ábra). Az inkompatibilis paprika-ObPV kapcsolatban azonban az *ACO* gén már 24 órával a fertőzés után erőteljesen aktiválódott, míg a kompatibilis paprika-PMMoV kapcsolatban ez a hatás csak egy nappal később jelentkezett (18. ábra). TMV fertőzés esetében már korábban kimutatták, hogy a fertőzés hatására mind az *ACO* mind az *ACS* gének expressziója megemelkedik (Kim és mtsai. 2003). Az *ACO* gén ObPV-fertőzés hatására meginduló aktiválódása feltételezhetően szerepet játszik a fertőzés során megfigyelt etilén akkumulációban. Az

RT-PCR kísérleteink során kontroll génként vizsgált aktin gén expressziója nem változott meg sem ObPV- sem PMMoV fertőzés hatására (18. ábra).

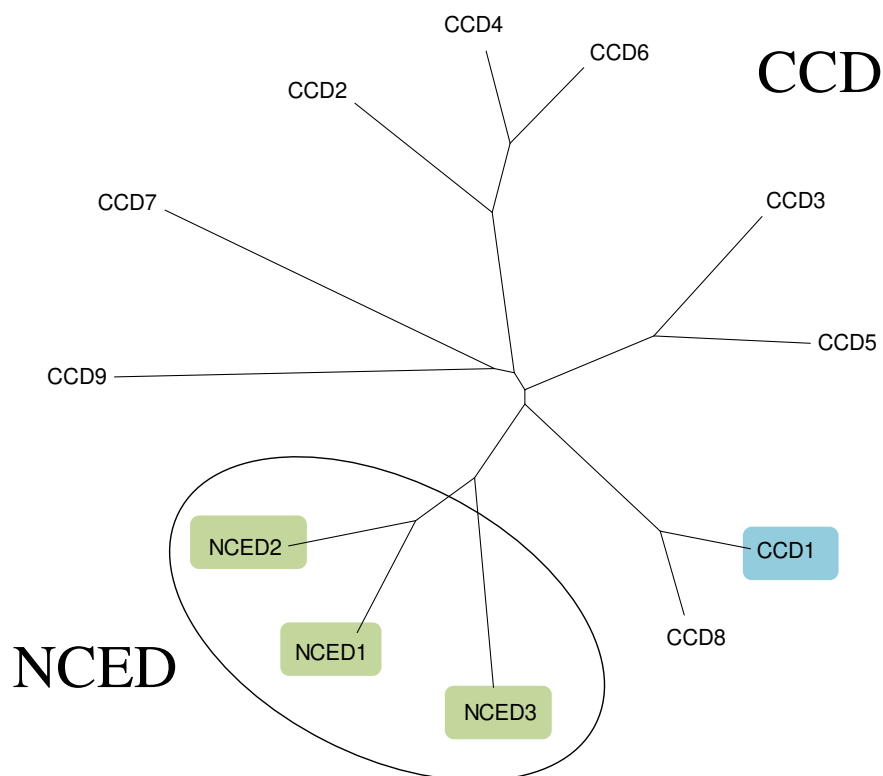


18. ábra. Az ObPV- és PMMoV-fertőzések hatása a szalicilsav, abszcizinsav és az etilén védekezési hormonok bioszintézisében szerepet játszó enzimeket kódoló gének expressziójára paprika levelekben. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be. Rövidítések: *ICS1*, izokorizmat szintetáz; *PAL*, fenilalanin ammónia liáz; *NCED*, 9-cisz-epoxikarotinoid dioxigenáz; *ACO*, 1-aminociklopropán-1-karboxilsav oxidáz. Egy aktin gén expresszióját is vizsgáltuk mint konstitutív kontroll gént. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

5.9. Vírusfertőzések hatása a paprika *CCD1* gén expressziójára

A munkacsoportunk korábbi eredményei szerint az ObPV-fertőzés jelentősen megnövelte az elektrolit kiáramlást, részleges kiszáradást okozott, növelte a hőleadást, ezenkívül csökkentette a klorofill-*a* tartalmat és a fotoszintézis hatékonyságát a fertőzött paprika levelekben (Rys és mtsai. 2014). A levelek spektrofotometriás módszerrel meghatározott klorofill-*b* és össz-karotinoid tartalma viszont nem változott meg szignifikáns módon az ObPV-fertőzés hatására. Közel-infravörös Raman spektroszkópia segítségével elért eredmények szerint viszont a karotinoid tartalom megnövekedett az ObPV-fertőzött levelekben, ami arra utal, hogy a spektrofotometriás és a Raman spektroszkópiás módszer a sokféle szerkezetű, eltérő karotinoidok különböző csoportjait

detektálja (Rys és mtsai. 2014). A karotinoidok anyagcseréjének jobb megismerése érdekében elsőként azonosítottuk a paprika genomban található azon géneket, amelyek karotinoid 9,10 (9',10')-hasító dioxigenáz (CCD) enzimeket kódolnak. A CCD enzimek specifikusan a karotinoid kromofórok 9-10 és 9'-10' kettős kötéseit hasítják, és így a karotinoidokat az oxidatív lebontás során apokarotinoidokká alakítják át (Bouvier és mtsai. 2003, Simkin és mtsai. 2003, Auldrige és mtsai. 2006). Kilenc gént azonosítottunk, amelyek által kódolt fehérjék szekvenciáit összehasonlítottuk egymással illetve a három paprika NCED szekvenciával (19. ábra).

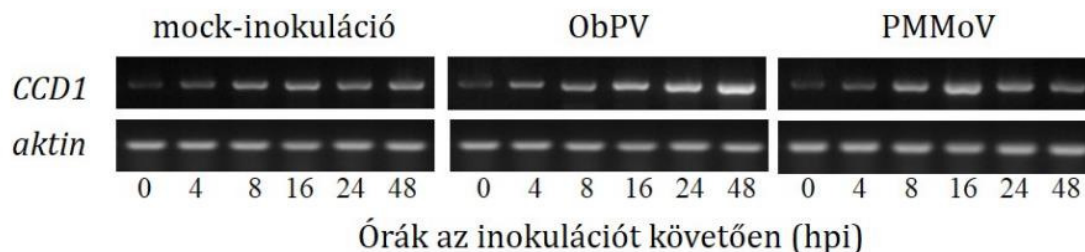


19. ábra. A paprika 9-*cisz*-epoxikarotinoid dioxigenáz (NCED) és karotinoid hasító dioxigenáz (CCD) enzimek aminosav szekvenciáinak hasonlósági törzsfája. A bemutatott fehérje szekvenciák GenBank-i azonosító számai: NCED1, XP_016552564; NCED2, XP_016546580; NCED3, XP_016574782; CCD1, NP_001311495; CCD2, XP_016582135; CCD3, XP_016571972; CCD4, XP_016552690; CCD5, XP_016549104; CCD6, XP_016546962; CCD7, XP_016544649; CCD8, XP_016538282; CCD9, XP_016537824.

Négy további paprika fehérje (XP_016576474, XP_016573079, XP_016573078, XP_016548024) jelentős szekvencia-homológiát mutatott a CCD fehérjékkel, de ezek a

szekvenciákat túl rövid voltak miatt kihagytuk a hasonlósági törzsfából, ugyanúgy, mint a GenBank-ban talált hat *CCD* pszeudogént.

Részletesen megvizsgáltuk egy paprika *CCD* fehérjét (*CCD1*) kódoló gén expresszióját az ObPV- és PMMoV-fertőzött paprika levelekben szemikvantitatív RT-PCR módszerrel, specifikus primer pár segítségével (F1. táblázat, Függelék). Paprikában eddig csak ezt a gént vizsgálták (GenBank Y14164; Bouvier és mtsai. 2003, Wang és mtsai. 2013, Rys és mtsai. 2014). Az ObPV-inokuláció jelentősen megemelte a *CCD1* gén expresszióját már 24 órával a fertőzést követően és az indukció mértéke tovább nőtt 48 órával a fertőzés után (20. ábra). Ezzel szemben a PMMoV-inokuláció csak egy gyenge és tranzienst gén-aktiválódást okozott, amely a fertőzést követő 16. óránál tetőzött (20. ábra). Mock-inokuláció hatására is észleltünk egy kismértékű, tranzienst gén-aktiválódást. Az aktin ún. „háztartási gén” expressziója nem változott meg egyik kezelés esetén sem. Az eredmények azt mutatják, hogy egyes karotinoidok mennyisége csökkenhet az ObPV-fertőzés hatására annak ellenére, hogy a levelek össz-karotinoid tartalma változatlan.



20. ábra. A paprika karotinoid hasító dioxigenáz 1 (*CCD1*, GenBank NP_001311495) enzimet kódoló gén expressziójának a változásai ObPV és PMMoV fertőzött paprika levelekben. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be. Egy aktin gén expresszióját is vizsgáltuk mint konstitutív kontroll gént. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

5.10. A WRKY transzkripció faktorok vizsgálata vírushatározott paprikában

A paprika *LOX* gének promótereinek az elemzése során kimutattuk, hogy a WRKY transzkripció faktorok nagy valószínűséggel részt vesznek ezeknek a géneknek a szabályozásában. A szakirodalmi adatok szintén arra utaltak, hogy egyes WRKY fehérjék fontos szerepet játszanak a vírushatározésekkel szembeni védekezési reakciók

szabályozásában különböző növényekben (Chen és Chen, 2000). A fenti két ok miatt vizsgálatokat végeztünk annak megállapítására, hogy az általunk vizsgált paprika-tobamovírus kölcsönhatásokban a WRKY fehérjék milyen szerepet játszanak. A vizsgálataink kezdetén a szakirodalmi adatok alapján a WRKY transzkripciós faktorok III. csoportja tűnt számunkra különösen fontosnak. Több ilyen típusú WRKY transzkripciós faktort kódoló gén jelentős mértékben aktiválódott vírus-fertőzések hatására rezisztens növényekben (Chen és Chen, 2000), de emellett szalicilsav hatására is nagymértékben indukálhatóak voltak (Kalde és mtsai. 2003).

5.10.1. Egy új paprika WRKY gén azonosítása

A vizsgálataink kezdeti szakaszában egy TMV-fertőzés hatására erőteljesen indukálódó, III. csoportba sorolt dohány WRKY génnel (*tWRKY3*, GenBank AF193770, Chen és Chen, 2000) végzett szekvencia homológia kereséssel azonosítottunk a paprika genomban egy új, III. csoportba tartozó WRKY gén szekvenciát. A gén teljes fehérje-kódoló részét (nyílt leolvasási keretét) specifikus primer párokkal (F1. táblázat, Függelék) végzett PCR reakciók segítségével sikeresen klónoztuk paprika levelekből, megszekvenáltattuk, majd az új WRKY gén szekvenciáját elhelyeztük a GenBank-ban (azonosító szám KF484401). A nukleotid szekvenciából lefordított 299 aminosav hosszúságú fehérje-szekvencia tartalmazta a tipikus WRKY aminosav motívumot, valamint a csak a III. csoportba sorolható WRKY faktorokra jellemző Cys-X₇-Cys-X₂₄-His-X₁-Cys cink-ujj motívumot (Eulgem és mtsai. 2000) (21. ábra).

Az új WRKY fehérje szekvenciával BLAST keresést végeztünk a GenBank-ban, amelynek eredményei szerint a szekvencia a legnagyobb (65%) hasonlóságot a burgonya WRKY70 szekvenciához mutatott (GenBank XP_006356477). Az új paprika WRKY protein az *Arabidopsis thaliana* mintegy 72 WRKY transzkripciós faktora (Dong és mtsai. 2003; Wu és mtsai. 2005) közül a legnagyobb hasonlóságot (42%) az AtWRKY70 fehérjével (GenBank NP_191199) mutatta, ezért a kódoló génjét *WRKY70*-nek neveztük el.

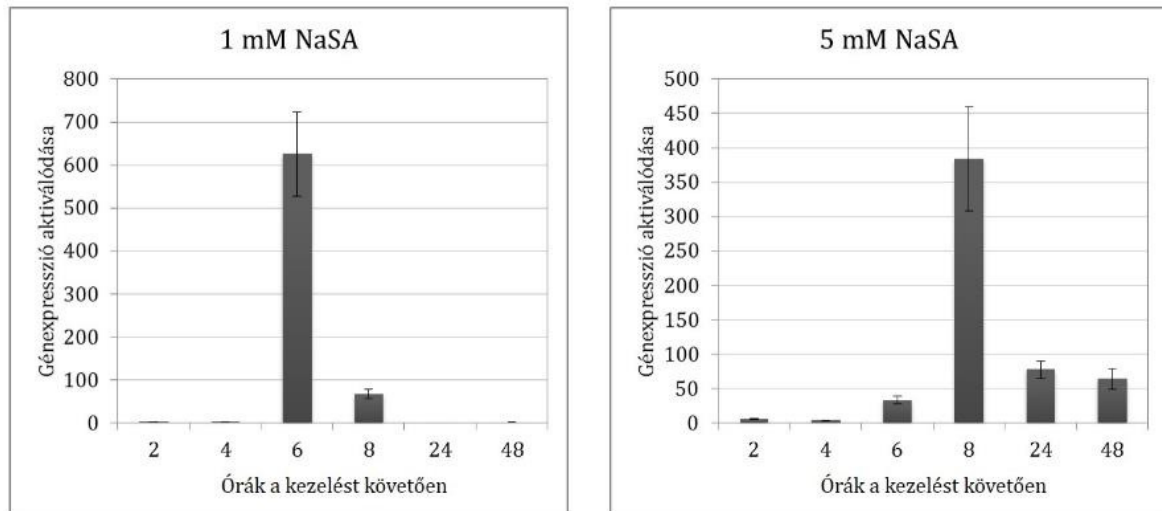
meelvdetprkrlikelvegksfakqlqslqppniehydgsvladelvlkiwrsftq
aitelntlvsnsilvqtqmevekteevdqadtgdrnselkkkgkqggkdrregcykr
rnngswmresetmndgca**wrky**gqksilnskyprcyrr**h**thkydgd**c**ratkqvhimq
enpkimyhhttyfgnht**c**npakirkhinnaqfnhsmlecppfevkpkipssvthdstee
eeslkgqgsdnvsstmdsylvwedfmpspshadstlashnssyfqqglissemgdlvkf
sdfeaieff

21. ábra. A paprika WRKY70 fehérje aminosav szekvenciája (GenBank AHA15410). A tipikus WRKY aminosav-motívum zöld színnel van kiemelve. A cink-ujj aláhúzással van jelölve, amelyen belül a tipikus elhelyezkedésű cisztein (c) és hisztidin (h) aminosavak lila, illetve kék színnel vannak kiemelve.

5.10.2. Szalicilsav hatása a *WRKY70* gén kifejeződésére

A szakirodalom szerint a III. csoportba sorolható WRKY transzkripció faktorok kódoló génei nagymértékben indukálhatóak szalicilsav kezelés hatására (Kalde és mtsai. 2003). Az újonnan azonosított *WRKY70* gén jellemzése érdekében ezért először megvizsgáltuk a szalicilsavval történő indukálhatóságot paprika levelekben, amelyeket 1 és 5 mM koncentrációjú nátrium-szalicilát vizes oldatokkal ecseteltünk be. A kontroll leveleket desztillált vízzel ecseteltük be. A vizsgálatokat valós idejű RT-qPCR módszerrel végeztük specifikus primer párok (F1. táblázat, Függelék) felhasználásával. A nátrium-szalicilát kezelések rövid időn belül igen nagymértékben megnövelték a *WRKY70* gén expresszióját (22. ábra). Az 1 mM nátrium-szalicilát kezelés hatására 6 órával a kezelést követően mintegy 620-szorosra nőtt a génexpresszió a desztillált vizes kontrollhoz képest. Ezt követően a nátrium-szalicilát kezelés hatása gyorsan lecsengett és 24 órával a kezelés után már visszaállt a kontroll értékre (22. ábra). A magasabb, 5 mM nátrium-szalicilát koncentrációjú oldattal történő kezelés hatása szintén már hat órával a kezelés után már megfigyelhető volt (33-szoros génaktiválódás), de ez a hatás kisebb mértékű volt, mint az 1 mM koncentráció esetében. Az 5 mM nátrium-szaliciláttal kezelt levelekben 8 órával a kezelés után mintegy 380-szorosra nőtt a *WRKY70* gén expressziója (22. ábra), majd ezután a génaktiválás mértéke gyorsan lecsökkent, de még két nap után sem esett vissza teljesen a kontroll szintre.

Ezek a megfigyeléseink alátámasztották a szakirodalom korábbi eredményeit is (Li és mtsai. 2004), amelyek szerint *Arabidopsis thaliana* *WRKY70* gén expressziója nagymértékben indukálódik szalicilsav kezelés hatására.

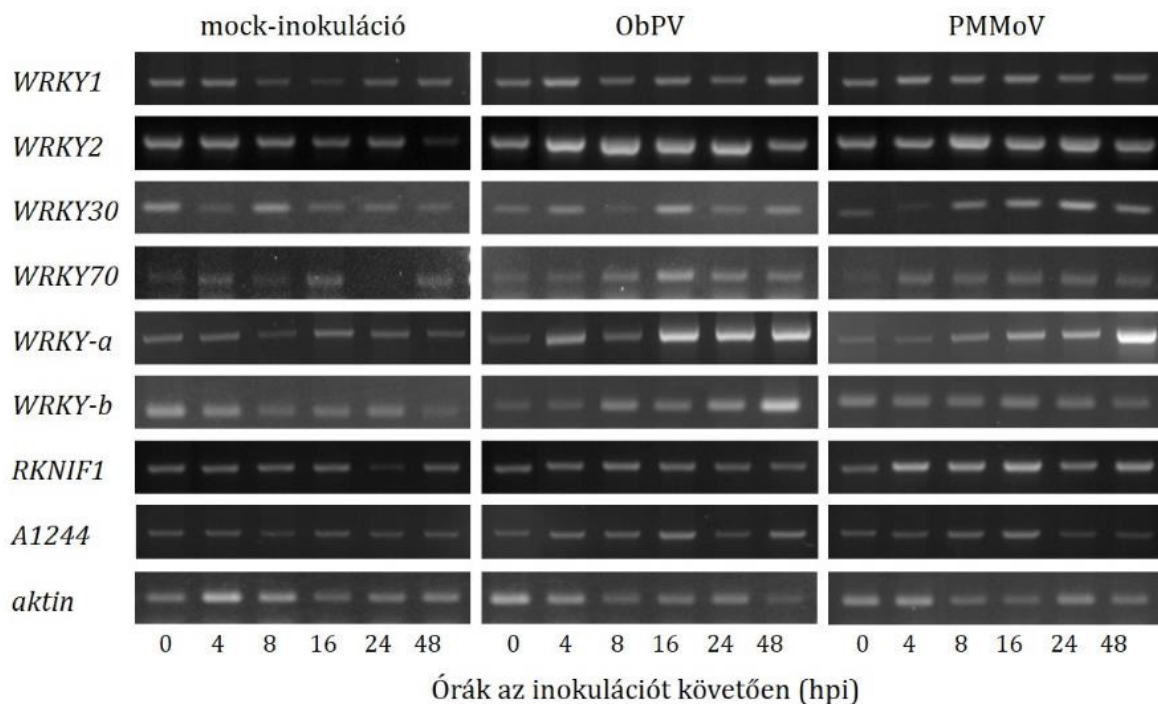


22. ábra. Különböző koncentrációjú vizes nátrium-szalicilát (NaSA) oldatokkal történő kezelések hatása a *WRKY70* gén kifejeződésére paprika levelekben, valós idejű RT-qPCR módszerrel vizsgálva. Az ábra három független kísérlet eredményeinek középértékét (\pm standard deviáció) mutatja be.

5.10.3. Tobamovírus fertőzések hatása paprika *WRKY* gének kifejeződésére

Megvizsgáltuk a *WRKY70* gén expressziójában bekövetkező változásokat ObPV- és PMMoV-inokulált paprika levelekben RT-PCR módszerrel és specifikus primerek segítségével. A fertőzéseket követő korai növényi választ vizsgáltuk (4-48 órával az inokuláció után). A génextpressziót vizes álfertőzésnek (mock inokulálás) kitett levelekben is mértük. Az ObPV-inokuláció hatására a *WRKY70* gén kifejeződése 48 óra után lényegesen megemelkedett, míg az PMMoV fertőzés hatására nem változott meg (23. ábra). Összehasonlításképpen további hét, a vizsgálataink időpontjában a GenBank-ban megtalálható paprika *WRKY* géntípusra terveztünk specifikus primer párokat és megvizsgáltuk a kifejeződésüket a fertőzött levelekben. A vizsgált gének GenBank-i azonosító számai: *WRKY1*: EF468464 (Oh és mtsai. 2008); *WRKY2*: DQ402421 (Oh és mtsai. 2006); *WRKY30*: FJ360844 (Jingyuan és mtsai. 2011); *WRKY70*: KF484401 (Juhász és mtsai., nem

publikált); *WRKY-a*: AY391747 (Park és mtsai. 2006); *WRKY-b*: AY743433 (Lim és mtsai. 2011); *RKNIF1*: DQ180348 (Li és mtsai., nem publikált); *A1244*: DQ102364 (Kim és mtsai., nem publikált); *aktin*: AY572427 (Mateos és mtsai. 2009). Három *WRKY* gén esetében (*WRKY1*, *RKNIF1*, *A1244*) egyik fertőzés sem változtatta meg számottevően a gén transzkriptumok mennyiségét (23. ábra). A *WRKY1* gén a II-c csoportba, az *RKNIF1* gén az I. csoportba, míg az *A1244* gén a II-e csoportba sorolható.



23. ábra. ObPV- és PMMoV-fertőzések hatása a *WRKY* gének kifejeződésére a fertőzött (inokulált) paprika levelekben RT-PCR módszerrel és specifikus primerekkel vizsgálva. A vizsgált gének GenBank-i azonosító számai: *WRKY1*: EF468464 (Oh és mtsai. 2008); *WRKY2*: DQ402421 (Oh és mtsai. 2006); *WRKY30*: FJ360844 (Zheng és mtsai. 2011); *WRKY70*: KF484401 (Juhász és mtsai. nem publikált); *WRKY-a*: AY391747 (Park és mtsai. 2006); *WRKY-b*: AY743433 (Lim és mtsai. 2011); *RKNIF1*: DQ180348 (Li és mtsai. nem publikált); *A1244*: DQ102364 (Kim és mtsai. nem publikált); *aktin*: AY572427 (Mateos és mtsai. 2009). Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

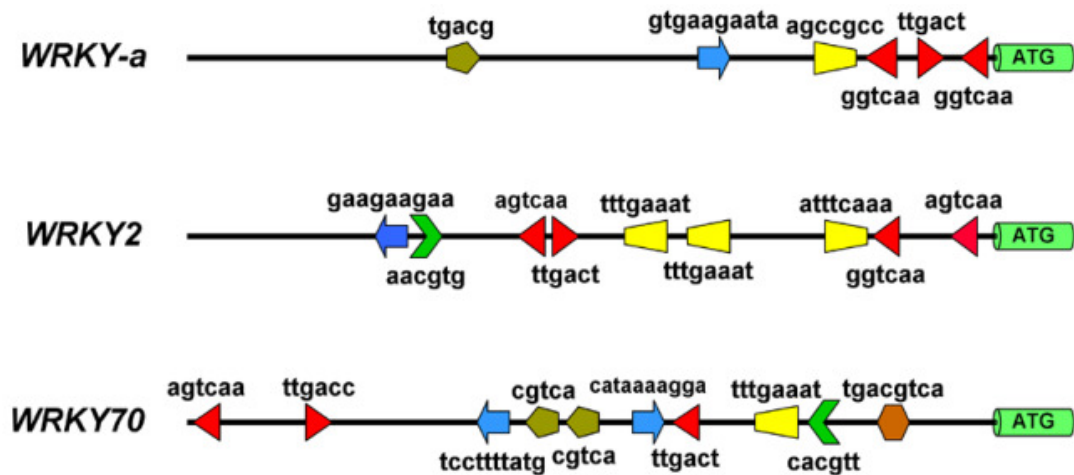
A fenti génektől eltérően az ObPV fertőzés jelentősen megnövelte a *WRKY30* (III. csoport) és a *WRKY-b* gének (II-c. csoport) transzkriptum mennyiségét 2 nappal a fertőzést követően, míg a PMMoV fertőzés nem okozott észrevehető változást (23. ábra). A *WRKY70* génhez hasonlóan a *WRKY30* szintén a *WRKY* gének III. csoportjába sorolható, és exogén szalicilsav kezeléssel jól aktiválható (Jingyuan és mtsai. 2011). A legnagyobb és

leggyorsabb gén-aktiválódásokat két, az I. csoportba sorolható *WRKY* gén esetében tapasztaltuk. Az ObPV-fertőzés hatására a *WRKY2* gén expressziója már a fertőzést követő 16. órában erőteljesen megemelkedett a fertőzött levelekben (23. ábra) ezt követően az expresszió szintje még erőteljesen tovább emelkedett. A PMMoV fertőzés nem növelte meg számottevően a *WRKY2* gén kifejeződését (23. ábra).

A *WRKY-a* gén transzkript mennyisége szintén jelentősen megemelkedett 16 órával az ObPV-fertőzést követően és a kísérlet végéig (48 óra a fertőzést követően) magas maradt. A PMMoV fertőzés szintén megnövelte a *WRKY-a* gén kifejeződését, de csak 48 órával a fertőzést követően (23. ábra). A kontroll, „háztartási gén”-ként vizsgált aktin expressziója nem változott meg jelentősen sem a vírusfertőzések, sem a vizes álfertőzés (mock-inokuláció) hatására.

5.10.4. Paprika *WRKY* gének promótereinek jellemzése

Három olyan paprika *WRKY* gén esetében végeztük el a promóter szekvenciák bioinformatikai, *in silico* vizsgálatát, amelyek a munkánk során kiemelt jelentőségűek voltak. A vírus-indukálható *WRKY-a* (GenBank AY391747) és a *WRKY2* (GenBank DQ402421) gént tranziens módon kifejező növényeket állítottunk elő (5.10.5 fejezet), míg a szalicilsav-indukálható *WRKY70* gén (GenBank KF484401) azonosítását, szekvenálását és jellemzését mi végeztük el. Mindhárom vizsgált paprika *WRKY* gén promóter szekvenciájában számos *cis*-szabályozó elemet azonosítottunk, ami arra utal, hogy ezen gének szabályozása komplex, számos tényező által meghatározott folyamat. Mindhárom *WRKY* gén promóterében több (3-4) W-boxot azonosítottunk (24. ábra), ami a *WRKY* transzkripció fehérjék kötőhelye. Ez mutatja, hogy a *WRKY* transzkripció faktorok szabályozhatják más *WRKY* gének, illetve a saját kódoló génjüknek az expresszióját is, lehetőséget adva ezzel pozitív vagy negatív visszacsatolásra is. Szintén mindhárom gén promóterében találtunk etilén által aktiválható, ún. ERE motívumokat is (24. ábra). A *WRKY2* gén promótere 3 ERE motívumot is tartalmazott, ami azt valószínűsíti, hogy ez a gén erősen etilén indukálható. Ezt valóban kimutatták már korábban etefon kezelés segítségével végzett kísérletekkel (Oh és mtsai. 2006). Szalicilsavval aktiválható nukleotid motívumokat is azonosítottunk mindhárom promóterben.



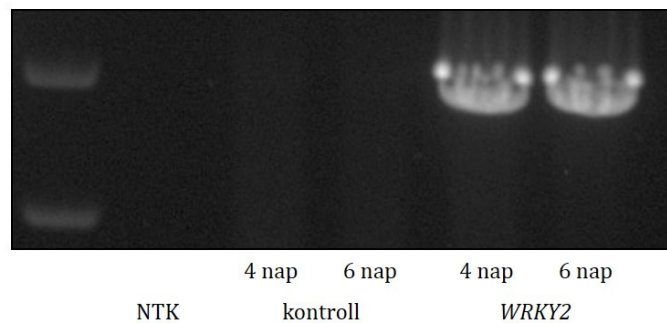
24. ábra. Betegség- és hormon-indukálható *cisz*-szabályozó nukleotid motívumok azonosítása három paprika *WRKY* gén 1500 bp hosszúságú promóter szekvenciájában. Az egyes szimbólumok jelentése: piros háromszög: *WRKY*-kötő *W*-box; sárga trapéz: etilén-aktiválható *ERE* elemek; oliva ötszög: *as-1*-szerű elemek; kék nyíl: szalicilsav-aktiválható *TCA*-típusú motívumok; barna hatszög: szalicilsav-aktiválható palindróm oktamer motívum; zöld nyílfej: jázmonsav-indukálható *G*-doboz-szerű motívum. A promóter *DNS* szakasz mindkét szálán azonosítottuk a szabályozó elemeket, a jobbra mutató szimbólumok a pozitív szálon talált elemeket jelölik, míg a balra mutatók a negatív szálon találtakat.

A *WRKY70* gén promóterében feltűnően sok szalicilsavval indukálható nukleotid motívumot találtunk, ami összhangban van saját kísérleti eredményeinkkel, amelyek igazolták a gén gyors és igen erős indukcióját 1 és 5 mM nátrium-szalicilát hatására. Ilyen motívumok voltak a két *TCA*-típusú *CATAAAAAGGA* elem (Pastuglia és mtsai. 1997), a két *as-1*-szerű *TGACG* motívum (Lebel és mtsai. 1998, Strompen és mtsai. 1998), valamint az érdekes palindróm szerkezetű, oktamer *TGACGTCA* motívum (Thibaud-Nissen és mtsai. 2006) (24. ábra). Ezek a motívumok kisebb számban, de megtalálhatóak voltak a *WRKY-a* és *WRKY2* gének promótereiben is. A jázmonsav hatására indukálható *G*-doboz-szerű *AACGTG* nukleotid elem (Memelink 2009) is azonosítható volt a *WRKY2* és *WRKY70* gének promótereiben (24. ábra). Az itt tárgyalt szabályozó nukleotid elemeken túlmenően számos más szabályozó elem is azonosítható a három *WRKY* gén promóterében (pl. számos fény hatására aktiválódó elem), amelyek azonban nem kapcsolódtak szorosan a kutatási témánkhoz. Meg kell jegyezni azt is, hogy az összes említett promóter elem nemcsak a promóter szakaszokban, de rendszertelen módon az egész paprika genomban

számos helyen előfordul, így a feltételezett szabályozó szerepüket minden esetben kísérletesen is igazolni kell.

5.10.5. A paprika *WRKY2* gént tranziens módon kifejező dohány létrehozása

Annak érdekében, hogy jobban megismerjük a *WRKY* géneknek a vírusfertőzött növények védekezésében betöltött szerepét, létrehoztunk olyan tranziens módon transzformált *Nicotiana benthamiana* növényeket, amelyekben a paprika *WRKY2* gén fokozottan fejeződött ki. Korábbi vizsgálataink során már kimutattuk, hogy a *WRKY2* paprika gén különösen erőteljesen és gyorsan indukálódott a rezisztenciát kiváltó ObPV-fertőzés hatására, míg a fogékonyságot eredményező PMMoV-fertőzés után csak kis mértékben és lassan aktiválódott, ezért ezt a gént választottuk ki *N. benthamiana* növények tranziens genetikai transzformációjához. Ezután megpróbáltuk felderíteni, hogy a *WRKY2* transzkripció faktor milyen védekezési gének expresszióját befolyásolja.

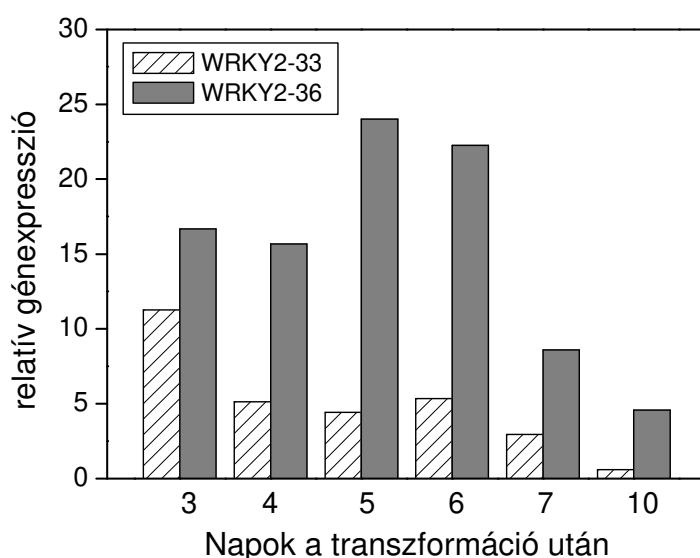


25. ábra. A paprika *WRKY2* gén kifejeződése tranziens módon transzformált *N. benthamiana* dohánynövények leveleiben 4 illetve 6 nappal az agrobaktériumos transzformáció után RT-PCR technikával detektálva. Specifikus primer pár: *WRKY2*-OSP (lásd 4.9. fejezet). A „kontroll” jelzésű növényeket üres expressziós vektort tartalmazó agrobaktérium törzssel transzformáltuk. NTK = nem transzformált kontroll növény. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

A paprika *WRKY2* gént tranziens módon kifejező *N. benthamiana* növények vizsgálatának első lépéseként megvizsgáltuk, hogy milyen eredményes volt a tranziens transzformáció. Ebből a célból először a *WRKY2* gént tartalmazó vektorral, illetve az üres expressziós vektorral transzformált *N. benthamiana* növények leveleiből a transzformációt követő 4. és 6. napon teljes RNS mintát izoláltunk, majd PCR technikával mutattuk ki a *WRKY2* gén

kifejeződését (25. ábra). Az előkísérletek igazolták, hogy a bevitt paprika gén erőteljesen kifejeződik, míg az üres expressziós vektorral transzformált kontroll levelekben nem volt megfigyelhető a *WRKY2* gén expressziója (25. ábra).

A következő kísérletben arra kerestünk választ, hogy a bevitt gén expressziója milyen tartós, hány napig figyelhető meg a transzformált levelekben. Ennek megállapításához valós idejű RT-qPCR technikával, specifikus primer pár segítségével (F1. táblázat, Függelék) detektáltuk a paprika *WRKY2* gén kifejeződését a transzformált *N. benthamiana* levelekben a transzformációt követő különböző időpontokban. A növényeket két független *E. coli* kolóniából felszaporított Gateway expressziós vektorral is transzformáltuk (ezeket 33 illetve 36 kódszámmal jelöltük). Mindkét transzformációs kísérlet esetén a *WRKY2* gén expressziója három nappal az Agrobaktériumos transzformációt követően már jól megfigyelhetően erőteljes volt (26. ábra), de a két transzformációs kísérlet eredményei jelentősen eltértek.



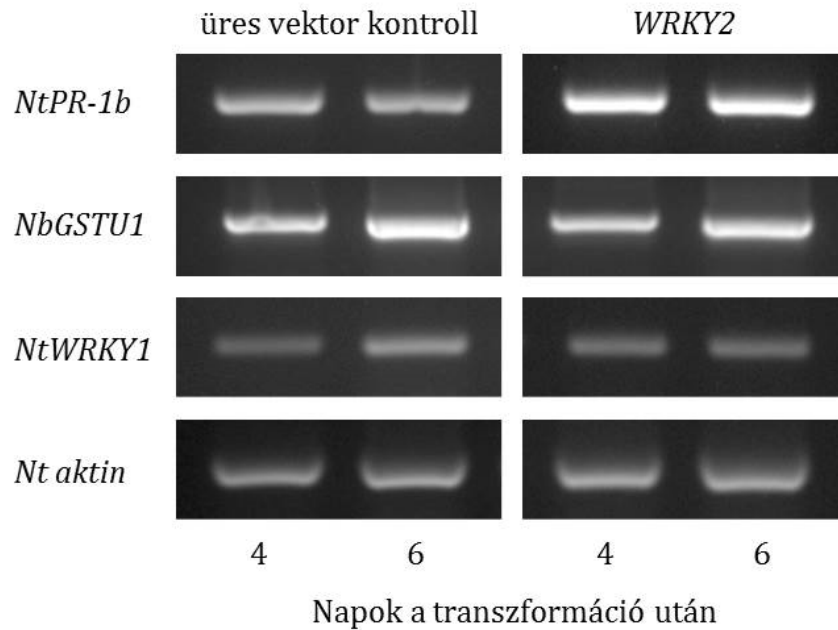
26. ábra. A paprika *WRKY2* gén kifejeződése tranziens módon transzformált *Nicotiana benthamiana* dohánynövények leveleiben valós idejű RT-qPCR technikával detektálva. Kontroll génként egy dohány aktin gén expresszióját is mértük, és ezekkel az értékekkel normalizáltuk a *WRKY2* expressziós értékeket. Az ábrán két független *E.coli* kolóniából (33 illetve 36 kódszámmal jelölve) felszaporított expressziós vektorral végzett transzformáció eredményeit mutatjuk be.

A 33 kódjelű expressziós vektorral történt transzformáció esetében a bevitt *WRKY2* gén expressziója a transzformációt követő 3 nap után csökkent, és 10 nap után már csak egy

kismértékű kifejeződés volt megfigyelhető. A 36 kódjelű expressziós vektorral transzformált növények leveleiben a *WRKY2* gén expressziója a transzformációt követő 5. napon érte el a legmagasabb értéket, de 7 nap után ebben az esetben is a génexpresszió mértéke erőteljesen visszaesett (26. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a tranziens génexpresszió annak ellenére is sikeres volt, hogy nem gátoltuk a *N. benthamiana* levelekben a transzformációt követően meginduló géncsendesítési folyamatokat a később tervezett TMV fertőzések miatt.

A kezdeti kísérleteket követően arra kerestünk választ, hogy a *WRKY2* gén tranziens kifejeztetése hogyan befolyásolja a vírusokkal szembeni védekezésben szerepet játszó egyes védekezési gének expresszióját a transzformált *N. benthamiana* növények leveleiben. Ezekben illetve az összes további kísérletben is csak a 36 kódjelű expressziós vektorral transzformált növényeket használtuk, mivel itt jelentősen magasabb volt a *WRKY2* gén expressziója, mint a 33 kódjelű vonalban.

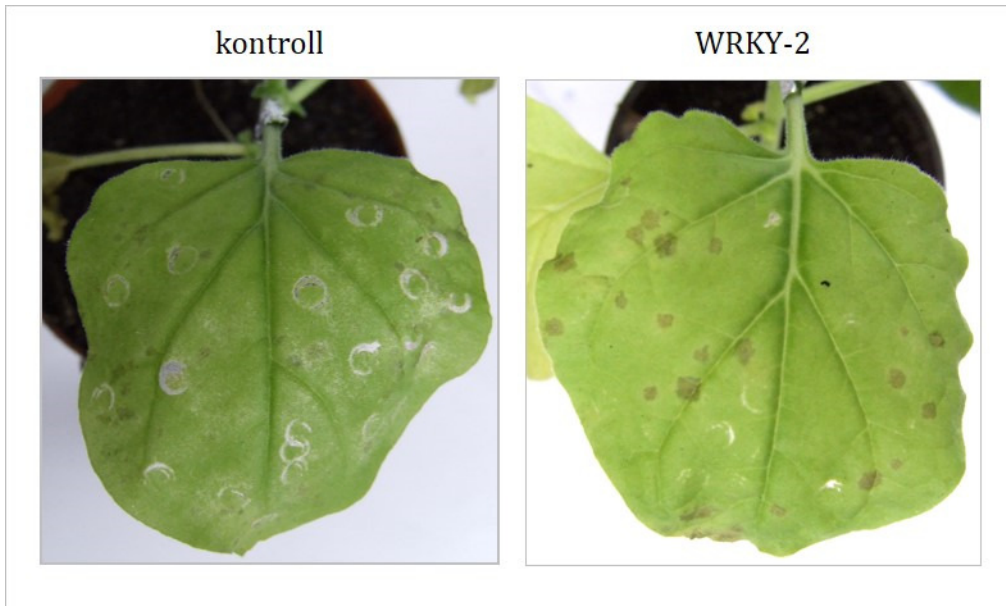
Három dohány gén, ill. géncsalád expresszióját vizsgáltuk, az *NtPR-1b* gént, mint rezisztencia-markert (Cornelissen és mtsai. 1986), a xenobiotikumok méregtelenítésében szerepet játszó glutation S-transzferáz Tau enzimcsalád kódoló génjeit egy degenerált primer pár (*NbGSTU1*) segítségével (Dean és mtsai. 2005), valamint egy elicitor kezelés hatására indukálódó dohány *WRKY* gént (*NtWRKY1*) (Yamamoto és mtsai. 2004). A *WRKY2* génnel történt transzformáció nem befolyásolta szignifikáns módon a *NbGSTU1* és *NtWRKY1* gének expresszióját a tranziens genetikai transzformációt követő 4. és 6. napon. Ezzel szemben ez a genetikai transzformáció jelentős hatást gyakorolt az *NtPR-1b* gén expressziójára. A *WRKY2* génnel transzformált levelekben a transzformációt követő 4. és 6. napon lényegesen nagyobb volt a *NtPR-1b* gén expressziója, mint az üres transzformációs vektorral transzformált levelekben (27. ábra).



27. ábra. A paprika *WRKY2* génnel történő genetikai transzformáció hatása három védekezési gén és a kontroll aktin gén expressziójára a tranziens módon transzformált *Nicotiana benthamiana* levelekben. Kontroll kísérletekben az üres expressziós vektorral transzformált *N. benthamiana* levelekben is detektáltuk a génexpressziós szinteket. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

5.10.6. A *WRKY2* gént tranziens módon kifejező dohány fertőzése TMV-vel

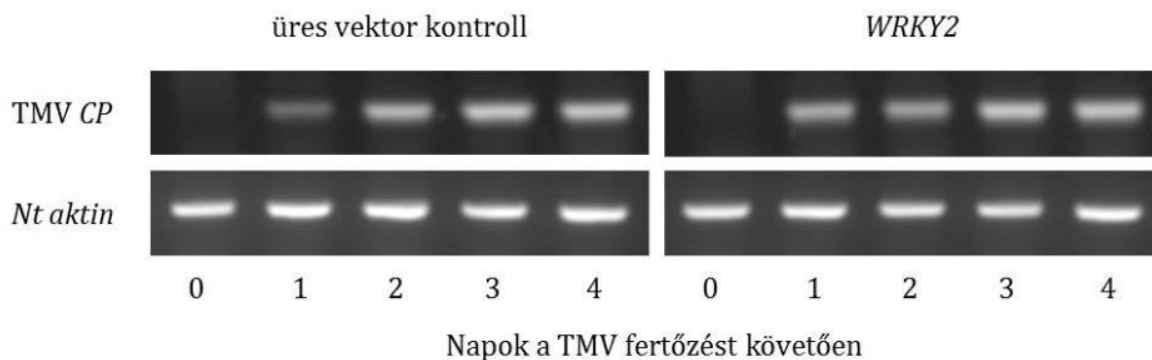
A *WRKY2* génnel transzformált növények egészséges (stresszmentes) állapotban történő jellemzése után megvizsgáltuk a transzformált növények védekezési reakcióit TMV fertőzést követően. A *N. benthamiana* növények *WRKY2* génnel illetve egy üres expressziós vektorral transzformált leveleit a transzformációt követő 4. napon mesterségesen fertőztük a TMV-U₁ törzsszel. Kontroll kísérletben mock-inokulációt (álfertőzést) is végeztünk. A TMV fertőzés következtében nekrotikus léziók jelentek meg mind a *WRKY2* génnel, mind az üres expressziós vektorral transzformált leveleken a fertőzést követő 4. napon (28. ábra). A nekrotikus léziók száma illetve átmérője nem tért el szignifikánsan a két kezelés között, ami azt mutatja, hogy a *WRKY2* gén tranziens kifejeződése nem befolyásolja a léziók kifejlődését. A mock-inokulált leveleken nem jelentkezték látható elváltozások.



28. ábra. TMV fertőzés hatására megjelenő nekrotikus léziók a paprika *WRKY2* génnel illetve az üres expressziós vektorral transzformált (kontroll) *Nicotiana benthamiana* növények levelein négy nappal a TMV fertőzést követően. Az ábrákon látható fehér, kör alakú elszíneződések az Agrobaktériumos infiltráció során keletkezett mechanikai sérülések. A kísérletet négy ismétlésben végeztük el, azonos eredménnyel.

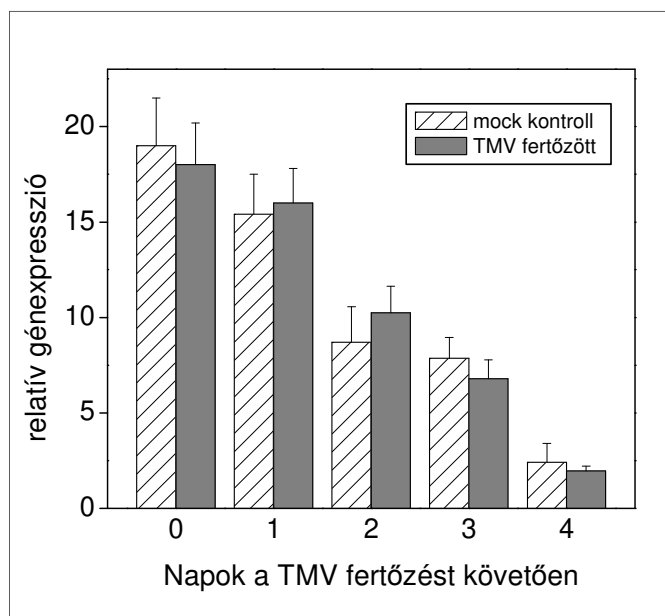
Ezután összehasonlítottuk a TMV replikáció sebességét a *WRKY2* génnel illetve az üres expressziós vektorral transzformált *N. benthamiana* levelekben a TMV fertőzést követő különböző időpontokban. A replikációt a TMV köpenyfehérjét kódoló *CP* gén transzkriptum mennyiségének a mérésével követtük RT-PCR technikával, specifikus primer pár (F1. táblázat, Függelék) segítségével. A fertőzött levelekből össz-RNS kivonást végeztünk, majd a reverz transzkripciót a specifikus primer pár reverz primerével és egy oligoT primerrel együtt végeztük. A kísérletek eredményei szerint a *WRKY2* génnel történt transzformáció nem befolyásolta szignifikánsan a TMV replikációját a fertőzött *N. benthamiana* levelekben (29. ábra).

Megvizsgáltuk azt is, hogy a TMV fertőzés megváltoztatja-e a beépített *WRKY2* gén expresszióját a transzformált *N. benthamiana* levelekben. A génexpressziót RT-qPCR technikával, specifikus primer pár (F1. táblázat, Függelék) segítségével detektáltuk a TMV-, illetve mock-inokulált levelekben. Az eredmények szerint a TMV fertőzés nem változtatja meg a *WRKY2* transzgén expresszióját a mock-inokulált kontroll kezeléssel összehasonlítva.



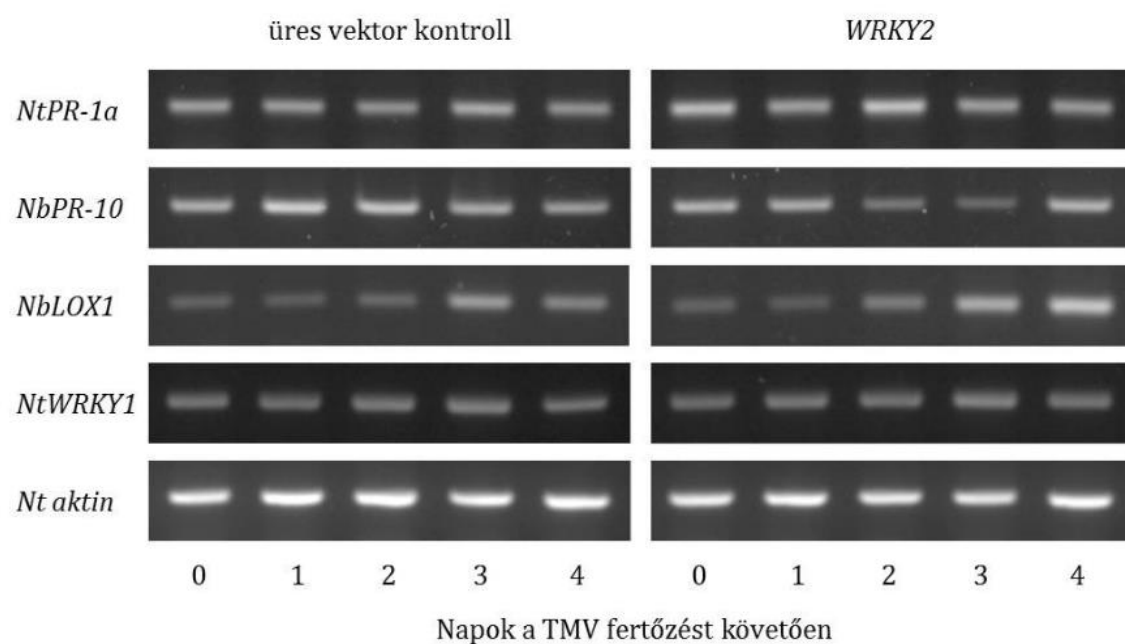
29. ábra. A TMV replikáció nyomonkövetése a paprika *WRKY2* génnel illetve az üres expressziós vektorral transzformált (kontroll) *Nicotiana benthamiana* levelekben a TMV fertőzést (inokulációt) követő különböző időpontokban. A TMV köpenyfehérjét (coat protein, CP) kódoló RNS mennyiségét szemikvantitatív RT-PCR alkalmazásával detektáltuk. A virális RNS reverz transzkripciójához az oligoT primer helyett a CP reverz primert használtuk. Konstitutív kontroll génként egy dohány aktin expresszióját is detektáltuk. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

Mind a TMV- mind a mock-inokulált levelekben a fertőzést követő napokban fokozatosan lecsökkent a beépített *WRKY2* transzgén expressziója (30. ábra).



30. ábra. A paprika *WRKY2* gén expressziójának változásai TMV- és mock-inokulált, a *WRKY2* génnel transzformált *Nicotiana benthamiana* levelekben a TMV-fertőzést követő különböző időpontokban. Az ábra három független kísérlet átlagát \pm a standard deviációt mutatja.

Ezután megvizsgáltuk, hogy a *WRKY2* génnel történő transzformáció hogyan befolyásolja egyes védekezési gének expresszióját a tranziens módon transzformált *N. benthamiana* levelekben a TMV fertőzés hatására. Négy védekezési gén expresszióját vizsgáltuk, két PR fehérjét kódoló gént (*NtPR-1a* és *NbPR-10*) mint rezisztencia-markereket (Pfitzner és Goodman 1987, Wu és mtsai. 2014), egy 9-lipoxigenázt (*NbLOX1*) (Huang és Schwab 2011) és egy elicitor kezelés hatására indukálódó dohány *WRKY* gént (*NtWRKY1*) (Yamamoto és mtsai. 2004).

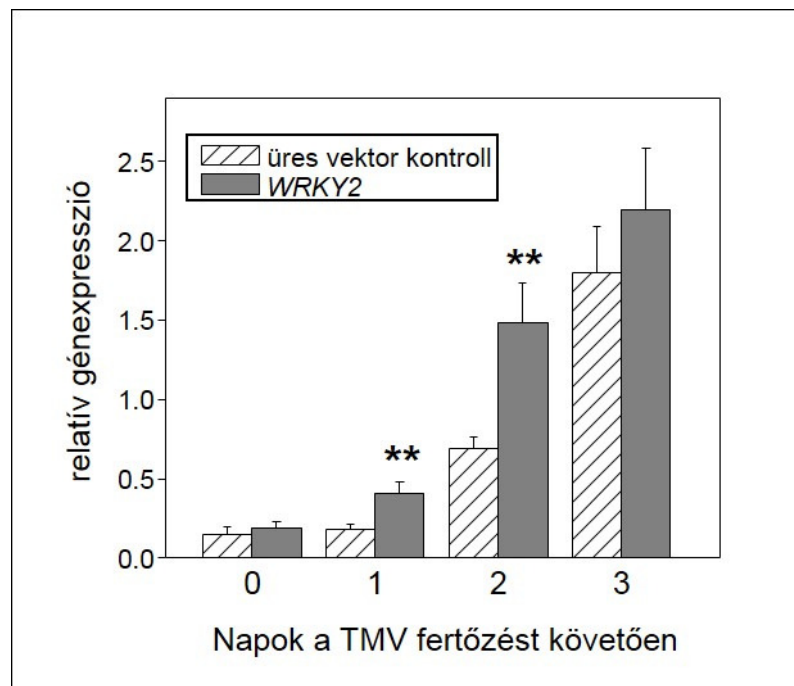


31. ábra. A paprika *WRKY2* génnel történő genetikai transzformáció hatása négy védekezési gén és a kontroll aktin gén expressziójára a tranziens módon transzformált *Nicotiana benthamiana* levelekben TMV fertőzést követően. Kontroll kísérletekben az üres expressziós vektorral transzformált *N. benthamiana* levelekben is detektáltuk a génexpressziós szinteket. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

A *WRKY2* génnel történt transzformáció a négy védekezési gén közül csak az *NbLOX1* gén expresszióját növelte meg szignifikáns módon, a többi három védekező gén expresszióját nem befolyásolta (31. ábra). A rezisztencia marker *NtPR-1a* és *NbPR-10* gének expresszióját nem változtatta meg a TMV fertőzés, sem a *WRKY2* génnel, sem az üres expressziós vektorral transzformált levelekben, ami azzal magyarázható, hogy a kompatibilis *N. benthamiana* - TMV kölcsönhatásban nem aktiválódnak ezek az inkompatibilis dohány - TMV kölcsönhatásokban megfigyelt védekezési reakciók. Az

NtWRKY1 gén expressziója nem változott meg szignifikánsan egyik növénycsoportban sem a TMV fertőzés hatására (31. ábra).

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a paprika *LOX* gének promóter régióiban számos WRKY transzkripció faktorot kötő nukleotid motívum (W-box) található. Feltehetően az *NbLOX1* gén promóter régiójában is megtalálhatóak ezek a motívumok, amely megmagyarázhatja azt, hogy a *WRKY2* génnel végzett transzformáció miatt befolyásolta az *NbLOX1* gén kifejeződését a TMV fertőzött *N. benthamiana* növények leveleiben. A *WRKY2* génnel végzett transzformáció hatását az *NbLOX1* génre valós idejű RT-qPCR technikával kvantitatív módon is megvizsgáltuk. Ehhez össz-RNS kivonást végeztünk a *WRKY2* génnel illetve az üres expressziós vektorral transzformált *N. benthamiana* levelekből a TMV fertőzést követő különböző időpontokban, majd egy



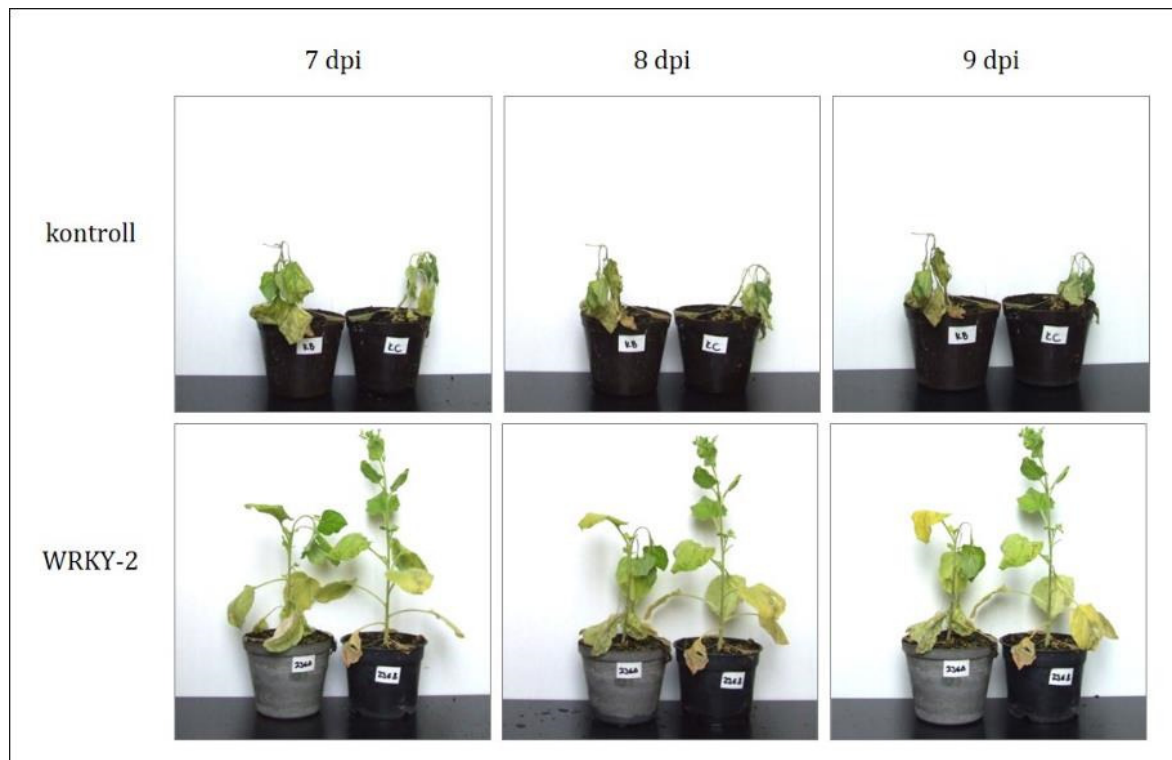
32. ábra. A lipoxigenáz-1 (*NbLOX1*) gén expressziójának aktiválódása TMV fertőzés hatására a paprika *WRKY2* génnel, illetve egy üres expressziós vektorral transzformált *N. benthamiana* növények leveleiben a TMV fertőzést követő különböző időpontokban. A valós idejű RT-qPCR méréseket génspecifikus primer párral végeztük. Egy aktin gén kifejeződését konstitutív kontrollnak használtuk. Az ábrán mutatott értékek három független párhuzamos mérés eredményei \pm standard hiba. Az ábra jelölései: ** mutatják a szignifikáns eltéréseket a *WRKY2* transzformált és kontroll, üres vektorral transzformált növények között P = 1% szinten.

specifikus primer pár (F1. táblázat, Függelék) segítségével megmértük az *NbLOX1* expresszióját. A TMV fertőzést megelőzően a *NbLOX1* expressziója nem tért el szignifikáns

módon a *WRKY2* génnel és az üres expressziós vektorral transzformált levelek között, de a TMV fertőzés hatására a génexpresszió mindkét csoportban jelentősen megemelkedett (32. ábra). Az eredmények igazolták a feltételezésünket, TMV fertőzés hatására a vizsgált *NbLOX1* gén expressziója szignifikánsan nagyobb mértékben aktiválódott a *WRKY2* génnel transzformált levelekben, mint a kontroll, üres expressziós vektorral transzformált levelekben. Egy nappal a TMV fertőzést követően a *WRKY2* génnel transzformált levelekben 2,3-szor magasabb volt a *NbLOX1* gén expressziója, mint a kontroll levelekben, majd az ezt követő napokban lassan csökkent a különbség a két kezelés között (32. ábra).

A TMV fertőzés kezdeti, látható lokális tüneteivel szemben a *WRKY2* génnel történő transzformáció igen jelentősen befolyásolta a TMV fertőzés későbbi, az egész növényre kiterjedő következményeit. Ismeretes, hogy a TMV fertőzés szisztemikus nekrotizhoz, a növények teljes elpusztulásához vezet *N. benthamiana* növények esetében (Culver 1996). A mi kísérleteinkben is megfigyelhető volt a gyors szisztemikus nekrotizis, ami egy héttel a TMV fertőzés után már a növény teljes pusztulását okozta (33. ábra). A *WRKY2* génnel történő transzformáció nem akadályozta meg ugyan a szisztemikus elhalást a transzformált *N. benthamiana* esetében, de igen jelentősen, mintegy 3 nappal késleltette azt (33. ábra). A mock-inokulált növények esetében nem jelentkeztek látható tünetek.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a paprika *WRKY2* gén kifejeződése a *N. benthamiana* növényekben jelentősen gátolja a vírus szisztemikus tüneti hatását. Feltételezésünk szerint a gén által kódolt *WRKY2* transzkripciós faktor olyan géneket aktivál a TMV fertőzött növényekben, amelyek géntermékei a vírus szisztemikus elterjedését gátolják, illetve késleltetik. A jövőbeni kísérleteinkben ezért a TMV-fertőzött *N. benthamiana* növények szisztemikus leveleiben fogjuk vizsgálni a *WRKY2* génnel végzett transzformáció hatásait.



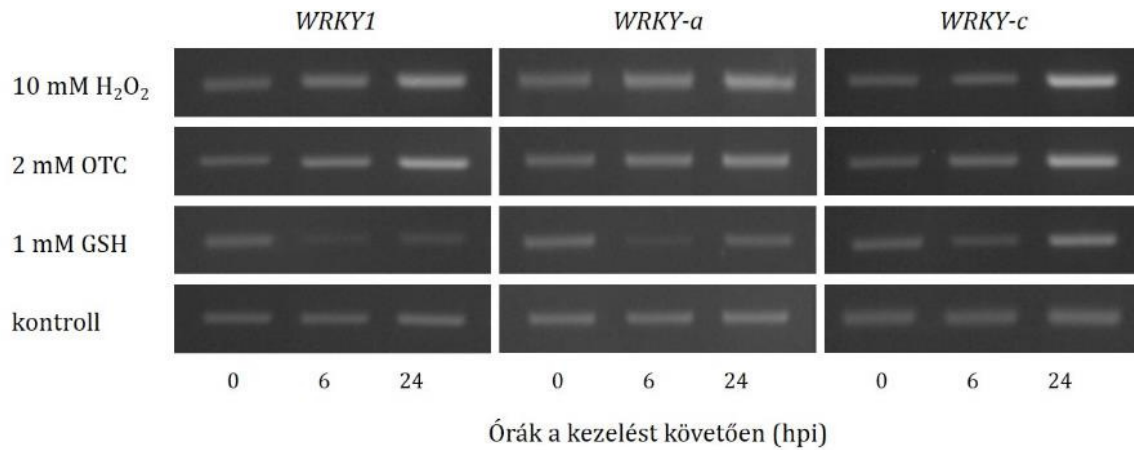
33. ábra. TMV fertőzés hatására fellépő szisztemikus nekrosis a paprika *WRKY2* génnel, illetve az üres expressziós vektorral transzformált (kontroll) *Nicotiana benthamiana* növények esetében 7, 8 és 9 nappal a TMV fertőzést követően (dpi). A TMV fertőzést (inokulációt) a három, korábban agroinfiltrált levélen végeztük el. A kísérletet négy ismétlésben végeztük el, azonos eredménnyel.

5.10.7. Redox-aktív anyagok hatása a *WRKY* gének expressziójára

Három redox-aktív anyaggal (H_2O_2 , L-2-oxo-4-thiazolidin-karboxilsav (OTC) és redukált glutation (GSH)) végzett kezelések után vizsgáltuk három paprika *WRKY* gén expresszióját. A redox kezelések közül a legnagyobb hatású a redukáló ágens 1 mM GSH oldattal történő kezelés volt, amely 6 óra inkubáció után igen jelentősen lecsökkentette mindhárom vizsgált *WRKY* gén expresszióját (34. ábra).

A génexpresszió visszaszorulása a *WRKY1* gén esetében 24 órás inkubálás után is számottevő volt, míg a *WRKY-a* és *WRKY-c* gének expressziója visszatért a kontroll kezelés szintjére (34. ábra). Az OTC a növényi sejtekben ciszteinné, majd GSH-vá alakul át, így egy szintetikus GSH prekuzornak tekinthető (Faragó és Brunold 1994, Gullner és Dodge 2000). Az OTC kezelések, a GSH kezelésekkal ellentétben, nem befolyásolták lényegesen a *WRKY* gének kifejeződését (34. ábra). Az oxidáló hatású kezelés 10 mM hidrogén-

peroxiddal jelentősen megnövelte a *WRKY-c* gén transzkriptumának a mennyiségét 24 órás inkubálás után, de a másik két vizsgált *WRKY* gén expresszióját nem változtatta meg (34. ábra).



34. ábra. Redox-aktív anyagokkal történő kezelések hatása *WRKY* gének expressziójára paprika levélkorongokban RT-PCR módszerrel kimutatva, specifikus primer párok segítségével. Az ábrán bemutatott agaróz gélek képek két független biológiai kísérlet reprezentatív eredményei. GSH: glutation, OTC: L-2-oxo-4-thiazolidin-karboxilsav. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

6. Az eredmények értékelése

A vizsgálataink kezdetén az volt a munkahipotézisünk, hogy a kompatibilis és inkompatibilis paprika - tobamovírus kölcsönhatások során bekövetkező biokémiai változások összehasonlítása segíthet a vírusokkal szembeni rezisztencia alapjainak jobb megismerésében. A vírusfertőzések során a növényi sejtek citoszóljába mikrosérüléseken vagy rovarok segítségével bejutott vírusokat általában rezisztencia fehérjék (R-fehérjék) ismerik fel (Padmanabhan és Dinesh-Kimar 2014). A kórokozó felismerése jelátviteli folyamatokat indít el, amelyekben védekezési hormonok és transzkripciós faktorok játszanak fontos szerepet. A jelátviteli folyamatok eredményeként a növényi sejtmagban nagymértékű transzkripciós újraprogramozás játszódik le, nagyszámú védekezési gén aktiválódik, míg más gének expressziója lecsökken (Singh és mtsai. 2002, Moore és mtsai. 2011). Ha a védekezési folyamatok erőteljesen és gyorsan aktiválódnak, akkor sikeresen gátolhatják a vírus replikációját illetve a növény különböző szöveteibe történő eljutását (inkompatibilis kölcsönhatás). Ellenkező esetben, a növény lassú és gyenge válasza esetén a vírusfertőzés sikeres lesz (kompatibilis kölcsönhatás), a betegség kialakul, ami különböző tünetekhez, a növény törpüléséhez vagy elpusztulásához vezet. Ezért vizsgálataink során olyan biokémiai változásokat kerestünk, amelyek a vírusfertőzést követő korai időpontokban és erőteljesen jelentkeznek az inkompatibilis paprika - tobamovírus kölcsönhatás során, míg a kompatibilis kölcsönhatás során nem, vagy csak kis mértékben figyelhetőek meg. Feltételezésünk szerint ezek a gyorsan aktiválódó reakciók szerepet játszanak a vírus-rezisztenciában és megismerésük elősegítheti a rezisztencia jobb megértését.

Vizsgálatainkhoz az L^3 rezisztencia gént tartalmazó TL 1791 paprika nemesítési vonalat (*Capsicum annuum* L.) választottuk, amelynek leveleit két különböző tobamovírral (ObPV és PMMoV) fertőztük. Az ObPV inokulációt követően kimutatható volt a H_2O_2 felhalmozódása a fertőzött levelekben (4. ábra), ami a vírusfertőzést követő oxidációs stresszre utal (Hernández és mtsai. 2016). A paprika leveleket PMMoV-val inokulálva megfigyelhető volt a vírus gyors replikációja (6. ábra) illetve a paprika kórfolyamathoz kapcsolt fehérjéit (PR-fehérjéket) kódoló géneknek az igen gyenge expressziója vagy az expresszió hiánya (8. ábra). Ezek a reakciók mutatják a kölcsönhatás kompatibilis jellegét. A PMMoV fertőzés sikerességét mutatta a vírus köpenyfehérje

gyorsan növekvő mennyisége is a paprika levelekben, amit "Western blot" technikával sikerült kimutatni mind a fertőzött alsó mind a nem-fertőzött szisztémikus levelekben (5. ábra). Az ObPV-el történő inokuláció után kismértékű vírusreplikáció volt megfigyelhető (6. ábra), ami bizonyítja az L^3 rezisztenciagén hatásosságát ezzel a vírussal szemben. Az ObPV-fertőzött levelekben megfigyelhető volt a *PR* gének gyors és igen erőteljes aktiválódása is. Az ObPV által kiváltott növényi immunitás meglétét bizonyítja többek között a *PR* gének transzkriptumainak nagymértékű akkumulációja. Az ObPV fertőzés a *BPR-1*, *PR-4* és *PR-10* gének jelentős indukcióját váltotta ki (8. ábra), melyek jól ismert antivirális növényi rezisztencia markerek (van Loon és mtsai. 2006). Ezek az eredmények igazolják a paprika - ObPV kölcsönhatás inkompatibilis jellegét. Mivel a PR-10 fehérje ribonukleáz aktivitást mutatott a TMV RNS-ével szemben (Park és mtsai. 2004), ezért elképzelhető, hogy ez a fehérje ténylegesen hozzájárul a paprika ObPV-vel szemben kialakított rezisztenciájához. Korábbi eredmények szerint 11, 18, 21 és 28 kDa molekulatömegű, tripszin ellenálló PR-fehérjék halmozódnak fel az ObPV-inokulált paprika levelekben (Tóbiás és mtsai. 1989). Kísérleteinkben a PMMoV fertőzött levelekben a *BPR-1*, *PR-4* és *PR-10* gének indukciója elhanyagolható volt (8. ábra).

Érdekes megfigyelés volt a kísérleteink során egy paprika defenzin gén korai időpontokban történő indukálása ObPV fertőzés esetében (9. ábra). A paprika defenzin és tionin gének szerepét már korábban kimutatták abiotikus stresszhatások és bakteriális fertőzések esetében. Ezek a gének növényi védekezési hormonokkal is gyorsan és erőteljesen indukálhatóak (Lee és mtsai. 2000, Do és mtsai. 2004). A magas cisztein tartalmú defenzin fehérje szerepe a vírus-rezisztenciában még ismeretlen.

A vírusfertőzés szignifikánsan megváltoztatja az intracelluláris membránlipidek anyagcseréjét a fertőzött növényi sejtekben különböző biokémiai mechanizmusok által (Stapleford és Miller 2010, Ishibashi és mtsai. 2012). Azonban kevés információ van a LOX enzimek által katalizált többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációjáról, habár ezeket a reakciókat kapcsolatba hozhatjuk a vírusok elleni rezisztenciával. Ahhoz, hogy felderítsük a LOX-ok szerepét az antivirális rezisztenciában, összehasonlítottuk a *LOX* gének expresszióját is az inkompatibilis és kompatibilis paprika-tobamovirus kölcsönhatásokban, annak érdekében, hogy találjunk az inkompatibilis reakcióban specifikusan aktiválódó géneket.

A *LOX* gének indukcióját és a fokozott *LOX* enzimaktivitást számos növény-patogén kölcsönhatásban vizsgálták már (Slusarenko 1996, Rancé és mtsai. 1998, Kolomiets és mtsai. 2000, Göbel és mtsai. 2001, García-Marcos és mtsai. 2013). A *LOX* aktivitás fokozódása általában korrelált a növényi betegségellenállósággal, így ez a hatás általában elhanyagolható volt a kompatibilis növény-patogén kölcsönhatásban (Slusarenko 1996). A kutatócsoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy három *9-LOX* gén expressziója jelentősen megnövekedett az ObPV inokulált levelekben, de csak igen kevésbé a PMMoV fertőzött levelekben (Gullner és mtsai. 2010). A saját vizsgálataink kezdetén csak egy paprika *LOX* gén szekvenciája volt elérhető az NCBI GenBank-jában (*LOX1*, FJ377708). Annak érdekében, hogy több információt szerezzünk a *LOX* gének szerepéről a vírusfertőzött paprika növényekben, további *LOX* géneket klónoztunk és szekvenáltattunk. Az új *LOX* gének szekvenciáinak segítségével specifikus PCR primereket terveztünk az expressziójuknak a jellemzésére. A munkánk során három *LOX* gén teljes illetve egy további *LOX* gén részleges fehérjekódoló szekvenciáját határoztuk meg. Ezeket a szekvenciákat a GenBankban is elhelyeztük: *13-LOXa* (JF304313), *9-LOXb* (DQ473539), *13-LOXc* (KC404864) és *9-LOXd* (DQ473540). Jellemeztük az új *LOX* gének expressziós mintázatát ObPV- és PMMoV-fertőzött levelekben valós idejű RT-qPCR-rel, annak érdekében, hogy többet tudjunk meg a *LOX*-ok szerepéről az antivirális rezisztenciában. Összehasonlítottuk továbbá a két *13-LOX* gén és a három *9-LOX* gén expresszióját a vírusfertőzött levelekben. Mind az öt *LOX* gén aktiválódott ObPV fertőzés hatására, de csak négy *LOX* gént aktivált a PMMoV (11. ábra). A kísérleteinkben a *9-LOX* gének indukciója jóval erőteljesebb volt az inkompatibilis paprika- ObPV kölcsönhatásban, mint a kompatibilis paprika- PMMoV kölcsönhatásban (11. ábra), mely alátámasztja az előzetes szemikvantitatív RT-PCR kísérleteinket (Gullner és mtsai. 2010). Ezzel ellentétben a két új *13-LOX* gén expressziója nem különbözött jelentős módon a kompatibilis és inkompatibilis paprika-vírus kölcsönhatásban (11. ábra), ami arra utal, hogy ezek a gének kevésbé fontosak az antivirális védekezési mechanizmusokban, mint a *9-LOX* gének. A *9-LOX* reakcióút preferenciáját figyelték meg elicitorral kezelt burgonyában is (Göbel és mtsai. 2001). Ezek a transzkripciós változások megelőzték a nekrotikus tünetek megjelenését (72 óra) és a teljes *LOX* enzimaktivás emelkedését ObPV-fertőzött levelekben (72 óra). *Arabidopsis*-ban a *9-* és *13-LOX* transzkriptum felhalmozódása is kimutatható CMV-fertőzést követően (La Camera és mtsai. 2009). Az újjanban azonosított

13-LOXa és 13-LOXc génekből következtetett fehérjeszekvenciák nagyfokú hasonlóságot mutattak a *Nicotiana attenuata* NaLOX2 fehérje szekvenciájával. Korábban már bizonyították, hogy a NaLOX2 fehérje által termelt lipid hidroperoxidokat a növény döntő mértékben az illékony C₆ oxilipinek bioszintéziséhez használja fel (Allmann és mtsai. 2010), ami arra utal, hogy a paprika 13-LOXa és a 13-LOXc fehérjéknek hasonló szerepük lehet a vírusfertőzött paprika levelekben.

A 9-LOX gének korai és erőteljes aktivációja többféleképpen hozzájárulhat a paprika vírusokkal szembeni rezisztenciájához. A LOX enzimek részt vehetnek a nekrotikus léziók kialakításában az inkompatibilis paprika-vírus kölcsönhatás során (Cacas és mtsai. 2005). Ezen kívül a 9-LOX enzimek részvételével termelődő bioaktív oxilipinek részt vehetnek különböző védekezési reakciókban (Weichert és mtsai. 1999, La Camera és mtsai. 2009). A harmadik lehetőségként a vírusfertőzés hatására aktiválódó, membránhoz kötött LOX enzimek módosíthatják az intracelluláris növényi membránok szerkezetét olyan módon, hogy ezzel akadályozzák a vírus replikációját. A sejten belüli membránok nélkülözhetetlenek a vírus RNS replikációjához. A pozitív szálú RNS vírusok jelentősen módosítják a növényi intracelluláris membránokat annak érdekében, hogy a replikációjukhoz védett környezetet hozzanak létre. A vírus-indukált membránstruktúrák szükségesek ahhoz, hogy elszigeteljék a replikáció során köztestermékként képződő virális dupla szálú RNS-t (dsRNS), ami egyébként aktiválhatná a növény vírus-indukált géncsendesítési védekezési reakcióit (Stapleford és Miller 2010, Chukkapalli és mtsai. 2012). A védett környezetben a vírusreplikáció membránhoz kötött RNS replikációs komplexekben történik. A replikációs komplexeket tartalmazó membrán "zsebek" különböző növényi intracelluláris sejt szervecskék membránjaiból alakulhatnak ki az egyes vírusok eltérő membrán-szelektivitása szerint (Lee és mtsai. 2001, Ishibashi és mtsai. 2012). Az RNS szintézis nagyon érzékeny a fogadó membránok lipidösszetételére, különös tekintettel a többszörösen telítetlen zsírsavakra (Lee és mtsai. 2001), melyek a LOX enzimek szubsztrátjai. Érdekes módon a Rozsnok mozaik vírus (*Brome mosaic virus*, BMV) replikációja jelentősen gátlódott élesztőben az *OLE1* gén mutációja következtében, amely gén egy delta-9-zsírsav deszaturáz (FAD) enzimet kódol (Lee és mtsai. 2001). Ez az eredmény bizonyította, hogy a virális RNS szintézis nagyon érzékeny a lipid összetételre, különösen a telítetlen zsírsavak szintjére. A LOX izoenzimek ismert módon képesek kötődni a növényi membránokhoz (Fornaroli és mtsai. 1999),

feltehetően az N-terminális PLAT doménjük segítségével, amely érzékeny az intracelluláris kalcium szintre (Newcomer és Brash 2015). A LOX enzimek képesek peroxidálni a szabad és membránhoz kötött többszörösen telítetlen zsírsavakat is (Chechetkin és mtsai. 2011, Nakashima és mtsai. 2011), és ezért jelentősen befolyásolhatják a vírusreplikációt. Ha a LOX-ok által okozott változások az intracelluláris növényi membrán szerkezetben csökkentik vagy súlyosan akadályozzák a vírus replikációját, a LOX enzimek aktivációja jelentősen hozzájárulhat az antivirális növényi rezisztenciához. Természetesen további kísérletek szükségesek a hipotézis bizonyítására.

A *LOX* gének expresszióját jelentősen befolyásolják a védekezéssel kapcsolatos hormonok (Nemchenko és mtsai. 2006, Porta és mtsai. 2008). Megvizsgáltuk öt paprika *LOX* gén expresszióját nátrium-szaliciláttal, metil-jazmonáttal és az etilén prekursor 1-amino-ciklopropán-1-karboxilsavval (ACC) kezelt paprika levelekben. A *LOX* gének igen különböző expressziós mintázatot mutattak a hormonkezeléseket követően. A nátrium-szalicilát és a metil-jazmonát mind az öt *LOX* gént aktiválta, de nagyon különböző mértékben és időprofilban. Az etilén prekursor ACC csak a *9-LOX1*, *13-LOXa* és *9-LOXb* gén expresszióját növelte meg (12-13. ábra). Egy korábbi közlemény az etilén gyors és jelentős akkumulációjáról számolt be az ObPV-fertőzött levelekben (Tóbiás és mtsai. 1989).

Az öt *LOX* gén promóterében számos szabályozó *cis*-elemet azonosítottunk. Korábban már azonosítottak a kukorica *LOX* gének promóterében patogénekkal és hormonokkal kapcsolatos szabályozó elemeket (Nemchenko és mtsai. 2006). Általában nagyszámú transzkripció faktor indukálódik összehangoltan a vírusfertőzött és hormonkezelt növényekben, melyek különböző szabályozó *cis*-elemekhez kötődhetnek a célgének promóterein, így szabályozva az expressziójukat. Ezért több szabályozó *cis*-promóter elem jelenléte és együttműködése határozza meg a szabályozott gén expresszióját. A kísérleteinkben feltártuk a *LOX* gének 1500 bp hosszúságú promóter szakaszán található, az etilén válaszáért felelős szekvencia-motívumok (ERE) száma és a *LOX* gének ACC indukálhatósága közötti összefüggést (13. és 15. ábra). Az ERE motívumok valódi biológiai jelentőségét a jövőben kísérletekkel még ellenőrizni kell. A *LOX* gének közül négy gén promóterében megtalálható volt a W-box nukleotid motívum, mely biztosítja a WRKY transzkripció faktorok kötődését a promóterhez (15. ábra). A WRKY transzkripció faktorokról kimutatták, hogy jelentősen indukálódnak vírusfertőzés (Oh és

mtsai. 2008, Huh és mtsai. 2015) és hormonkezelés (Lim és mtsai. 2011) hatására paprikában. A WRKY transzkripciós faktorok közreműködnek a hormonokkal kapcsolatos gén aktivációban is. Egy szalicilsav-érzékeny receptor kináz teljes expressziójához egy W-box volt szükséges *Brassica oleracea*-ban (Rocher és mtsai. 2005). A WRKY transzkripciós faktorok részt vesznek a jázmonsav-szabályozott génaktivációban is (McGrath és mtsai. 2005).

A LOX anyagcseréhez szorosan kapcsolódik a 9-LOX és 13-LOX izoenzimek közreműködésével termelt oxilipinek képződése. Ezért az oxilipinek bioszintézisében szerepet játszó gének expresszióját szintén megvizsgáltuk az ObPV és PMMoV fertőzött növényekben. Első lépésként a GenBank-ban található szekvencia-adatok alapján azonosítottuk a szóba jöhető géneket (16. ábra). Ezután kilenc gén expresszióját követtük a vírus-, illetve mock inokulált levelekben szemikvantitatív RT-PCR technikával. Korábbi vizsgálatokkal (Gullner és mtsai. 2010) összhangban jelentősen megemelkedett *9-DES* génexpressziót találtunk az ObPV inokulált paprika levelekben (17. ábra). Új eredmény a *9-HPL1* és *9-HPL2* gének erőteljes és igen korai indukciója a PMMoV-fertőzött levelekben. A 9-HPL enzimek a 9-DES enzimekhez hasonlóan a citokróm P-450 enzimcsaládba tartoznak (CYP74B alcsalád) (Howe és Schillmiller, 2002). A *9-HPL* gén által kódolt enzimek a 18 szénatomot tartalmazó 9-hidroperoxi-zsírsav láncokat hasítják el két 9 szénatomos vegyületre, egy aldehidre illetve egy oxo-karboxilsavvá. A két kettős kötést tartalmazó 9(S)-hidroperoxi-10(E),12(Z)-oktadekadiénsav szubsztrát esetében a 9-HPL enzimaktivitás termékei a (3Z)-nonenál és a 9-oxo-nonánsav, míg a három kettős kötést tartalmazó 9(S)-hidroperoxi-10(E),12(Z),15(Z)-oktadekatriénsav szubsztrát esetében a termékek a (3Z,6Z)-nonadienál és a 9-oxo-nonánsav (Noordermeer és mtsai. 2001, Mita et al 2005). Egy mandula magvakból izolált 9-HPL enzim vizsgálatokor a (2E)-nonenált azonosították GC-MS technikával, mint az enzimaktivitás fő termékét (Mita és mtsai. 2005). A (2E)-nonenál valószínűleg a (3Z)-nonenál izomerizációjával alakul ki. A PMMoV-fertőzött levelekben kimutatott erősen indukálódott *9-HPL* expresszió szerepe és jelentősége a vírushoz fertőzött paprika levelekben egyelőre teljesen ismeretlen, feltárásához további vizsgálatok szükségesek, így a (3Z)-nonenál, (2E)-nonenál, (3Z,6Z)-nonadienál és a 9-oxo-nonánsav szintjének GC-MS mérése a fertőzött paprika levelekben.

Kutatócsoportunk lengyel kooperációban UHPLC-MS/MS technikával kimutatta, hogy az ObPV-fertőzött paprika levelekben több növényi hormon szintje igen jelentős mértékben megemelkedik (Dziurka és mtsai. 2016). Három nappal az ObPV fertőzést követően jelentősen megnőtt a mock-kontrollhoz képest nemcsak a szalicilsav és a jázmonsav szintje (73-szorosra illetve 8-szorosra), de megemelkedett az abszcizinsav, indol-3-ecetsav, indol-3-butánsav, a *cisz*-zeatin, *cisz*-zeatin-9-ribozid és a *transz*-zeatin-9-ribozid szintje is a fertőzött levelekben. A szisztémikus, nem fertőzött levelekben 20 nappal az alsó levelek ObPV inokulációja után nem találtunk szignifikáns változásokat ezeknek a hormonoknak a szintjében. A PMMoV inokuláció hatására csak a gibberellinsav és a szalicilsav szintje változott meg a fertőzött levelekben (Dziurka és mtsai. 2016). A hormon analízishez kapcsolódva megvizsgáltuk több olyan paprika gén expresszióját az ObPV- és PMMoV-inokulált paprika levelekben, amelyek által kódolt fehérjék meghatározó szerepet játszanak a hormonok bioszintézisében. A szemikvantitatív RT-PCR vizsgálataink szerint az ObPV-inokuláció jelentősen aktiválta három paprika fenilalanin-ammónia liáz (*PAL*) gén expresszióját, míg ugyanezekben a levelekben az izokorizmat-szintetáz enzimet kódoló *ICS1* gén expressziója nem változott meg (18. ábra). Mindkét gén a szalicilsav bioszintézisben játszik szerepet. Ezek a vizsgálatok azt mutatták, hogy az ObPV-inokuláció hatására döntően a *PAL* enzimek részvételével zajló fenilpropanoid reakcióút aktiválódása okozza a szalicilsav akkumulációját és nem az izokorizmat szintetáz katalizálta reakcióút (Catinot és mtsai. 2008). Mind az ObPV, mind a PMMoV inokuláció jelentősen aktivált egy, az etilén bioszintézisben résztvevő 1-aminociklopropán-1-karboxilsav oxidáz (*ACO*) gént (18. ábra). Fontos különbség volt azonban az, hogy az inkompatibilis paprika-ObPV kapcsolatban ez a gén már a fertőzést követően egy nappal jelentősen indukálódott, míg a kompatibilis paprika-PMMoV kapcsolatban ez a hatás csak 2 nappal a fertőzés után jelentkezett. Érdekes módon Tóbiás és mtsai. (1989) eredményei szerint viszont csak az ObPV-fertőzött paprika növények mutattak nagymértékű etilén termelést, de a PMMoV-fertőzés esetében az etilénfelhalmozódás nem volt kimutatható. Az etilén bioszintézise több szinten szabályozódik, így az etilén képződést befolyásolja nemcsak az *ACS* és *ACO* gének expressziója, de a hírvivő RNS-eik stabilitása, az *ACS* és *ACO* enzimek poszt-transzlációs módosításai (Kim és mtsai. 2003) és az intracelluláris redox környezet is (Datta és mtsai. 2015).

A szalicilsav, jázmonsav és etilén mellett az abszcizinsav (ABA) is fontos szerepet játszik a fertőzött növények védekezési reakcióinak szabályozásában. Az ABA egy általánosan előforduló növényi hormon, amely ismert szerepet tölt be a növényi embrió fejlődésében, a mag csírázásában illetve a különböző abiotikus stresszhatásokhoz való adaptációs folyamatokban, mint pl. szárazság, sóstressz, hideg-stressz esetében. Ha külsőleg adunk ABA-t a növényi szövetekhez, akkor gyors sztóma-zárodást okoz, ami csökkenti a szövetek transzspiráció miatti vízvesztését (Qin és Zeevaart 1999). Az ABA egy szeszkviterpenoid (C₁₅) vegyület, bioszintetikus prekursorai magasabbrendű növényekben az epoxikarotinoid (C₄₀) vegyületek, amelyek termelését a zeaxantin epoxidáz enzimek katalizálják. Az ABA bioszintézisének a sebesség-meghatározó lépése feltehetően a 9-*cisz*-epoxikarotinoidok (a violaxantin és a neoxantin *cisz*-izomerjei) hasítása. Ezt a reakciót a 9-*cisz*-epoxikarotinoid dioxigenáz (NCED) enzimek katalizálják, a reakció termékei a xantoxin (C₁₅) és az apo-karotinoidok (C₂₅) (Burbidge és mtsai. 1997, Thompson és mtsai. 2000, Nambara és Marion-Poll 2005). Ez a reakció a tilakoid membránokban zajlik, ahol a karotinoid szubsztrát is megtalálható. A xantoxin enzimatikusan továbbalakul abszcizin-aldehiddé alkohol-dehidrogenáz enzimek segítségével, ami végül az abszcizin-aldehid oxidáz enzim közreműködésével ABA-vá alakul (Nambara és Marion-Poll, 2005). A GenBank-ban található szekvencia adatok alapján megszerkesztettük a paprika genomában található három NCED és kilenc CCD enzim hasonlósági törzsfáját (19. ábra). A törzsfán jól elkülönülnek az NCED és CCD fehérjék szekvenciái (19. ábra). Kísérleteink során megvizsgáltuk a három *NCED* gén expressziójának a változásait az ObPV- és PMMoV-inokulált paprika levelekben, de nem sikerült szignifikáns változást kimutatni egyik gén esetében sem (18. ábra). Ezek az eredmények mutatják, hogy az ObPV-inokulált levelekben észlelt ABA-akkumuláció nem az *NCED* gének aktiválódásának a következménye, hanem itt más tényezők játszanak szerepet.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az ObPV-fertőzés jelentősen indukál egy karotinoid hasító dioxigenáz enzimet kódoló gént (*CCD1*) is a fertőzött paprika levelekben (20. ábra), ami arra utal, hogy a vírusfertőzés aktiválhatja egyes karotinoidok lebomlását. Paprikában csak az általunk is vizsgált *CCD1* gént tanulmányozták eddig részletesen (GenBank Y14164; Bouvier és mtsai. 2003). Az *Arabidopsis thaliana* modellnövényben a *CCD* géneket egy kisebb géncsalád kódolja (Schwartz és mtsai. 2001, Auldrige és mtsai.

2006). Ha a paprika *CCD1* gén szekvenciáját összehasonlítjuk valamennyi *A. thaliana CCD* gén szekvenciájával, akkor a legnagyobb hasonlóságot az *AtCCD1* (GenBank NM_116217) gén esetében találjuk. Ismeretes, hogy az *AtCCD1* gén által kódolt enzim különböző karotinoidok 9,10 (9',10') kettős kötéseinek a szimmetrikus hasítását katalizálja, amelynek során egy C₁₄ dialdehid és két C₁₃ ciklohexon származék keletkezik (Schwartz és mtsai. 2001). Érdekes módon egy tipikus CCD1 enzimtermék, az illékony terpenoid β-jonon kimutatható volt gázkromatográfiás-tömegspektrometriás detektálással az ObPV-fertőzött paprika levelekben (Frigyes Dávid, ELTE, nem közölt eredmények). Mivel a CCD enzimek részt vehetnek az abszcizinsav bioszintézisében (Auldrige és mtsai. 2006), a paprika *CCD* géncsalád tagjainak aktiválódása szerepet játszhat az ObPV-fertőzött levelek lehullásában is, ami a fertőzés után 6-7 nappal figyelhető meg. A *CCD* gének szabályozása abiotikus és biotikus stresszhatások esetén nagyrészt feltáratlan. További vizsgálatok szükségesek annak megállapításához, hogy az ObPV- és PMMoV fertőzések hogyan hatnak a *CCD* géncsalád egyes tagjainak az expressziójára illetve az összetett karotinoid vegyületcsalád egyes tagjainak a koncentrációjára a fertőzött paprika levelekben.

A fertőzött növényekben kialakuló vírus-rezisztencia megértéséhez a gyors és kiterjedt transzkripció újraprogramozást kell felderíteni. Az újraprogramozás szabályozásában alapvető fontosságúak a transzkripció faktor fehérjék, amelyek számos védekezési gén promóteréhez kapcsolódva képesek a gének transzkripcióját befolyásolni (Després és Fobert 2006). Az utóbbi években számos transzkripció faktor család szerepét vizsgálták és igazolták fertőzött növényekben (Després és Fobert 2006, Pandey és Somssich 2009, Gatz 2013). A saját kísérleteink során a paprika WRKY típusú transzkripció faktorok szerepét kívántuk tisztázni az általunk vizsgált paprika-tobamovírus kölcsönhatásokban. Ennek két oka volt: a) a korábbi kutatások szerint egyes WRKY transzkripció faktorok fontos szerepet játszhatnak a vírusfertőzött növények védekezésében (Yang és mtsai. 1999, Chen és Chen 2000, Liu és mtsai. 2004, van Verk és mtsai. 2008) így a tobamovírusokkal fertőzött paprikában is (Park és mtsai. 2006, Oh és mtsai. 2008, Huh és mtsai. 2012, 2015); b) az általunk vizsgált paprika *LOX* gének promótereiben számos "W-box" nukleotid motívumot azonosítottunk, amely igazoltan részt vesz a WRKY fehérjék megkötésében. Így feltételeztük, hogy a WRKY transzkripció faktorok részt vesznek a *LOX* gének szabályozásában a vírusfertőzések során. A W-boxok jelenlétét korábban már több növényi *LOX* gén promóterében kimutatták (Cheng és mtsai.

2006, Nemchenko és mtsai. 2006, Huh és mtsai. 2015), de ennek jelentőségét nem vizsgálták meg a vírus-rezisztencia szempontjából. Kimutatták azt is, hogy egy kórokozóval indukálható *WRKY30* gént túltermelő transzgenikus rizsnövényben a rizs *LOX* és *AOS* gének expressziója jelentősen indukálódott (Peng és mtsai. 2012).

A kísérleteink kezdeti szakaszában kevés paprika *WRKY* szekvencia volt elérhető. Ugyanakkor a TMV-fertőzött dohánylevelekben kimutatták a *WRKY* gének III. csoportjába tartozó egyes tagjainak jelentős aktiválódását (Chen és Chen 2000). Ezért új III. csoportba sorolható *WRKY* géneket szeretnénk volna találni paprikában. Sikeresen megszekvenáltunk egy ilyen új gént (*WRKY70*, GenBank KF484401). A gén által kódolt fehérjeszekvencia mutatta a III. csoport fehérjéinek jellegzetes aminosav motívumait (21. ábra). A *WRKY70* gén expressziója igen erőteljesen aktiválódott szalicilsav hatására (22. ábra), ami alátámasztotta a korábbi, *Arabidopsis thaliana*-val elért eredményeket (Kalde és mtsai. 2003, Li és mtsai. 2004). A paprika *WRKY70* gén promótere több szalicilsav-indukálhatóságra utaló nukleotid-motívumot is tartalmazott (24. ábra). Az ObPV vagy PMMoV-inokulált paprika levelekben a *WRKY70* gén indukálódott (23. ábra), ami mutatja, hogy a szalicilsav illetve a vírusfertőzések különböző módokon szabályozzák a gén kifejeződését.

A kísérleteink során két kutatócsoport is megszekvenálta a paprika teljes genomját (Kim és mtsai. 2014b, Qin és mtsai. 2014). Jelenlegi ismereteink szerint a paprika genom 71 *WRKY* gént tartalmaz (Diao és mtsai. 2016). Saját kísérleteink során számos *WRKY* gén expresszióját vizsgáltuk meg vírusfertőzött paprika levelekben. Több *WRKY* gén expresszióját nem befolyásolta lényegesen egyik vírusfertőzés sem (23. ábra). Az I. csoportba sorolható *WRKY-1* és *WRKY2* gének viszont igen gyorsan és erőteljesen indukálódtak az ObPV-inokulált levelekben, míg a PMMoV nem okozott jelentős génaktiválódást (23. ábra). Az expressziós mintázatok arra utalnak, hogy ezek a gének szerepet játszhatnak a vírusokkal szembeni rezisztenciában. Fontos megjegyezni, hogy a már szintetizált *WRKY* fehérjék gyakran poszt-transzlációs módon, kináz enzimek közreműködésével zajló foszforiláció révén aktiválódnak (Ishihama és Yoshioka 2012). Kimutatták, hogy a *Nicotiana benthamiana* *WRKY8* fehérje fiziológiás szubsztrátuma a SIPK, NTF4 és WIPK kinázoknak. A foszforiláció egyes szerin-prolin (SP) aminosav motívumoknál következik be. A mitogén-aktivált fehérje kinázok (MAPK) és a *WRKY8* kölcsönhatásához szükséges a *WRKY* szekvenciában a kináz dokkoló domén (D-domén)

megelepte (Ishihama és mtsai. 2011). Kimutatták azt is, hogy a foszforiláció szerepet játszik a növényi védekezési reakciók aktiválódásában (Ishihama és mtsai. 2011). Érdekes módon a paprika WRKY-a és WRKY2 fehérjeszekvenciáiban is megtalálhatóak D-domén motívumok (Ishihama és Yoshioka 2012, Huh és mtsai. 2015), ami arra utal, hogy ezek a WRKY fehérjék is foszforiláció révén aktiválódhatnak.

A paprika WRKY2 fehérje vírusrezisztenciában játszott szerepét a további kísérleteinkben részletesen vizsgáltuk. A funkcionális vizsgálatok érdekében a paprika WRKY2 gént vírus-fogékony *N. benthamiana* dohány levelekben tranziens módon fejeztettük ki, Gateway vektor-technológiával (Earley et al. 2006), *Agrobacterium tumefaciens* segítségével (25. és 26. ábra). Korábbi vizsgálatok már kimutatták, hogy egy gyapot WRKY gént túltermelő transzgenikus *N. benthamiana* emelkedett antivirális rezisztenciát mutatott (Sun et al. 2012). A paprika WRKY2 gént kifejező, valamint az üres expressziós vektort tartalmazó (kontroll) *N. benthamiana* növényeket TMV-vel fertőztük, ami szisztemikus nekrotizist, a növény néhány napon belüli teljes elpusztulását eredményezi (Culver 1996). Érdekes módon a WRKY2 gént kifejező növényekben a szisztemikus nekrotizis később következett be (3 napos késleltetés), mint a kontroll növények esetében (33. ábra). A PR-1 géncsalád aktiválódását általában rezisztencia-markerként használják, ezért ez az eredmény arra utal, hogy a WRKY2 génnel történt transzformáció megnövelheti a tranziens módon transzformált növények ellenállóképességét mikrobiális kórokozókkal szemben.

Megvizsgáltuk a TMV fertőzés következményeit is a WRKY2 gént kifejező, illetve az üres expressziós vektort tartalmazó kontroll *N. benthamiana* növények leveleiben. A TMV köpenyfehérje gén expressziójának a mértéke (29. ábra) nem tért el lényegesen a WRKY2-termelő, illetve a kontroll dohányok között, a betegség látható tünetei, pontosabban a TMV fertőzés hatására megjelenő nekrotikus léziók száma nem változott a WRKY2-termelő növényekben (28. ábra). Ezek az eredmények megmutatták, hogy a TMV-vel szembeni rezisztenciát, nem befolyásolta jelentősen a WRKY2 gén expressziója a vírus-inokulált levelekben (lokális fertőzés). A korábbi feltevésünknek megfelelően viszont a TMV fertőzés erősebben indukálta a *NbLOX1* gén kifejeződését a WRKY2-termelő dohánylevelekben, mint a kontroll esetében (31. és 32. ábra). Több PR gén esetében ugyanakkor nem tért el lényegesen a TMV-fertőzött növényekben kimutatott génkifejeződés a WRKY2-termelő, illetve kontroll növények között (31. ábra). A tranziens

módon transzformált növényekkel végzett kísérleteket összegezve az állapítható meg, hogy a paprika *WRKY2* gén kifejeződése a TMV-vel fertőzött *N. benthamina*-ban 1) nem változtatja meg jelentősen a betegség lokális lefolyását (a vírus rezisztenciát) 2) az egész növény szisztémikus nekrozisát viszont jelentősen (3 nappal) késlelteti. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TMV növényen belüli lokális (sejtről-sejtre történő) és hosszú távú transzportja is gátlódhat. Ennek pontos igazolására további vizsgálatok szükségesek.

Az utolsó kísérleteink során megállapítottuk, hogy a paprika levelekben a *WRKY1*, *WRKY-a* és *WRKY-c* gének kifejeződését jelentősen lecsökkenti a redukált glutation (GSH) kezelés (34. ábra). Az oxidáló hatású hidrogén-peroxid viszont megnövelte a *WRKY-c* gén transzkriptumának a mennyiségét, míg a másik két vizsgált *WRKY* gén expresszióját nem változtatta meg (34. ábra). Az eredmények azt igazolták, hogy a redox hatások jelentősen befolyásolják egyes *WRKY* gének expresszióját, bár ezek a mechanizmusok még ismeretlenek. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy exogén glutation kezelés erőteljesen befolyásolja egyes védekezési gének expresszióját bab sejtszuspenzióban. A GSH indukálta a sejtfalban található hidroxiprolin-gazdag glükoproteineket illetve a PAL-t és a kalcion-szintáz enzimeket kódoló géneket. (Wingate et al. 1988). Újabb, az egész transzkriptomot átfogó vizsgálatok szerint az exogén GSH kezelés jelentősen befolyásolja számos gén kifejeződését *Arabidopsis thaliana* növényekben, köztük számos *WRKY* transzkripció faktor kódoló gén expresszióját is (Hacham et al. 2014). Az oxidációs stressz aktiválhat redox-érzékeny transzkripció faktorokat is (Dietz 2014).

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Gullner Gábornak, aki megteremtette a munkámhoz szükséges háttérrel, munkám során útmutatást és szakmai segítséget nyújtott és mindig biztatott.

Köszönöm az ATK Növényvédelmi Intézet igazgatóinak, Dr. Barna Balázsnak, Dr. Kiss Leventének és Dr. Kontschán Jenőnek, hogy biztosították számomra a feltételeket a kísérletek elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom az ATK NÖVI minden munkatársának, különösen Dr. Tóbiás Istvánnak, Dr. Bozsó Zoltánnak és Dr. Szatmári Ágnesnek a munkám során nyújtott elméleti és gyakorlati segítségért.

Végezetül hálás vagyok férjemnek, kislányaimnak és családomnak, hogy mindvégig támogattak.

8. Irodalomjegyzék

- Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
- Ádám AL, Bestwick CS, Barna B, Mansfield JW. 1995. Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Planta* 197: 240–249.
- Alazem M, Lin N-S. 2015. Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology* 16: 529–540.
- Allan AC, Lapidot M, Culver JN, Fluhr R. 2001. An early tobacco mosaic virus-induced oxidative burst in tobacco indicates extracellular perception of the virus coat protein. *Plant Physiology* 126: 97–108.
- Allmann S, Halitschke R, Schuurink RC, Baldwin IT. 2010. Oxylin channelling in *Nicotiana attenuata*: lipoxygenase 2 supplies substrates for green leaf volatile production. *Plant, Cell and Environment* 33: 2028–2040.
- Alonso E, Garcia-Luque I, De La Cruz A, Wicke A, Avila-Rincon MJ, Serra MT, Castresana C, Diaz-Ruiz, JR. 1991. Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mosaic virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. *Journal of General Virology* 72: 2875-2884.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.
- Andreou A, Feussner I. 2009. Lipoxygenases - structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* 70: 1504–1510.
- Ashrafi H, Hill T, Stoffel K, Kozik A, Yao J, Chin-Wo SR, Van Deynze A. 2012. *De novo* assembly of the pepper transcriptome (*Capsicum annuum*): a benchmark for in silico discovery of SNPs, SSRs and candidate genes. *BMC Genomics* 13: 571.
- Auldridge ME, Block A, Vogel JT, Dabney-Smith C, Mila I, Bouzayen M, Magallanes-Lundback M, DellaPenna D, McCarty DR, Klee HJ. 2006. Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates

- the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant Journal* 45: 982–993.
- Axelrod B, Cheesbrough TM, Laakso S. 1981. Lipoxygenase from soybeans. *Methods in Enzymology* Academic Press. p. 441–451.
- Bannenberg G, Martínez M, Hamberg M, Castresana C. 2009. Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* 44: 85–95.
- Bari R, Jones JDG. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69: 473–488.
- Bartling D, Radzio R, Steiner U, Weiler EW. 1993. A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular cloning and functional characterization*. *European Journal of Biochemistry* 216: 579–586.
- Beachy RN, Heinlein M. 2000. Role of P30 in replication and spread of TMV. *Traffic* 1: 540–544.
- Beznier L, Rochon DM, Hamilton RI. 1997. Characterization of an isolate of pepper mild mottle tobamovirus occurring in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19: 83–88.
- Beijerinck MW. 1898. Über ein *Contagium vivum fluidum* als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. *Verhandelingen der Koninklyke Akademie van Wettenschappen te Amsterdam* 65: 1–22.
- Benoit R, Auer M. 2011. A direct way of redox sensing. *RNA Biology* 8: 18–23.
- Berzal-Herranz A, de la Cruz A, Tenllado F, Díaz-Ruíz JR, López L, Sanz AI, Vaquero C, Serra MT, García-Luque I. 1995. The *Capsicum L³* gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology* 209: 498–505.
- Bhattacharjee S, Zamora A, Azhar MT, Sacco MA, Lambert LH, Moffett P. 2009. Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves Argonaute4-dependent translational control. *Plant Journal* 58: 940–951.
- Blée E. 1998. Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research* 37: 33–72.
- Blée E. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* 7: 315–322.
- Bol JF, Linthorst HJM, Cornelissen BJC. 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology* 28: 113–138.

- Bouvier F, Suire C, Mutterer J, Camara B. 2003. Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of a carotenoid dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15: 47–62.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology* 108: 1353-1358.
- Buonaurio R, Servili M. 1999. Involvement of lipoxygenase, lipoxygenase pathway volatiles, and lipid peroxidation during the hypersensitive reaction of pepper leaves to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54: 155–169.
- Burbidge A, Grieve T, Jackson A, Thompson A, Taylor I. 1997. Structure and expression of a cDNA encoding a putative neoxanthin cleavage enzyme (NCE), isolated from a wilt-related tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) library. *Journal of Experimental Botany* 48: 2111-2112.
- Cacas JL, Vailleau F, Davoine C, Ennar N, Agnel JP, Tronchet M, Ponchet M, Blein JP, Roby D, Triantaphylides C, Montillet JL. 2005. The combined action of 9-lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. *Plant Cell and Environment* 28: 1367–1378.
- Catinot J, Buchala A, Abou-Mansour E, Métraux J-P. 2008. Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters* 582: 473–478.
- Chechetkin IR, Osipova EV, Antsygina LL, Gogolev YV, Grechkin AN. 2011. Oxidation of glycerolipids by maize 9-lipoxygenase and its A562G mutant. *Chemistry and Physics of Lipids* 164: 216–220.
- Chen C, Chen Z. 2000. Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Molecular Biology* 42: 387–396.
- Chen L, Zhang L, Li D, Wang F, Yu D. 2013a. WRKY8 transcription factor functions in the TMV-cg defense response by mediating both abscisic acid and ethylene signaling

- in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 110: E1963–1971.
- Chen X, Liu J, Lin G, Wang A, Wang Z, Lu G. 2013b. Overexpression of *AtWRKY28* and *AtWRKY75* in *Arabidopsis* enhances resistance to oxalic acid and *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Cell Reports 32: 1589–1599.
- Cheng Q, Zhang B, Zhuge Q, Zeng Y, Wang M, Huang M. 2006. Expression profiles of two novel lipoxygenase genes in *Populus deltoides*. Plant Science 170: 1027–1035.
- Chukkapalli V, Heaton NS, Randall G. 2012. Lipids at the interface of virus-host interactions. Current Opinion in Microbiology 15: 512–518.
- Cornelissen BJ, Hooft van Huijsduijnen RA, Van Loon LC, Bol JF. 1986. Molecular characterization of messenger RNAs for “pathogenesis related” proteins la, lb and lc, induced by TMV infection of tobacco. EMBO Journal 5: 37–40.
- Cremers CM, Jakob U. 2013. Oxidant sensing by reversible disulfide bond formation. Journal of Biological Chemistry 288: 26489–26496.
- Csilléry G, Tóbiás I, Rusko J. 1983. A new pepper strain of *Tomato mosaic virus*. Acta Phytopathologica Hungarica 18: 195–200.
- Culver JN. 1996. Tobamovirus cross protection using a potexvirus vector. Virology 226: 228–235.
- Dang F, Wang Y, She J, Lei Y, Liu Z, Eulgem T, Lai Y, Lin J, Yu L, Lei D, Guan D, Li X, Yuan Q, He S. 2014. Overexpression of *CaWRKY27*, a subgroup IIe WRKY transcription factor of *Capsicum annuum*, positively regulates tobacco resistance to *Ralstonia solanacearum* infection. Physiologia Plantarum 150: 397–411.
- Datta R, Kumar D, Sultana A, Hazra S, Bhattacharyya D, Chattopadhyay S. 2015. Glutathione regulates 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase transcription via WRKY33 and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by modulating messenger RNA stability to induce ethylene synthesis during stress. Plant Physiology 169: 2963–2981.
- Dean JD, Goodwin PH, 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. Journal of Experimental Botany 56: 1525–1533.

- De Pater S, Greco V, Pham K, Memelink J, Kijne J. 1996. Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 24: 4624–4631.
- Després C, Fobert PR. 2006. *In vivo* biochemical characterization of transcription factors regulating plant defense response to disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28: 3-15.
- Diao WP, Snyder JC, Wang SB, Liu JB, Pan BG, Guo GJ, Wei G. 2016. Genome-wide identification and expression analysis of WRKY gene family in *Capsicum annuum* L. *Frontiers in Plant Science* 7: 211.
- Dietz K-J. 2014. Redox regulation of transcription factors in plant stress acclimation and development. *Antioxidants and Redox Signaling* 21: 1356–1372.
- Do HM, Lee SC, Jung HW, Sohn KH, Hwang BK. 2004. Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (*CADEF1*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Science* 166: 1297-1305.
- 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*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 163–175.
- Dong J, Chen C, Chen Z. 2003. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology* 51: 21–37.
- Dong X. 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 316–323.
- Dong X. 2004. NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 547–552.
- Dziurka M, Janeczko A, Juhász C, Gullner G, Oklestková J, Novák O, Saja D, Skoczowski A, Tóbiás I, Barna B. 2016. Local and systemic hormonal responses in pepper leaves during compatible and incompatible pepper-tobamovirus interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, in press.
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal* 45: 616-629.
- Elmore JM, Lin Z-JD, Coaker G. 2011. Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 365–371.

- Elvira MI, Galdeano MM, Gilardi P, García-Luque I, Serra MT. 2008. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L³ plants. *Journal of Experimental Botany* 59: 1253–1265.
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G. 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8: 978–984.
- Erickson FL, Holzberg S, Calderon-Urrea A, Handley V, Axtell M, Corr C, Baker B. 1999. The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant Journal* 18: 67-75.
- Etalo DW, Stulemeijer IJE, van Esse HP, de Vos RCH, Bouwmeester HJ, Joosten MHAJ. 2013. System-wide hypersensitive response-associated transcriptome and metabolome reprogramming in tomato. *Plant Physiology* 162: 1599–1617.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5: 199–206.
- Eulgem T, Somssich IE. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 366–371.
- Faragó S, Brunold C. 1994. Regulation of thiol contents in maize roots by intermediates and effectors of glutathione synthesis. *Journal of Plant Physiology* 144: 433–437.
- Feussner I, Wasternack C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53: 275–297.
- Fornaroli S, Petrusa E, Braidot E, Vianello A, Macri F. 1999. Purification of a plasma membrane-bound lipoxygenase from soybean cotyledons. *Plant Science* 145: 1–10.
- Fukuda Y, Shinshi H. 1994. Characterization of a novel cis-acting element that is responsive to a fungal elicitor in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Molecular Biology* 24: 485–493.
- Gallé Á, Csiszár J, Benyó D, Laskay G, Leviczky T, Erdei L, Tari I. 2013. Isohydric and anisohydric strategies of wheat genotypes under osmotic stress: biosynthesis and function of ABA in stress responses. *Journal of Plant Physiology* 170: 1389-1399.
- García-Marcos A, Pacheco R, Manzano A, Aguilar E, Tenllado F. 2013. Oxylin biosynthesis genes positively regulate programmed cell death during compatible

- infections with the synergistic pair *Potato virus X* - *Potato virus Y* and *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Virology* 87: 5769–5783.
- Gatz C. 2013. From pioneers to team players: TGA transcription factors provide a molecular link between different stress pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26: 151-159.
- Gianinazzi S, Martin C, Vallée JC. 1970. Hypersensitivity to viruses, temperature and soluble proteins in *Nicotiana Xanthi* n.c. Appearance of new macromolecules at the repression of viral synthesis. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De l'Académie Des Sciences. Série D: Sciences Naturelles* 270: 2383–2386.
- Gilardi P, Garcia-Luque I, Serra MT. 1998. Pepper mild mottle virus coat protein alone can elicit the *Capsicum* spp. L³ gene-mediated resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1253-1257.
- Goelet P, Lomonosoff GP, Butler PJ, Akam ME, Gait MJ, Karn J. 1982. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 79: 5818-5822.
- Göbel C, Feussner I, Schmidt A, Scheel D, Sanchez-Serrano J, Hamberg M, Rosahl S. 2001. Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *Journal of Biological Chemistry* 276: 6267–6273.
- Goldsbrough AP, Albrecht H, Stratford R. 1993. Salicylic acid-inducible binding of a tobacco nuclear protein to a 10 bp sequence which is highly conserved amongst stress-inducible genes. *Plant Journal* 3: 563–571.
- Greenleaf WH, Cook AA, Heyn ANJ. 1964. Resistance to *Tobacco mosaic virus* in *Capsicum*, with reference to the Samsun latent strain. *Phytopathology* 54: 1367–1371.
- Gullner G, Dodge AD. 2000. Accumulation of glutathione in pea leaf discs exposed to the photooxidative herbicides acifluorfen and 5-aminolevulinic acid. *Journal of Plant Physiology* 156: 111–117.
- Gullner G, Künstler A, Király L, Pogány M, Tóbiás I. 2010. Up-regulated expression of lipoxygenase and divinyl ether synthase genes in pepper leaves inoculated with Tobamoviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 387–393.

- Hacham Y, Koussevitzky S, Kirma M, Amir R. 2014. Glutathione application affects the transcript profile of genes in *Arabidopsis* seedling. *Journal of Plant Physiology* 171: 1444–1451.
- Hernández JA, Gullner G, Clemente-Moreno MJ, Künstler A, Juhász C, Díaz-Vivancos P, Király L. 2016. Oxidative stress and antioxidative responses in plant-virus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 94: 134-148.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research* 27: 297–300.
- Hornung E, Walther M, Kühn H, Feussner I. 1999. Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 4192–4197.
- Hornung E, Kunze S, Liavonchanka A, Zimmermann G, Kühn D, Fritsche K, Renz A, Kühn H, Feussner I. 2008. Identification of an amino acid determinant of pH regiospecificity in a seed lipoxygenase from *Momordica charantia*. *Phytochemistry* 69: 2774–2780.
- Horváth E, Csiszár J, Gallé Á, Poór P, Szepesi Á, Tari I. 2015. Hardening with salicylic acid induces concentration-dependent changes in abscisic acid biosynthesis of tomato under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 183: 54-63.
- Horváth J. 1986a. Compatible and incompatible relations between *Capsicum* species and viruses. I. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 21: 35-49.
- Horváth J. 1986b. Compatible and incompatible relations between *Capsicum* species and viruses. II. New compatible host-virus relations (susceptible plants). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 21: 51-58.
- Horváth J. 1986c. Compatible and incompatible relations between *Capsicum* species and viruses. III. New incompatible host-virus relations (resistant and immune plants). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 21: 59-62.
- Howe GA, Schillmiller AL. 2002. Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 230–236.
- Huang F-C, Schwab W. 2011. Cloning and characterization of a 9-lipoxygenase gene induced by pathogen attack from *Nicotiana benthamiana* for biotechnological application. *BMC Biotechnology* 11: 30.

- Huang S, Gao Y, Liu J, Peng X, Niu X, Fei Z, Cao S, Liu Y. 2012. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. *Molecular Genetics and Genomics* 287: 495–513.
- Huh SU, Choi LM, Lee G-J, Kim YJ, Paek K-H. 2012. *Capsicum annuum* WRKY transcription factor d (CaWRKYd) regulates hypersensitive response and defense response upon *Tobacco mosaic virus* infection. *Plant Science* 197: 50–58.
- Huh SU, Lee G-J, Jung JH, Kim Y, Kim YJ, Paek K-H. 2015. *Capsicum annuum* transcription factor WRKYa positively regulates defense response upon TMV infection and is a substrate of CaMK1 and CaMK2. *Scientific Reports* 5: 7981.
- Hull, R. 2002: Matthews' Plant Virology. Fourth Edition. Academic Press, London.
- Hwang IS, Hwang BK. 2010. The pepper 9-lipoxygenase gene CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiology* 152: 948–967.
- Ievinsh G. 1992. Soluble lipoxygenase activity in rye seedlings as related to endogenous and exogenous ethylene and wounding. *Plant Science* 82: 155–159.
- Ikeda R, Watanabe E, Watanabe Y, Okada Y. 1993. Nucleotide sequence of tobamovirus Ob which can spread systemically in *N* gene tobacco. *Journal of General Virology* 74: 1939-1944.
- Ishibashi K, Miyashita S, Katoh E, Ishikawa M. 2012. Host membrane proteins involved in the replication of tobamovirus RNA. *Current Opinion in Virology* 2: 699–704.
- Ishiguro S, Nakamura K. 1994. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. *Molecular and General Genetics* 244: 563–571.
- Ishihama N, Yamada R, Yoshioka M, Katou S, Yoshioka H. 2011. Phosphorylation of the *Nicotiana benthamiana* WRKY8 transcription factor by MAPK functions in the defense response. *Plant Cell* 23: 1153-1170.
- Ishihama N, Yoshioka H. 2012. Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 431-437.
- Itoh A, Howe GA. 2001. Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry* 276: 3620–3627.
- Itzhaki H, Maxson JM, Woodson WR. 1994. An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-

- transferase (GST1) gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 8925–8929.
- Jalloul A, Montillet JL, Assigbetsé K, Agnel JP, Delannoy E, Triantaphylidès C, Daniel JF, Marmey P, Geiger JP, Nicole M. 2002. Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant Journal* 32: 1–12.
- Jingyuan Z, Xuexiao Z, Zhenchuan M, Bingyan X. 2011. A novel pepper (*Capsicum annuum* L.) WRKY gene, *CaWRKY30*, is involved in pathogen stress responses. *Journal of Plant Biology* 54: 329–337.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- Kalde M, Barth M, Somssich IE, Lippok B. 2003. Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 295–305.
- Kálmán D. 2003: Paprika enyhe tarkulás vírus (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) izolátumok patológiai, szerológiai és molekuláris biológiai jellemzése. Doktori (PhD) értekezés, Veszprémi Egyetem, Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar
- Kim YJ, Hwang BK. 2000. Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia Plantarum* 108: 51–60.
- Kim CY, Liu Y, Thorne ET, Yang H, Fukushige H, Gassmann W, Hildebrand D, Sharp RE, Zhang S. 2003. Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell* 15: 2707–2718.
- Kim DS, Hwang BK. 2014. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL1*) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany* 65: 2295–2306.
- Kim DS, Jeun Y, Hwang BK. 2014a. The pepper patatin-like phospholipase CaPLP1 functions in plant cell death and defense signaling. *Plant Molecular Biology* 84: 329–344.
- Kim S, Park M, Yeom S-I, Kim Y-M, Lee JM, Lee H-A, Seo E, Choi J, Cheong K, Kim K-T, Jung K, Lee G-W, Oh S-K, Bae C, Kim S-B, Lee H-Y, Kim S-Y, Kim M-S, Kang B-C, Jo YD, Yang H-B, Jeong H-J, Kang W-H, Kwon J-K, Shin C, Lim JY, Park JH, Huh JH, Kim J-S, Kim B-D, Cohen O, Paran I, Suh MC, Lee SB, Kim Y-K, Shin Y, Noh S-J, Park J, Seo YS, Kwon S-Y, Kim HA, Park JM, Kim H-J, Choi S-B, Bosland PW, Reeves G, Jo S-H, Lee

- B-W, Cho H-T, Choi H-S, Lee M-S, Yu Y, Do Choi Y, Park B-S, van Deynze A, Ashrafi H, Hill T, Kim WT, Pai H-S, Ahn HK, Yeam I, Giovannoni JJ, Rose JKC, Sørensen I, Lee S-J, Kim RW, Choi I-Y, Choi B-S, Lim J-S, Lee Y-H, Choi D. 2014b. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics* 46: 270–278.
- Kirita M, Akutsu K, Watanabe Y, Tsuda S. 1997. Nucleotide sequence of the Japanese isolate of pepper mild mottle tobamovirus RNA. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 63: 373-376.
- Klug A. 1999. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 354: 531-535.
- Knoester M, Linthorst HJM, Bol JF, Van Loon LC. 2001. Involvement of ethylene in lesion development and systemic acquired resistance in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 45–57.
- Kolomiets MV, Chen H, Gladon RJ, Braun EJ, Hannapel DJ. 2000. A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiology* 124: 1121–1130.
- Kushwaha N, Sahu PP, Prasad M, Chakraborty S. 2015. Chilli leaf curl virus infection highlights the differential expression of genes involved in protein homeostasis and defense in resistant chilli plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 4757-4770.
- Künstler A, Király L, Pogány M, Tóbiás I, Gullner G. 2007. Lipoxygenase and glutathione peroxidase activity in tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic virus. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 42: 197–207.
- Künstler A, Bacsó R, Gullner G, Hafez YM, Király L. 2016. Staying alive - is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 93: 75-84.
- Kushwaha N, Sahu PP, Prasad M, Chakraborty S. 2015. Chilli leaf curl virus infection highlights the differential expression of genes involved in protein homeostasis and defense in resistant chilli plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 4757-4770.

- La Camera S, Balagué C, Göbel C, Geoffroy P, Legrand M, Feussner I, Roby D, Heitz T. 2009. The *Arabidopsis* patatin-like protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* 22: 469–481.
- La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T. 2004. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews* 198: 267–284.
- Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld J-P. 2004. The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology* 134: 1006–1016.
- Lantos F, Mike K, Monostori T, Helyes L. 2012. Evaluation of calcium deficiency symptoms in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits via visual plant diagnosis and microscopic examination. *Acta Horticulturae* 938: 283-289.
- Lartey RT, Voss TC, Melcher U. 1996. Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1327–1338.
- Lebel E, Heifetz P, Thorne L, Uknes S, Ryals J, Ward E. 1998. Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 16: 223–233.
- Lee SC, Hong JK, Kim YJ, Hwang BK. 2000. Pepper gene encoding thionin is differentially induced by pathogens, ethylene and methyl jasmonate. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56: 207-216.
- Lee WM, Ishikawa M, Ahlquist P. 2001. Mutation of host delta-9 fatty acid desaturase inhibits brome mosaic virus RNA replication between template recognition and RNA synthesis. *Journal of Virology* 75: 2097–2106.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research* 30: 325–327.
- Lewandowski DJ, Dawson WO. 2000. Functions of the 126- and 183-kDa proteins of tobacco mosaic virus. *Virology* 271: 90-98.

- Li G, Meng X, Wang R, Mao G, Han L, Liu Y, Zhang S. 2012. Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 8: e1002767.
- Li J, Brader G, Palva ET. 2004. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16: 319–331.
- Lim JH, Park C-J, Huh SU, Choi LM, Lee GJ, Kim YJ, Paek K-H. 2011. *Capsicum annuum* WRKYb transcription factor that binds to the *CaPR-10* promoter functions as a positive regulator in innate immunity upon TMV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411: 613–619.
- Liu SQ, Liu XH, Jiang LW. 2011. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the lipoxygenase gene family in cucumber. *Genetics and Molecular Research* 10: 2613–2636.
- Liu W, Xie Y, Ma J, Luo X, Nie P, Zuo Z, Lahrmann U, Zhao Q, Zheng Y, Zhao Y, Xue Y, Ren J. 2015. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics* 31: 3359–3361.
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. 2004. Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 38: 800–809.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 25: 402–408.
- Martini N, Egen M, Rüntz I, Strittmatter G. 1993. Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *Molecular and General Genetics* 236: 179–186.
- Mateos RM, Bonilla-Valverde D, del Río LA, Palma JM, Corpas FJ. 2009. NADP-dehydrogenases from pepper fruits: effect of maturation. *Physiologia Plantarum* 135: 130–139.
- Matos AR, Pham-Thi AT. 2009. Lipid deacylating enzymes in plants: old activities, new genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 491-503.
- McGrath KC, Dombrecht B, Manners JM, Schenk PM, Edgar CI, Maclean DJ, Scheible W-R, Udvardi MK, Kazan K. 2005. Repressor- and activator-type ethylene response

- factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiology* 139: 949–959.
- Memelink J. 2009. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* 70: 1560–1570.
- Mène-Saffrané L, Esquerré-Tugayé M-T, Fournier J. 2003. Constitutive expression of an inducible lipoxygenase in transgenic tobacco decreases susceptibility to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Molecular Breeding* 12: 271–282.
- Meng Y, Wise RP. 2012. HvWRKY10, HvWRKY19, and HvWRKY28 regulate Mla-triggered immunity and basal defense to barley powdery mildew. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 1492–1505.
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR. 1995. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 20: 506–510.
- Meshi T, Motoyoshi F, Adachi A, Watanabe Y, Takamatsu N, Okada Y. 1988. Two concomitant base substitutions in the putative replicase genes of tobacco mosaic virus confer the ability to overcome the effects of a tomato resistance gene, *Tm-1*. *EMBO journal* 7: 1575–1581.
- Minor W, Steczko J, Stec B, Otwinowski Z, Bolin JT, Walter R, Axelrod B. 1996. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry* 35: 10687–10701.
- Mita G, Quarta A, Fasano P, De Paolis A, Di Sansebastiano GP, Perrotta C, Iannaccone R, Belfield E, Hughes R, Tsesmetzis N, Casey R, Santino A. 2005. Molecular cloning and characterization of an almond 9-hydroperoxide lyase, a new CYP74 targeted to lipid bodies. *Journal of Experimental Botany* 56: 2321–2333.
- Mitter N, Kazan K, Way HM, Broekaert WF, Manners JM. 1998. Systemic induction of an *Arabidopsis* plant defensin gene promoter by tobacco mosaic virus and jasmonic acid in transgenic tobacco. *Plant Science* 136: 169–180.
- Montillet J-L, Agnel J-P, Ponchet M, Vaillau F, Roby D, Triantaphylidès C. 2002. Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydroperoxides is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 633–639.

- Moore JW, Loake GJ, Spoel SH. 2011. Transcription dynamics in plant immunity. *Plant Cell* 23: 2809-2820.
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I. 2009. Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 511–517.
- Motoyoshi F, Oshima N. 1977. Expression of genetically controlled resistance to *Tobacco mosaic virus* infection in isolated tomato leaf mesophyll protoplasts. *Journal of General Virology* 34: 499–506.
- Nambara E, Marion-Poll A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review Plant Biology* 56: 165-185.
- Nakashima A, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Sugimoto K, Takabayashi J, Matsui K. 2011. Monogalactosyl diacylglycerol is a substrate for lipoxygenase: its implications for oxylin formation directly from lipids. *Journal of Plant Interactions* 6: 93–97.
- Nemchenko A, Kunze S, Feussner I, Kolomiets M. 2006. Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *Journal of Experimental Botany* 57: 3767–3779.
- Newcomer ME, Brash AR. 2015. The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Science* 24: 298–309.
- Noordermeer MA, Veldink GA, Vliegthart JF. 2001. Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *ChemBioChem* 2: 494-504.
- Oh S-K, Yi SY, Yu SH, Moon JS, Park JM, Choi D. 2006. CaWRKY2, a chili pepper transcription factor, is rapidly induced by incompatible plant pathogens. *Molecules and Cells* 22: 58–64.
- Oh S-K, Baek K-H, Park JM, Yi SY, Yu SH, Kamoun S, Choi D. 2008. *Capsicum annuum* WRKY protein CaWRKY1 is a negative regulator of pathogen defense. *New Phytologist* 177: 977–989.
- Ohme-Takagi M, Suzuki K, Shinshi H. 2000. Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant and Cell Physiology* 41: 1187–1192.
- Ohtsubo N, Mitsuhara I, Koga M, Seo S, Ohashi Y. 1999. Ethylene promotes the necrotic lesion formation and basic *PR* gene expression in TMV-infected tobacco. *Plant and Cell Physiology* 40: 808–817.

- Okada Y. 1999. Historical overview of research on the tobacco mosaic virus genome: genome organization, infectivity and gene manipulation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 354: 569-582.
- Osman TAM, Buck KW. 1997. The tobacco mosaic virus RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-binding subunit of yeast eIF-3. *Journal of Virology* 71: 6075-6082.
- Padgett HS, Beachy RN. 1993. Analysis of a tobacco mosaic virus strain capable of overcoming *N* gene-mediated resistance. *Plant Cell* 5: 577-586.
- Padgett HS, Watanabe Y, Beachy RN. 1997. Identification of the TMV replicase sequence that activates the *N* gene-mediated hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 709-715.
- Padmanabhan MS, Dinesh-Kumar SP. 2014. The conformational and subcellular compartmental dance of plant NLRs during viral recognition and defense signaling. *Current Opinion in Microbiology* 20: 55-61.
- Pandey SP, Somssich IE. 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology* 150: 1648-1655.
- Park CJ, Shin R, Park JM, Lee GJ, Yoo TH, Paek KH. 2001. A hot pepper cDNA encoding a pathogenesis-related protein 4 is induced during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Molecules and Cells* 11: 122-127.
- Park CJ, Kim K-J, Shin R, Park JM, Shin Y-C, Paek K-H. 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant Journal* 37: 186-198.
- Park CJ, Shin Y-C, Lee B-J, Kim K-J, Kim J-K, Paek K-H. 2006. A hot pepper gene encoding WRKY transcription factor is induced during hypersensitive response to *Tobacco mosaic virus* and *Xanthomonas campestris*. *Planta* 223: 168-179.
- Pastuglia M, Roby D, Dumas C, Cock JM. 1997. Rapid induction by wounding and bacterial infection of an *S* gene family receptor-like kinase gene in *Brassica oleracea*. *Plant Cell* 9: 49-60.
- Pategas KG, Schuerger AC, Wetter C. 1989. Management of tomato mosaic virus in hydroponically grown pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Disease* 73: 570-573.

- Peng X, Hu Y, Tang X, Zhou P, Deng X, Wang H, Guo Z. 2012. Constitutive expression of rice *WRKY30* gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, *PR* gene expression and resistance to fungal pathogens in rice. *Planta* 236: 1485–1498.
- Pfitzner UM, Goodman HM. 1987. Isolation and characterization of cDNA clones encoding pathogenesis-related proteins from tobacco mosaic virus infected tobacco plants. *Nucleic Acids Research* 15: 4449–4465.
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28: 489–521.
- Podolyan A, White J, Jordan B, Winefield C. 2010. Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. *Functional Plant Biology* 37: 767–784.
- Porta H, Figueroa-Balderas RE, Rocha-Sosa M. 2008. Wounding and pathogen infection induce a chloroplast-targeted lipoxygenase in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* 227: 363–373.
- Porta H, Rocha-Sosa M. 2002. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology* 130: 15–21.
- Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez MJ, Kift N, Carbonne F, Griffiths G, Esquerré-Tugayé M-T, Rosahl S, Castresana C, Hamberg M, Fournier J. 2005. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiology* 139: 1902–1913.
- Qin X, Zeevaart JA. 1999. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 15354-15361.
- Qin C, Yu C, Shen Y, Fang X, Chen L, Min J, Cheng J, Zhao S, Xu M, Luo Y, Yang Y, Wu Z, Mao L, Wu H, Ling-Hu C, Zhou H, Lin H, González-Morales S, Trejo-Saavedra DL, Tian H, Tang X, Zhao M, Huang Z, Zhou A, Yao X, Cui J, Li W, Chen Z, Feng Y, Niu Y, Bi S, Yang X, Li W, Cai H, Luo X, Montes-Hernández S, Leyva-González MA, Xiong Z, He X, Bai L, Tan S, Tang X, Liu D, Liu J, Zhang S, Chen M, Zhang L, Zhang L, Zhang Y, Liao W, Zhang Y, Wang M, Lv X, Wen B, Liu H, Luan H, Zhang Y, Yang S, Wang X, Xu J, Li X, Li S, Wang J, Palloix A, Bosland PW, Li Y, Krogh A, Rivera-Bustamante RF, Herrera-

- Estrella L, Yin Y, Yu J, Hu K, Zhang Z. 2014. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 111: 5135–5140.
- Quackenbush J, Cho J, Lee D, Liang F, Holt I, Karamycheva S, Parvizi B, Pertea G, Sultana R, White J. 2001. The TIGR Gene Indices: analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species. *Nucleic Acids Research* 29: 159–164.
- Rancé I, Fournier J, Esquerré-Tugayé MT. 1998. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 6554–6559.
- Rast ATB. 1988. Pepper tobamoviruses and pathotypes used in resistance breeding. *Capsicum Newsletter* 7: 20–23.
- Rocher A, Dumas C, Cock JM. 2005. A W-box is required for full expression of the SA-responsive gene SFR2. *Gene* 344: 181–192.
- Rouster J, Leah R, Mundy J, Cameron-Mills V. 1997. Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant Journal* 11: 513–523.
- Rozañov MN, Koonin EV, Gorbalenya AE. 1992. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the “Sindbis-like” supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* 73: 2129–2134.
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE. 1996. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *EMBO Journal* 15: 5690–5700.
- Rushton PJ, Somssich IE. 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 311–315.
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ. 2010. WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* 15: 247–258.
- Ruzicska P, Gombos Z, Farkas GL. 1983. Modification of the fatty acid composition of phospholipids during the hypersensitive reaction in tobacco. *Virology* 128: 60–64.
- Rys M, Juhász C, Surówka E, Janeczko A, Saja D, Tóbiás I, Skoczowski A, Barna B, Gullner G. 2014. Comparison of a compatible and an incompatible pepper-tobamovirus

- interaction by biochemical and non-invasive techniques: chlorophyll a fluorescence, isothermal calorimetry and FT-Raman spectroscopy. *Plant Physiology and Biochemistry* 83: 267–278.
- Salamon P. 2006: Növények és vírusok kapcsolatai a paprika (*Capsicum*) – tobamovírus patoszisztémákban. Doktori (PhD) értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar.
- Scholthof K-BG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C, Foster GD. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938–954.
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD. 2001. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *Journal of Biological Chemistry* 276: 25208–25211.
- Shah J, Klessig DF. 1996. Identification of a salicylic acid-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis-related beta-1,3-glucanase gene, *PR-2d*. *Plant Journal* 10: 1089–1101.
- Shi W, Liu D, Hao L, Wu C, Guo X, Li H. 2014. GhWRKY39, a member of the WRKY transcription factor family in cotton, has a positive role in disease resistance and salt stress tolerance. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 118: 17–32.
- Siedow JN. 1991. Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 145–188.
- Simkin AJ, Changfu Z, Kuntz M, Sandmann S. 2003. Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *Journal of Plant Physiology* 160: 439–443.
- Singh DP, Moore CA, Gilliland A, Carr JP. 2004. Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid. *Mol. Plant Pathology* 5:57-63.
- Singh KB, Foley RC, Onate-Sánchez L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 430-436.
- Slusarenko AJ. 1996. The role of lipoxygenase in plant resistance to infection. In: *Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes* (Ed. Piazza G.), AOCS Press, Champaign, IL, pp. 176-197.
- Stanley WM. 1935. Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science* 81: 644-645.

- Stapleford KA, Miller DJ. 2010. Role of cellular lipids in positive-sense RNA virus replication complex assembly and function. *Viruses* 2: 1055–1068.
- Steczko J, Donoho GP, Clemens JC, Dixon JE, Axelrod B. 1992. Conserved histidine residues in soybean lipoxygenase: functional consequences of their replacement. *Biochemistry* 31: 4053–4057.
- Strompen G, Grüner R, Pfitzner UM. 1998. An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant Molecular Biology* 37: 871–883.
- Stumpe M, Kandzia R, Göbel C, Rosahl S, Feussner I. 2001. A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells. *FEBS Letters* 507: 371–376.
- Sun J, An H, Shi W, Guo X, Li H. 2012. Molecular cloning and characterization of *GhWRKY11*, a gene implicated in pathogen responses from cotton. *South African Journal of Botany* 81: 113–123.
- Takahashi H, Kanayama Y, Zheng MS, Kusano T, Hase S, Ikegami M, Shah J. 2004. Antagonistic interactions between the SA and JA signaling pathways in *Arabidopsis* modulate expression of defense genes and gene-for-gene resistance to cucumber mosaic virus. *Plant and Cell Physiology* 45: 803–809.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Thaler JS, Owen B, Higgins VJ. 2004. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* 135: 530–538.
- Thangavelu M, Belostotsky D, Bevan MW, Flavell RB, Rogers HJ, Lonsdale DM. 1993. Partial characterization of the *Nicotiana tabacum* actin gene family: evidence for pollen-specific expression of one of the gene family members. *Molecular and General Genetics* 240: 290–295.
- Thibaud-Nissen F, Wu H, Richmond T, Redman JC, Johnson C, Green R, Arias J, Town CD. 2006. Development of *Arabidopsis* whole-genome microarrays and their application to the discovery of binding sites for the TGA2 transcription factor in salicylic acid-treated plants. *Plant Journal* 47: 152–162.

- Thompson AJ, Jackson AC, Symonds RC, Mulholland BJ, Dadswell AR, Blake PS, Burbidge A, Taylor IB. 2000. Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant Journal* 23: 363-374.
- Tóbiás I, Rast ATB, Maat DZ. 1982. Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: comparative host reactions and serological relationships. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 88: 257–268.
- Tóbiás I, Fraser R, Gerwitz A. 1989. The gene-for-gene relationship between *Capsicum annuum* L. and tobacco mosaic virus: effects on virus multiplication, ethylene synthesis and accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 271–286.
- Umate P. 2011. Genome-wide analysis of lipoxygenase gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Signaling and Behavior* 6: 335–338.
- Vaghchhipawala Z, Rojas CM, Senthil-Kumar M, Mysore KS. 2011. Agroinoculation and agroinfiltration: simple tools for complex gene function analyses. In: *Plant Reverse Genetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 678 (Ed. Pereira A). Springer Science+Business Media, LLC, pp. 65-76.
- Van de Poel B, Bulens I, Markoula A, Hertog MLATM, Dreesen R, Wirtz M, Vandoninck S, Oppermann Y, Keulemans J, Hell R, Waelkens E, De Proft MP, Sauter M, Nicolai BM, Geeraerd AH. 2012. Targeted systems biology profiling of tomato fruit reveals coordination of the Yang cycle and a distinct regulation of ethylene biosynthesis during postclimacteric ripening. *Plant Physiology* 160: 1498–1514.
- Van de Poel B, Van Der Straeten D. 2014. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Frontiers in Plant Science* 5: 640.
- Van Loon LC, 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 tobacco mosaic virus. *Virology* 40: 190–211.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135–162.

- Van Loon LC, Van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85–97.
- Van Verk MC, Pappaioannou D, Neeleman L, Bol JF, Linthorst HJM. 2008. A Novel WRKY transcription factor is required for induction of *PR-1a* gene expression by salicylic acid and bacterial elicitors. *Plant Physiology* 146: 1983–1995.
- Velasco L, Janssen D, Ruiz-Garcia L, Segundo E, Cuadrado IM. 2002. The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a pepper mild mottle virus (PMMoV) isolate that overcomes *L³* resistance in pepper. *Journal of Virological Methods* 106: 135–140.
- Vlot, AC, Dempsey DA, Klessig DF. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*:47, 177–206.
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X. 2006. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathogens* 2: e123.
- Wang YQ, Yang Y, Fei Z, Yuan H, Fish T, Thannhauser TW, Mazourek M, Kochian LV, Wang X, Li L. 2013. Proteomic analysis of chromoplasts from six crop species reveals insights into chromoplast function and development. *Journal of Experimental Botany* 64: 949-961.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Mettraux JP, Ryals JA. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085–1094.
- Weber H. 2002. Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science* 7: 217–224.
- Weber H, Chételat A, Caldelari D, Farmer EE. 1999. Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* 11: 485–494.
- Weichert H, Stenzel I, Berndt E, Wasternack C, Feussner I. 1999. Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves--preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS Letters* 464: 133–137.
- Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78: 1101-1115.

- Whitham S, McCormick S, Baker B. 1996. The *N* gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 8776–8781.
- Wingate VP, Lawton MA, Lamb CJ. 1988. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiology* 87: 206-210.
- Winterbourn CC, Hampton MB. 2008. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 45: 549–561.
- Wright KM, Duncan GH, Pradel KS, Carr F, Wood S, Oparka KJ, Santa Cruz S. 2000. Analysis of the *N* Gene Hypersensitive Response Induced by a Fluorescently Tagged Tobacco Mosaic Virus. *Plant Physiology*: 123: 1375–1386.
- Wu K-L, Guo Z-J, Wang H-H, Li J. 2005. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins. *DNA Research* 12: 9–26.
- Wu W-Q, Fan H-Y, Jiang N, Wang Y, Zhang Z-Y, Zhang Y-L, Wang X-B, Li D-W, Yu J-L, Han C-G. 2014. Infection of *Beet necrotic yellow vein virus* with RNA4-encoded P31 specifically up-regulates pathogenesis-related protein 10 in *Nicotiana benthamiana*. *Virology Journal* 11: 118.
- Yalpani N, Silverman P, Wilson TM, Kleier DA, Raskin I. 1991. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3: 809–818.
- Yamamoto S, Nakano T, Suzuki K, Shinshi H. 2004. Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. *Biochimica et Biophysica Acta* 1679: 279–287.
- Yang PZ, Chen CH, Wang ZP, Fan BF, Chen ZX. 1999. A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant Journal* 18: 141–149.
- Yang PZ, Chen ZX. 2001. A family of dispersed repetitive DNA sequences in tobacco contain clusters of W-box elements recognized by pathogen-induced WRKY DNA-binding proteins. *Plant Science* 161: 655–664.
- Yu D, Chen C, Chen Z. 2001. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* 13: 1527–1540.

- Zheng Z, Mosher SL, Fan B, Klessig DF, Chen Z. 2007. Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biology* 7: 2.
- Zheng JY, Zou XX, Mao ZC, Xie BY. 2011. A novel pepper (*Capsicum annuum* L.) WRKY gene, *CaWRKY30*, is involved in pathogen stress responses. *Journal of Plant Biology* 54: 329-337.
- Zhu F, Xi D-H, Yuan S, Xu F, Zhang D-W, Lin H-H. 2014. Salicylic acid and jasmonic acid are essential for systemic resistance against tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 567–577.

9. Összefoglalás

Kutatásaink célja az volt, hogy jobban megismerjük a tobamovírusokkal szembeni rezisztenciát meghatározó biokémiai reakciókat paprikában. Egy kompatibilis és egy inkompatibilis paprika-tobamovirus kölcsönhatás összehasonlítása során azokat a növényi védekezési reakciókat kerestük, amelyek korai időpontban és erőteljesen indukálódnak az inkompatibilis kapcsolatban, míg a kompatibilis kapcsolatban csak kis mértékben vagy egyáltalán nem aktiválódnak. A munkánk korai szakaszában klónoztuk és megszekvenáltattuk három paprika lipoxigenáz gén és egy *WRKY* transzkripciósfaktort kódoló gén teljes szekvenciáját, illetve egy lipoxigenáz és egy 9-allénoxid-szintetáz gén részleges szekvenciáját (GenBank JF304313, DQ473539, DQ473540, KF484401, KC404864 és KC404862). A paprika genom ismertté válása után feltérképeztük a paprika genomban előforduló PR-1, PR-4, PR-10 és lipoxigenáz fehérjéket valamint az oxilipin bioszintézisben és a karotinoid lebontásban részt vevő egyes enzimeket. Megállapítottuk, hogy az inkompatibilis paprika-ObPV kölcsönhatás során egyes kórfolyamathoz kapcsolódó fehérjéket (BPR-1, PR-4 és PR-10, defenzin), 9-lipoxigenáz enzimeket (9-LOX1, 9-LOXb, 9-LOXd), egy lipáz enzimet (PAT1) és *WRKY* transzkripciósfaktorokat (*WRKY*-a, *WRKY*2) kódoló paprika gének indukciója szerepet játszhatnak a vírusrezisztenciában. Részletesen megvizsgáltuk öt lipoxigenáz gén indukálhatóságát három növényi hormonnal. A lipoxigenáz gének promótereinek bioinformatikai elemzésével kimutattuk, hogy összefüggés van a gének etilén-indukálhatósága és a promótereikben található, etilénnel aktiválható transzkripciósfaktorokat kötő nukleotid motívumok száma között. Megállapítottuk, hogy az ObPV-inokulált levelekben mért szalicilsav felhalmozódás a fenilpropanoidokon keresztül történő bioszintézis aktiválódásával magyarázható. Kimutattuk az általunk megszekvenált paprika *WRKY70* gén igen erős indukálhatóságát szalicilsav hatására. A *WRKY2* gén funkcionális vizsgálatát is elvégeztük olyan módon, hogy ezt a gént tranziens módon kifejeztettük *N. benthamiana* dohánylevelekben. A *WRKY2* gént kifejező, tranziens módon transzformált dohányokat TMV-vel fertőzve kimutattuk, hogy a *WRKY2* expressziója nem módosította a TMV fertőzés lefolyását a fertőzött (inokulált) levelekben, de lényegesen késleltette a növények szisztemikus nekrozisát. Ezek szerint a *WRKY2* gén túltermelésének hatására a TMV növényen belüli lokális (sejtről-sejtre történő) és hosszú távú transzportja is gátlódhat.

Summary

The aim of our studies was to reveal key biochemical mechanisms underlying the resistance of pepper plants against tobamoviruses. We compared plant defense reactions during the incompatible pepper-ObPV and the compatible pepper PMMoV interactions. We identified those defense reactions, which were rapidly and robustly activated during the incompatible interaction, while they were only weakly induced or not at all in the compatible interaction. In the early phase of our work we cloned the complete coding sequence of three pepper lipoxygenase genes and a gene encoding a WRKY transcription factor as well as the partial sequence of a lipoxygenase and a 9-allene oxide synthase gene (GenBank JF304313, DQ473539, DQ473540, KF484401, KC404864 és KC404862). Later, as the entire pepper genome sequence has been published, we prepared the dendrograms of protein sequences of pepper PR-1, PR-4, PR-10 and lipoxygenases as well as those proteins that are participating in the biosynthesis of oxylipins and in the catabolism of carotenoids. We demonstrated that pepper genes encoding pathogenesis related proteins (BPR-1, PR-4, PR-10 and a defensin), 9-lipoxygenases (9-LOX1, 9-LOXb, 9-LOXd), a lipase (PAT1) and WRKY transcription factors (WRKY-a, WRKY2) can play principal roles in virus resistance. The bioinformatic analysis of the promoter sequences of lipoxygenase genes revealed a correlation between the ethylene-inducibility of these genes and the number of ethylene-specific nucleotide motifs in the promoter regions. We found that the marked accumulation of salicylic acid in ObPV-inoculated pepper leaves can be explained by the activation of the phenylpropanoid pathway of salicylic acid biosynthesis. We observed that salicylic acid very robustly induced the expression of the pepper *WRKY70* gene, which was sequenced by us. We carried out the functional analysis of the pepper *WRKY2* gene by creating transgenic *N. benthamiana* plants transiently overexpressing *WRKY2*. By infecting the transgenic plants with TMV we demonstrated that in the inoculated leaves, the overexpression of *WRKY2* did not modify the TMV replication rate. On the other hand, *WRKY2*-overexpression significantly delayed the systemic necrosis of virus-infected plants. These results showed that the overexpression of *WRKY2* probably hinder both the local (cell-to-cell) and long-distance movement of TMV.

10. Függelék

F1. táblázat A PCR kísérletekhez használt primerek (5'- 3' irányban)

célgén (GenBank)	forward primer	reverz primer	termék mérete (bp)	annealing hőmérséklet (°C)
ObPV köpenyfehérje (L11665)	ttactgtctccaagccaacta	gtaccacgcactaactcg	403	51
PMMoV köpenyfehérje (AB000709)	gggctgatccattagagtta	gagttgtagcccaggtgagtc	417	53
CaBPR-1 (AF053343)	gctggtgccgtgaagat	agaataacaaaataaaacaacaag	445	51
CaPR-4 (AF244122)*	aactgggatttgagaactgccagc	atccaaggtagatatagagcttcc	489	54
CaPR-10 (AF244121)**	atggtgaaggtgatggtggtgctg	tcccttagaagaactgatacaacc	484	55
defenzin (AF442388)	ccatgcgtttcttctgctatt	gaactacgagcctagtgaca	394	56
aktin (AY572427)	agcaactgggacgatatggagaaga	aagagacaacaccgctgaatagca	198	55

Szekvenáláshoz használt primerek

13-LOXa 1	gactcaaagaagattaaaaaaaaataa	atagcatcattttatttcacg	2816	52
13-LOXa 2	cagaagattttggagaagt	ttggcctatttggaaagtaacct	1866	51
13-LOXa 3	taacattctcaggcaacac	aggcatttatctccattgtat	873	53
13-LOXc degenerált	gctattgarctsactgrcca	ggccaccavgttcrtc	659	55
13-LOXc 3' RACE outer	tcattggctaaggactcattgtgctacaga	gctgtcaacgatacgtacgtaacg***		55
13-LOXc 3' RACE inner	ttccttggcaagtattcaatggagtaag	gctgtcaacgatacgtacgtaacg***		55
13-LOXc	gggcaaattgaaggaactga	tctttcataaacattagctga	184	55

Specifikus LOX primerek valós idejű RT-qPCR-hez

9-LOX1	aggactcacaggcaaaggaataccaacag	gagccctatttaactcaagctcttggat	281	65
13-LOXa	gaaacaattgaaccttactgggctgaagac	tttttatttcacgtgaatgtttattacaca	295	59
9-LOXb	tatctccctaactcgcctacacta	aaacaacaaaacaaacgattcaa	541	58

9-LOXd	gttctacagcacagatagcct	ggggaatttgctatattgtac	175	55
--------	-----------------------	-----------------------	-----	----

Az oxilipinek bioszintézisében szerepet játszó gének primerei

13-AOS-1 (XM_016713195)	acgacgcattattgagatc	ccagcacactgcttggtg	208	54
13-AOS-2 (XM_016692951)	gagtcacatgacgctaccttc	tccgattccggtcattgg	182	55
13-HPL (NM_001324881)	agtgccaagtcaaatgac	tctgtggaccattagacc	221	52
AOC (XM_016699708)	aggggtttccggtaagta	gacccaacaaaagtcgtga	236	60
9-DES (NM_001324584)	ccagtaccattacagtacg	cctccattagaccatagac	216	54
9-AOS-1 (XM_016690320)	acaggaggaccggctttacat	gattttgatattcgtttccc	559	56
9-AOS-2 (XM_016690286)	aattcggaccactcttgcttg	ggcacattgcatgggtttat	240	58
9-HPL-1 (XM_016684207)	acaatgcgtagggaggatct	ttcggagtaaccacatgcaga	247	58
9-HPL-2 (XM_016684206)	tggtgtgctgtagacagg	agaccacgagtcctagac	200	58
PAT1 (NM_001324789)	aacagggcgatacgaaccagt	aattttatttcctcgtggggatgt	247	53

A hormonok bioszintézisében szerepet játszó gének primerei

ACO (XM_016698789)	ttggagaagttggctgaggagta	aagttggcgcgggatagattac	433	56
actin (AY572427)	agcaactgggacgatatggagaaga	aagagacaacaccgctgaatagca	198	55
ICS1 (AY743431)	tcacggtgcaccaactc	ccaagaccctttcaaccaa	179	58
13-LOX2 (JQ219046)	ggaccggcgatgcagaga	atgtactgcatcttaa	234	50
13-LOX6 (XM_016692059)	acttggcagcatgcaatttgt	cgcgatcttcttcgaaagac	164	59
NCED1 (XM_016697078)	gaaaaggaatggaaatcgga	cggggacgtatattctaac	231	55
NCED2 (XM_016691094)	agtaccacaaaaattatagg	tctgagctttccgaatc	208	57
NCED3 (XM_016719296)	aaagagtgcatatggtt	tcaagaagggtattcaataga	200	54
PAL1 (KF279696)	ggaaggaacttgaactga	gcacttgacaagcactaaca	204	58
PAL2 (XM_016710142)	ggcaagtcatccattcttaa	ggggacgagatgaaccat	214	52
PAL3 (XM_016687267)	aggtgaaagagtcgatca	gaatctgaaaaatggcacta	188	52
CCD1 (Y14164)	gccgccttatgaatccagaccta	gggatggcatatcgggggtgatag	611	55

WRKY gének primerei

WRKY1 (EF468464)	agcagcagcaagaggaaaga	acccccacaatgtttggta	390	56
WRKY2 (DQ402421)	accactgttacggagggtgt	cgaacgaaaggaaactgcta	182	58
WRKY30 (FJ360844)	agtagttcggatgttatcacc	gaaatttcagccgttgacata	151	58
WRKY70 (KF484401)	acttatgggaagattttatgcc	acaacattagccttaagggttt	181	55
WRKY70 klónozáshoz	tcttatctctttccctcttcc	caacattagccttaagggttt	1093	56
WRKY-a (AY391747)	caaagcctcaatccaccag	gctcgctctacatgcttcctaac	446	55
WRKY-b (AY743433)	aaggcataaatacactgggt	agcagcgtgtttttatgctc	176	58
RKNIF1 (DQ180348)	gagggcggtagaagtacaa	tgcaaacgcgagaactagaaa	543	55
A1244 (DQ102364)	gcatcaccagcaacaacaac	acgatgcgcaatctcctaat	517	58
aktin (AY572427)	agcaactgggacgatatggagaaga	aagagacaacaccgctgaatagca	198	56

WRKY2 transzformáció primerei

WRKY2-OSP	ggagatagaaccatggctgcttcaagtttctcat	cctccggatcctcagcaaagcaatgactccata	1670	52
M13	gtaaaacgacggccag	caggaaacagctatgac	?	52
PE100 35 S upper:	ctaacagaactcgccgtgaag			
PE103 GFP rev:		atcaccttcaccctctccac		
WRKY2 qPCR primer (DQ402421)	gcacaagtccaggatgtcca	tgagatgtcacggagggtct	205	60
NtPR-1a (D90196)	taaaagcaacttaagtcaa	caagtagctagaccatcaaca	194	56
NtPR-1b (X03465)	caggaagtggcgattttatg	agaccacttgactttttacagat	400	58
NbPR-10 (KF841443)	cagtgaaggcaaagatcaagc	caagcccttaggaactcttag	253	56
NtGSTU1* (degenerált primer pár)	gatggcagaagtgaagttg	ctcctagccaaaatscca	n.d.	50
NbLOX1 (KC585517)	gcctgttaaagttccatata	gcctacagcattacatcc	231	58
NtWRKY1 (AB022693)	ctcgtcgggatcttatcatga	ttacagctgccaaccaatct	280	58
TMVCP-1 (AF165190)	cttgtcatcagcgtgggc	aagtactgtcagggaac	165	47
dohány aktin** (X69885)	cggaatccacgagactacatac	gggaagccaagatagagc	230	60

* (Dean és mtsai. 2005); ** (Thangavelu és mtsai. 1993); n.d. = nem definiált