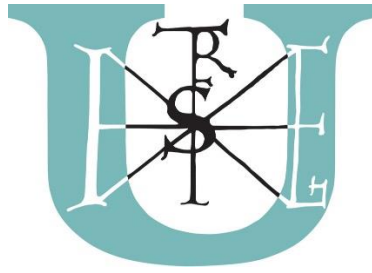


Doktori (PhD) értekezés

Kámán-Tóth Evelin

Budapest

2018.



Szent István Egyetem
Kertészettudományi Doktori Iskola

Reaktív oxigén származékokat termelő enzimrendszerek szerepe a
növényi sejt megbetegedésében és a rezisztenciában, *Arabidopsis*
thaliana-*Alternaria brassicicola* kapcsolatában

Kámán-Tóth Evelin

Budapest

2018.

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Zámboriné dr. Németh Éva
 Egyetemi tanár, DSc
 Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar,
 Gyógy és Aromanövények Tanszék

Témavezető: Dr. Pogány Miklós
 Tudományos főmunkatárs, PhD
 MTA ATK Növényvédelmi Intézet
 Növényi Kórélettani osztály

Dr. Palkovics László
 Egyetemi tanár, DSc
 Szent István Egyetem
 Kertészettudományi Kar
 Növénykórtani Tanszék

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

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG

Elnöke: Hegedűs Attila, DSc, SZIE

Tagjai:

Pótelnöke: 1. Bíró Borbála, DSc, SZIE

Titkár: 2. Karacs-Végh Anita, PhD, SZIE

3. Molnár Orsolya, PhD, MTA ATK Növi

4. Pál Magda, PhD, MTA ATK Mgi

Opponensei: 1. Papp István, DSc, SZIE

2. Barna Balázs. CMHAS, MTA ATK Növi

TARTALOMJEGYZÉK

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
1. BEVEZETÉS.....	9
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	10
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	11
3.1. A növényi stressz általános jellemzése.....	11
3.2. Növényi védekezési formák patogénekkal szemben	12
3.3. A patogén által kiváltott növényi immunreakció	12
3.4. Reaktív oxigén fajták a növényekben.....	13
3.5. ROS termelő enzimrendszerek.....	15
3.5.1. NADPH-oxidázok.....	15
3.5.2. Sejtfa-peroxidázok.....	16
3.5.3. Poliamin-oxidázok	17
3.6. Antioxidánsok szerepe a redox egyensúly fentartásában.....	17
3.7. Reaktív oxigén származékok és növényi hormonok kapcsolata.....	19
3.8. Gazda-patogén kapcsolatok a kórokozó életmódja alapján	22
3.8.1. NADPH-oxidáz gének <i>Alternaria</i> fajokban.....	22
3.8.2. <i>Alternaria</i> fajok védekezése a növényi reaktív oxigén származékokkal szemben	23
3.9. Reverz genetikai eljárások.....	24
3.9.1. T-DNS inszerciós mutagenézis.....	24
3.9.2. Vírus-indukálta géncsendesítés.....	25
3.10. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>Rhizobium radiobacter</i>) genetikai manipulációja.....	26
3.11. Vizsgálatunk modell organizmusai	27
3.11.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
3.11.2. Az <i>Alternaria</i> spp. nemzetség.....	28
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	30
4.1. Növénynevelési körülmények, növényi anyagok	30
4.2. Az <i>Alternaria brassicicola</i> gomba fenntartása és a gombafertőzés	32
4.3. Transzgén jelenlétének igazolása a <i>prx33</i> mutánsban.....	33
4.4. Mutáció és transzgén hatásának igazolása qPCR-rel.	34
4.5. Fertőzést követő génindukciós időpontok meghatározása	41
4.6. Kórtani vizsgálatok	42
4.6.1. Léziószám meghatározás.....	42
4.6.2. DAB festés	42
4.6.3. DCFH-DA festés.....	43
4.7. <i>Alternaria brassicicola</i> gomba biomassza mennyiségének meghatározása.....	43

4.8. Génaktivitás és a szenescencia kapcsolata	44
4.9. Vírus-indukálta géncsendesítés (VIGS, Virus-induced gene silencing).....	35
4.10. Arabidopsis tranziens transzformációja agroinfiltrációval	39
4.11. Agrobaktérium elektroporálásának optimalizálása	45
4.11.1. Elektrokompetens sejt készítése	45
4.11.2. Elektroporáció	46
4.11.3. Agrobaktérium törzsek	47
4.11.4. Direkt elektroporáció	47
4.11.5. Transzformációs hatékonyság számítása	48
4.12. Statisztika	48
5. EREDMÉNYEK	49
5.1. T-DNS beépülés igazolása a vizsgált <i>At3g49110</i> és <i>At3g49120</i> lokuszokon	49
5.2. T-DNS inszerció és transzgén hatásának igazolása <i>prx33</i> és H4 növényekben.....	50
5.3. TRV alapú géncsendesítés adaptálása Arabidopsisra	51
5.4. Géncsendesítés hatásának igazolása.....	54
5.5. <i>Alternaria brassicicola</i> fertőzésre kialakuló génindukciók	55
5.6. <i>Alternaria brassicicola</i> gomba tüneteinek értékelése.....	57
5.7. <i>Alternaria brassicicola</i> fertőzés hatására keletkező hidrogén-peroxid kimutatása Arabidopsis növényekben	58
5.8. <i>Alternaria brassicicola</i> gomba biomassza mennyiségének meghatározása	60
5.9. Génműködés és a levél életkorának kapcsolata	61
5.10. Kölcsönható gének	63
5.11. Agrobaktérium elektroporációjának optimalizálása	65
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	74
7. KÖVETKEZTETÉSEK	75
8. ÖSSZEFOGLALÁS	80
9. SUMMARY	81
10. MELLÉKLETEK.....	82
M1. Irodalomjegyzék.....	82
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	97

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ROS	Reactive Oxygen Species, Reaktív oxigén származékok
MAMP	Microbe-associated molecular pattern, Mikróbákhoz kapcsolt molekuláris mintázat
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern, Patogénekhez kapcsolt molekuláris mintázat
PTI	PAMP-triggered immunity, PAMP kiváltotta immunitás
TRV	Tobacco rattle virus
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PR	Pathogenesis Related
ETI	Effector-triggered immunity, Effector kiváltotta immunitás
HR	Hypersensitive reaction, Hiperszenzitív reakció
Avr	Avirulens
SOD	Superoxide dismutase, Szuperoxid-dizmutáz
SAR	Systemic acquired resistance, Szisztémikus szerzett rezisztencia
SA	Salicylic acid, Szalicilsav
Me-SA	Methyl-salicylate, Metil-szalicilsav
LB táptalaj	Luria-Bertani táptalaj
GFP	Green fluorescent protein, Zöld fluoreszcens fehérje
DMSO	Dimetil-szulfoxid
VIGS	Virus-induced gene silencing, Vírus indukált géncsendesítés
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate
HAI	Hours After Inoculation, fertőzés óta eltelt óraszám
DAI	Days After Inoculation, fertőzés óta eltelt napok száma
MOCK	Fertőzetlen kontroll

KAT	Kataláz
H ₂ O ₂	Hidrogén-peroxid
RBOH	Respiratory burst oxidase homolog
TMV	Tobacco mosaic virus
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl--D-galactoside
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid

1. BEVEZETÉS

A növényeket életük során rengeteg biotikus és abiotikus stressz éri. A helyhez kötött életmód miatt nem térhetnek ki a stresszhatások elől, ezért különböző védelmi mechanizmusokat kellett kifejlesztetniük, hogy kivédjék azokat. Kedvezőtlen környezeti hatásokra és kórokozók támadására a növények magas reaktivitású, oxigéntartalmú szabadgyökök és molekulák termelésével védekeznek, az úgynevezett reaktív oxigén származékokkal (ROS). A hirtelen nagy mennyiségben felhalmozódó reaktív oxigén származékok az oxidatív robbanás jelenségét idézik elő (Daudi és mtsai 2012). A ROS többféle módon károsíthatják a behatoló kórokozókat, okozhatnak anyagcsere gátlást, védekezési jelátviteli utakat aktiválhatnak és a növényi szövetkárosítás által kialakult nekrotikus léziókban a kórokozók további tápanyagfelvételét is korlátozhatják (Baker és Orlandi 1995). A növényi szövetkárosítás révén gátolt anyagfelvétel hatékonynak bizonyulhat különféle biotróf életmódú patogénekkal szemben, ugyanakkor nekrotróf gombák támadásakor, például *Alternaria* fajok fertőzése során az oxidatív robbanás okozta növényi szövet károsodás elő is segítheti a kórokozó kolonizációját, mivel ezek a fonalas gombák képesek az elhalt növényi szövetekből is tápanyagokat kinyerni (Glazebrook és mtsai 2005). A növényi sejtközi járatokban történő reaktív oxigén származékok felhalmozódása különféle enzimrendszerek működésének következménye, ilyenek egyebek mellett a NADPH-oxidázok, a sejtfal-peroxidázok és a poliamin-oxidázok.

A leginkább tanulmányozott enzim, mely a növényi sejtközi járatokban felhalmozódó ROS termelődésért nagyban felelős, a plazmamembránban lokalizált NADPH-oxidáz (RBOH, respiratory burst oxidase homolog) (Frederickson és Loake 2013; Liu és He 2016). E fontos enzim mellett a sejtfal-peroxidázok és poliamin-oxidázok szerepe és jelentősége patogénekkal szemben még nem kellőképpen ismert, kevés tanulmány foglalkozik velük.

Doktori dolgozatom témájaként tehát a növényi sejtközi járatban kialakult oxidatív robbanásért felelős enzimrendszerek szerepét vizsgáljuk, különösképpen két sejtfal-peroxidázét, a PRX33 és PRX34 peroxidázét, *Arabidopsis thaliana* modellnövény és egy jelentős gazdasági károkat okozó nekrotróf kórokozó, az *Alternaria brassicicola* kapcsolatában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Az AtPRX33 (*At3g49110*) és AtPRX34 (*At3g49120*) sejtfal-peroxidázok szerepének igazolása az extracelluláris oxidatív robbanásban és a növényi rezisztenciában *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* növény-kórokozó kapcsolatában. Szerepük tisztázása érdekében célunk SALK T-DNS inszerciós, valamint transzgénikus növények felhasználása, bennük a vizsgált sejtfal-peroxidázok hiányára kialakuló tünetek vizsgálata gombafertőzés hatására.
2. Célunk volt olyan szabályozó géneknek a leírása, melyek a növény fertőzésre adott válaszában szerepet játszanak és hatással vannak a PRX33 és PRX34 gének működésére, aktiválódására.
3. A PRX33 és PRX34 sejtfal peroxidázok együttes vizsgálatához TRV alapú vírus-indukálta géncsendesítés adaptálása *Arabidopsis* növényre, majd a PRX33 és PRX34 sejtfal-peroxidázokat kódoló gének csendesítése egy növényen belül.
4. A génszabályozási munkák során gyakran alkalmazott *Agrobacterium tumefaciens* baktérium elektroporációs módszerének optimalizálása a laboratóriumi munkák hatékonyabbá tétele céljából.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A növényi stressz általános jellemzése

A megterheléssel járó helyzetek leírására, melyek során az adott szervezet viselkedése eltér a normálistól, a különböző tudományágak a stressz kifejezését használják. Szigeti (1998), a növényekre vonatkoztatva a következőképpen fogalmazta meg a stressz meghatározását. A stressz egy olyan terheléses állapot, amelyben a növényvel szembeni fokozott igénybevétel a funkciók kezdeti destabilizációját követően egy normalizálódáson át az ellenállóság fokozódásához vezet, majd a tűréshatár túllépésekor tartós károsodást vagy akár pusztulást is okoz.

Stresszornak azokat a környezeti elemeket nevezik, amelyek stresszt okoznak, ennek eredményeként az élőlények fiziológiai folyamataik megváltoztatásával próbálnak alkalmazkodni a kialakult stresszhelyzethez. A növényekre ható stresszorokat több szempont szerint is csoportosíthatjuk. Megkülönböztethetünk természetes, illetve antropogén tényezőket. A természetes stresszorok a természeti környezet spontán megváltozásai, mint pl. a nagy fényintenzitás, a fagy, a szikesedés vagy az ásványi anyagok hiánya. Az antropogén stresszorok pedig az emberi tevékenység eredményeként létrejövő károsító tényezők. Ide soroljuk a herbicideket, peszticideket, a légszennyező anyagokat, a toxikus fémek feldúsulását, stb. Más felosztás szerint beszélhetünk biotikus és abiotikus tényezőkről. Az abiotikus tényezők az élettelen környezeti hatások, mint a szél, a hőmérséklet, vízellátottság, stb. míg a biotikus hatású stresszorok közé a patogén vírusokat, baktériumokat, gombákat vagy kártevő rovarokat soroljuk (Gaspar és mtsai. 2002, Levitt 1980).

Az élőlényekben, így a növényekben is a stressz hatására egy jellegzetes eseménysor indul be, amit stressz-szindrómának nevezünk. Ez három, egymástól jól elkülöníthető szakaszból áll. Az első a vészreakció, mely során a stressz-hatásnak köszönhetően fokozódik a terhelés, a szervezet működése eltér a normálistól, ennek következtében pedig csökken a vitalitás, azaz a növény életképessége. Ekkor előtérbe kerülnek a lebontó folyamatok a felépítő jellegűekkel szemben. Az ellenállás minimumának elérése után akut károsodás következik be. Ha a növény rezisztenciapotenciálja lehetővé teszi, akkor a második fázisba, az ellenállási szakaszba jut, amelyben alkalmazkodási és reparációs folyamatok eredményeként a növény ismét normális működést mutat, fokozódik az ellenállóképessége és edzettebbé válik. A harmadik a kimerülési fázis, amely az alkalmazkodóképességet meghaladó mértékű igénybevétel esetén következik be. Ha a

stressz-hatás megszűnik, a növény regenerálódik és beáll egy új standard szintre (Szigeti 1998, Osmond és mtsai 1980)

3.2. Növényi védekezési formák patogénekkel szemben

A növények, életük során számos mikroba fajjal kerülnek kapcsolatba. Bizonyos esetekben ez az érintkezés a növény számára hátrányos és megbetegedéshez vezethet, ilyenkor a növény-mikroba kapcsolat gazda-patogén kapcsolattá válik.

Mivel a növények nem rendelkeznek adaptív immunrendszerrel, hogy megvédjék magukat az őket károsító mikrobákkal szemben, a védekezéshez különböző kórokozó felismerő rendszereket és specifikus reakciókat fejlesztettek ki. A növény-patogén kölcsönhatások magyarázására a legelfogadottabb modell a Jones és Dangl (2006) által kidolgozott cikk-cakk modell. Ennek lényege, hogy a fertőzésekre adott növényi választ két fő szakaszra oszthatjuk. Az első szakasz, a kórokozó észlelése a patogének speciális molekuláris mintázatának révén (Microbial- or pathogen-associated molecular patterns, MAMP/PAMP) révén és az erre adott általános válaszreakció beindítása, míg a második szakaszban a kórokozó effektorainak felismerését követően egy specifikus immunválasz figyelhető meg.

3.3. A patogének által kiváltott növényi immunreakció

A fertőzés első szakaszában a növények plazma membránjában lokalizált PR receptorok (Pattern Recognition receptor) felismerik és megkötik a mikrobák által termelt MAMP/PAMP-okat. Ilyen mikrobákhoz/patogénekhez kapcsolt molekuláris mintázat például a flagellin, a xylanáz, a β -glükán, az ergoszterol vagy egyes lipopoliszacharidok. Ezek olyan molekuláris struktúrák, melyek egyedül a mikroorganizmusokra jellemzőek, ezáltal elkülöníthetőek a gazdaszervezet számára (Akira és mtsai. 2006). A specifikus felismerés a PTI-t, azaz a PAMP-ok által kiváltott immunreakciót (PAMP-triggered immunity) eredményezi, mely egy igen fontos védekezési reakció az összes növényfaj számára (Jones és Dangl 2006). Ugyanakkor nem minden növényfaj képes felismerni és válaszolni az egyes molekuláris mintázatokra, például az *Arabidopsis thaliana* felismeri a *Pseudomonas syringae*-ből származó harpineket és flagellineket, míg a paradicsom a gomba eredetű kitin fragmentumok, glikoproteinek és ergoszterolok azonosítására képes (Felix és mtsai. 1999, Boller és mtsai. 1995). A PTI során igen gyorsan beindul a reaktív

oxigén származékok termelése kis amplitúdóval, de csak viszonylag rövid ideig. Az ekkor termelt reaktív oxigén származékok egyrészt szignálként funkcionálnak a további immunreakciók beindításához, másrészt károsítják a patogéneket (Zang és mtsai 2007, Soyly és mtsai. 2005, Torres és mtsai. 2006).

Az evolúció során bizonyos kórokozók alkalmazkodtak ehhez a védekezési mechanizmushoz, és olyan effektorok termelésébe kezdtek, amelyek a sejtbe jutva elnyomják a növényi immunreakciót, a PTI-t. A növények ennek kivédése érdekében specifikus rezisztencia géneket, R-géneket fejlesztettek ki, melyekkel felismerik a patogének effektorait. Ezek az Avr (Avirulens) fehérjék. Az így lejátszódó folyamatot nevezzük effektorok által kiváltott immunreakciónak, azaz ETI-nek (Effector-triggered immunity) (Dangl és Jones 2001). Az ETI egy gyorsabb és intenzívebb immunreakció mint a PTI és leggyakrabban hiperszenzitív reakcióval (HR), tehát sejthalállal jár a fertőzött növényi szövetrészen (Greenberg és mtsai. 2004, Truman és mtsai. 2006).

3.4. Reaktív oxigén fajták a növényekben

A reaktív oxigén származékok, vagy rövidítve ROS (Reactive Oxygene Species), olyan oxigéntartalmú molekulák és szabadgyökök, melyek igen reaktívak, ezáltal toxikusak lehetnek az élőlények számára. A szabad gyökökre jellemző, hogy az atomok külső elektronhéján párosítatlan elektron található, vagyis egy elektron van egy orbitálon. Az elektronpályák akkor stabilak, ha az elektronok párokban helyezkednek el, ebből következik, hogy a szabadgyökök igen reaktívak és általában rövid élettartamúak. A legfontosabb ROS fajták a szuperoxid gyök (O_2^-) a hidrogén-peroxid (H_2O_2), hidroxil gyök (OH) és a nitrogén-monoxid (NO). A növény normális metabolikus folyamatai mellett állandóan keletkeznek, a fotoszintézis során a kloroplasztiszban vagy a glikolízis során, és keletkeznek reaktív oxigén származékok a peroxiszómákban, az endoplazmatikus retikulumban és a glioxiszómákban is. A fotoszintetizáló szövetekben a kloroplasztisz termeli legnagyobb mennyiségben a reaktív oxigén származékokat, köszönhetően a fotoszintetikus elektrontranszport láncnak. Ilyenkor szuperoxid gyök szabadul fel (Takagi és mtsai 2016). A nem fotoszintetizáló szövetekben, mint a gyökér, vagy a mag szöveiteiben viszont a mitokondriumok működése járul hozzá a legnagyobb mennyiségben a ROS képződésben. A mitokondriumokban a NADPH dehidrogenáz I, II komplex és az ubikinon pool a fő forrása a ROS termelőedésnek (Huang és mtsai 2016, Navrot és mtsai 2007).

A normál metabolikus folyamatok mellett abiotikus és biotikus stressz is indukálja a ROS termelőését a növényekben, mely sokszor olyan nagymértékű felhalmozódásához vezet, hogy

úgynevezett oxidatív robbanást eredményez (Bhattacharjee 2005). Abiotikus és biotikus stressz során tehát a növény képes a ROS fokozott termelése által az oxidatív robbanás kialakítására, mely túlnyomó részt hidrogén-peroxidot tartalmaz. Doke és munkatársainak (1983) megfigyelései alapján stressz hatásra a legkorábban megjelenő reaktív oxigénforma a szuperoxid, mely a szuperoxid-dizmutáz (SOD) izoenzimek működésének köszönhetően gyorsan átalakul hidrogén-peroxiddá. A hidrogén-peroxid egy közepes reakcióképességű molekula, mely gyorsan átjut a sejtmembránon, így a keletkezési helyétől távolabb is képes kifejteni a hatását, a szuperoxid erre csak korlátozottan képes. A hidrogén-peroxidról bizonyították, hogy egyéb fontos kórélettani szerepei mellett két igen fontos szerepe van a patogenezisben. Egyrészt toxikus a kórokozókra és gátolja a növekedésüket, valamint PR fehérjék és fitoalexinek termelődését indukálja (Doke 1997).

A reaktív oxigén származékok a biotikus és abiotikus stressz folyamatokban hírvívó molekulaként vagy szignálként is részt vesznek. Nem csak a képződési helyük környékén képesek hatni, hanem például a hidrogén-peroxid távolabbra diffundálva egy sor egyéb védekezési reakciót is aktivál (Torres és mtsai 2006). Szignálként azáltal érvényesülhet, hogy az adott ROS, az elsődleges szignálra adandó válaszként proteinek vagy más struktúrákat változtat meg közvetlenül. Ehhez redox érzékeny fehérjékre van szükség, melyek reverzibilis módon át tudnak alakulni egy oxidációs/redukációs folyamatban a növény redox állapotának megfelelően (Bhattacharjee 2005). A ROS tehát direkt, vagy indirekt módon oxidálják ezeket a redox érzékeny peptideket és fehérjéket, mint a glutation (GSH) vagy a tioredoxin, ezáltal megváltozik a sejtek redox állapota (Vranová és mtsai 2002). A sejtek a normál redox állapotukat komplex antioxidáns rendszerrel törekednek fenntartani. Antioxidáns pl. az aszkorbát és a glutation. Az antioxidáns molekulák oxidált vagy redukált formába történő átalakulása úgy működik, mint egy szenzor, mely változik a különböző hatásokra és megváltoztatja a sejt redox egyensúlyát (Foyer és Noctor 2016). Számos szignál útvonal áll redox szabályozás alatt, de a ROS valószínűleg direkt kapcsolatban állnak a redox metabolizmussal.

A ROS szignálként betöltött funkciója érvényesülhet az által is, hogy megváltozott sejtfunkcióhoz vezető jelátviteli kaszkádot indítanak el. Ilyen a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád, mely az eukarióta sejtekben evolúciósan konzervált jelátviteli mechanizmus. Olyan láncreakción alapszik, melynek utolsó tagja a MAP kináz (MAPK). A MAP kináz a tirozin és treonin aminosavainak foszforilációja következtében aktiválódik, a MAP kináz kináz (MAPKK) által, melynek aktivátora pedig a MAP kináz kináz kináz (MAPKKK). A MAPK kaszkád után a jelátviteli útvonal következő tagjai a transzkripciós faktorok, melyek képesek aktiválódásuk után bizonyos gének expresszióját indukálni (Nakagami és mtsai. 2005, Mishra és

mtsai 2006). *Nicotiana tabacum* dohány növényben nemrég azonosítottak egy WRKY transzkripciós faktort, mely MAPK által válik foszforilálttá és az aktiválást követően RBOH fehérjét szabályoz. Így kapcsolat alakul ki a MAP kinázok foszforilációs tevékenysége és a patogénekre adott növényi válasz, védekezési reakciók között (Adachi és mtsai 2015).

3.5. ROS termelő enzimrendszerek

Kórokozó mikroorganizmusok támadása során a növényi sejtközütti/intercelluláris járatokban felhalmozódó ROS fő forrásai, a plazmamembránban lokalizált NADPH-oxidázok (NOX), peroxidázok és amin-oxidázok (Torres és mtsai 2002), továbbá oxalát-oxidázok és kinon-reduktázok (Kärkönen és Kuchitsu 2015).

3.5.1. NADPH-oxidázok

A NADPH-oxidázokat, melyeket növényekben RBOH (respiratory burst oxidase homologue) rövidítéssel jelölünk, az emlős fagocita fehérvérsejtek szuperoxid termeléséért felelős NOX2 gén nukleotid sorrendjével való hasonlóságuk alapján fedeztek fel. A plazmamembránban lokalizált NADPH-oxidáz kulcsszereppel bír a növényi oxidatív robbanás kialakulásában, mivel működése közben szuperoxid gyök aniont generál az apoplaszt felé, ami gyorsan átalakul H_2O_2 -vé. Működésük szükséges számos növényfaj fejlődéséhez, továbbá biotikus és abiotikus stresszekre adott válaszaihoz. Nem kevés olyan eredmény született, mely az RBOH fehérjék növény-kórokozó kölcsönhatásokban betöltött funkciójára utal azáltal, hogy a fertőzött növényekben szabályozzák a programozott sejthalál kifejlődését. *Arabidopsis thaliana* növényben 10 NADPH-oxidáz kódoló *rboh* izoformát írtak le, *Oryza sativa* növényben 9-et, *N. benthamiana* növényben pedig kettőt (Marino és mtsai 2012; Kaur és mtsai 2014). Az RBOH fehérjék közül *Arabidopsis* növényben az RBOHF-nek és az RBOHD-nek tulajdonítanak igen fontos szerepet a rezisztenciában. (Torres és mtsai 2002, Torres és mtsai 2006). A növényi NADPH-oxidázok 6 transzmembrán doménből, citoszolikus FAD és NADPH kötő doménekből állnak (Kadota és mtsai 2015). *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* növény-gomba kölcsönhatás vizsgálata segítségével derült fény arra, hogy az *AtrbohD* gén által kódolt NADPH-oxidáz növényi hormonok (szalicilsav, etilén) szintjének szabályozásán keresztül befolyásolja a gombafertőzés során kialakuló növényi programozott sejthalált. Ezen kívül, az *A. brassicicola*-fertőzött *Arabidopsis* levelekben az RBOHD sejthalált indukál a kórokozó által közvetlenül megtámadott sejtekben, viszont gátolja a sejthalál terjedését a környező sejtekben (Pogány és

mtsai 2009). Habár a NADPH-oxidázok aktiválódásának mechanizmusa még nem teljesen világos, azt már tudni lehet, hogy az enzim Ca^{2+} ion kötése és foszforilációja vezet hatékony működéséhez. *Arabidopsis thaliana* sejtszuszenziót bakteriális MAMP Flg22-vel kezelve az RBOHD fehérje foszforilálódik (Ogasawara és mtsai 2008). Az RBOHD fehérje foszforilációját Ca^{2+} ion kötése előzi meg (Kimura és mtsai 2012), a kalcium függő aktivációt pedig fehérje foszforiláció és RBOH specifikus fehérje interakciók szabályozzák (Kawarazaki és mtsai 2013; Kaur és mtsai 2014).

3.5.2. Sejtfal-peroxidázok

A növényi sejtközi járatokban képződő ROS alternatív (NADPH-oxidázoktól eltérő) forrásaként sejtfal-peroxidáz enzimeket jelölnek meg. Ezek a fehérjék a peroxidázok III. osztályába tartoznak, ami a szekréciós peroxidázokat (pl. torna peroxidáz izoenzim C) foglalja magába (Blee és mtsai 2001). A III. osztályú peroxidázok redox reakciókban vesznek részt, melyben hidrogén-peroxidot használnak szubsztrátként, de maguk is képesek hidrogén-peroxidot generálni (Berglund és mtsai 2002). Az apoplasztban történő peroxidáz-függő oxidatív robbanást először Bach és munkatársai (1993) írták le sárgarépa (*Daucus carota*) sejtszuszenzió esetében. O'Brien és mtsai (2012) munkája alapján a patogénekre indukálódó oxidatív robbanásakor keletkező hidrogén-peroxid 50%-ért peroxidázok a felelősek *Arabidopsis thaliana* növényben. *Arabidopsis thaliana* növényben legalább 73 III. osztályú peroxidáz található (Welinder és mtsai 2002), ezek közül a PRX33 és PRX34 sejtfal-peroxidáz tűnik kulcsfontosságúnak a növényi védekezésben. *FBP1* (French bean peroxidase 1) antiszensz szekvenciával transzformált *Arabidopsis* növényekben csökkent az *AtPRX33* és *AtPRX34* sejtfal-peroxidázok mRNS szintje és a növények hidrogén-peroxid termelése vad típusú növényekhez képest. Mindezek miatt ezek a növények érzékenyebbé váltak *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 és *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 kórokozók fertőzésével szemben (Bindschedler és mtsai 2006). *AtPRX33* és *AtPRX34* knockdown mutáns *Arabidopsis* növényekben pedig a csökkent ROS termelés mellett a kallóz felhalmozódás is gátolt (Daudi és mtsai 2012). *Verticillium longisporum* fertőzött levelekben az apoplaszt fehérjék között a PRX34 mennyisége nőtt meg jelentősen vad típushoz képest (Floerl és mtsai 2012). Aszkorbát hiányos *Arabidopsis* levelekben pedig megnövekedett sejtfal-peroxidáz aktivitást írtak le, melyek közül a PRX33 és PRX34 sejtfal-peroxidázt emelték ki, melyek mennyisége aszkorbáthiányos állapot hatására jelentősen megnő (Sultana és mtsai 2015).

3.5.3. Poliamin-oxidázok

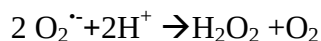
A poliaminok kicsi, pozitív töltéssel rendelkező alifás szénhidrogének. Számos funkciójuk ismert a növényekben, növekedési folyamatokban és különböző stresszválaszokban is részt vesznek. A növényekben keletkezett poliaminok a poliamin-oxidázok (PAO) által degradálódnak, ami során hidrogén-peroxid szabadul fel. Az *Arabidopsis thaliana* 5 poliamin-oxidáz izoformával rendelkezik, melyek szerepét elsősorban a csíranövény fejlődésével és a virágzással hozták kapcsolatba (Fincato és mtsai 2012), ugyanakkor vannak munkák, melyek szerint részt vesznek a növénykórokozók elleni védelmi mechanizmusokban is (Cona és mtsai 2006). A gazda eredetű hiperszenzitív reakció (HR) során kialakuló hidrogén-peroxid egyik fő forrása származhat a poliaminokból, mely hozzájárul az oxidatív robbanás kialakulásához és indukálja a hiperszenzitív sejthalált. Dohány mozaik vírussal (TMV) szemben rezisztens *Nicotiana tabacum* esetében leírták, hogy a vírus fertőzésekor jelentősen megnő a poliaminok és a poliamin-oxidázok szintje. Ugyanakkor specifikus PAO inhibitorokkal kezelt dohány-növényeken a poliamin-oxidázok hiányában nem tapasztalható a TMV kiváltotta HR (Yoda és mtsai 2009). Inkompatibilis növény-gomba kapcsolatban, árpa és lizstharma esetében a poliaminok szintje erősen megnövekedik, ami az őket lebontó poliamin-oxidáz enzimek szintjének növekedésével jár (Walters 2000). Mindezek alapján a gazda eredetű hiperszenzitív reakció (HR) során kialakuló hidrogén-peroxid egyik fő forrása származhat a poliaminokból, melyek így hozzájárulnak az oxidatív robbanás kialakulásához és a hiperszenzitív sejthalálhoz.

3.6. Antioxidánsok szerepe a redox egyensúly fentartásában

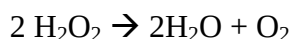
A növények a megnövekedett ROS mennyiséget és az okozott oxidatív károsodást antioxidánsokkal ellensúlyozzák, mellyel hozzájárulnak a sejtek normál redox egyensúlyának kialakításához. Mivel a reaktív oxigén származékok részt vesznek számos folyamatban, mint a kórokozók elleni védelemben vagy a szignál transzdukcióban, ezért a sejtek nem a ROS teljes eliminálására törekednek, hanem a megfelelő pro- és antioxidáns egyensúly fenntartására. Ha az egyensúly a prooxidánsok felé billen, oxidatív stresszről beszélünk (Ursini és mtsai. 2016).

Az antioxidánsok lehetnek enzimatisz és nem enzimatisz. Az enzimatisz antioxidánsok katalizálják a gyök-kioltó reakciókat, vagy maguk is képesek a ROS semlegesítésére. Így funkciójuk a kontrollálatlan gyökös láncreakció kialakulásának megelőzése. A magasabb rendű növényekben található legfontosabb enzimatisz antioxidánsok a szuperoxid dizmutáz (SOD) és a kataláz (KAT).

A ROS elleni első védelmi vonalat a szuperoxid dizmutáz jelentheti, mely a kloroplasztiszban, peroxiszómákban és a citoszolban lokalizált. A SOD egy fémtartalmú enzim, attól függően, hogy milyen fémet tartalmaz, megkülönböztetünk Cu/Zn-SOD-ot, Mn-SOD-ot és Fe-SOD-ot. Az enzim a szuperoxid dizmutációját katalizálja, mely során H_2O_2 és O_2 keletkezik. Működése:



A kataláz négy alegységből álló enzim, mely a hidrogén-peroxid hidrogéndonor nélküli bontását katalizálja:



A kataláz az egyik legjelentősebb hidrogén-peroxidot semlegesítő antioxidáns a növényekben. Keletkezhet a peroxiszómákban, mitokondriumokban és a glioxiszómákban is (Barna és mtsai. 2003, Willekens és mtsai. 1997).

Nem enzimatisz antioxidáns pedig a glutation, az aszkorbinsav, a tokoferol, a karotinoidok, a prolin és a betain.

A sejtekben természetes körülmények között a glutation redukált formája (GSH) található meg döntő többségben, oxidált formájának (GSSG) mennyiségi növekedése pedig elsősorban oxidatív stressz hatására következik be, ilyenkor thiol disszulfid kötések alakulnak ki. A GSSG vissza is alakulhat GSH-vá a NADPH függő glutation reduktáz enzim segítségével (GR). A glutation és a glutation-reduktáz (GR) részt vesz a hidrogén-peroxid lebontásában a citoszolban és a kloroplasztiszban (Noctor és mtsai. 2012).

Az aszkorbinsav közvetlenül reakcióba tud lépni a szuperoxiddal és a hidroxil gyökkel, valamint a hidrogén-peroxidot vízzé tudja átalakítani aszkorbát-peroxidáz segítségével. Az aszkorbát-peroxidáz megtalálható a glioxiszómákban, a peroxiszómákban, a citoplazmában, a kloroplasztiszban és a mitokondriumban (Arora és mtsai. 2002).

A karotinoidok fontos szerepet játszanak a nem-enzimatisz védekező mechanizmusokban. Többek között részt vesznek a kloroplasztisz belső membránrendszerének fotooxidatív stressz elleni védelmében. A gerjesztett klorofill molekulák többlet energiájának átvételével megelőzik a szinglet oxigén képződését.

A tokoferolok közül a legaktívabb antioxidáns az E vitamin. Az E vitamin (α -tokoferol) a membránok kettős lipid rétegében található, és védelmet nyújt a lipidperoxidáció ellen. Ezt elsősorban a lipidperoxil gyökök semlegesítésével teszi, amely során az E vitaminból tokoferoxil

szabad gyök keletkezik. Az oxidált vitamin az aszkorbát-glutation ciklusban nyeri vissza redukáló képességét (Engin 2009).

Az antioxidánsoknak fontos szerepük van a védekezési mechanizmusokban, de mennyiségük megnövekszik a növények növekedése és fejlődése során is. Elsődleges információt nyújtanak a sejtek redox állapotáról és részt vesznek a biotikus/abiotikus stresszel összefüggésben álló génexpresszió szabályozásában is (Shao és mtsai. 2008, Foyer és mtsai. 2005). Antioxidánsok határozzák meg a ROS életidejét és a ROS szignál specifikitását, mivel folyamatos kapcsolatban állnak egymással. A növényi sejtek tehát általánosan eredményesen védekeznek a magas szuperoxid, hidrogénperoxid vagy a szinglet oxigén mennyisége ellen, ugyanakkor a fiziológiai hatása az oxidatív állapotváltozásnak még mindig vitatott téma. Erre példa Rizhsky és mtsai (2002) munkája, melyben az alacsony kataláz és aszkorbát-peroxidáz aktivitású dohány növények alig mutattak károsodást a különböző abiotikus stresszekre, a kontroll növényekhez képest. Kanwischer és mtsai (2005) pedig tokoferolt nem termelő *Arabidopsis* növényeket vizsgáltak, melyekben az antioxidáns hiánya miatt megnőtt a lipid-peroxidázok mennyisége. Viszont ezek a növények alig mutattak abnormális fenotípust.

3.7. Reaktív oxigén származékok és növényi hormonok kapcsolata

A hidrogén-peroxidról megállapították, hogy különböző növényi hormonok termelődését is előidézi, mint például az etilénét és a szalicilsavét és számos hormon jelátviteli útjában vesz részt másodlagos hírvivőként (Chen és mtsai 1993).

Az etilén felszabadulásának és termelődésének növekedése valamint a növényi betegségek közötti kapcsolat ismert. Összefüggés állapítható meg a kórokozó fertőzésére bekövetkező etiléntermelődés és a klorotikus tünetek kifejlődése között is. Inkompatibilis növény-patogén kapcsolat esetében megfigyelték, hogy a hiperszenzitív reakció (HR) kialakulása mellett az etilén termelődés is megnövekedik és a két folyamat összefüggésbe hozható egymással. Dohány növényt megfertőzve dohány mozaik vírussal (TMV), az inokulációt követően körülbelül 40 óra elteltével már látható jelei vannak a HR tüneteinek. Az etilén termelés növekedése a fertőzésre azonban már 24 órával az inokuláció után elkezdődik (Balázs és mtsai 1969; De Laat és Van Loon 1982). Paradicsom növény és *Phytophthora infestans* kapcsolatában Spanu és Boller (1989) pedig megállapították, hogy az etilén szintéziséért felelős gének aktivitása a léziókat alkotó klorotikus szövetekben magas. Az még vitatott kérdés, hogy vajon a nekrosis kialakulásához szükséges-e az etilén termelődése, ugyanakkor több etilént alultermelő növény esetében, mint az *Arabidopsis etr1-1* és *ein2-1* mutáns, az etilén inszenzitív szója és a

paradicsom *Nr* mutáns, avirulens kórokozóval történő fertőzésekor normális idő alatt fejlődtek ki nekrotikus léziók (Bent és mtsai 1992, Thomma és mtsai 1999, Hoffman és mtsai 1999, Ciardi és mtsai 2000). Az etilén bioszintézis útját szignálként is számon tartják, mely gyakran szabályozó hatással van olyan védekezési jelátviteli utakra, melyeket a jázmonsav és a szalicilsav befolyásol. Az etilén szignálról úgy tartják, hogy ellentétes hatása van a szalicilsav szignállal és leginkább a nekrotróf kórokozók elleni rezisztenciát indukálja (Glazebrook 2005). Mint minden szignálnál, az etilén szignál esetében is szükség van receptorokra, melyek érzékelik a megnövekedett mennyiségű jelző molekulákat. *Arabidopsis* esetében öt etilén receptort írtak le, az ETR1, ERS1, ETR2, ERS2, és EIN4 receptorokat, melyek az endoplazmatikus retikulumban lokalizáltak és az etilén válasz negatív regulátoraként működnek (Stepanova és mtsai 2009). Az EIN3 transzkripciós faktorról megállapították, hogy fontos szerepet játszik a fotoszintetikus és fejlődésbeli folyamatok mellett a védekezési mechanizmusokban is. Megnövekedett etilénszintre aktiválódik és leginkább olyan gének transzkripcióját szabályozza, melyek részt vesznek a nekrotrófok elleni védekezésben (Robert-Seilanianz és mtsai 2011). Az etilén bioszintézise az egyike azoknak a PTI kiváltotta válaszreakcióknak, melyek együtt a reaktív oxigén származékokkal és a MAPK szignál kaszkáddal szabályozzák a védekezési fehérjék és metabolitok termelődését (Broekgaarden és mtsai 2015). Han és munkatársai (2010) kimutatták, hogy *Arabidopsis* esetében a nekrotróf *Botrytis cinerea* fertőzésére a MPK6 és MPK3 enzimek foszforilálják az etilén bioszintézisében fontos szerepet játszó fehérjéket, az ACS2-t és ACS6-ot (AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE), mely így gyors etilén termelődést indukált. Ezáltal rávilágítottak a MAPK jelátviteli kaszkád fontosságára és szerepére az etilén bioszintézis útvonalában.

A szalicilsav (SA) az etilén mellett szintén egy olyan növényi hormon, melynek fontos szerepet tulajdonítanak a növényi védekezés rendszerében, mivel nélkülözhetetlen a szisztémikus szerzett rezisztencia (SAR) kialakulásához. SAR-nak nevezik azt a jelenséget, mikor egy nekrotizáló kórokozóval történő elsődleges fertőzést követően egy második fertőzés során a növény egy magasabb szintű, erősebb rezisztenciát mutat, ami a kórokozónak már egy szélesebb körével szemben érvényesül. A szalicilsav SAR kiváltása mellett PR gének expresszióját is indukálja (Ryals és mtsai 1996). Gaffney és mtsai (1993) kimutatták, hogy a szalicilsav akkumulációjára képtelen transzgenikus dohány (*nahG*) növénynél nem tapasztalható a PR gének expressziója és nem voltak képesek a SAR kifejllesztésére. Ebből arra következtettek, hogy a SA felhalmozódása nélkülözhetetlen a PR gének expressziójának aktiválásához és ez által a szisztémikus szerzett rezisztenciához. Újabb eredmények szerint, a szalicilsav ugyan szükséges a SAR létrejöttéhez, viszont nem a szalicilsav az a transzportált szignálmolekula, amely a fertőzés helyéről a

távolabbi szövetekbe szállítódik, hanem egyéb molekulák mellett a metil-szalicilát (Me-SA). A szalicilsavat metil-SA-vá átalakító szalicilsav-metiltraszferáz enzim működése az elsődlegesen fertőzött szövetekben, valamint az azt szalicilsavvá visszaalakító metil-szalicilsav-észteráz enzim aktivitása a fertőzéstől távolabbi szövetekben nélkülözhetetlen a SAR kialakulásához (Park és mtsai, 2007). A Me-SA-ból történő átalakulás szalicilsavvá megváltoztatja a citoplazma redox állapotát, aminek következtében aktiválttá válik az NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related protein genes 1) transzkripciós faktor, ami a SAR egyik fontos szabályozó eleme. Az NPR1 az aktivációt követően transzkripciós kaszkádot indít el, mely pedig PR gének expresszióját eredményezi (Dong 2004, Mou és mtsai 2003).

Biotikus és abiotikus stressz kiváltotta válaszokban a jázmonsav is szabályozó szereppel bír, mely leginkább a rovarok és egyéb állatok rágása elleni védekezésben nyilvánul meg, de fontos szerepét a nekrotróf kórokozók ellen is megfigyelték már (Browse 2009). A különböző stressz kiváltotta hormonális jelátviteli utak kapcsolódnak egymáshoz, szabályozzák egymást. A jázmonsav útvonala a növényben ellentétes hatással bír, mint a szalicilsavé, valamint a két hormon egymás antagonistái is, tehát képesek egymás termelődését gátolni. Spoel és mtsai (2003) tanulmánya szerint *Arabidopsis thaliana* növényben a *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 által kiváltott jázmonsav szintézis és szignál útvonal gátolja a szalicilsav felhalmozódását. A szalicilsav termelésére képtelen *Arabidopsis* NahG mutáns növényben pedig a *P. syringae* fertőzés erősen indukálta a jázmonsav szintézisét, viszont ezáltal hiperérzékeny lett a kórokozóra (Melotto 2006). A jázmonsav másik fontos hormon kapcsolata az etilén, mellyel együttesen, szinergista módon fejtik ki hatásukat a kórokozókkal szemben. O'Donnell és mtsai (1996) munkája szerint az etilén és a jázmonsav indukálják egymás termelődését és mindkettő szükséges a defenzin és tionin antimikrobiális fehérjék szintéziséhez. A jázmonsav képes kapcsolódni az etilén prekursorának számító ACC-hez (aminocyclopropane-1-carboxylic acid), majd további védekezésben résztvevő géneket aktiválni, elsősorban a nekrotófok elleni védekezésben (Staswick és Tiriyaki 2004). E két hormon együttes működése a védekezési reakciókban ERF (Ethylene response factor) transzkripciós faktorokat kódoló gének által szabályozottak, mivel mindkét hormon jelátviteli útjához szükséges az ERF1 génexpresszió (Lorenzo és mtsai 2003).

3.8. Gazda-patogén kapcsolatok a kórokozó életmódja alapján

A növénypatogéneket az életmódjuk alapján gyakran két nagy csoportba sorolják, a nekrotróf és biotróf kórokozók közé. A biotróf kórokozók életmódjához élő szövetek, egészséges sejtek szükségesek melyektől elvonják a szükséges tápanyagokat. Ezzel szemben a nekrotróf kórokozók toxinjaikkal és sejtfalbontó enzimeikkel károsítják a sejteket, majd az így elhalt sejtekből nyernek ki tápanyagokat. Eszerint a meghatározás szerint azonban bizonyos kórokozók lehetnek biotrófok is és nekrotrófok is, mivel az életmódjuk függ a környezettől vagy az aktuális életciklusuktól (Glazebrook és mtsai 2005).

A korábban jellemzett R-gén által okozott immunválasz nem bizonyul sikeres stratégiának egy nekrotróf kórokozóval szemben, mivel a hiperszenzitív reakcióval járó sejtelhalás nem okoz gátat a növekedésének. Ráadásul bizonyos nekrotróf gombák, mint például a növénypatogén *Alternaria* fajok, kihasználva a növény védekezési rendszerét, gazda specifikus toxinokkal indukálják a gazdanövény programozott sejthalálát, majd sejtfalbontó enzimekkel tovább roncsolják a szöveteket (Lawrence és mtsai 2008). A reaktív oxigén származékok fokozott felhalmozódása sem minden esetben jelent védelmet a kórokozókkal szemben, mivel a nekrotróf patogének olyan enzimrendszereket is kifejlesztettek, melyekkel hatékonyan ellensúlyozzák a sejteiket károsító toxikus reaktív oxigén származékokat (Mayer és mtsai 2001, Lin és mtsai 2011, Molina és Kahmann 2007).

3.8.1. NADPH-oxidáz gének *Alternaria* fajokban

NOX (NADPH-oxidáz) enzimkomplexekeket írtak már le állatok és növények mellett számos gombában is. A NOX komplexszel ortológ *NOXA*, *NOXB* és *NOXC* gének funkciója gombák fejlődésében, fiziológiájában és az általuk előidézett kórfolyamatokban részben már ismert (Lara-Ortiz és mtsai 2003). A *NOXA* és *NOXB* gének analógok az emlősökben található *gp91^{phox}* (*NOX2*) génnel, és a *NOXR* által szabályozottak. A gomba *NOXC* pedig tartalmaz egy kalcium kötő motívumot (calcium-binding EF-hand motif), mely megegyezik a növényi RBOH enzimben található motívummal (Aguirre és mtsai 2005, Takemoto és mtsai 2007).

Alternaria alternata fajban megtalálhatóak a *NOXA*, *NOXB* és *NOXR* fehérjék is egyaránt. Mind a három NOX fehérje szerepet játszik a vegetatív növekedésben, a sporulációban, az oxidatív stressz elleni védekezésben és a fertőzőképességben (Yang és Chung 2012). Az

AaNOXA hidrogén-peroxid és szuperoxid termelődésért felelős. A gén deléciója csökkent hidrogén-peroxid termeléshez vezet, valamint a mutáns izolátum érzékenyebbé válik hidrogén-peroxidot és szuperoxidot generáló ágensekkel történő kezelésre. Az *AaNOXA* ezen kívül szabályozza az *AaHOG1* (high-osmolarity glycerol 1) MAP kinázt és az *AaAP1* redox érzékeny transzkripciós regulátort kódoló géneket, melyek a gomba virulenciájában játszanak szerepet. A HOG1 és az AP1 ugyanakkor negatív regulátora a *NoxB* és *NoxR* transzkripciójának, amit azzal magyaráznak, hogy a HOG1 és AP1 működése védi a gombasejteket a nagymértékű ROS termelésekor. Mint ezt korábban említettük, gombákban a NOXA és NOXB, a NOXR által szabályozottak, azonban *Alternaria alternata* fajban a NOXR esetében csak a NOXA-ra gyakorolt negatív reguláló hatást tudták kimutatni (Yang és Chung 2012, Morita és mtsai 2013).

3.8.2. *Alternaria* fajok védekezése a növényi reaktív oxigén származékokkal szemben

A nekrotróf kórokozó gombák - mint a növénypatogén *Alternaria* fajok - fennmaradásában létfontosságú a növények védekezéséért termelt reaktív oxigén származékaival szembeni védelem. A növényi patogének érzékenységet a reaktív oxigén származékokkal szemben tulajdonképpen az határozza meg, hogy mennyire képesek a ROS ellensúlyozására, a normális sejten belüli redox állapotukat fenntartani, és hogy képesek-e a károsodott sejtek regenerálására. A redox állapotváltozásokkor aktiválódó YAP1 (yes-associated protein 1) transzkripciós faktor kórfolyamatban való közreműködését számos növénypatogén gombában leírták már (Molina és Kahmann 2007, Enjarbert és mtsai 2007, Kuge és mtsai 2001). *Alternaria alternata*-ban a YAP1 transzkripciós faktort kódoló *AP1* gén hibás működése miatt a mutáns gombaizolátum fokozott érzékenységet mutatott hidrogén-peroxiddal, kálium-oxiddal és menadiónnal szemben, ugyanakkor só és egyéb ozmotikus stresszre nem mutatott nagyobb szenzitivitást. A mutáns gombában mért antioxidáns kapacitás viszont nagyon alacsony szintre csökkent. Mindezek alapján Yang és munkatársai (2009) arra következtettek, hogy az *AaAP1* gén által irányított útvonal hatékony ROS detoxifikáláshoz vezet, mely elengedhetetlen a sikeres kolonizációhoz. Oxidatív változásra a YAP1-ben diszulfidkötések alakulnak ki, ami gyors konformációs változást okoz. Ezután a sejtmagba szállítódik, ahol a további stressz válaszáért felelős gének expresszióját szabályozza (Okazaki és mtsai 2007, Chen és mtsai 2014).

A nem riboszomális peptid szintetáz 6 génnek (*NPS6*) is tulajdonítanak szerepet reaktív oxigén származékok hatásának ellensúlyozásában. Ennek a génnek a deléciója *Alternaria alternata*-ban a *yap1* mutánssal megegyező fenotípushoz vezetett (Oide és mtsai 2006).

A reaktív oxigén származékokkal szembeni védelemben elengedhetetlen a megfelelő sejtfal integritás. Ennek a fenntartásában játszanak szerepet a *Hog1*, *NPS2* és *Slt2* gének, melyeket *A. brassicicola*-ban és *A. alternata*-ban is leírtak. Ezek mutációjakor a gomba csökkent virulenciát mutatott a vad típushoz képest és fitoalexinokkal szemben is szenzitívebbek voltak (Joubert és mtsai 2011a, Kim és mtsai 2007, Lin és Chung 2010).

3.9. Reverz genetikai eljárások

A molekuláris szintű biológiai kutatások egyik fő célja, hogy élő rendszereken belül lehessen vizsgálni bizonyos gének és fehérjék szerepét, működését. Ehhez nyújtanak segítséget, az úgynevezett reverz genetikai módszerek, mely során egy nyomon követett mutációból vagy hibás gén okozta elváltozásból következtetni lehet azok eredeti funkciójára. Ilyen reverz genetikai módszerek közé tartozik a T-DNS inszerciós mutagenézis és a vírus-indukálta géncsendesítés is.

3.9.1. T-DNS inszerciós mutagenézis

Növények transzformálására széleskörben elterjedt módszer az *Agrobacterium tumefaciens* (Az újonnan bevezetett neve: *Rhizobium radiobacter*) általi mutagenézis. Ez a folyamat egy természetes génátviteli mechanizmuson alapszik, melynek során bakteriális gének épülnek be a fertőzött növények sejtmagi örökítőanyagába.

Az *Agrobacterium* nemzetség képviselői az *A. tumefaciens*, az *A. vitis*, az *A. rhizogenes* és az *A. rubi* fajok (Gelvin 2003). Ezek a baktériumok kétszikű növényeket a sebzési helyükön fertőznek, majd a fertőzött növényeken tumorfejlődést és hajszálgöykeresedést indukálnak. A tumorszövetek specifikus aminosav származékokat, úgynevezett opinokat termelnek, melyekért a baktérium sejtekben található Ti (Tumor-inducing) plazmid a felelős. Ugyanis ez a baktérium rendelkezik egy úgynevezett Ti-plazmiddal, melynek egy részét, a T-DNS-t vagy transzfer DNS-t képes átjuttatni a fertőzött növénybe és beépíteni annak sejtmagi DNS állományába, ezáltal képes a növényvel termeltetni a számára szükséges aminosavakat. A T-DNS körülbelül 21-23 kbázis nagyságú, az opin szintéziséért és a tumor indukálásáért felelős géneket tartalmazza. A T-DNS átviteléért a Ti-plazmidon lévő virulencia (*virA* - *virG*) régiónak, valamint a

kromoszómális virulencia (*chvA*, *chvB*) régióknak van meghatározó szerepe. A *chv* gének folyamatosan, úgynevezett konstitutív módon nyilvánulnak meg és termékeik a baktérium növényi sejtfalhoz való tapadását okozzák, a *vir* gének expressziója viszont szigorúan szabályozott, és aktiválódásuk indítja el az átviteli mechanizmust. A sérült növényi szövetekből kiszabaduló fenolos vegyületek, mint például az acetosziringon, indukálják ezen gének átírását (Yanofsky és mtsai 1985, Thomashow és mtsai 1980).

Mivel a T-DNS jobb-, és baloldali határszakaszai közötti szekvenciák a növényi genomba történő beépülés szempontjából nem meghatározóak, ezért az Agrobaktérium Ti-plazmid T-DNS része alkalmas arra, hogy vektorként felhasználva idegen géneket építsünk bele és általa juttassuk be azokat magasabbrendű növényekbe. Így a növényi genomba épült mesterséges T-DNS a továbbiakban növényi szekvenciaként funkcionál (Gheysen és mtsai. 1987).

A T-DNS inszerciós mutagenézis is az Agrobaktérium általi géntranszferen alapszik. Ebben az esetben az Agrobaktérium Ti-plazmidjának módosított változatát használják, melyben a T-DNS-en található tumor indukálásért felelős géneket antibiotikum rezisztenciát kódoló génekre cserélték, megkönnyítve ezzel a szelekciót. A T-DNS random módon épül be a növényi genomba, így a beépült T-DNS-eknek csak egy része integrálódik működő génekbe. Szignifikáns forráspont a beépülés helyére nézve nem ismert. Átlagosan a transzformánsok 57 %-a tartalmazza a beépült T-DNS-t egyszeres kópiában, míg 25 %-uk kétszeres kópiában (Feldmann 1991, Azpiroz-Leehan és Feldmann 1997). Az ily módon létrehozott növényeket nevezzük inszerciós mutánsoknak, melyekben a T-DNS beépülése az érintett gén inaktiválását okozhatja, és gyakran kis deléciókat (4-80 bp), illetve átrendeződéseket eredményezhet.

3.9.2. Vírus-indukálta géncsendesítés

A vírus-indukálta géncsendesítés egy olyan technika, mely kihasználja a növényekben természetesen jelen levő, RNS-ek kiváltotta antivirális védelmi mechanizmust. Ennek fontos szerepe van az idegen eredetű nukleinsavak elleni növényi védekezésben, valamint a növény saját génexpressziójának szabályozásában a különböző fejlődési stádiumokban.

Mikor egy vírus megtámad egy növényi sejtet, aktiválódik egy RNS alapú védelmi mechanizmus, mely a virális genomot célozza. A folyamat magába foglalja a kettős szálú RNS-ek (dsRNS) és a kis RNS-ek (siRNS) felismerését, melyek templátként szolgálnak az eliminálni kívánt nukleinsavak felismerésében (Ratcliff és mtsai. 1999, Zamone 2001). A felismerést

követően ezeket a kettős szálú RNS-eket Dicer-like fehérjék (DCL), melyek RNáz III típusú ribonukleázok, 21-24 bp hosszú szakaszokra darabolják úgy, hogy 5' végükön foszfát, 3' végükön 2 túlnyúló nukleotiddal rendelkeznek ez után. Az így feldarabolt és megjelölt siRNS-ek beépülnek a RISC komplexbe, ami pedig a megkötött siRNS nukleotid sorrendje alapján felismeri a további dsRNS-eket és feldarabolja azokat (Bernstein és mtsai 2001, Hamilton és mtsai 2002). A RISC komplex úgynevezett Argonaute (AGO) fehérjékből áll, melyek három konzervált doménből állnak. Ezek a PAZ, MID és PIWI domének. A MID domén képes a siRNS-ek 5' végéhez kapcsolódni, a PAZ domén pedig a 3' végekhez. A PIWI domén a fehérje komplex endonukleotikus aktivitásáért felelős. A 21-24 nukleotid hosszúságú siRNS-ek képesek nemcsak sejtről-sejtre, de a növény szállítószövet rendszerét kihasználva hosszú távon is terjedni és templátként szolgálva aktiválni a távolabbi sejtekben a specifikus géncsendesítést (Himber és mtsai. 2003).

A Vírus-indukálta géncsendesítés egy olyan vírus vektor technológia, mely során a csendesíteni kívánt gén egy szakasza van bejuttatva a virális vektor genomjával együtt a növény szervezetébe, így a géncsendesítés nem csak a vírus ellen lép fel, hanem a célgénről keletkezett mRNS-ek ellen is. A technikának köszönhetően kialakult tünetekből, elváltozásokból következtetni tudunk a célgén funkciójára (Lu és mtsai. 2003).

3.10. *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) genetikai manipulációja

A növények transzformálására használt Agrobaktérium genetikai manipulációjára, vagyis idegen DNS bejuttatására a baktériumba, leginkább három módszert alkalmaznak a molekuláris biológiai munkák során. Ilyen a három szülő keresztezés (triparental mating) módszer, a baktériumok hősokkolása (freeze–thaw) és az elektroporáció (Wise és mtsai. 2006).

A triparental mating módszerhez nem konjugatív, de mobilizálható plazmidokat juttatnak Agrobaktérium sejtekbe. Ehhez kétféle *E.coli* törzsre van szükség. Az első törzs tartalmazza a „helper” plazmidot, mely egy olyan konjugációra képes plazmid, ami kódolja az összes olyan fehérjét, amelyek szükségesek a konjugációs híd kialakításához és a genetikai anyag átadásához a recipiens sejtbe. A helper plazmid átadódik a második *E.coli* törzsnek, melyet donor törzsnek neveznek. Ez a donor törzs pedig átjuttatja a célgéneket Agrobaktériumba (Waters 1999). A módszer hátránya, hogy az Agrobaktériumon kívül *E.coli* törzsekre is szükség van, valamint,

hogy nehéz elkerülni az Agrobaktérium plazmidok és az *E. coli* plazmidok közötti rekombinációt (Singh és mtsai. 1993).

Hőszokkal és elektroporálással történő transzformációhoz a baktériumok sejtfalát megfelelően átjárhatóvá kell tenni anélkül, hogy a baktérium elpusztulna. A hőszokk transzformáláshoz ún. kémiai kompetens sejteket használnak, melyek egy Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionos kezelés és hűtés során válnak kompetenssé. Hőszokkal, azaz 37 °C-os rövid hőkezeléssel a sejtmembrán fluiditása megváltozik, ezáltal átjárhatóvá válik a bejuttatni kívánt idegen DNS számára. A hőszokk módszer előnye az egyszerűség, ugyanakkor a hatékonysága messze alulmarad az elektroporálással elérhető hatékonysághoz képest (Holsters és mtsai. 1978).

A leghatékonyabb baktérium transzformációs technika az elektroporálás. Ennek során elektrokompétens sejtek kerülnek felhasználásra, melyeket úgy állítanak elő, hogy a baktériumokat tartalmazó oldatot ionmentes oldatra cserélik, ami desztillált vízből és glicerinnél áll. Erre azért van szükség, mert az eljárás során a DNS-t és a baktériumokat tartalmazó szuszpenziót nagy elektromos feszültséggel kezelik, mely során a membránon lévő pórusok kinyílnak és a membrán átjárhatóvá válik a DNS számára. Ha az oldatban elektromosan vezető komponensek, például ionok vannak, akkor rövidzárlat keletkezik és a transzformálás sikertelen lesz. Az elektroporációs eljárás alkalmazásával cirkuláris és lineáris DNS-t is be lehet juttatni a sejtekbe, azaz plazmidokon kívül például PCR termék is transzformálható (Mattanovich és mtsai. 1989; Mersereau és mtsai. 1990; Kotnik 2013).

3.11. Vizsgálatunk modell organizmusai

3.11.1. Arabidopsis thaliana

A molekuláris növénybiológiában az *Arabidopsis thaliana* növényt fontos modellként használják számos előnyös tulajdonsága miatt. Magyar elnevezése a lúdfű. A lúdfű a keresztesvirágúak családjába tartozik, egynyári, rövid tenyészidővel rendelkezik, teljes életciklusa 6-8 hét. Mérsékelt fényigényű hosszú nappalos növény, virágzáshoz 14-16 órás megvilágítást igényel. Önbeporzó, pollenjét a szél nem terjeszti, a keresztbeporzás nagy egyedsűrűségű állományokban is minimális és egyszerre rengeteg magot (5-10,000 db) produkál. Mindezen tulajdonságai miatt laboratóriumi körülmények között kiválóan tartható.

A legelterjedtebb *Arabidopsis* ökotípus, az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia, mely genomja a zárvatermő növények közül igen kicsinek számít, 5 kromoszómából ($2n=10$) áll. A teljes genom szekvenciája 2000-ben készült el (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000, Schoof és mtsai 2002). A jelenleg elérhető legpontosabb információ az *Arabidopsis* genomjáról és génkészletéről a TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) és NASC (<http://arabidopsis.info/>) honlapjain található. A korábbi fejezetben említett inszerciós mutagenézis módszert használva *Arabidopsis* növényeken, a vizsgált génekről kapott információ könnyen alkalmazható más fajok rokon génjeinek feltérképezésére, és elősegíti azok célzott és hatékony alkalmazását a mezőgazdasági, élelmiszeripari, vagy más ipari felhasználásokat célzó növénynemesítésben.

3.11.2. Az *Alternaria* spp. nemzetség

Az *Alternaria* fajok jelentős része szaprotróf gomba, sok közülük azonban növényi kórokozó. A növénypatogén *Alternaria* gombafajokat fontos kórokozóként tartják számon, mert jelentős gazdasági károkat okoznak és egyes fajaik igen széles gazdanövény körrel rendelkeznek. Legismertebb képviselőik a keresztesvirágúakat károsító *Alternaria brassicicola* és *A. brassicae*, a sárgarépat megbetegítő *A. dauci*, a búzát károsító *A. triticina*, a lent fertőző *A. linicola*, a főként citrusfélék kórokozójaként ismert *A. citri*, a burgonyát és paradicsomot károsító *A. solani* és a rendkívül széles gazdanövénykörrel rendelkező *A. alternata* (Thomma 2003).

Az *Alternaria* fajok rendszertani besorolásukat tekintve az Ascomycota törzs, Pezizomycotina altörzs, Dothideomycetes osztály, Pleosporales rend, Pleosporaceae család *Alternaria* nemzetségébe tartoznak.

Termesztett gazdanövényeiken akár 20-50%-os termésvesztést is előidézhetnek (Braverman 1971). Európában az 1980-as évek végén káposztafélék körében a termésvesztesség többször is elérte a 89%-ot *Alternaria brassicicola* és *Alternaria brassicae* okozta fertőzések miatt (Humpherson-Jones 1989). Görögországban 1989 és 1993 között 15-79%-os termésvesztést írtak le napraforgó (*Helianthus annuus*) esetében *Alternaria alternata* fertőzés miatt (Lagopodi és Thanassouloupoulos 1998). 2006 és 2008 között Kínában 80%-os *A. alternata* fertőzöttséget figyeltek meg mandarin (*Citrus reticulata*) gyümölcsökön (Wang és mtsai 2010).

Az *Alternaria* gombafajok jelentőségét növeli az a tény is, hogy a nemzetség egyes fajai humán egészségügyi problémák okozói is lehetnek. Az 1930-as évek elején fény derült arra, hogy az *Alternaria alternata* gomba spóráit belélegezve allergiás tünetek, valamint légúti

megbetegedések alakulhatnak ki. Azóta *A. alternata* fajból 16 allergént azonosítottak, melyek többsége különféle enzimaktivitással bíró fehérje, például diszulfid-izomeráz, Mn szuperoxid-dizmutáz, mannitol-dehidrogenáz, enoláz és glutation S-transzferáz (Kustrzeba-Wójcicka és mtsai 2014).

Az *Alternaria* fajok gazdasági jelentősége miatt indokolt e nekrotróf gombakórokozók alaposabb megismerése. Megállapítható, hogy mind a gombafajok fertőzési mechanizmusában, mind az ellenük megnyilvánuló növényi védekezés kialakulásában rengeteg megválaszolatlan kérdés vetődik fel. Az *Arabidopsis thaliana* és *Alternaria brassicicola* közti növény-gomba kölcsönhatás modellként történő használata mára elterjedt növénybiológiai kutatásokban. Az *A. thaliana* genetikai állományának ismerete, valamint különféle reverz genetikai technikák kiaknázása segít feltárni az *Alternaria* fajokkal szembeni fogékony és rezisztens növényi válasz molekuláris szintű mechanizmusait. Az *Alternaria* nemzetségen belül pedig 25 faj genetikai állományának szekvencia adatai már szintén rendelkezésünkre állnak, ilyenek az *A. brassicicola*, az *A. alternata* vagy az *A. solani* is: <http://alternaria.vbi.vt.edu/index.html> (Dang és mtsai 2015).

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Növénynevelési körülmények, növényi anyagok

Kísérleteinkhez *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia (Col-0) vad típusú növényeket és különböző SALK T-DNS mutáns (**1. Táblázat**), valamint transzgenikus *Arabidopsis* növényeket használtunk. A felhasznált SALK T-DNS vonalak minden esetben homozigóták voltak a T-DNS inszercióra.

1. Táblázat. A SALK T-DNS vonalak.

Mutáns/transzformáns	AGI kód	STOCK név	Gén név
<i>prx33</i> mutáns	<i>At3g49110</i>	SALK_062314	<i>Peroxidase 33</i>
<i>jar1</i> mutáns	<i>At2g46370</i>	SALK_030821	<i>Jasmonate resistant1</i>
<i>nho1</i> mutáns	<i>At1g80460</i>	SALK_067205	<i>Nonhost resistance to P.s. phaseolica1</i>
<i>npr1</i> mutáns	<i>At1g64280</i>	N3726	<i>Arabidopsis nonexpressor of PR genes1</i>
<i>mpk6</i> mutáns	<i>At2g43790</i>	SALK_004221	<i>MAP kinase 6</i>
<i>nia2</i> mutáns	<i>At1g37130</i>	SALK_138297	<i>Arabidopsis nitrate reductase2</i>
<i>ein2</i> mutáns	<i>At5g03280</i>	SALK_086500	<i>Ethylene insensitive2</i>
<i>sag101</i> mutáns	<i>At5g14930</i>	SALK_022911	<i>Senescence-associated gene 101</i>
<i>wrky40</i> mutáns	<i>At1g80840</i>	N119583	<i>WRKY DNA-binding protein 40</i>
<i>bik1</i> mutáns	<i>At2g39660</i>	SALK_005291	<i>Botrytis-induced kinase 1</i>
<i>cpk5</i> mutáns	<i>At4g35310</i>	SALK_138808	<i>Calmodulin-domain protein kinase 5</i>

<i>rboh</i> d mutáns	<i>At5g47910</i>	SALK_070610	<i>Respiratory burst oxidase homologue D</i>
<i>erecta</i> mutáns	<i>At2g26330</i>	SALK_04410 SALK_066455C	<i>Quantitative Resistance to Plectosphaerella 1</i>
<i>utr3</i> mutáns	<i>At1g14360</i>	SALK_064051C SALK_136447C	<i>UDP-Galactose Transporter 3</i>
<i>ann1</i> mutáns	<i>At1g35720</i>	SALK_132169C SALK_149772C	<i>Annexin 1</i>
<i>th7</i> mutáns	<i>At1g59730</i>	SALK_018227	<i>Thioredoxin H-type 7</i>
<i>cam4</i> mutáns	<i>At1g66410</i>	SALK_021224	<i>Calmodulin 4</i>
<i>gstu19</i> mutáns	<i>At1g78380</i>	SALK_041942 SALK_077958C	<i>Glutathione S-Transferase TAU 19</i>
<i>dwarf1</i> mutáns	<i>At3g19820</i>	SALK_006932 SALK_030692	<i>Cell Elongation Protein</i>
<i>arfc1</i> mutáns	<i>At3g22950</i>	SALK_027967 SALK_015199C	<i>ADP-Ribosylation Factor C1</i>
<i>mapr3</i> mutáns	<i>At3g48890</i>	SALK_056475C SALK_042103C	<i>Membrane-Associated Progesterone Binding Protein 3</i>
	<i>At4g37445</i>	SALK_022186C SALK_135593C	
<i>nhl3</i> mutáns	<i>At5g06320</i>	SALK_150318C SALK_035427C	<i>NDR1/HIN1-like 3</i>

Transzgénikus *Arabidopsis* genotípusok:

H4 (asFBP1.1): Bindschedler és mtsai (2006) által létrehozott és leírt transzformáns, a *Phaseolus vulgaris* peroxidáz génjét expresszálja antiszensz orientációban.

GFP transzformáns: egy mGFP-ER szekvenciának köszönhetően (Haseloff és mtsai 1997) zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló transzgénikus *Arabidopsis* növények, melyek Agrobaktérium általi virágbemártásos módszerrel jöttek létre (Logemann és mtsai 2006).

Az *Arabidopsis* magvakat Pindstrup Plus Orange (Pindstrup Mosenburg) típusú talajba vetettük, majd 3-4 napig 4°C-on hidegkezeltek őket. Ezután növényeinket azonos körülmények között, növénynevelő kamrákban neveltük, rövidnappalos fényviszonyok mellett: 12 óra megvilágítás 22 °C-on és 12 óra sötétben 21 °C-on. Öntözéshez ioncserélt vizet használtunk. Kísérleteinket azonos korú, 5-6 hetes, egészséges *Arabidopsis* növényekkel végeztük.

4.2. Az *Alternaria brassicicola* gomba fenntartása és a gombafertőzés

Fertőzőanyagként az *Alternaria brassicicola* MUCL20297 törzset használtuk, mely egy káposztáról izolált nekrotróf gomba kórokozó (Thomma és mtsai 1998). Fertőzés előtt 7-10 napig szobahőmérsékleten, sötétben, steril burgonya dextróz (PDA) táptalajon tenyésztettük.

Burgonya dextróz táptalaj:

10g burgonyapehely

10 g agar

3,5 g glükóz

0,5 l ioncserélt víz

A fertőzéshez használt konídiumokat ecset segítségével és ioncserélt vízzel lemostuk a telepek felületéről, majd az így kapott gomba szuszpenziót gézlapon átszűrtük a táptalaj törmelékek és micélium darabok eltávolítása céljából. Bürker-féle sejtszámláló kamrával 6×10^5 konídium/ml koncentrációt állítottunk be. A beállított sűrűségű gomba szuszpenziót kézi permetezővel egységesen a növények felületére permeteztük, majd az inokulált növényeket ezután zárható, átlátszó műanyag dobozokban tartottuk, melyekben magas páratartamot hoztunk létre ioncserélt víz permetezésével. A hőmérséklet és a megvilágítás a növények korábbi nevelési

körölményeivel azonos volt. A fertőzetlen kontroll növényeket vízzel permetezve, a fertőzöttekkel megegyező paraméterek mellett tartottuk.

4.3. Transzgén jelenlétének igazolása a *prx33* mutánsban.

Prx33 inszerciós *Arabidopsis* növényünkben a T-DNS helyét polimeráz láncreakcióval (PCR) határoztuk meg. PCR reakcióhoz a SALK Intézet által ajánlott Lba1 reverse primert használunk, mely a T-DNS-hez kötődik, valamint egy olyan forward primert, mely a *PRX33* génen belül a T-DNS feltételezett helyének egyik végére terveztünk.

Mindehhez 6 hetes *prx33*-as *Arabidopsis* növényekből vontunk ki genomi DNS-t. A növényi mintát folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd dörzsmozsárral eldörzsöltük. Ebből 0,1 g-nak megfelelő mennyiséget 2 ml-es Eppendorfba helyeztünk és DNS-t izoláltunk belőle illusztr Nucleon PhytoPure Kit (GE Healthcare Life Science) segítségével, a gyártó által megadott protokoll szerint.

A kapott DNS tisztaságát és koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel ellenőriztük, majd a DNS koncentrációját 500 ng DNS/μl nukleáz mentes víz-re állítottuk be.

Ezután Maxima Hot Start Master Mixet (Thermo Fischer Scientific) használva PCR reakciót mértünk össze, a gyártó általi protokollnak megfelelően.

PRX33 genotipizáló forward primer: 5'-ATTATAGTTGTTGTCAGCATTAGCA-3'

Lba1 reverse primer: 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'

PCR beállítása:

- | | | |
|-----------------------|----------------|--------|
| • kezdő denaturáció | 95 °C – 4 perc | |
| • denaturáció | 95°C – 20 mp | } 35 x |
| • anellálás | 60°C – 3 mp | |
| • polimerizáció | 72°C – 45 mp | |
| • végső polimerizáció | 72°C – 5 perc | |

A PCR terméket gélelektroforézissel, 1 %-os agaróz gélen tettük láthatóvá, a termék méretét pedig DNS létra (GeneRuler, Thermo Fischer Scientific) segítségével állapítottuk meg.

4.4. Mutáció és transzgén hatásának igazolása qPCR-rel.

Prx33 Salk T-DNS inszerciós *Arabidopsis* növényünkben a mutáció hatásának igazolására, valamint H4 transzgénikus *Arabidopsis* növényben a *PRX33* és *PRX34* gén csökkent működésének kimutatására valós idejű kvantitatív PCR-t (real-time, qPCR) használtunk, mellyel összehasonlítottuk a mutáns és transzformáns növényekben mért relatív génexpressziót a vad típusú (Columbia, Col-0) *Arabidopsis* növényekben mérhetővel. Vizsgálatunkhoz 6 hetes növényeket használtunk, mind a *prx33* mutáns, a H4 transzformáns és a Columbia növények esetében. A mérést 3 független biológiai ismétlésben végeztük és minden biológiai ismétléshez 3-3 db egész, gyökér nélküli *Arabidopsis* növényt dolgoztunk fel. A növényi mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd dörzsmozsárral eldörzsöltük őket. Ebből 0,1 g-nak megfelelő mennyiséget 2 ml-es centrifuga csövekbe helyeztünk és RNS-t izoláltunk belőlük Viogene, Total RNA Extraction Miniprep Kit segítségével, a gyártó által megadott protokoll szerint.

A kapott RNS-ek tisztaságát és koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel ellenőriztük, majd az összes RNS koncentrációját 100 ng RNS/μl nukleáz mentes víz-re állítottuk be.

Ezután az esetleges DNS szennyeződéseket DNase kezeléssel (Invitrogen, DNA-free™ DNA Removal Kit) távolítottuk el.

A már tiszta RNS-eket Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis Kit-tel cDNS-sé írtuk át a gyártó által biztosított protokoll szerint haladva, majd az átírt cDNS-eket 5-szörösre hígítottuk nukleáz mentes vízzel.

A valós idejű PCR-hez Biorline SensiFAST SYBR® No-ROX Kit-et használtunk. Háztartási génként, melynek expressziójához hasonlítottuk a célgénét, az *Arabidopsis At4g26410* ismeretlen funkciójú génjét használtuk, mint referencia gén, mivel Czechowski és mtsai (2005) alapján az *At4g26410* különböző stressz hatások ellenére is stabilan kifejeződő gén. A reakciókat 3 technikai ismétlésben végeztük C-1000 Thermal Cycler, CFX96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad) készülékben. A felhasznált primereket és beállítási módot a **2. Táblázatban** tüntettük fel, tervezésükhöz az Oligo 7 software-t használtuk, alkalmasságuk letesztelésére pedig az Integrated DNA Technologies, OligoAnalyzer 3.1 webes alkalmazást (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

2. Táblázat. Felhasznált primerek I.

Gén	Felhasznált primer	Beállítási mód
<i>PRX33-At3g49110</i>	Forward 5'-CGAGAAACCATTGTAAATGAGT-3'	Denaturáció: 95°C – 6 perc Amplifikáció 40 ciklusban 95°C – 30mp 60°C – 1 perc
	Reverse 5'-CCGAGCCGAATTTGCG-3'	
<i>At4g26410</i>	Forward 5'-GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC-3'	
	Reverse 5'-GGTCCGACATACCCATGATCC-3'	
<i>PRX34-At3G49120</i>	Forward 5'-CGAGAAACCATTGTAAATGAGT-3'	
	Reverse 5'-CCGAGCCGAATTTGCG-3'	

A gének transzkripció, vagy mRNS szintjének megállapításához az eredményeket ΔC_t módszerrel számoltuk: $2^{-\Delta \Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen 2001).

4.5. Vírus-indukálta géncsendesítés (VIGS, Virus-induced gene silencing)

A *PRX33* és *PRX34* gének együttes vizsgálatához a Tobacco Ratle Virus (TRV) alapú géncsendesítési technikát használtuk, mely független módszer a SALIK T-DNS inszerciós mutánsokkal végzett kísérletekhez képest. Vírus-indukálta géncsendesítéssel csökkentettük az mRNS termékének szintjét a két kérdéses génnek egy növényen belül egyszerre. Ehhez pTRV1 és pTRV2 vírusvektortokat (Arabidopsis Biological Resource Center, STOCK: CD3-1039) módosítottunk és használtunk. A TRV1 vektor hordozza a vírus replikációjához szükséges régiókat, az RNS függő RNS polimerázt és a mozgási fehérjét, míg a TRV2 nem esszenciális régiókat tartalmaz, ezáltal alkalmas arra, hogy egyéb idegen DNS fragmenteket építsünk hozzá. Mind a két vektor szükséges egyszerre a vírus-indukálta géncsendesítés kialakításához.

VIGS konstrukciók létrehozása

Első lépésként a kontrollnak használt TRV2-GFP konstrukciót alkottuk meg, mely a GFP (green fluorescent protein) mRNS szintjét csökkenti.

Egy mGFP5 szekvenciára tervezett primerekkel 256 bp hosszú szakaszt amplifikáltunk PCR segítségével, Maxima Hot Start Master Mixet (Thermo Fischer Scientific) használva.

mGFP5 primer szekvenciák: Forward 5'-CGCTCTAGAATGCCTGAGGGATACGTGCAG-3'

Reverse 5'-CGCTCTAGATTCGATGTTGTGGCGGGTCTT-3'

PCR beállítása:

- | | | |
|-----------------------|----------------|--------|
| • kezdő denaturáció | 95 °C – 4 perc | |
| • denaturáció | 95°C – 20 mp | } 35 x |
| • anellálás | 60°C – 3 mp | |
| • polimerizáció | 72°C – 30 mp | |
| • végső polimerizáció | 72°C – 5 perc | |

Az így kapott terméket ezután pGEM®-T Easy (Promega) vektorba klónoztuk a gyártó által biztosított protokollt követve, majd a ligátumot *Escherichia coli* DH5α kompetens sejtekbe transzformáltuk hősokk módszerrel. Minden transzformációhoz friss kompetens sejteket használtunk és közvetlenül a transzformálás előtt készítettük Tu és mtsai (2005) által publikált protokoll szerint.

Hősokk transzformáció:

- 50 µl kompetens sejthez 5 µl ligátumot és 0,5 µl DMSO-t kevertünk 2 ml-es centrifuga csövekbe.
- Az elegyet 30 percig jégen inkubáltuk.
- Az inkubálás után gyors hősokk következett, 42 °C-ra helyeztük a centrifuga csöveket 1-2 percig, majd jégen tartottuk őket 1-2 percig.
- 450 µl szobahőmérsékletű SOC táptalajjal feloldottuk az elegyet és 37 °C-on 60 percig alacsony fordulatszámon pörgettük.
- Ezután maximum sebességen centrifugáltuk a csöveket 2 percig és a felülúszót leöntöttük a baktérium pelletről.
- Majd 100 µl táptalajt pipettáztunk a pellet felszínére és vortex segítségével felfuszpendáltuk.
- Az így kapott szuszpenziót szelektív LB táptalajra szélesztettük és 1 napig 37 °C-on inkubáltuk, a telepek megjelenéséig.

SOC táptalaj:

- 20 g bakto-tripton
- 5 g élesztő kivonat
- 0,5 g NaCl
- 10 ml 250 mM KCl
- 1000 ml ioncserélt víz

Autoklávozás után 10mM steril $MgCl_2$ -ot és 20mM steril glükóz oldatot adtunk hozzá.

LB táptalaj:

- 10 g/L tripton
- 5 g/L élesztő kivonat
- 5 g/L NaCl
- 15 g/L agar

Autoklávozás után, a szobahőmérsékletűre hűlt LB táptalajhoz 250 μ l/500 ml ampicillint, 80 μ l/500 ml IPTG-t és 750 μ l/500 ml X-Gal-t adtunk a baktérium szelekció miatt.

A megjelenő fehér kolóniákból plazmidot tisztítottunk ki NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) Kittel. A kitisztított plazmidból EcoRI restrikciós enzimmal (FastDigest, Thermo Fischer Scientific) kiemésztettük a beépített GFP szakaszt, hogy a termék két végére EcoRI ragadós restrikciós hely kerüljön. Majd foszfátáz enzimes (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Fischer Scientific) kezelést alkalmaztunk, hogy elkerüljük a termék két ragadós végének összekapcsolódását. Az emésztési reakció elegyet 1 %-os agaróz gélen megfuttattuk és kivágtuk a 256 bp hosszúságnak megfelelő terméket, ami a GFP fragment. Majd Agarose Gel DNA Extraction Kittel (Roche) visszaizoláltuk a GFP terméket.

A pTRV2 plazmidot is hasítottuk EcoRI restrikciós enzimmal (FastDigest, Thermo Fischer Scientific) és a kitisztított GFP termékkel együtt ligálási reakciót mértünk össze.

Ligálás (Thermo Fischer Scientific):	0,5 µl puffer
	0,5 µl T4 DNS ligáz
	1 µl plazmid
	3 µl insert

A ligátumot betranszformáltuk *E.coli* DH5 α kompetens sejtekbe, hogy kellőképpen felszaporítsuk a plazmid mennyiségét és végül szelektív, kanamicint (30 μ g/ml) tartalmazó LB táptalajra szélesztettük. A klónozás sikerességét kolónia PCR-rel ellenőriztük a kinőtt baktérium telepekből.

Kolónia PCR lépései:

- 20µl nukleáz mentes vizet tartalmazó PCR csövekbe egy kacsnyi baktérium mennyiséget helyeztünk.
- Alapos vortexelést követően 5 percig 95°C-on inkubáltuk a csöveket.
- Ezután 5 percig 10.000 rpm-en centrifugáltuk őket, majd a felülúszót, mely tartalmazza a bakteriális DNS-t, új csőbe pipettáztuk át és kolónia PCR-hez templátként használtuk. A PCR-t *taq* DNS polimerázzal (Thermo Fischer Scientific) végeztük a gyártó általi protokoll szerint.

A kolónia PCR alapján pozitív telepekből kitisztítottuk a TRV2-GFP plazmidot NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) Kittel és 100 ng/μl koncentrációjúra hígítottuk nukleáz mentes vízzel.

A két sejtfal-peroxidázrt egyszerre csendesítő VIGS konstrukcióhoz *Arabidopsis* vad típusból származó mRNS-t reverz transzkripcióval átírt cDNS-ből felszaporítottunk PCR-rel egy olyan 300 bp hosszú szakaszt, mely nagyfokú azonosságot mutat a *PRX33* és a *PRX34* lókuszokban. Ezáltal alkalmas mindkét gén csendesítésére egyszerre. Ennek kiválasztásához a siRNA Scan (<http://bioinfo2.noble.org/RNAiScan.htm>.) (Xu és mtsai 2006) webes alkalmazást használtuk a következő keresési beállításokkal: *Arabidopsis thaliana* DCFC Gene Index V 15 release on 4/23/2010, *Arabidopsis thaliana* TAIR 9 V 9 release on 6/19/2009 and *Arabidopsis thaliana* mRNA (from TIGR Ath1 5).

A PRX33 és PRX34 csendesítéséhez szükséges szekvencia felszaporítására használt primer pár:

Forward 5'-CGCGGATCCGCTGATGGCACACAAACATTC-3'

Reverse 5'-GCGGGATCCAATACAATCTGCTCCTGCTCAA -3'

A klónozási munka a TRV2-GFP plazmiddal megegyező módon zajlott, azzal a különbséggel, hogy a pGem T-Easy vektorból BamHI restrikciós enzimmal emésztettük ki a beklónozott fragmentet, amit aztán a már elkészített TRV2-GFP plazmidba építettünk be.

Az elkészített plazmidok szekvenciáját Sanger szekvenálással (Macrogen, EZ-seq) ellenőriztük.

Végső lépésként az elkészített TRV2-GFP és TRV2-GFP-PRX plazmidokat *Agrobacterium tumefaciens* MOG301 (Hood és mtsai 1993) baktériumba transzformáltuk elektroporálással. Az elektroporáláshoz saját, általunk optimalizált protokollt használtunk. Az elektroporálás lépéseit dolgozatom későbbi fejezeteiben (4.11; 5.11) részletezem.

Az elektroporálás után kinőtt telepeket kolónia PCR-rel ellenőriztük a korábban részletezett módon és a megfelelő baktérium telepeket további szelektív táplemezekre szélesztettük.

4.6. *Arabidopsis* tranziens transzformációja agroinfiltrációval

A VIGS plazmidokat tartalmazó agrobaktériumokkal agroinfiltrációt végeztünk zöld fluoreszcens fehérjét kódoló mGFP-ER gént (Haseloff és mtsai 1997) expresszáló transzformáns, hosszú nappalos körülmények között nevelt *Arabidopsis* növényeken

. Az agroinfiltrációt Burch-Smith és mtsai (2006) módszere alapján végeztük, kisebb változtatásokkal.

A TRV1, TRV2-GFP, TRV2-GFP-PRX és TRV2-PDS plazmidokat tartalmazó agrobaktériumokat kiszélesztettük kanamicint (30 µg/ml) és rifampicint (50 µg/ml) tartalmazó LB táptalajra és 27 °C-on egész éjszakán át inkubáltuk.

Másnap a frissen kinőtt baktérium pázsitról pár kacsnyi baktériumot szuszpendáltunk 4 ml Agrobaktérium inkubáló puffert tartalmazó kémcsövekben és spektrofotométerrel OD₆₀₀=1,5 sűrűségűre állítottuk be.

Agrobaktérium inkubáló puffer (pH 5,6):

1,95 g MES

2 g MgCl₂·6H₂O

1 l ioncserélt víz

Ezután DMSO-ban (Dimetil-szulfoxid) feloldott 150mM acetosziringon stock-ból 1 µl/ml-t pipettáztunk minden egyes kémcsőbe, majd 3 órán át inkubáltuk őket szobahőmérsékleten.

Az inkubáció letelte után a TRV1 plazmidot tartalmazó agrobaktérium szuszpenziót 1:1 (v/v) arányban elegyítettük a TRV2 plazmidos agrobaktérium szuszpenzióval.

Agroinfiltrációhoz 2-3 hetes, 3-4 levéllel rendelkező GFP-t expresszáló *Arabidopsis* növényeket használtunk, melyek hosszúnappalos körülmények között (16 óra fény/8 óra sötétség) voltak nevelve.

1 ml-es fecskendővel infiltráltuk minden növény alsó 2 levelét a baktérium szuszpenzióval, majd növénynevelő kamrákban továbbra is hosszúnappalos körülmények között neveltük őket.

Az infiltráció utáni 10. napon UV lámpával (100 W-os, Blak Ray; model B100AP; UV Products) megvilágítva kiválasztottuk azokat a növényeket, amelyeken látható a géncsendesítés, azaz nem zölden fluoreszkálnak, hanem a géncsendesítés hatására vörös fényt bocsátanak ki. Ezeket a kisselektált növényeket neveltük tovább a kifejelett (6 hetes) állapotukig és használtuk őket, mint vírus inokulum, mivel további vizsgálatra a hosszú nappalon nevelt növények a korai virágzás és kis zöldtömeg miatt nem alkalmasak. A kisselektált növényeket a további felhasználásig -70°C-on, fagyasztva tartottuk.

Ezután rövid nappalon nevelt (10 óra fény/14 óra sötét) 2-3 hetes GFP-t expresszáló *Arabidopsis* növényeket mechanikai vírusátvitellel fertőztünk meg. Ehhez mindkét konstrukcióból (GFP-t és sejtfa-peroxidázokat csendesítő konstrukció) 3-4, előzőleg lefagyasztott géncsendesített *Arabidopsis* növényt dörzsöltünk el 1 ml ioncserélt vízben, melyhez karborundumot adtunk. A növényi nedvet ezután kézzel finoman a növények leveleibe dörzsöltük. A géncsendesítés sikerességét az inokulációt követő 10. napon UV lámpával ellenőriztük, a géncsendesítés mértékét pedig valós idejű PCR-rel határoztuk meg, ahol a célgének mRNS szintjét mértük MOCK és *Alternaria* fertőzést követően, a korábban már ismertetett metodika szerint. Az ellenőrző valós idejű PCR-hez nem használhattuk a célszakaszok felszaporításához alkalmazott primereket, mivel azok a növényekben lévő TRV megfelelő szakaszához is be tudnak kötődni, ezért a célgének egy másik régiójához kötődő primer párt választottunk. A sejtfa-peroxidázok mRNS szintjének méréséhez a korábban már alkalmazott, a 3. táblázatban leírt primerekkel dolgoztunk.

4.7. Fertőzést követő génindukciós időpontok meghatározása

A fertőzés hatására bekövetkező oxidatív robbanás kialakulásáért felelős gének (sejtfal-peroxidázok és poliamin-oxidázok) esetében szeretnénk volna megismerni, hogy a növényi immunválasz mely szakaszában vesznek részt és pontosan mikor aktiválódnak. Ennek céljából vizsgáltuk vad típusú növényekben a *PRX33*, *PRX34* sejtfal-peroxidázokat kódoló gének és az *Arabidopsis* összes poliamin-oxidázt kódoló génjének (*PAO1*, 2, 3, 4, 5) transzkriptum szintjét *Alternaria brassicicola* gombával történő fertőzést követően különböző időpontokban, 2, 6, 12, 24 és 48 óra elteltével. A vizsgálathoz egész, gyökér nélküli növényeket használtunk, 3 független biológiai ismételtsben és az egyes ismétlésekhez 3-4 növényt dolgoztunk fel. Kontrollként fertőzetlen növényekben mértük a kérdéses gének expresszióját. A fertőzött növényeket folyékony nitrogénnel eldörzsöltük, RNS-t izoláltunk belőlük, cDNS szintézist hajtottunk végre és végül valós idejű PCR-rel megállapítottuk a vizsgált gének mRNS szintjét. Az alkalmazott metodika megegyezett a korábban leírtakkal (RNS kivonás, DNase kezelés, cDNS szintézis, qPCR). A használt primereket a **2. és 3. Táblázatban** tüntettük fel.

3. Táblázat. Felhasznált primerek II.

Gén	Primer szekvenciák	Beállítási mód
<i>PRX33-At3g49110</i>	Forward 5'-CGAGAAACCATTGTAAATGAGT-3' Reverse 5'-CCGAGCCGAATTTGCG-3'	Denaturáció: 95°C – 6 perc Amplifikáció 40 ciklusban 95°C – 30mp 60°C – 1 perc
<i>PRX34-At3G49120</i>	Forward 5'-TCTCTTCGTCTTCAACATCGTC -3' Reverse 5'-TCCGACCTTAACATTTACAATGGTT -3'	
<i>PAO1-At5G13700</i>	Forward 5'-CCAGGAGACGATGAAAGAGG-3' Reverse 5'-GTAGCTACCGCGTTGAAACC-3'	
<i>PAO2-At2G43020</i>	Forward 5'-AGTCATTGCTGTCCCTCTTG -3' Reverse 5'-CCTAGGTCGTTGATTGCTTCT-3'	
<i>PAO3-At3G59050</i>	Forward 5'-A GTCAGGGATGAGCAGGA – 3' Reverse 5'-GAGAGAGTGTTGATTACAGGGCGATA-3'	
<i>PAO4-At1g65840</i>	Forward 5'-TGTTATTGTGATTGGTAGTGGTA-3' Reverse 5'-TAAGGGATTCTCATCAGAGA-3'	

PAO5- At4g29720	Forward 5'-TCAGGCAAAGGAGGACTAAAC-3' Reverse 5'-CGAGTGGCAGAGTAATGAAGTGA-3'	
--------------------	--	--

4.8. Kórtani vizsgálatok

4.8.1. Léziószám meghatározás

Az *Alternaria brassicicola* gombafertőzés tüneteinek számszerűsítésére lézió számlálást használtuk, mellyel a klorotikus és nekrotikus tüneteket mutató levélfelületet viszonyítottuk az egész levélfelülethez. Ehhez minden genotípusból (*prx33*, *rboh*d, Col-0, *TRV-GFP-PRX* és *TRV-GFP*) 30-30 db közepes korú (5.-10. levélig) levelet használtunk, melyeket a fertőzés 10. napján vágunk le a növényekről. A kísérletet két egymástól független időpontban ismételtük meg. A levágott levelekről fényképeket készítettünk, majd ImageJ programmal lemértük a fertőzött és teljes levélfelületet, majd a kapott értékekből arányt számoltunk, ahol az 1 érték a teljes levélfelületnek felel meg.

4.8.2. DAB festés

A fertőzés során keletkező hidrogén-peroxid detektálásához DAB (3,3'-Diaminobenzidine) festést alkalmaztunk. Növényanyagként 2 napos, *Alternaria brassicicola*-val fertőzött egész növényeket használtunk (2DAI). A levágott egész, gyökér nélküli növényekbe DAB festéket (1mg DAB/ml ioncserélt víz) infiltráltunk vákuum segítségével, majd 2 óráig szobahőmérsékleten és fényben inkubáltuk őket. Az inkubálást követően színtelenítő oldatban való 1 napos áztatással eltávolítottuk a színtesteket a növényekből, hogy láthatóvá váljon a DAB-bal megfestett hidrogén-peroxid. A hosszabb tárolhatóság érdekében 50%-os glicerines oldatban tartottuk a kiszíntelenedett növényeket. Ezután két írásvetítő fólia közé helyeztük a növényeket, majd fénymikroszkóp alatt fényképeket készítettünk az elszíneződött foltokról. Vizsgálatainkhoz kontroll növényeket is használtunk, melyeket nem fertőztünk meg *A.brassicicola*-val (MOCK).

Színtelenítő oldat:

80% etanol

20% kloroform

0,15% triklór-ecetsav

4.8.3. DCFH-DA festés

A hidrogén-peroxid termelődési helyének megállapítása mellett a mennyiségét is szeretnénk volna meghatározni és összehasonlítani a *prx33* mutáns és *TRV-GFP-PRX* géncsendesített növényekben termelődött H_2O_2 -t a Columbia növényekben tapasztalhatóval. Ehhez a DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) festéket használtuk Bozsó és mtsai (2005) alapján. 2 napos *A. brassicicola* fertőzött növényeket választottunk ki, melyeknek 30-30 középső levélemeletből (5-ik- 8-ik levélig) származó, tehát közepes fiziológiai állapotú levelét vágtuk le és használtuk infiltráláshoz. 20 mM-os DCFH-DA törzsoldatot készítettünk tömény etanolban, majd 0,4 mM-ra hígítottuk 10 mM-os nátrium-foszfát pufferrel (pH 7,4), amivel vákuuminfiltráltuk az összes levelet. 10 perc sötétben inkubálás után AlphaMager berendezéssel UV fény alatt fényképeket készítettünk a levelekről, majd a fényképekből, a készülékhez tartozó AlphaView programmal, Multiplex Band analízissel megállapítottuk minden egyes levél átlagos pixel fluoreszcencia intenzitását. A kísérletet 2 független biológiai ismétléssel végeztük.

4.9. *Alternaria brassicicola* gomba biomassza mennyiségének meghatározása

A kísérleti növényeinket fertőző *A. brassicicola* biomasszájának meghatározásához DNS alapú valós idejű kvantitatív PCR-t alkalmaztunk, hogy igazoljuk, a gomba növekedése gátlódik a *prx33* mutáns és *TRV-GFP-PRX* géncsendesített *Arabidopsis* növényekben a vad típushoz képest. Az alkalmazott módszerünk lényege, hogy a megfertőzött növényekből genomi DNS-t vontunk ki, mely tartalmazta a növényi és gomba DNS-t egyaránt. Majd a valós idejű PCR során a növényi *At4g26410* referencia gén Ct eredményére normalizáltuk a gomba ITS régiójából nyert Ct értéket. *A. brassicicola* ITS régióra tervezett primer pár:

Forward 5'-TCTCCAGTTTGCTGGAGACT-3'

Reverse 5'-GGATGCTGACCTTGGCTGGA-3'

A genomi DNS izolálást Brouwer és mtsai (2003) által használt kivonás alapján, kis módosítással végeztük. *A. brassicicola* gombával történő fertőzés utáni 10. napon (10DAI) vettünk mintát a különböző kísérleti növényekből. 3 biológia ismétlést végeztünk és minden

ismétlés 10-10 db fertőzött levelet tartalmazott, melyek körülbelül 15 különböző növény középső levélemeletéből származtak.

A DNS kivonás menete:

- A mintákat folyékony nitrogénnel eldörzsöltük, majd 0,1g-ot mértünk ki belőlük 1,5 ml-es centrifuga csövekbe.
- A homogenizátumhoz 300 µl lízis puffert adtunk és 300 µl fenol: kloroform: izoamil alkoholos (25:24:1) keveréket, majd jó alaposan vortexel elkevertük.

Lízis puffer (pH 8):

2,5 M LiCl

50 mM Tris-HCL

6,25 mM EDTA

4 % Triton X-100

- 5 perces 10.000 rpm-en végzett centrifugálás után a legfelső áttetsző fázist új csőbe raktuk át és kétszeres mennyiségű tömény etanollal kicsaptuk a DNS-t.
- 5 percig centrifugáltuk 10.000 rpm-en, majd a felülúszót leöntöttük a pelletként összegyűlt DNS-ről.
- Újabb tömény etanolt pipettáztunk a kicsapott DNS-re és 15 percig -20 °C-on inkubáltuk.
- A felülúszót újra leöntöttük a pellet felszínéről és 70 %-os etanollal mostuk. Az etanol eltávolítása után végül vákuumcentrifugában 10-15 percig szárítottuk a DNS pelletet.
- A jól kiszáradt pelleteket 40 µl nukleáz mentes vízben feloldottuk.

A DNS mennyiségét és tisztaságát Nanodrop spektrofotométerrel állapítottuk meg, és 100 ng/ µl koncentrációjúra állítottuk be. Ezután a valós idejű PCR-hez ezt használtuk templátként 10-szeres hígításban. A protokoll többi része, valamint a PCR beállítási mód megegyezett a korábban leírt real-time PCR protokollal.

4.10. Génaktivitás és a szeneszcencia kapcsolata

Számos tanulmány szerint összefüggés tapasztalható az *Arabidopsis* NADPH oxidáz működése és az etilén, mint szeneszcencia hormon, vagy a prekuzora, az ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) között (Pogány és mtsai 2009, Mersmann és mtsai 2010, Yao és mtsai 2017). Emiatt összefüggést feltételeztünk a levelek kora és az általunk vizsgált gének (*RbohD*, *PRX33*,

PRX34) expressziós aktivitása között. Így megmértük az *Arabidopsis* Col-0 növények *RbohD*, *PRX33*, *PRX34* géneinek transzkriptum szintjét fertőzés hatására, a növény 3 különböző levélemeletében, azaz különböző korú leveleiben. Mintavételi időpontnak a fertőzést követő 24. órát választottuk. Kontrollnak Col-0 MOCK növényeket használtunk. A méréshez 3 független biológiai ismétlést végeztünk 3 levélemeletben, felső-fiatal levelek, középső és alsó-öregebb levelek. Egy méréshez 10-10 db levelet dolgoztunk fel, melyek körülbelül 15 különböző növényről származtak. A relatív génexpresszió méréséhez qPCR-t használtunk, melyhez az RNS kivonás, DNase kezelés, cDNS szintézis és a qPCR metodikája és beállítási módjai megegyeztek a korábban leírtakkal. Az *RbohD* gén expressziójának megállapításához a következő primer szekvenciákat használtuk: *RbohD* forward 5'-CTGGACACGTAAGCTCAGGA-3', reverse 5'-GCCGAGACCTACGAGGAGTA-3'. A *PRX33* és 34 primereket pedig már korábban, a 2. Táblázatban feltüntettük.

4.11. Agrobaktérium elektroporálásának optimalizálása

Az *Agrobacterium tumefaciens* baktériummal végzett növényi transzformáció gyakran és széles körben használt módszer a növénybiológiai kutatásokban. A transzformációhoz használt plazmidot leggyakrabban elektroporálással juttatják be az agrobaktérium sejtekbe, ezért ennek a klónozási lépésnek a hatékonysága kulcsfontosságú lehet. Munkánk során az elektroporálás különböző lépéseit optimalizáltuk és egyszerűsítettük, a maximális transzformációs hatékonyság mellett.

4.11.1. Elektrokompetens sejt készítése

Az elektroporálás optimalizálásához az *Agrobacterium tumefaciens* MOG301 (Hood és mtsai 1993) törzsét használtuk, melyet szilárd, antibiotikumot tartalmazó LB táptalajra (10 g/L tripton, 5 g/L élesztő kivonat, 5 g/L NaCl, 15 g/L agar és 50 µg/ml rifampicin) szélesztettünk és 27°C-on egész éjszakán át (~16 óra) inkubáltuk. Másnap a frissen felnőtt baktérium pázsitra 4 ml steril 10 %-os glicerint pipettáztunk és oltókaccsal óvatosan lekapartuk a táptalaj felületéről a baktérium gyepet. A glicerines baktérium szuszpenziót 2 ml-es centrifuga csövekbe öntöttük át, majd 4 °C-

on, 14.000 rpm-en 1 percig centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük a baktérium pelletről és felöntöttük újabb 10 %-os steril glicerinnel. A glicerines mosás fontosságának megállapítása érdekében végeztünk elektroporálást mosási lépés nélkül, egyszeri és kétszeri mosáson átesett mintákon, majd meghatároztuk az elektroporációs hatékonyságukat. A végső centrifugálás után az összes baktérium pelletet 400 μ l 10%-os steril glicerinben szuszpendáltuk fel és az elektroporálás megkezdéséig jégen tartottuk.

4.11.2. Elektroporáció

80 μ l elektrokompetens baktérium szuszpenzióhoz különböző mennyiségű plazmid DNS-t adtunk, hogy meghatározzuk azt a legalacsonyabb plazmid mennyiséget, amivel még sikeres a transzformáció. 1, 5, 10, 25, 75 és 100 ng pTRV2 plazmiddal (Arabidopsis Biological Resource Center, STOCK: CD3-1043) végeztük az elektroporálást, mivel ebből a plazmidből mindig elegendő mennyiség állt a rendelkezésünkre. A plazmidokkal összekevert baktérium szuszpenziót lehűtött elektroporáló küvettákba (Bio-rad, Gene Pulser) pipettáztuk majd elektroporáltuk őket.

A leghatékonyabb elektroporáció elérése érdekében különböző beállítási módokat használtunk. Három különböző feszültséget, az 1, 2 és 2,5 kV/cm-t teszteltük 200 Ohm ellenállás és 25 μ F mellett. Ezen kívül az ellenállást is változtattuk, 400 és 800 Ohm ellenállás hatását vizsgáltuk meg 2,5 kV/cm feszültség és 25 μ F mellett.

Az elektroporációs hatékonyság növelése céljából többszöri elektroporálást is végeztünk Mahmood és mtsai (2008) alapján. Egyszer, kétszer és háromszor elektroporáltuk a mintáinkat 2,5 kV/cm feszültségen, 200 Ohm ellenálláson és 25 μ F mellett.

Elektroporálás után a mintákhoz 1 ml folyékony táptalajt öntöttünk. Kétféle táptalaj hatását vizsgáltuk, SOC és LB folyékony táptalajok hatását hasonlítottuk össze.

Ezután a mintákat 1, 2 valamint három órán át inkubáltuk 27 °C-on rázatva, ezáltal teszteltük a hosszú inkubációs idő szükségességét.

Az inkubáció után százszorosra hígítottuk a mintáinkat és ebből 100 μ l-t szélesztettünk ki rifampicint (50 μ g/ml) és kanamicint (50 μ g/ml) tartalmazó szilárd LB táptalajra. A lemezeket 27 °C-on 2 napig inkubáltuk tovább a telepek megjelenéséig.

Minden beállítási mód esetében használtunk negatív kontrollt, mely templát nélküli elektroporálást jelentett.

4.11.3. Agrobaktérium törzsek

A legmegfelelőbbnek ítélt beállítási módszerrel transzformáltunk két másik Agrobaktérium törzset, az LBA4404 (Hoekema és mtsai 1983) és EHA105 (Hood és mtsai 1993) törzset és transzformálhatóságukat a MOG303 baktériumhoz hasonlítottuk.

4.11.4. Direkt elektroporáció

A klónozási munkákat nagyban meghosszabbítja az, hogy a ligálási folyamat után *E.coli* baktériumot használunk transzformációhoz és az ebből kitisztított plazmidot transzformáljuk csak Agrobaktériumba. A folyamat lerövidítése érdekében direkt elektroporálást végeztünk *Agrobacterium tumefaciens* MOG303-ba, az *E.coli* baktériumba való transzformálás elhagyásával, és helyette az általunk optimalizált elektroporációs metodikát alkalmaztuk.

Az *Arabidopsis At4g10540* génjéről átírt cDNS-ről egy 350 bp hosszú cDNS fragmentet amplifikáltunk Phusion High-Fidelity DNA Polymerase enzimmel (Thermo Scientific), a gyártó utasításainak megfelelően.

A felhasznált primerek a következők voltak:

Forward: 5'-TGAAGATCTATGAAGAGTTGCAGAACCTTAA-3'

Reverse: 5'-CCACTAGTCCGAGTTGTATCTAGTTGG-3'

A PCR terméket ezután High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) segítségével kitisztítottuk, majd ezt, valamint pCAMBIA1302 plazmidot BcuI/BglII (FastDigest, Thermo Scientific) restriktációs enzimekkel hasítottuk. Az emésztési termékeket újra tisztítottuk High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) segítségével, majd összemértük a ligálási reakciót, melyhez T4 DNA Ligase enzimet használtunk és az inszert:plazmid arány 3: 1 volt. A ligálási reakció végén inaktiváltuk a ligáz enzimet 60 °C-on való 10 perces inkubálással. Ezután a reakció elegyből 1 µl-nyit adtunk 80 µl elektrokompetens agrobaktériumhoz és elvégeztük az elektroporálást, az általunk optimalizált protokoll szerint.

4.11.5. Transzformációs hatékonyság számítása

Minden egyes beállítási módot kétszer-háromszor ismételtünk meg, három technikai ismétléssel, és minden esetben használtunk negatív kontrollt, mely nem tartalmazott plazmid DNS-t.

A kinőtt telepeket megszámloltuk és transzformációs hatékonyságot számoltunk belőlük, melyet a CFU (colony formin unit)/ μg plazmid DNS formában tüntettünk fel.

4.12. Statisztika

Vizsgálatainkat legalább 3 egymástól független biológiai ismétléssel végeztük, és a biológiai ismételések 3 technikai ismétléssel történtek. Az eredményeink közötti szignifikáns különbségeket statisztikai analízissel támasztottuk alá, melyet két kezelés esetén páros t-próbával, több kezelés esetén pedig one-way ANOVA és post-hock teszttel végeztük. A statisztikai analízishez IBM SPSS Statistics 20. Software-t használtuk. A statisztikailag szignifikáns különbséget $P < 0.05$ értéknél állapítottuk meg.

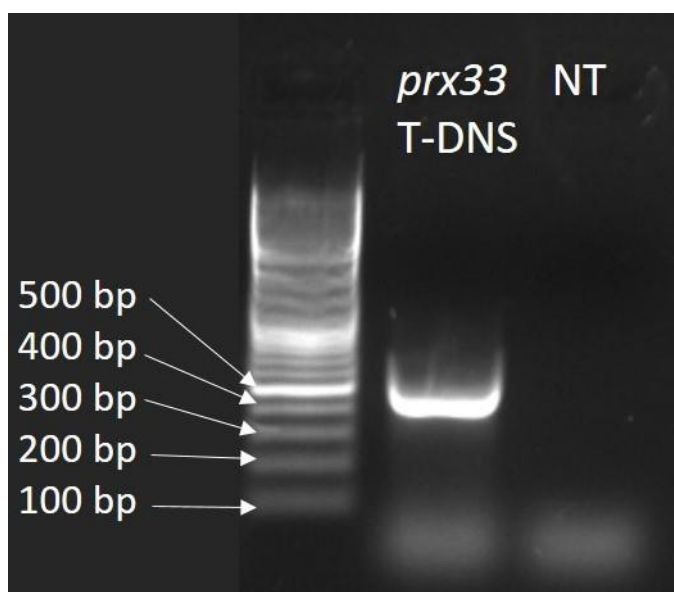
5. EREDMÉNYEK

5.1. T-DNS beépülés igazolása a vizsgált *At3g49110* és *At3g49120* lókuszokon

Az *Arabidopsis thaliana*-ban működő 33-as sejtfal-peroxidázt kódoló gén az *At3g49110*-es lókuszon található. Ez egy 2179 bp hosszú régió, mely 3 intronnal tagolt (**1. Ábra**). A *prx33*-as (SALK_062314) mutáns *Arabidopsis* növényben a T-DNS inszert feltételezett helyét PCR-el igazoltuk (**2. Ábra**), ez alapján az inszert ténylegesen az *At3g49110*-es lókusz start kodonjától (ATG) downstream irányban az első intronba épült be. Az *At3g49120*-as régió, mely a 34-es sejtfal-peroxidázt kódolja, 2482 bp hosszú és szintén 3 intronnal rendelkezik (**1. Ábra**).



1. Ábra. *At3g49110* és *At3g49120* lókuszok exon és intron helyei.

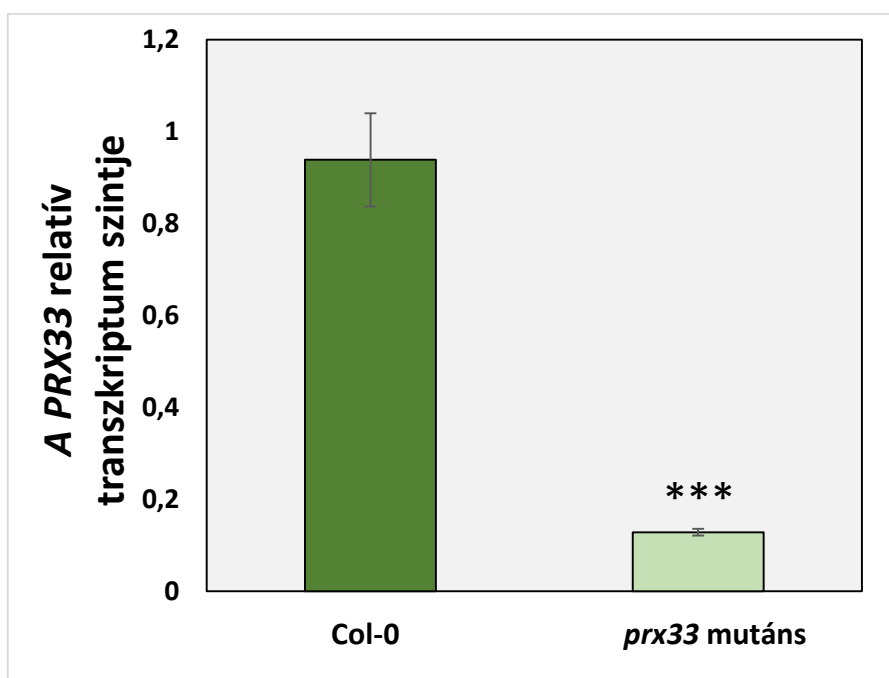


2. Ábra. T-DNS helyének meghatározása.

A két vizsgált lókuszt az *Arabidopsis* 3. kromoszómáján helyezkedik el, egymáshoz nagyon közel, egy gén található csak köztük (*At3g49115*), ezért kapcsolt géneknek tekinthetjük őket. A két lókuszt szekvenciája között nagyfokú hasonlóságot találtunk, 90%-ban hasonlóak.

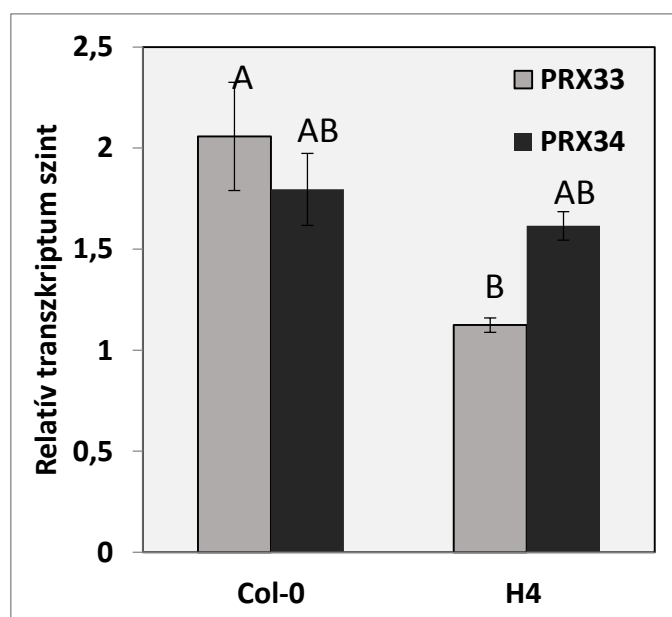
5.2. T-DNS inszerció és transzgén hatásának igazolása *prx33* és H4 növényekben

A *prx33* Salk T-DNS inszerció mutáns *Arabidopsis* növényrel történő vizsgálataink megkezdése előtt igazolni szeretnénk volna, hogy az *At3g49110* génbe beépült T-DNS valóban megakadályozza, vagy csökkenti a 33-as sejtfal-peroxidáz gén mRNS transzkripcióját. Ezért megmértük a *prx33*-as mutánsban a 33-as sejtfal-peroxidáz relatív génexpressziós szintjét és az *A.thaliana* Columbia vad típusban mért szinthez viszonyítottuk. Eredményeink alapján a PRX33 mutáns egy knock down mutáns, melyben az általunk vizsgált sejtfal-peroxidáz gén igen alacsony szinten működik a vad típushoz képest (**3. Ábra**).



3. Ábra. Az PRX33 relatív transzkriptum szintje Col-0 és *prx33* mutáns *Arabidopsis* növényekben. A feltüntetett eredmények 3 biológiai ismétlés átlagát mutatják. Minden biológiai ismétlés 3 technikai ismétlésből állt. A Col-0 és *prx33* között kapott statisztikailag szignifikáns különbséget Student féle t-tesztel mutattuk ki. (***) $\alpha=0,001$

Az asFBP1.1, vagy H4 nevű transzformáns *Arabidopsis* Bindschedler és mtsai (2006) által létrehozott és leírt növény, mely a *Phaseolus vulgaris* peroxidáz génjét expresszálja antiszensz orientációban. A transzgén hatására az *Arabidopsis* PRX33-as és PRX34-es gén működése csökken. Ennek igazolására megmértük mindkét sejtfal-peroxidáz relatív transzkriptum szintjét a transzformáns növényekben és a vad típushoz viszonyítottuk. Saját eredményeink alapján a H4 transzgénikus *Arabidopsis* növényt nem tartottuk a legmegfelelőbbnek vizsgálatainkhoz, mivel a PRX34 gén transzkriptum szintje nem csökkent statisztikailag szignifikánsan a vad típushoz képest (4. Ábra).



4. Ábra. PRX33 és PRX34 gén relatív génexpressziója H4 és vad típusú *Arabidopsis* növényekben. A feltüntetett eredmények 3 biológiai ismétlés átlagát mutatják, melyek közül minden ismétlés összesen 3 technikai ismétlésből állt. A statisztikailag szignifikáns különbséget Tukey posthoc teszttel mutattuk ki ($p < 0,05$).

5.3. TRV alapú géncsendesítés adaptálása *Arabidopsis* növényre

A két sejtfal-peroxidáz hatását szeretnénk volna együttesen vizsgálni egy növényen belül, azonban a szakirodalomban használatos H4 transzformáns *Arabidopsis*-t nem tartottuk erre a célra a legmegfelelőbbnek. Ezért a vírus-indukálta géncsendesítést alkalmaztuk, hogy egy növényen belül mindkét sejtfal-peroxidáz kódoló gén mRNS szintjét csökkentsük. Ezen kívül egy a korábbi vizsgálatainktól eltérő, független módszert kerestünk, mellyel megerősíthetjük a Salk T-DNS inszerciós mutánsokkal kapott eredményeinket.

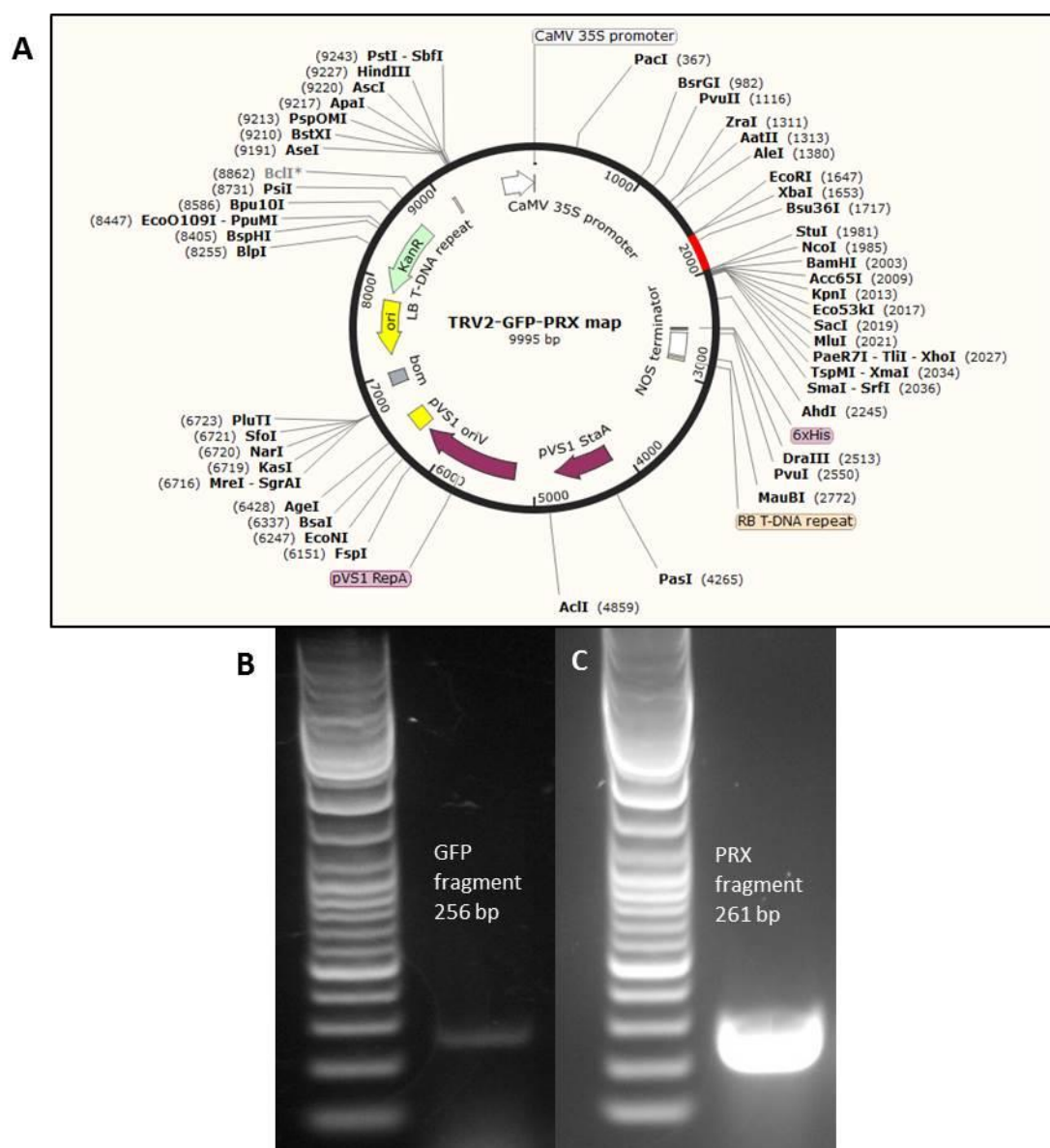
A *Nicotiana benthamiana* dohánynövény fitoén-deszaturáz (PDS) génjét csendesítő VIGS konstrukciót (TRV-PDS) már rutinszerűen használjuk Intézetünkben. A módszer adaptálásához *Arabidopsis* növényre, először ezt a konstrukciót alkalmaztuk, hogy megtudjuk, hatékonyan működik-e a TRV alapú géncsenedesítés *Arabidopsis* növénynél. Hayward és mtsai (2011) munkája szerint a hosszú nappalon (16/8 óra) nevelt *Arabidopsis* növényeken végzett géncsenedesítés közel 90%-os hatékonyságú, ezzel szemben a rövid nappalon (8/16 óra) nevelték esetében ez csak 10 %. Emiatt hosszú nappalt alkalmaztunk a jobb hatékonyság érdekében. Viszont ebben az esetben nagyon gyorsan elkezdtek virágozni és a PDS csenedesítése miatt kialakuló fehéredés csak a virágzati tengelyen alakult ki (5. Ábra A kép). Ennek elkerülése végett a továbbiakban hosszú nappalos megvilágítás mellett neveltük a növényeinket és a virágzati tengelyt, mely mutatta a géncsenedesítés tüneteit, mint vírus inokulum használtuk fel és mechanikai vírusátvitellel juttattuk rövid nappalon nevelt növényekbe a géncsenedesítést okozó konstrukciókat. Vírusanyagnak tehát az előzőleg agroinfiltrált növények eldörzsölt szövetét használtuk. Az így megfertőzött növények már virágzás előtt is mutatták a géncsenedesítés tüneteit, vagyis az elfehéredett leveleket (5. Ábra B kép).



5. Ábra. Fitoén-deszaturáz csendesített *Arabidopsis* növények

Hosszú nappalon (16/8 óra) nevelt PDS csendesített *Arabidopsis* növények (A). Rövid nappalon (8/16 óra) nevelt PDS csendesített *Arabidopsis* növények (B).

Ugyanakkor, szelekciós markernek *Arabidopsis* esetében PDS helyett a GFP-t választottuk, mivel a fitoén-deszaturáz csendesítése olyan redox változásokat okozhat a növényekben, melyek vizsgálataink szempontjából nem előnyösek. Ezért elkészítettük kontrollnak a TRV2-GFP és TRV2-GFP-PRX (6. Ábra) géncsendesítő konstrukciókat, melyek a GFP-t termelő transzgenikus *Arabidopsis* növényekben gátolják a GFP termelődését, tehát UV lámpa alatt nem adnak ki zöld fluoreszcens jelet, ezáltal a növények feldolgozás nélkül is könnyen szelektálhatóak (7. Ábra).



6. Ábra. TRV2-GFP-PRX

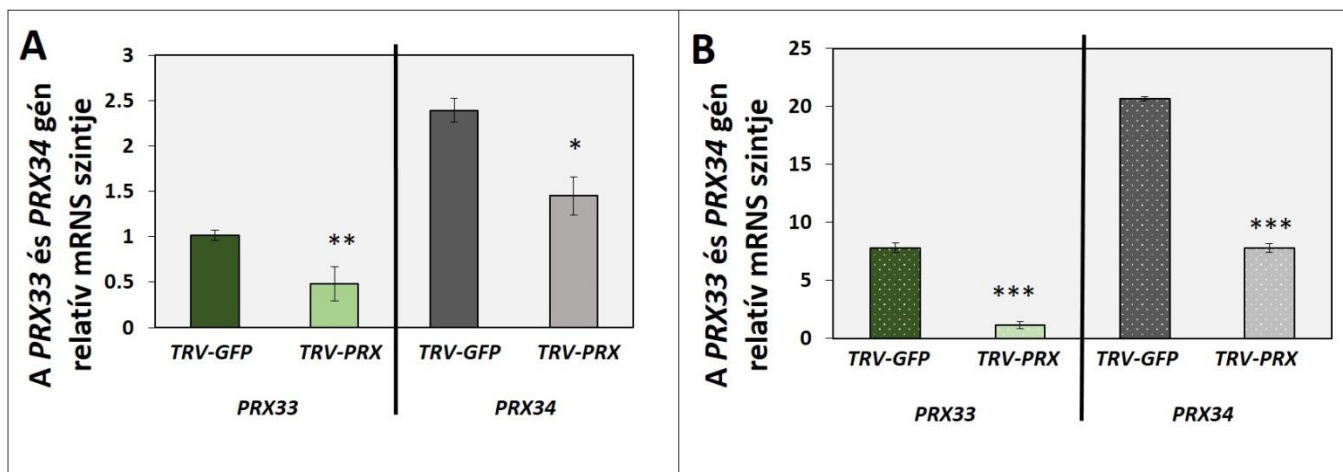
TRV2-GFP-PRX plazmidterkép (A). TRV2-GFP-PRX plazmidot tartalmazó *E.coli*-ből kolónia PCR-rel felszaporított GFP (B) és PRX fragment (C) gélképe.



7. Ábra. GFP csendesített (balra) és GFP-t termelő (jobbra) *Arabidopsis* növények UV fény alatt.

5.4. Géncsendesítés hatásának igazolása

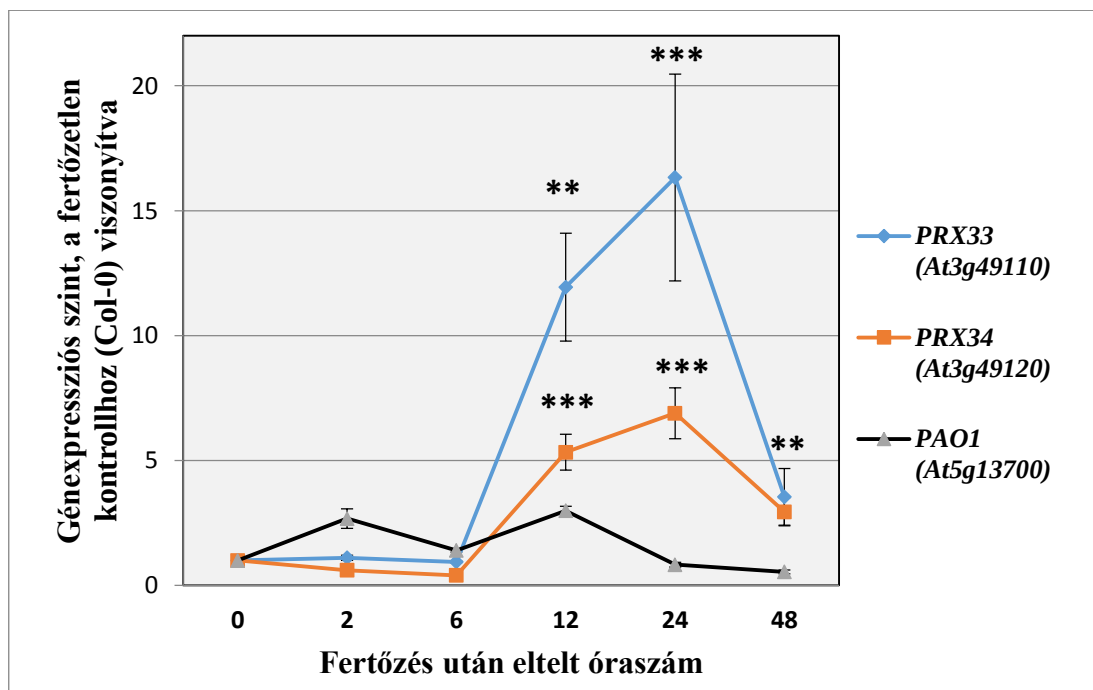
Vírus-indukálta géncsendesítéssel (VIGS) sikeresen létrehoztunk *PRX33* és *PRX34* géneket csendesítő konstrukciókat. A VIGS működését a növények mRNS szintjének megméréseivel igazoltuk kontroll körülmények között (**8. Ábra**, A kép) és *Alternaria brassicicola* fertőzés után 24 órával is (**8. Ábra**, B kép). A géncsendesítésnek köszönhetően mindkét időpontban jóval alacsonyabb volt a *PRX33* és *PRX34* gének mRNS terméke, mint a kontrolnak használt *TRV-GFP* növényekben.



8. Ábra. Vírus-indukálta géncsökkentés hatása a *PRX33* és *PRX34* gének mRNS szintjére kontroll körülmények között (A) és *A.brassicicola* fertőzés után 24 órával (B). A feltüntetett eredmények 3 biológiai ismételtes átlagát mutatják, melyek közül minden ismételtes összesen 3 technikai ismételtesből állt. A statisztikailag szignifikáns különbséget Student félé t-teszttel mutattuk ki (* $\alpha=0,05$ ** $\alpha=0,01$ *** $\alpha=0,001$).

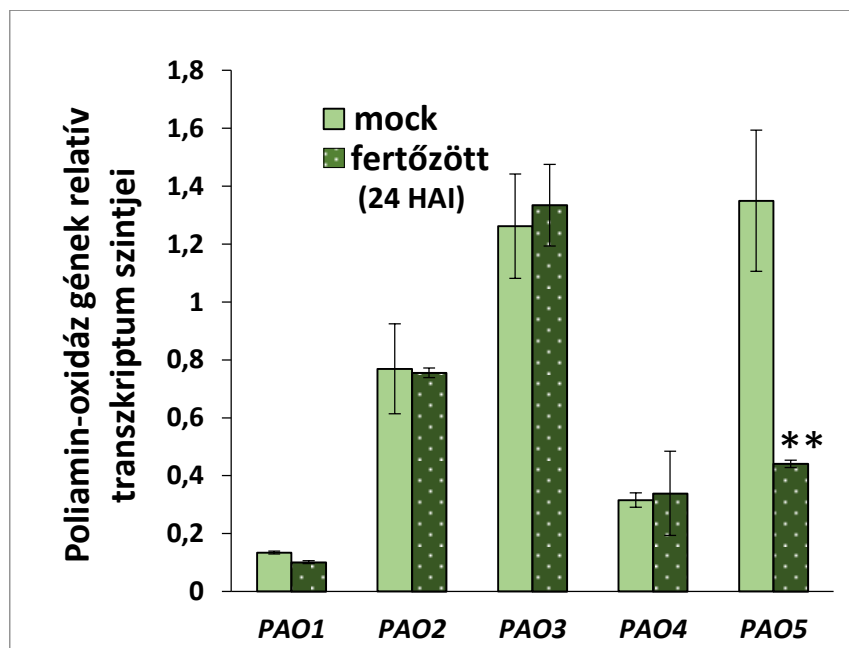
5.5. *Alternaria brassicicola* fertőzésre kialakuló génindukciók

Columbia vad típusú növényekben megmértük, hogy *Alternaria brassicicola* fertőzés hatására mely időpontokban aktiválódnak az általunk vizsgált gének, melyekről feltételeztük, hogy részt vesznek a fertőzést követő védekezési mechanizmusokban. Azt tapasztaltuk, hogy a két sejtfal-peroxidáz működése már a fertőzés utáni korai időpontokban beindul (6 óra), az idő előrehaladtával pedig fokozatosan nő és végül 24 óra elteltével tetőzik. 24 óra után viszont csökken a génaktivitás (9. Ábra).



9. Ábra. *A. brassicicola* fertőzést követő génindukciók. A feltüntetett eredmények 3 biológiai ismétlés átlagát mutatják, melyek közül minden ismétlés összesen 3 technikai ismétlésből állt. A statisztikailag szignifikáns különbséget Student féle t-tesztel mutattuk ki (** $\alpha=0,01$ *** $\alpha=0,001$).

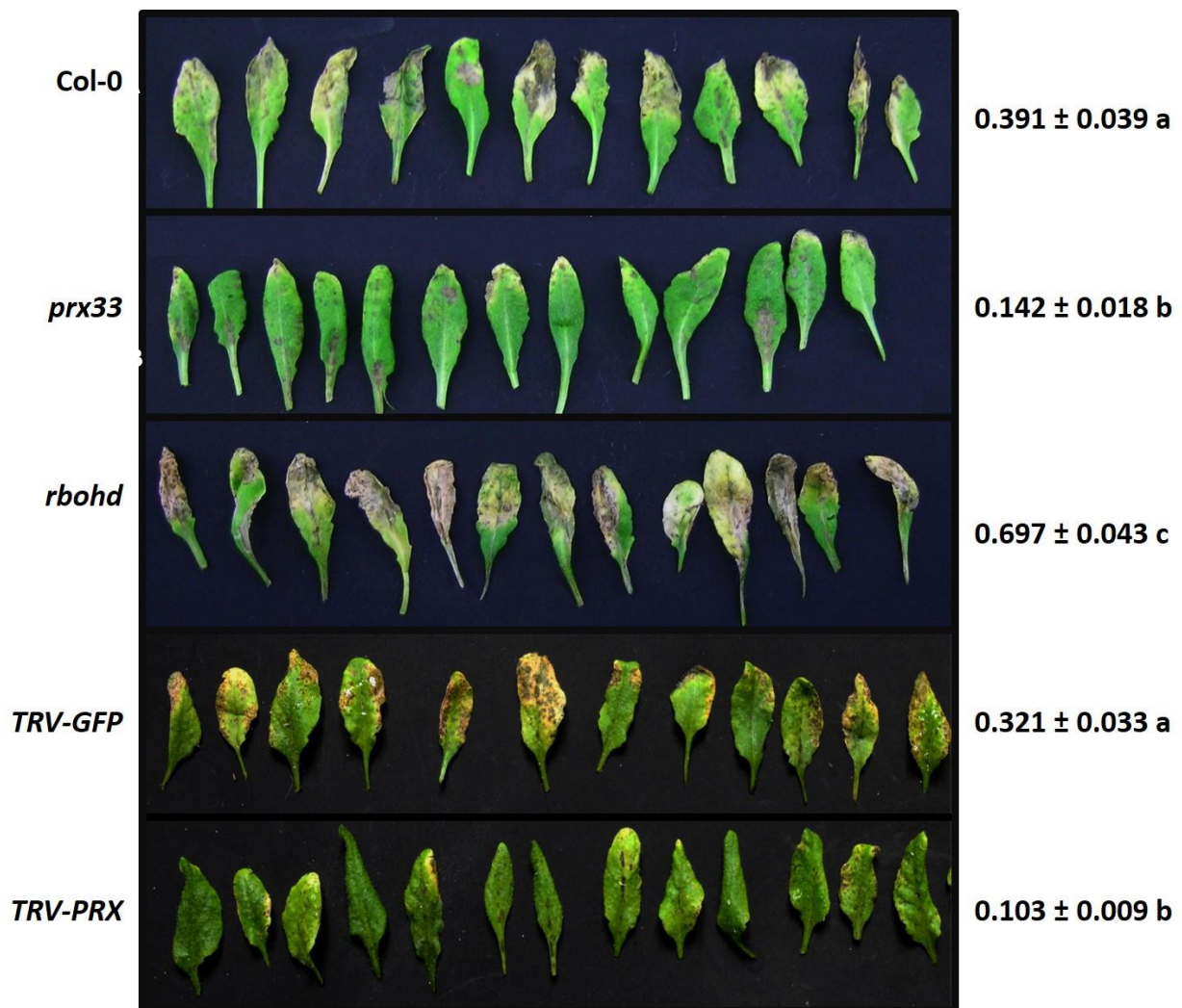
A *PAO1* génnél azonban nem tapasztaltunk jelentős mértékű génindukciót *A. brassicicola* fertőzésre, ezért megmértük az *Arabidopsis* többi poliamin-oxidázt kódoló génjének (*PAO2*, 3, 4, 5) indukcióját a fertőzés utáni 24. órában, és összehasonlítottuk a MOCK eredményekkel (**10. Ábra**). Azonban az *Arabidopsis* többi *PAO* génjénél sem emelkedett a génexpressziós szint *Alternaria* fertőzést követően, sőt, a *PAO5* gén esetében inkább repressziót tapasztaltunk. Ezért ezekkel a génekkel további vizsgálatokat nem végeztünk.



10. Ábra. Poliamin-oxidáz kódoló gének kifejeződési szintjei *A.brassicicola* fertőzést követő 24. órában, vad típusú növényekben. A feltüntetett eredmények 3 biológiai ismételtes átlagát mutatják, melyek közül minden ismételtes összesen 3 technikai ismételtesből állt. A statisztikailag szignifikáns különbséget Student féle t-tesztel mutattuk ki (** $\alpha=0,01$)

5.6. *Alternaria brassicicola* gomba tüneteinek értékelése

Prx33 és *RbohD* mutáns *Arabidopsis* növényeket, valamint *TRV-GFP-PRX* géncsendesített *Arabidopsis* növényeket és a kontrolljaikat (Columbia, *TRV-GFP*) *Alternaria brassicicola* nekrotróf gombakórokozóval fertőztük és a fertőzést követő 10. napon értékeltük a tüneteket. A 33-as sejtfal-peroxidáz mutáns növényeinken a kontrollokhoz képest kevesebb nekrotizáló léziót és kevesebb sejtelhalást tapasztaltunk (**11. Ábra**). Hasonló tüneteket mutatott a *TRV-GFP-PRX* géncsendesített *Arabidopsis* is, azaz a kontrolljához képest (*TRV-GFP*) láthatóan kevesebb tünet alakult ki gombafertőzés hatására. A látottakat igazolta a lézió számlálás eredménye is, miszerint a *PRX33* és *PRX34* gén csökkent működésének köszönhetően kevesebb roncsolódott szövet keletkezett a kontrollokhoz képest. A lézió számlálás eredményét a **11. Ábrán** tüntettük fel. Az *rbohD* mutáns *Arabidopsis* növényt viszonyítási alapként használtuk, mivel Pogány és munkatársai (2009) alapján *Alternaria* fertőzésre igen erős tüneteket produkál, mely erős sejtelhalással is jár.



11. Ábra. *Alternaria brassicicola*-val fertőzött *Arabidopsis* növények a fertőzést követő 10. napon és a fertőzött levélfelület aránya ± standard hibával. A genotípusok közötti statisztikailag szignifikáns különbséget Tukey posthock teszttel mutattuk ki ($p < 0,05$).

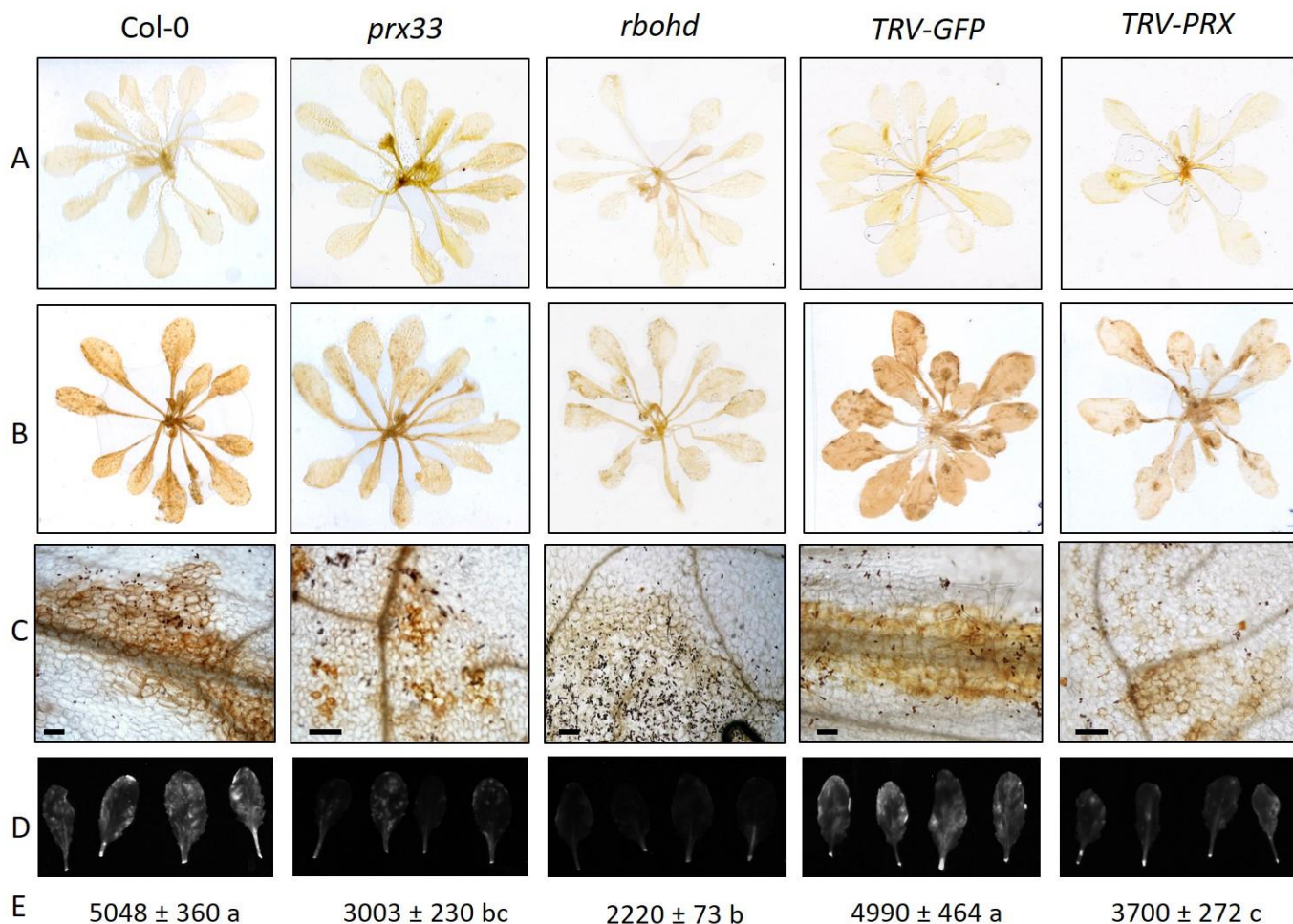
5.7. *Alternaria brassicicola* fertőzés hatására keletkező hidrogén-peroxid kimutatása *Arabidopsis* növényekben

Az *A. brassicicola* fertőzésre keletkező hidrogén-peroxid detektálására DAB festést végeztünk, mellyel láthatóvá tehető hol és milyen sejtek termelik a hidrogén-peroxidot. A DAB festésnek köszönhetően megállapítottuk, hogy a 33-as sejtfa-peroxidáz enzim valóban hozzájárul a fertőzés hatására indukálódó hidrogén-peroxid termelődéséhez, mivel hiányában, a *prx33* mutánsnál alacsonyabb szintű DAB festődést tapasztaltunk, valamint a festődött sejtek és sejtcsoportosulások száma is kevesebb volt Columbia vad típushoz képest, a fertőzést követő 2. napon. Hasonló eredményt láthatunk TRV-GFP-PRX géncsendesített *Arabidopsis* növények

esetében is, ahol kevesebb festődött sejtet találtunk a kontroll TRV-GFP növényekhez képest (12. Ábra).

DCFH-DA fluoreszcens festéket használva meghatároztuk a keletkezett hidrogén-peroxid mennyiségét is *Alternaria* fertőzés utáni 2. napon. A PRX33 mutánsban és a TRV-GFP-PRX géncsendesített növényekben a kontrollokhoz képest alacsonyabb fluoreszcens jelet tudtunk kimutatni, ezzel megegyezően tehát alacsonyabb hidrogén-peroxid mennyiséget mértünk (12. Ábra, D,E sor).

A *prx33* mutáns és *TRV-GFP-PRX*, valamint kontrolljaik vizsgálata mellett *rboh*d mutáns *Arabidopsis* növényeken is elvégeztük a festési eljárásokat, mivel az *rboh*d mutáns esetében már korábban alacsony hidrogén-peroxid akkumulációt írtak le (Pogány és mtsai 2009, Torres és mtsai 2005), ezáltal alkalmasnak találtuk a módszer használhatóságának tesztelésére, viszonyítási alapként.



12. Ábra. Hidrogén-peroxid kimutatása *Arabidopsis* növényekben *A. brassicicola* fertőzés hatására

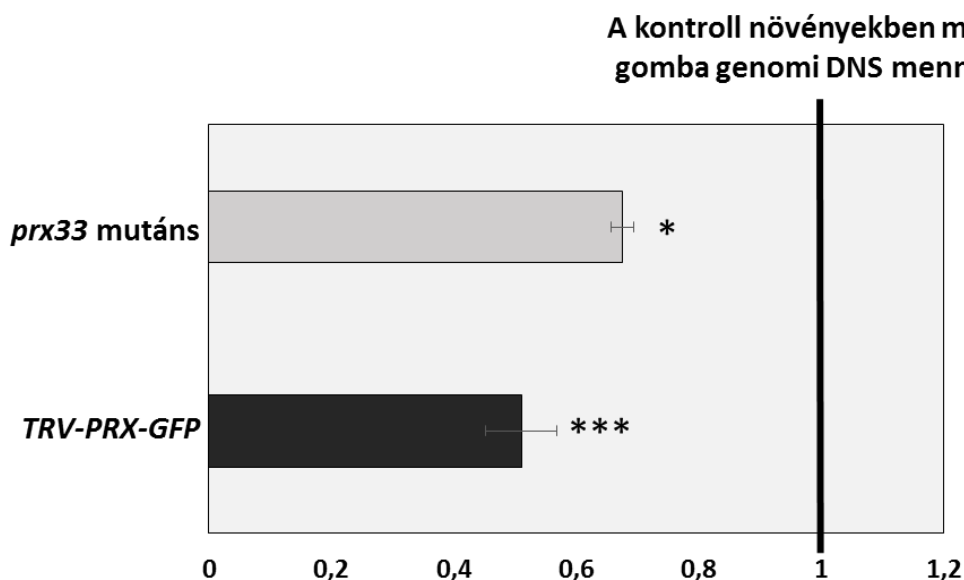
MOCK inokulált növények DAB-al festve (A). *A. brassicicola*-val fertőzött DAB festett növények (2DAI) (B). *A. brassicicola*-val fertőzött DAB festett növények (2DAI) fénymikroszkópos képei, méretarány = 50 µm (C). DCFH-DA festett levelek *A. brassicicola* fertőzés után 2 nappal, UV fény alatt (D). Hidrogén-peroxid mennyiségi meghatározása átlagos pixel fluoreszcencia intenzitás alapján, DCFH-DA festett levelekből, *A. brassicicola* fertőzés után 2 nappal (E). A genotípusok közötti statisztikailag szignifikáns különbséget Tukey posthock teszttel mutattuk ki ($p < 0,05$).

5.8. *Alternaria brassicicola* gomba biomassza mennyiségének meghatározása

Annak érdekében, hogy kiderítsük, valódi gombarezisztenciával állunk-e szemben, azaz a sejtfal-peroxidázok hiányában az *Alternaria brassicicola* növekedése visszaszorul-e a vad típushoz képest, a növényeket kolonizáló gomba biomasszájának mennyiségét számszerűsítő valós idejű,

gomba genomi DNS specifikus PCR vizsgálatokat végeztünk a *prx33* mutáns és a *TRV-GFP-PRX* géncsendesített *Arabidopsis* növényeken, a fertőzés 10. napján.

A csökkent génműködésnek köszönhetően, a *prx33* és *TRV-GFP-PRX* esetében alacsonyabb volt az *Alternaria brassicicola* relatív biomassza mennyisége a kontrollokhoz képest tehát a gomba kolonizációjában gátlás lépett fel (**13. Ábra**).



***A. brassicicola* relatív genomi DNS mennyisége a kontroll növényekhez viszonyítva**

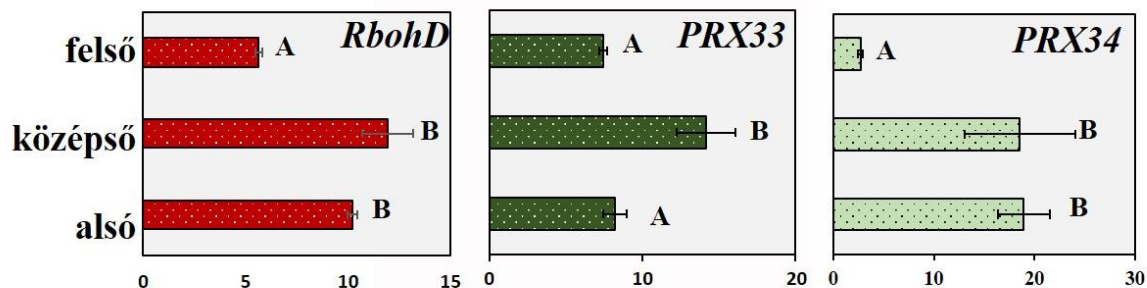
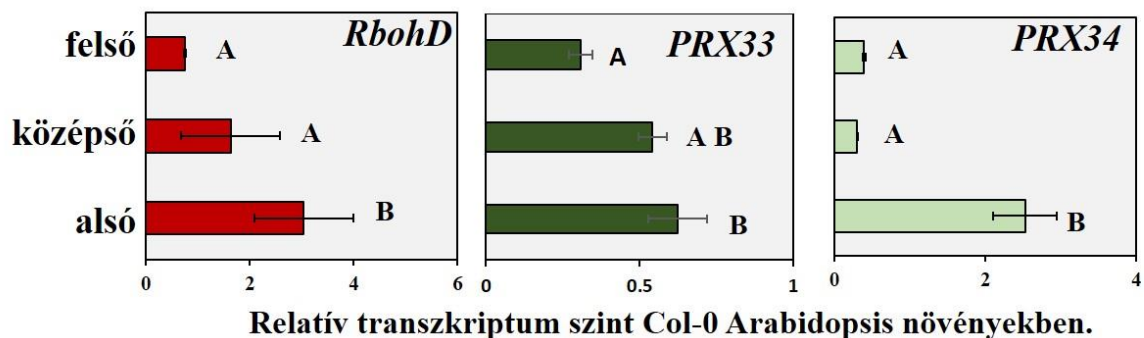
13. Ábra. *A. brassicicola* genomi DNS mennyiségének relatív meghatározása (10 DAI).

Az értékek közötti statisztikailag szignifikáns különbséget Student féle t-tesztel mutattuk ki.

(* $\alpha=0,05$ *** $\alpha=0,001$)

5.9. Génműködés és a levél életkorának kapcsolata

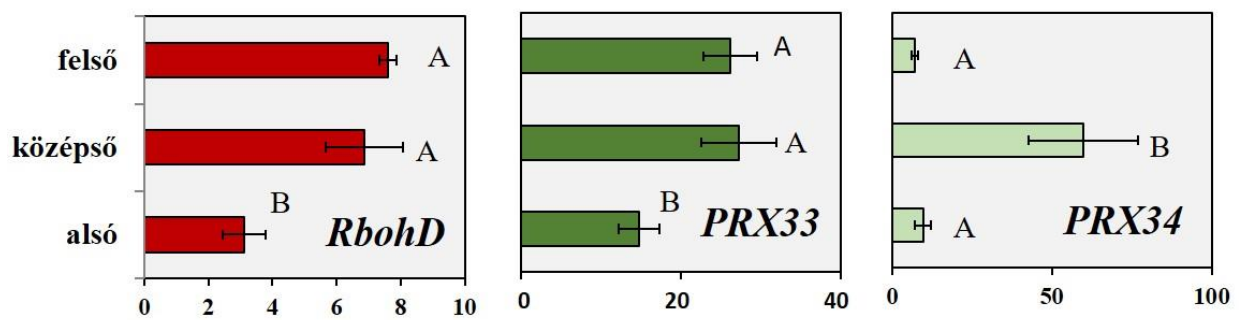
A levelek kora és az általunk vizsgált gének (*RbohD*, *PRX33*, *PRX34*) expressziós aktivitása közötti kapcsolat feltételezése miatt megmértük az *Arabidopsis* Col-0 növények *RbohD*, *PRX33*, *PRX34* génjeinek transzkriptum szintjét fertőzés nélkül és fertőzés hatására (24 hai), a növény 3 különböző levélemeletében (felső, középső és alsó), mely 3 különböző élettani állapotnak felelnek meg. Eredményeinket a **14. Ábrán** összegeztük.



Relatív transzkriptum szint Col-0 Arabidopsis növényekben, fertőzés után 24 órával.

14. Ábra. Transzkriptum szintek a vad típusú *Arabidopsis* különböző korú leveleiben, mock inokulált és fertőzött körülmények között. A levélemeletek közötti statisztikailag szignifikáns különbséget Tukey posthoc teszttel mutattuk ki ($p < 0,05$).

Mind a három általunk vizsgált gén alapexpressziója, tehát fertőzés nélkül, az öregedő levelekben volt a legmagasabb, a legfiatalabb levelekben pedig a legalacsonyabb. Fertőzés hatására viszont a három levélemenet közül a középső szintben mértük a legmagasabb génaktivitást az *RBOHD* és *PRX33* gének esetében, a *PRX34*-nél pedig az alsó és középső levélemenetben mért expresszió azonos volt. Ugyanakkor érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy hiába a három levélemenet közül fertőzésre a legfiatalabb levelek relatív génexpressziós szintje a legalacsonyabb, a fertőzetlen növényeken mért alapexpresszióhoz képest viszont ezeknek a fiatal leveleknek nő meg ugrásszerűen a génaktivitása. A két mérés (mock és fertőzött minták) aránya alapján tehát, a fiatalabb és közepes korú levelekben a legaktívabbak az általunk vizsgált gének (15. Ábra).



Mock és fertőzött (24 hai) minták relatív transzkriptum szint aránya

15. Ábra. Fertőzött és MOCK inokulált minták relatív transzkriptum szint aránya a különböző levélemeletekben. A levélemeletek közötti statisztikailag szignifikáns különbséget Tukey posthoc teszttel mutattuk ki ($p < 0,05$).

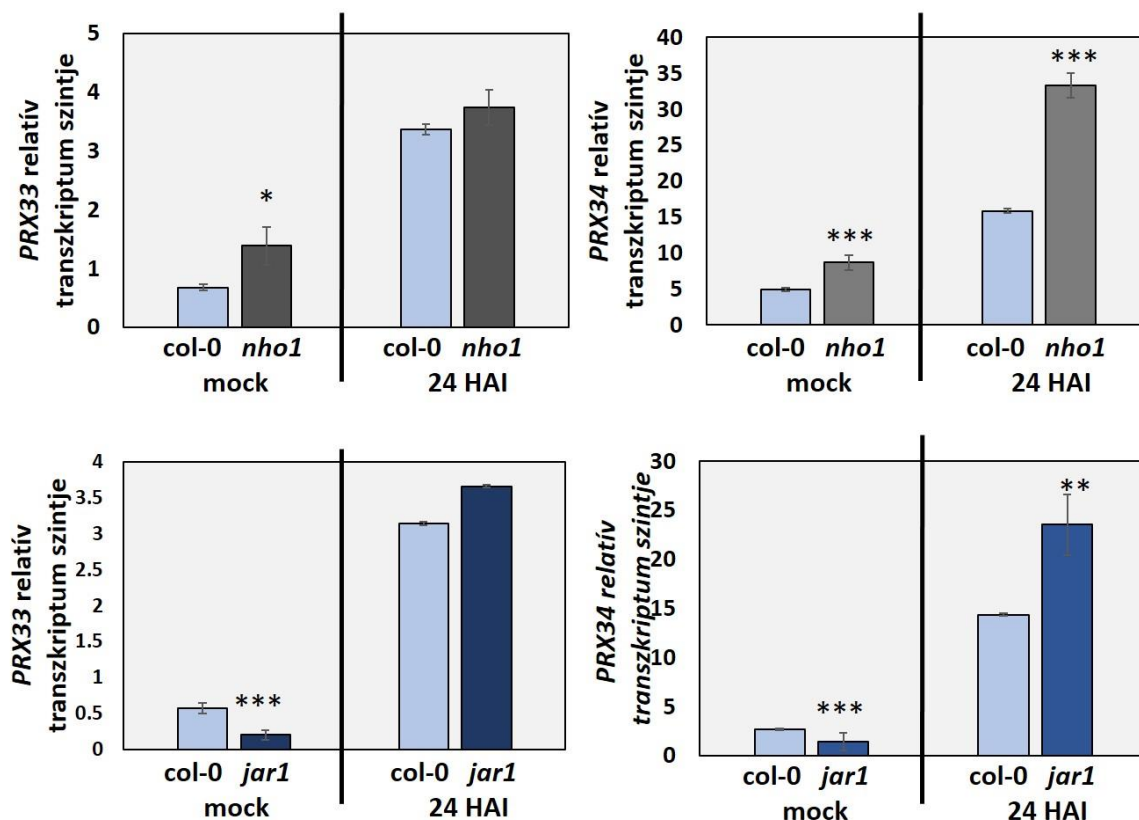
5.10. Kölcsönható gének

Eddigi eredményeink alapján azt már tudjuk, hogy a *PRX33*, *PRX34* és *RbohD* gének aktiválódnak *A. brassicicola* fertőzés hatására és csökkent termelődésük a fogékonyság változásához vezet, így szerepük van a patogenezisben. Ugyanakkor, arról kevés adatunk van, hogy ezeknek a géneknek a működését pontosan mi szabályozza, milyen faktorok kapcsolódnak be a sejtközi járatban lezajló jelátviteli folyamatokba. Ezért kiválasztottunk 10 olyan gént, melyek fontos szabályozó szereppel bírnak a fertőzésre bekövetkező védelmi mechanizmusokban:

NPR1 (*Arabidopsis Nonexpresser of PR genes 1*, At1g64280), *MPK6* (*MAP Kinase 6*, At2g43790) *NIA2* (*Arabidopsis Nitrate Reductase 2*, At1g37130), *EIN2* (*Ethylene Insensitive 2*, At5g03280), *SAG101* (*Senescence-Associated Gene 101*, At5g14930), *JAR1* (*Jasmonate resistant 1*) és *NHO1* (*Nonhost resistance to P.s. phaseolicola 1*, At1g80460), *WRKY40* (At1g80840), *BIK1* (*Botrytis-induced kinase1*, At2g39660), *CPK5* (*Calmodulin-domain protein kinase 5*, At4g35310)

A kiválasztott génekre Salk T-DNS inszerciós mutánsokat rendeltünk és vizsgáltuk bennük a *PRX33* és *PRX34* gének expresszióját. Ehhez előzetesen szelektáltuk őket az *Alternaria brassicicola* gomba fertőzésére adott tünetek alapján és csak azokat vizsgáltuk tovább, melyek tünetei eltértek a vad típusú Columbiától. Ez alapján az *ein2*, *nia2*, *nho1*, *jar1*, *mpk6* és *npr1* mutánsokat választottuk ki (**1. Táblázat**), mivel fogékonyabbak voltak a Columbiánál. A hat

kiválasztott mutánsban a *PRX33* és *PRX34* gének expresszióját mértük és hasonlítottuk össze a vad típusban mért eredményekkel MOCK és 24 órás fertőzéses körülmények között. A megvizsgált mutánsok közül az *nho1* és *jar1*-ben mért génexpressziós szint tért el jelentős mértékben a Columbiától a *PRX33* és *PRX34* gének esetében (**16. Ábra**). Érdekes módon az *RBOHD* gén expressziója egyik mutánsban sem változott jelentős módon, ezért nem is tüntettük fel az ábráinkon.



16. Ábra. *nho1* és *jar1* mutáns *Arabidopsis* növényekben mért relatív génexpresszió fertőzetlen és fertőzött körülmények között. A statisztikailag szignifikáns különbséget Student féle t teszttel mutattuk ki.

(* $\alpha=0,05$ ** $\alpha=0,01$ *** $\alpha=0,001$)

Egy másik megközelítés során olyan géneket választottunk ki, melyek fehérje termékéről megállapították, hogy fizikai kölcsönhatást létesít az RBOHD-vel (Geisler-Lee és mtsai. 2007, Jones és mtsai. 2014): *UTR 3* (UDP-Galactose Transporter 3), *ANN1* (Annexin 1), *TH 7* (Thioredoxin H-type 7), *CAM 4* (Calmodulin 4), *GSTU 19* (Glutathione S-Transferase TAU 19),

ERECTA (Quantitative Resistance to *Plectosphaerella* 1), *DWARF 1* (Cell Elongation Protein), *ARFC 1* (ADP-Ribosylation Factor C1), *MAPR3* (Membrane-Associated Progesterone Binding Protein 3), *At4g37445* és *NHL 3* (*NDR1/HIN1-like* 3) (1. Táblázat).

Majd ezek T-DNS mutáns *Arabidopsis* vonalainál vizsgáltuk az *A.brassicicola* fertőzésre adott tüneteket. Két mutánsnál találtunk jelentős eltérést a vad típussal összehasonlítva, melyeknél a mutáció ugyanazt a lókuszt érintette, az *At2g26330*-at, ami az *ERECTA* (Quantitative Resistance to *Plectosphaerella* 1) kifejeződéséért felelős. A két *erecta* mutáns fertőzésre adott tünete megegyezett az *rboh*d mutánsal (17. Ábra), mivel 7 nappal az *A.brassicicola* fertőzése után nagymértékű sejtelhalás volt megfigyelhető a leveleken.



17. Ábra. Col-0 vad típus, *rboh*d, *erecta* (SALK_04410) és *erecta* (SALK_066455C) mutánsok *A. brassicicola* fertőzésre mutatott tünetei, a fertőzést követő 7. napon.

5.11. Agrobaktérium elektroporációjának optimalizálása

A növények Agrobaktérium általi transzformációja egy általános és széles körben elterjedt technikának számít a molekuláris növénybiológiai kutatásokban. E módszer fontos eleme az agrobaktériumba történő elektroporálás. Ugyanakkor az elektroporálás egyes lépéseire a szakirodalomban többféle variációt találunk (Mattanovich és mtsai. 1989; Mersereau és mtsai.

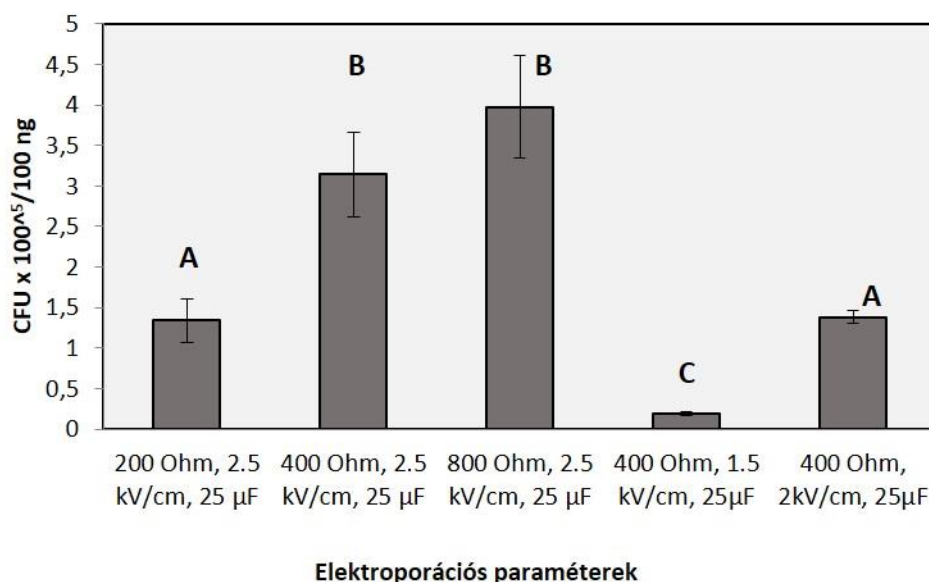
1990; De la Riva és mtsai. 1991; Main és mtsai. 1995; Lin 1995; den Dulk-Ras és mtsai. 1995; McCormac és mtsai. 1998; Hitzeroth és mtsai. 2016), melyeknek fontossága vagy szükségessége nem minden esetben tisztázott. Emiatt kidolgoztunk egy módszert, melyben a korábbi protokollokhoz képest jelentősen lecsökkentettük az elektroporálás idejét, de az egyszerűség és rövideg ellenére hatékonyan és megbízhatóan végezhető. Mindezeknek köszönhetően az elektroporálás valóban egy rutin eljárássá tehető.

5.11.1. Baktériumszuszpenzió mosásának hatása a transzformációra

A táptalaj felszínéről lemosva a baktériumokat, steril 10 %-os glicerinnel tisztítottuk azokat, hogy eltávolítsuk a törmelékektől és az egyéb ionoktól. Ez a tisztítási vagy mosási lépés centrifugálásból és a baktérium pellet felszuszpendálásából állt, 10 %-os steril glicerinben. A transzformációs hatékonyságát összehasonlítottuk a mosás nélkül elektroporált mintákat az egyszer és a kétszer átmosott minták hatékonyságával. A mosási lépés kihagyásával az elektroporálás során sokszor túl nagy feszültség alakult ki, aminek köszönhetően a minták szétdurrantak. Az egyszeri és kétszeri mosás már biztonságosnak bizonyult, azonban különbséget nem tapasztaltunk közöttük a kinőtt telepek tekintetében.

5.11.2. Elektroporációs paraméterek beállítása

Különböző elektroporációs paraméterek kipróbálásával megállapítottuk a transzformációs hatékonyság szempontjából a legjobb beállítási módot. Megvizsgáltunk három különböző feszültséget (1.5, 2, 2.5 kV/cm) és három különböző ellenállást (200, 400, 800 Ohm) 25 μ F mellett, mely állandó volt. Eredményeink azt mutatják, hogy az ellenállás növelésével nő a transzformáns sejtek száma, ugyanakkor 400 Ohm fölött már nem lényeges az emelkedés. A 2 kV/cm feszültség is javítja a hatékonyságot az 1.5 kV/cm-hez képest, viszont e fölött már nem nő statisztikailag szignifikánsan a hatékonyság (**18. Ábra**).



18. Ábra. Különböző elektroporációs paraméterekkel végzett elektroporáció hatása a transzformációs hatékonyságra. A statisztikailag szignifikáns különbséget LSD posthoc teszttel mutattuk ki. ($p < 0,05$)

5.11.3. Többszörös elektroporálás

Mahmood és mtsai. (2008) szerint a többszörös elektroporálás javítja a transzformáció hatékonyságát LBA4404 és EHA101 baktériumtörzsek esetében. Az egymás után ötször elvégzett elektroporáláskor a hatékonyság szinte lineárisan növekszik. Kísérleteink során mi MOG301 baktériumtörzsön vizsgáltuk a kétszeri valamint háromszori elektroporálást. Eredményeink ugyanakkor, ellentétben Mahmood munkájával, arra utalnak, hogy a többszöri elektroporáció nem növeli statisztikailag szignifikáns módon a transzformált sejtek számát (**4. Táblázat**).

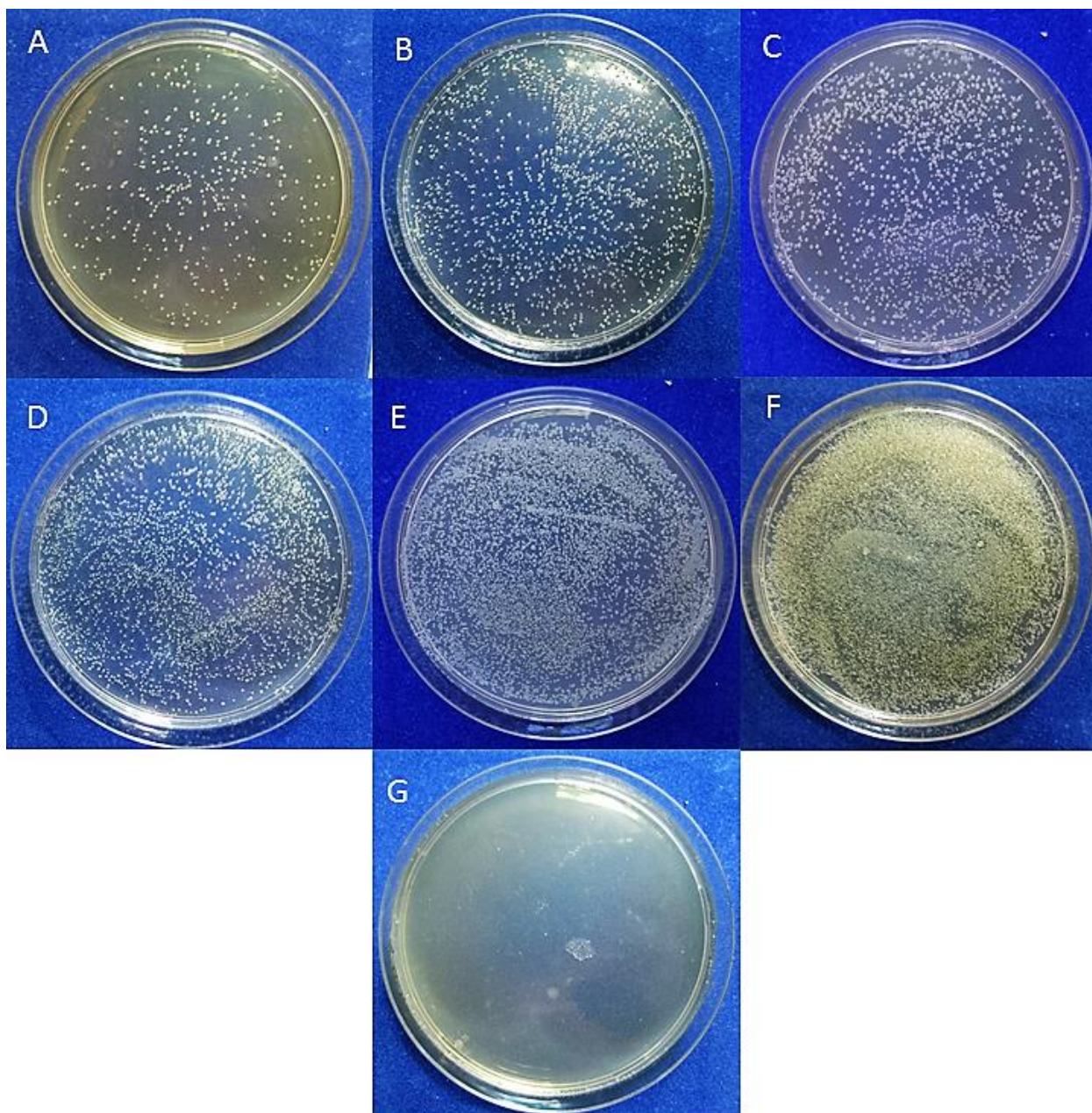
4. Táblázat. Többszöri elektroporáció hatása a transzformált sejtek számára.

Elektroporálások száma	CFU*10 ⁵ /μg plazmid DNS
1x	6.01 ± 1.84 ^a
2x	7.9 ± 1.89 ^a
3x	5.25 ± 1.23 ^a

A táblázatban feltüntetett eredmények 3 mérés átlagát mutatják standard hibával ($\pm$ SE). Egy mérés alkalmával 3 technikai ismétlést végeztünk. A statisztikai analízist one-way ANOVA és Tukey posthock teszttel készítettük. ($p < 0,05$)

5.11.4. Alacsony koncentrációjú plazmid transzformálhatósága

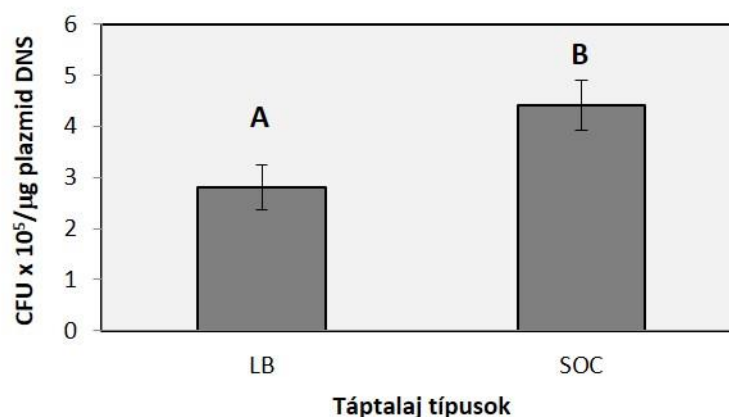
A legalacsonyabb, még transzformálható plazmidmennyiség meghatározásához 1, 5, 10, 25, 75 és 100 ng plazmidot elektroporáltunk Agrobaktériumba. A koncentráció csökkentésével természetesen a transzformált sejtek száma is csökkent (**19. Ábra**). Ugyanakkor a legalacsonyabb mennyiséggel, 1 ng plazmid DNS hozzáadásával is sikeresen működött a transzformáció, átlagosan $3,6 \times 10^3$ CFU /μg DNS mennyiségű transzformált sejtet eredményezett.



19. Ábra. Elektroporálás szempontjából megfelelő plazmid mennyiség meghatározása. A betranszformált plazmid mennyiségek: 1 ng (A), 10ng (B), 25ng (C), 50 ng (D), 75 ng (E), 100 ng (F), negatív kontrol (G).

5.11.5. Inkubációkor használt SOC és LB táptalaj összehasonlítása

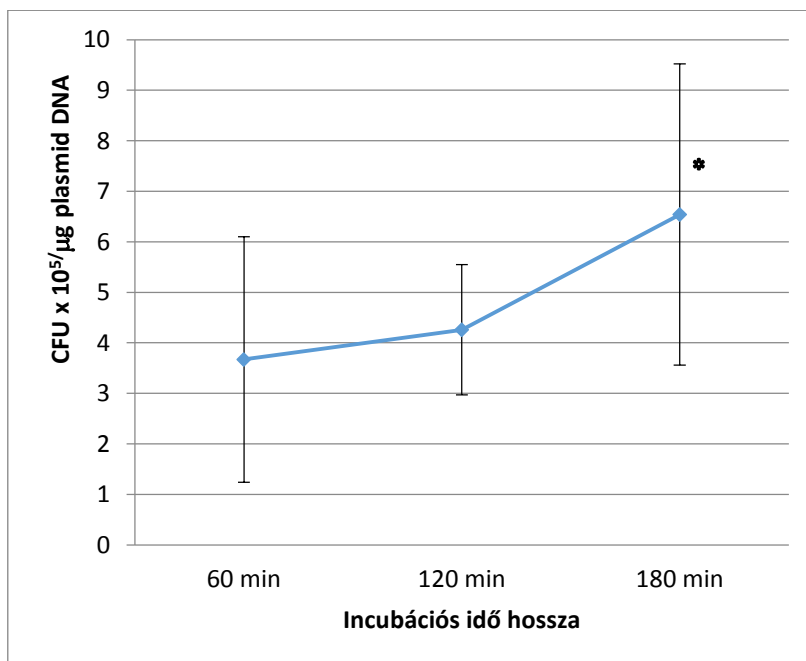
Az elektroporáció befejeztével a baktérium szuszpenziót folyékony táptalajban inkubáltuk. Kétféle táptalaj, SOC és LB, hatását vizsgáltuk a transzformációs hatékonyság növelése céljából. Eredményeink azt mutatják, hogy a SOC táptalaj összetétele megfelelőbb a baktériumok növekedéséhez elektroporáció után, mivel az LB táptalajban inkubált szuszpenzió szétszélesztése után kevesebb transzformált sejtet tudtunk számolni (**20. Ábra**).



20. Ábra. LB és SOC folyékony táptalaj hatása a transzformációs hatékonyságra. A statisztikailag szignifikáns különbséget Student féle t teszttel mutattuk ki. ($p < 0,05$)

5.11.6. Inkubációs idő hosszának hatása a hatékonyságra

Az elektroporációs protokoll rövidítése és egyszerűsítése céljából különböző hosszú ideig inkubáltuk az elektroporált baktérium szuszpenziót folyékony SOC táptalajban. 1, 2 és 3 óráig való inkubálást hasonlítottunk össze (**21. Ábra**). Az inkubálás hosszának növelésével növekedett a transzformált sejtek száma, ugyanakkor már egy rövidebb, 1 órás inkubálással is kellő mennyiségű transzformált sejt keletkezett, mely elegendő lehet a rutinszerű transzformálási munkákhoz.



21. Ábra. Inkubációs idő hatása a transzformációs hatékonyságra. A statisztikailag szignifikáns különbséget Tukey posthoc teszttel mutattuk ki. (* $\alpha=0,05$)

5.11.7. Különböző agrobaktérium törzsek transzformálhatósága

Az általunk optimalizált transzformációs metodikát végrehajtottuk még másik két agrobaktérium törzsön, az EHA 105 és LBA 4404 agrobaktérium törzseken (Hood és mtsai 1993, Hellens és mtsai 2000), majd a kapott elektroporált sejtek száma alapján összehasonlítottuk az elektroporálhatóságukat a MOG301-es baktérium törzsével. Az eredményeket a **5. Táblázatban** összegeztük.

5. Táblázat. Különböző agrobaktérium törzsek elektroporálhatósága.

<i>Agrobactérium</i> törzsek	CFU*10 ⁵ /μg plazmid DNS
MOG301	2.7 ± 0.29 ^a
EHA 105	1.25 ± 0.15 ^b
LBA 4404	0.044 ± 0.011 ^c

A táblázatban feltüntetett értékek két biológiai ismétlés átlagát mutatják standard hibával ($\pm$ SE) és az eredmények közötti szignifikancia értékeket. A statisztikailag szignifikáns különbséget one way ANOVA és Tukey posthoc teszttel mutattuk ki. ($p < 0,05$)

5.11.8. Ligátum direkt transzformálhatóságának hatékonysága

Az általános klónozási munkák során az összeligált plazmidot először *E.coli* baktériumba szokás transzformálni, majd az ebből kitisztított és felszaporodott plazmidot kell agrobaktériumba elektroporálni. A köztes, *E.coli* baktériumba való transzformálásra a plazmid koncentráció növelése miatt van szükség. Ez a lépés viszont, egy kellőképpen hatékony elektroporálással kiváltható, hiszen a korábbi eredményeinkből kiindulva, már igen kis mennyiségű (1 ng) plazmid DNS-sel is elegendő transzformált sejtet kaphatunk. Ezért az általunk optimalizált elektroporációs protokolt használtuk direkt transzformációra, kihagyva az *E.coli*-ba történő transzformálást. Egy μl ligátumot adtunk 80 μl *A. tumefaciens* MOG303 elektrokompetens sejtszuszpenzióhoz és ezt elektroporáltuk a az optimalizált metodika szerint. Az inkubáció után az egész szuszpenziót (1ml) szélesztettük szelektív LB táptalajra, ahonnan 2 nap elteltével 200-400 kolóniát számoltunk, tehát a direkt transzformációval gyorsan és hatékonyan lehet klónozási munkákat végezni.

5.11.9. Optimalizált elektroporációs eljárás lépései:

- *Agrobacterium tumefaciens* MOG301-es törzset szélesztettünk rifampicint (50 $\mu\text{g/ml}$) tartalmazó szilárd LB táptalajra és egész éjszakán át inkubáltuk 27°C-on.
- A másnapra felnőtt baktérium pázsitot 4 ml 10%-os steril glicerinnel lemostuk és a szuszpenziót 2 ml-es Eppendorf csövekbe pipettáztuk.
- A csöveket 14000 rpm-en, 4 °C-on 1 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk, a baktérium pelletet pedig feloldottuk 1 ml 10%-os steril gliceriben.
- A centrifugálást megismételtük, eltávolítottuk a felülúszót, majd annyi gliceriben oldottuk fel a baktérium pelletet, hogy az egy petricsészéről lemosott baktérium és glicerín végtérfogata 400 μl legyen. A centrifugálás után a csöveket végig jégben tartottuk.
- Ezután 80 μl baktérium szuszpenzióhoz 100 ng plazmidot adtunk és az elegyet elektroporáló küvettába pipettáztuk át.
- A következő elektroporációs beállításokkal elvégeztük az elektroporálást: 2.5 kV, 25 μF és 400 Ohm.
- Az elektroporált baktérium szuszpenziót 1 ml steril, folyékony SOC táptalajban oldottuk fel és 1 órát inkubáltuk 27°C-on rázatva.

- Az inkubációs idő letelte után 100 µl szuszpenziót szélesztettünk kanamicint (30 µg/ml) és rifampicint (50 µg/ml) tartalmazó LB táptalajra, majd 2 napon át inkubáltuk 27°C-on, a telepek megjelenéséig.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kimutattuk azt, hogy a *PRX33* és *PRX34* sejtfal-peroxidázokat kódoló gének *A. brassicicola* nekrotróf gomba fertőzésre aktiválódnak *Arabidopsis thaliana* növényben és a fertőzés után 24 óra múlva érik el expressziójuk csúcsát.
2. Csökkent *prx33/prx34* génműködésnek köszönhetően a növények ellenállóbbá válnak *A. brassicicola* gombafertőzéssel szemben. Funkciójukat tekintve fokozzák a növény fogékonyságát *A. brassicicola* fertőzésével szemben.
3. *A. brassicicola* gomba támadása során az alacsony *prx33* és *prx34* transzkriptum szintet produkáló növényekben kevesebb hidrogén-peroxid képződik, mint a vad típusú fertőzött növényekben.
4. A *PRX33/PRX34* sejtfal-peroxidázok és az *RBOHD* NADPH-oxidáz esetében kimutattuk, hogy az *Arabidopsis* levelek, fejlődési állapotuknak megfelelően, eltérő *PRX33/PRX34* és *RBOHD* génaktivitást mutatnak fertőzetlen körülmények között és *A. brassicicola* fertőzés hatására.
5. A *JAR1* és az *NHO1* géneknek szabályozó szerepet tulajdonítunk a *PRX33* és *PRX34* sejtfal-peroxidázok működésében, az *ERECTA* gén által kódolt fehérjét pedig az *RBOHD* NADPH-oxidáz működését befolyásoló kölcsönható partnerként írtuk le.
6. *Agrobacterium tumefaciens* sejtek transzformációjára kidolgoztunk egy optimalizált elektroporációs eljárást.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Az extracelluláris ROS termelésében szerepet játszó enzimek tanulmányozására leginkább olyan példákat találunk a szakirodalomban, ahol ezeket az enzimeket egymástól függetlenül, különböző rendszerekben vizsgálják. Ahol pedig a NADPH-oxidázokat, a sejtfa-peroxidázokat és a poliamin-oxidázokat mégis együttesen tanulmányozzák, ott enzim inhibitorokkal befolyásolják azok működését (O'Brien és mtsai, 2012; Dmochowska-Boguta és mtsai, 2013; Roach és mtsai, 2015). Az előzőekkel ellentétben dolgozatomban az extracelluláris ROS felhalmozódásban szerepet játszó főbb enzimsziszteket, mint a NADPH-oxidázok, a sejtfa-peroxidázok és poliamin-oxidázok, együttesen vizsgáltuk, végig az *Alternaria brassicicola*-*Arabidopsis thaliana* kapcsolatában. Munkánkat nehezítette, hogy nincs megbízható knock-out *prx33/prx34 Arabidopsis* genotípus, ezért adaptáltuk a T-DNS inszerciós mutáns növényektől független, Vírus-indukálta géncsentesítés módszerét, mely lehetővé tette, hogy egyszerre vizsgáljuk a két sejtfa-peroxidáz szerepét. A különböző knock-out, knock-down inszerciós mutáns és géncsentesített növényeken végzett kísérleteink eredménye így ténylegesen a ROS termelő enzimek szerepét jelzik a patogének által kiváltott oxidatív robbanásban.

Vad típusú *Arabidopsis* növényekben az *A. brassicicola* fertőzésre kialakuló génindukciók és transzkriptum szintek a *PRX33*, *PRX34* és a *PAO* gének (*PAOI*, 2, 3, 4 és 5) tanulmányozásakor azt mutatták, hogy a két sejtfa-peroxidáz fontos szerepet játszik ebben a gomba-növény kölcsönhatásban és az *Arabidopsis* növény *A. brassicicola* fertőzésre adott válaszreakciójában (9-10. Ábra). A *PRX33* és *PRX34* gének transzkriptum szintje a fertőzés után 24 órával éri el a csúcsot, mely megegyezik az *RbohD* gén *A. brassicicola* gomba fertőzésre adott transzkripciós válaszával (Pogány és mtsai 2009).

Ellentétben az *RBOHD*-vel kapcsolatos korábbi eredményekkel, ahol az *RBOHD* génműködésben sérült *Arabidopsis* növényeken az *Alternaria brassicicola* fertőzés nagyfokú szöveti nekrozist és sejtelhalást eredményez (Pogány és mtsai 2009), a csökkent *PRX33/PRX34* génaktivitásnak köszönhetően a növényeken tapasztalt tünetek erőssége és mennyisége is csökken (11. Ábra). A gyenge tünetek mellett a gomba kolonizációja is visszaszorul (13. Ábra), hasonlóan az *rbohD* inszerciós mutáns esetében mért gomba biomassza szinttel, ahol az erős nekrotikus tünetek mellett a gomba kolonizációja gátlódott. Kérdéses azonban, hogy vajon a csökkent nekrotikus tünetek a *prx33/prx34* alultermelő növényeknél a visszaszorult gomba növekedéssel függnek össze, vagy azzal, hogy a sejtfa-peroxidázok hiányában a sejtfa nem indukálódik. Feltehetően vad típusú növényekben a *PRX33/PRX34* gének inkább hozzájárulnak a

nekrotikus tünetek kialakulásához, valamint a gomba sikeres kolonizációjához, mint gátolnák azokat.

A *PRX33/PRX34* gének működése nagyban hozzájárul a növényi sejtközi járatban fertőzés hatására felhalmozódó ROS mennyiségének robbanásszerű megugrásához, mivel ezen gének aktivitásának csökkenése esetében kevesebb a növényekben mért hidrogén-peroxidnak a mennyisége, és az azt termelő sejtek száma is redukált (**12. Ábra**).

Míg az *RBOHD* gén gátlása *Alternaria* gombával fertőzött *Arabidopsis* növényeken nagyfokú sejtelhalást eredményez, a gomba növekedésére negatívan hat. A *PRX33/PRX34* gének alulszabályozásával gátolt extracelluláris oxidatív robbanás azonban a nekrotikus léziók csökkenését és a gomba növekedésének visszaszorulását vonja magával (**11. Ábra**). Eredményeink azt mutatják, hogy az általunk vizsgált két sejtfal-peroxidáz működése hozzájárul az *Alternaria brassicicola* nekrotróf gomba által indukált extracelluláris oxidatív robbanás kialakulásához *Arabidopsis thaliana* növényben, ezáltal a gomba kolonizációjához is egyaránt. Ez a megállapítás felveti azt a kérdést, hogy vajon a *prx33/prx34*-et alulttermelő növényekben a fertőzés során visszaszorult nekrotikus tüneteket a sejthalált indukáló ágensek működésében történt gátlás okozza, vagy a gomba növekedésében történt visszaszorulás?

A levelek kora és a ROS termelő enzimeket kódoló gének transzkripciós szintje között összefüggést állapíthatunk meg, mint ahogy a szenescens levelekben a magas ROS szint alacsony antioxidáns kapacitással is párosul (Barna és mtsai 2012). Az öregedő leveleknél a fiatal levelekhez képest megnövekedett alap transzkriptum szint tapasztalható az *RbohD*, *PRX33* és *PRX34* gének esetében, míg nekrotróf gombatámadást követően ezek a levelek nem képesek olyan hirtelen mértékben növelni a transzkripciós szintet, mint a nem szenescens levelek. A fiatalabb levelek ugyanakkor nem expresszálják ezeket a géntermékeket folyamatosan nagy mennyiségben, viszont fertőzésre erős transzkriptum szint növeléssel reagálnak (**14. Ábra**). A szenescencia és a transzkriptum szintek összefüggésbe hozhatóak a gomba fertőzési képességével is, miszerint a nekrotróf *Alternaria brassicicola* gomba az idősebb, öregedő leveleket képes kolonizálni, ahol a ROS termelő enzimeket kódoló gének alap transzkriptum szintje magas.

A *JAR1* és *NHO1* gének vizsgálata alapján arra következtetünk, hogy ezen géneknek szabályozó szerepük lehet a *PRX33/PRX34* jelátviteli utakban, mivel a *JAR1* és *NHO1* alulműködésének hatására fertőzetlen körülmények között és gombafertőzés hatására is megváltoztatták a *PRX33* és *PRX34* gének expresszióját (**16. Ábra**). A *JAR1* gén alulműködése a *PRX33* és *PRX34*

alapexpressziójára gátló hatással van, viszont fertőzés hatására feltételezhetően felszabadul a gátló hatás alól és a kontrollhoz képest magasabb transzkriptum szint alakul ki. A *JAR1* (JASMONATE RESISTANCE 1) a jázmonsav amido-szintetázt kódolja, mely katalizálja a biológiailag aktív jasmonyl-isoleucine (JA-Ile) konjugátum kialakulását. *Arabidopsis thaliana* növényben ez az aminosav szükséges a jázmonsavhoz kapcsolt válaszreakciókhoz, ezáltal a patogénekre adott immunválaszokhoz és az abiotikus stresszre indukálódó reakciókhoz (Staswick és Tiriyaki 2004; Staswick és mtsai, 2002; Rao és mtsai 2000). A *JAR1* génnek szerepe van az oxidatív robbanás szabályozásában, *jar1* mutáns *Arabidopsis* esetében a bakteriális MAMP elicitorral, flagellinnel előidézett oxidatív robbanás erősödik (Yi és mtsai 2014).

Nho1 T-DNS mutáns esetében a *PRX33* és *PRX34* gének alapexpressziója és *A. brassicicola* fertőzés utáni transzkriptum szintje is növekszik, feltételezhetően az *NHO1* szabályozó szerepe miatt. Az *NHO1* (NONHOST RESISTANCE TO P. S. PHASEOLICOLA 1) fehérje egy glicerol kináz, mely átalakítja a glicerolt glicerol-3-foszfáttá. *Arabidopsis* növényben az *NHO1* expressziója indukálódik a nonhost *Pseudomonas* baktérium törzsek hatására és működése rezisztenciát okoz a nonhost és avirulens *Pseudomonas* törzsek, valamint a nekrotróf *Botrytis cinerea* patogén ellen (Lu és mtsai, 2001; Kang és mtsai, 2003; Li és mtsai, 2005). Az *NHO1* valószínűleg a növényi védelmi mechanizmusok egyik fontos résztvevője *Arabidopsis* növényben, ugyanakkor a pontos funkciója a védekezési válaszreakciókban tisztázásra szorul (Lu és mtsai, 2010; Maeda és mtsai, 2010).

Az *ERECTA* (QUANTITATIVE RESISTANCE TO PLECTOSPHAERELLA 1, AGI locus code: *At2g26330*) fehérje a protein kinázok szupercsaládjába tartozik, azon belül pedig a Ser/Thr protein kinázok családjába, ahova olyan fehérjéket sorolnak még, melyeket kapcsolatba hoztak a fejlődéssel, a kórokozók elleni védekezéssel és a fitohormonok érzékelésével (Torii és mtsai 1996, Sánchez és mtsai 2009). Az *ERECTA* fehérjéről megállapították, hogy részt vesz a patogének elleni immunválaszban, mivel az *erecta* mutáns *Arabidopsis* növények érzékenyek bizonyulnak számos kórokozóval szemben (*Magnaporthe oryzae*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Verticillium longisporum*) (Llorente és mtsai, 2005; Haffner és mtsai, 2014; Takahashi és mtsai, 2016). *Arabidopsis* gyökerében kimutatták, hogy az *ERECTA* részese annak a szignál útvonalnak, mely felelős a ROS érzékelésében (Cui és mtsai, 2014). Az *RBOHD* és *ERECTA* fehérjék között pedig fizikai kölcsönhatást találtak (Geisler-Lee és mtsai. 2007, Jones és mtsai. 2014). Saját eredményeink azt mutatják, hogy az *ERECTA* az *RBOHD*-hez hasonlóan feltehetően szükséges az *A. brassicicola* által okozott nekrotikus elhalások kialakulásának

meggátolásához, mivel *erecta* mutáns *Arabidopsis* növényeken fertőzés hatására erős szöveti nekrozis volt megfigyelhető a vad típussal összehasonlítva (**17. Ábra**).

Agrobacterium tumefaciens elektroporálásának optimalizálása

Az *Agrobacterium tumefaciens* transzformálása elektroporációval a növénybiotechnológiai módszerek egyik alappillére. Az ilyen rutin eljárásként használt elektroporációs módszernél a maximális hatékonyság mellett a gyorsaság és az egyszerűség is alapvető kritérium. Az általunk leírt optimalizált metodikával a célunk a módszer leegyszerűsítése és felgyorsítása volt a hatékonyság romlása nélkül. Így összesen az egész folyamat, az elektrokompetens sejt elkészítésétől kezdve az elektroporált sejtek kiszélesztéséig, maximum 90 percet vesz igénybe. Összehasonlítva a szakirodalomban használt metodikákkal (De la Riva és mtsai 1991; Dulk-Ras és mtsai 1995), ez az idő jelentősen rövidebb.

Elektrokompetens sejt preparálásához kiindulásként szilárd táptalajra leoltott baktériumot használtunk folyékony sejt kultúra helyett, melynek nagy előnye a könnyebb kezelhetőség és egyszerűség. A protokoll optimalizált lépései mellett nincs szükség a kiindulási sejtszám mérésére és beállítására, mert a szilárd táptalajról lemosott sejtszuszpenzió mindig megfelelő mennyiségű sejtet biztosít.

Számos, agrobaktérium elektroporálására használt protokollban (Dulk-Ras és mtsai 1995; McCormac és mtsai 1998) többszöri tisztítást javasolnak az elektrokompetens sejt elkészítéséhez, ami tapasztalataink szerint már több a szükségesnél. Az általunk kidolgozott metodikában lerövidítettük a mosások számát arra a minimális számra, amennyivel megfelelő hatékonysággal működik az elektroporálás. Ezzel a lépéssel jelentősen felgyorsítottuk a kompetens sejt készítésének folyamatát.

A különböző transzformációs paraméterek kipróbálása mellett az elektroporációt követő megfelelő tápközeg kiválasztásával a transzformációs hatékonyságot $2-5 \times 10^5$ CFU/ μ g plazmid DNS számra tudtuk beállítani (**20. Ábra**), ami ugyan alacsonyabb más protokollokhoz képest (Mersereau és mtsai 1990; Dulk-Ras és mtsai 1995), viszont megbízhatóan kellő számú transzformáns baktérium sejtet biztosít a mindennapi rutin használathoz.

Az optimalizált protokoll megbízhatóságát jelzi az, hogy még nagyon alacsony koncentrációjú, 1 ng/ μ l DNS-t is következetesen lehet vele elektroporálni *A. tumefaciens* baktériumba.

A direkt transzformáció beállításával pedig lehetővé tettük a génebézési eljárások során köztes lépésként alkalmazott *E. coli* baktériumba történő transzformációnak az elhagyását, ezáltal is egyszerűbbé és gyorsabbá téve a módszert.

Az általunk kidolgozott protokoll egy olyan általános elektroporálási módszer, mely többféle *Agrobacterium* törzs elektroporálását is lehetővé teszi, leghatékonyabban pedig a MOG 301-es törzssel működik (**5. Táblázat**).

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A PRX33 és a PRX34 sejtfal-peroxidázok szerepére vonatkozó ismereteink a patogének által indukált oxidatív robbanásban még nem elég alaposak annak ellenére, hogy számos tudományos eredmény jelzi a fontosságukat. Munkánkban e két III. típusú peroxidázt, valamint a NADPH-oxidáz RBOHD-t vizsgáltuk egyazon rendszerben, *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* kapcsolatában.

Mikroszkópos eredményeinkkel szemléltettük, hogy *Arabidopsis* növényben PRX33 és PRX34 gátolt működése esetében megváltozik a ROS termelődése, kevesebb hidrogén-peroxid keletkezik *Alternaria brassicicola* gomba fertőzésére. A gomba fertőzése során a növényi sejthalál kialakulását a PRX33 és PRX34 sejtfal-peroxidázok és az általuk termelt ROS fokozzák (szemben az RBOHD NADPH-oxidázzal, mely a növényi sejtek nekrozisát korlátozza). Az *A. brassicicola* nekrotróf gomba általi kolonizációt viszont mind a PRX33/PRX34, mind az RBOHD egyaránt elősegíti.

A PRX33 és PRX34 gének működésében szerepet játszik a levelek kora is. Különbséget állapítottunk meg az extracelluláris ROS termelődéséért felelős gének működésében a levelek korának megfelelően, amiből azt a következtetést vonhattuk le, hogy ezeknek a géneknek a működése nem állandó, idővel változik, befolyásolva a gomba terjedési képességét is.

Több, a növényi védekezésben jelentős gén közül sikerült kiválasztanunk a *JAR1*-et, az *NHO1*-et és az *ERECTA* gént, melyek feltehetően hatással vannak a PRX33, PRX34 és az RBOHD gének működésére.

Kutatómunkánk során kidolgoztunk egy olyan elektroporációs protokolt is, mellyel célunk a transzformációs laboratóriumi munkák hatékonyabbá és gyorsabbá tétele.

9. SUMMARY

Our knowledge about the role of PRX33 and PRX34 cell wall peroxidases are scarce, though many studies indicate their importance. In our work we examined the two class III peroxidases PRX33 and PRX34 and NADPH oxidase RBOHD in the same *Arabidopsis-Alternaria* pathosystem.

We presented microscopic images on the altered pattern of ROS accumulation which showed less hydrogen peroxide accumulation in *Arabidopsis* plants following inoculation with *A. brassicicola* when *PRX33* and *PRX34* transcript levels were suppressed in *Arabidopsis* plants following inoculation with *A. brassicicola*. In contrast with the ROS-producer NADPH oxidase RBOHD, which regulates the spread of cell death in pathogen-infected *Arabidopsis* tissues and the lack of functional *RBOHD* gene triggers enhanced necrotic lesions, the diminished expression of *PRX33* and *PRX34* cell wall peroxidases generate resistance against *Alternaria*. Active *PRX33* and *PRX34* cell wall peroxidases contribute to the accumulation of hydrogen peroxide and promote the colonization process of the necrotrophic fungus *A. brassicicola*. Fungal growth, on the other hand, is similarly reduced both by the lack of RBOHD and the two apoplastic peroxidases. Senescence plays an important role in the activity of *PRX33* and *PRX34* genes. Different activity was found in the function of the genes responsible for the production of extracellular ROS according to the age of the leaves. It is assumed that the activity of these genes depends on the age of the leaves and possibly changes the infection ability of fungal pathogens. From several pathogenesis related genes *JAR1*, *NHO1* and *ERECTA* were selected indicating their involvement in the *PRX33*, *PRX34* and *RBOHD* signaling networks.

Whithin the frames of this research we also developed an electroporation protocol which makes the transformation of *Agrobacterium tumefaciens* cells more efficient and faster.

10. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

1. Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, Ishihama N, Yoshioka M, Katou Y, Yaeno T, Shirasu K and Yoshioka H (2015): WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*. 27: 2645–2663.
2. Aguirre J, Ríos-Momberg M, Hewitt D and Hansberg W (2005): Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*. 13: 111–118.
3. Akira S, Uematsu S and Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124: 783-801.
4. Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408: 796–815.
5. Arora A, Sairam RK and Srivastava CG (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. 82: 1227-1238.
6. Azpiroz-Leehan R and Feldmann KA. (1997): T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends in Genetics*. 13: 152-156.
7. Bach M, Schnitzler JP and Seitz HU (1993): Elicitor-induced changes in Ca^{++} influx, K^{+} efflux, and 4-hydroxybenzoic acid synthesis in protoplast of *Daucus carota* L. *Plant Physiology*. 103: 407–412.
8. Baker CJ and Orlandi EW (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*. 33: 299–321.
9. Balazs, E, Gaborjanyi R, Toth A and Kiraly Z (1969): Ethylene production in Xanthi tobacco after systemic and local virus infections. *Acta phytopathologica*.
10. Barna B, Fodor J, Harrach BD, Pogány M and Király Z (2012): The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiology Biochemistry*. 59: 37-43.
11. Barna B, Fodor J, Pogány M and Király Z (2003): Role of reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance. *Pest Management Science*. 59: 459-464.
12. Bent A F, Innes RW, Ecker JR and Staskawicz BJ (1992): Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Molecular Plant–Microbe Interaction*. 5: 372–378.

13. Berglund GI, Carlsson GH, Smith AT, Szoke H, Henriksen A and Hajdu J (2002): The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*. 417: 463–467.
14. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM and Hannon GJ (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409: 363–366.
15. Bhattacharjee S (2005): Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant. *Current Science*. 89:1113–1121.
16. Bindschedler L, Dewdney J, Blee K, Stone J, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies D, Ausubel FM and Bolwell GP (2006): Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal*. 47: 851–863.
17. Blee KA, Jupe SC, Richard G, Zimmerlin A, Davies DR and Bolwell GP (2001): Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Molecular Biology*. 47: 607–620.
18. Boller T (1995): Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual review of plant biology*. 46: 189-214.
19. Bozsó Z, Ott PG, Szatmári A, Czalleng G, Varga G, Besenyei E, Sárdi É, Bányai É and Klement Z (2005): Early detection of Bacterium-induced basal resistance in tobacco leaves with diaminobenzidine and dichlorofluorescein diacetate. *Journal of Phytopathology*. 153: 596-607.
20. Braverman SW (1971): Reaction of broccoli and cauliflower introductions to *Alternaria brassicicola*. *Plant Disease Reporter*. 55: 454–457.
21. Broekgaarden C, Caarls L, Vos AI, Pieterse MJC and Van Wees SCM (2015): Ethylene: Traffic controller on hormonal crossroads to defense. *Plant Physiology*. 169: 2371-2379.
22. Brouwer M, Lievens B, Van Hemelrijck W, Van den Ackerveken G, Cammue BPA and Thomma BPHJ (2003): Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiol Letters*. 228: 241-248.
23. Browse J (2009): Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*. 60: 183–205.
24. Burch-Smith TM, Schiff M, Liu Y, and Dinesh-Kumar SP (2006): Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 142: 21–27.

25. Chen LH, Yang SL and Chung KR (2014): Resistance to oxidative stress via regulating siderophore-mediated iron acquisition by the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata* Microbiology. 160: 970–979.
26. Chen Z, Shilva H and Klessig RF (1993) Active oxigene species in the induction of plant systemic acquired resistance by SA. Science. 262: 1883-1886.
27. Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE, and Klee HJ (2000): Response to *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. Plant Physiology. 123:81-92.
28. Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R and Tavladoraki P (2006): Functions of amine oxidases in plant development and defence. Trends in Plant Science. 11:80-88.
29. Cui H, Kong D, Wei P, Hao Y, Torii KU, Lee JS and Li J (2014): SPINDLY, ERECTA, and its ligand STOMAGEN have a role in redox-mediated cortex proliferation in the *Arabidopsis* root. Molecular Plant. 7:1727–1739.
30. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK and Scheible W-R (2005): Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 139: 5–17.
31. Dang HX, Pryor B, Peever T and Lawrence CB (2015): The *Alternaria* genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergenic species. BMC Genomics. 16: 239.
32. Dangl JL and Jones JDG (2001): Plant panthogens and integrated defence responses to infection. Nature. 411: 826-833.
33. Daudi A, Cheng Z, O'Brien J, Mammarella N, Khan S, Ausubel FM and Bolwell GP (2012): The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity. The Plant Cell. 24: 275–287.
34. De la Riva G, Van Montagu M, Inzé D and Dhaese P (1991): High-efficiency transformation of *Agrobacterium tumefaciens* with plasmid DNA by electroporation. Biotechnologia Aplicada. 8: 345-351.
35. De Laat AMM and Van Loon LC (1982): Regulation of ethylene biosynthesis in virus-infected tobacco leaves II. Time course of levels of intermediates and in vivo conversion rates. Plant Physiology. 69: 240–245.
36. Den Dulk-Ras A and Hooykaas PJ (1995): Electroporation of *Agrobacterium tumefaciens*. Methods in Molecular Biology. 55: 63-72.

37. Dmochowska-Boguta M, Nadolska-Orczyk A and Orczyk W (2013): Roles of peroxidases and NADPH oxidases in the oxidative response of wheat (*Triticum aestivum*) to brown rust (*Puccinia triticina*) infection. *Plant Pathology*. 62: 993-1002.
38. Doke N (1983): Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal cell wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiological Plant Pathology*. 23:359-367.
39. Doke N (1997): The oxidative burst: Roles in signal transduction and plant stress. In *Oxidative stress and molecular biology of antioxidative defense*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY, USA. 785-813.
40. Dong X (2004): NPR1, all things considered. *Current Opinion Plant Biology*. 7:547–52.
41. Engin KN (2009): Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Molecular Vision*. 15: 855–860.
42. Enjalbert B, MacCallum DM, Odds FC and Brown AJP (2007): Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. 75: 2143–2151.
43. Feldmann KA (1991): T-DNA insertion mutagenesis in *Arahidopsis*: mutational spectrum. *Plant Journal*. 1:71-82.
44. Felix G, Duran JD, Volko S and Boller T (1999): Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*. 18: 265-276.
45. Fincato P, Moschou NP, Ahou A, Angelini R, Roubelakis-Angelakis AK, Federico E and Tavladoraki P (2012): The members of *Arabidopsis thaliana* PAO gene family exhibit distinct tissue- and organ-specific expression pattern during seedling growth and flower development. *Amino Acids*. 42:831–841.
46. Floerl S, Majcherczyk A, Possienke M, Feussner K, Tappe H, Gatz C, Feussner I, Kües U and Polle A (2012): *Verticillium longisporum* infection affects the leaf apoplastic proteome, metabolome, and cell wall properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7. e31435.
47. Foyer CH and Noctor G (2005): Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses *The Plant Cell*. 17: 1866–1875.
48. Foyer CH and Noctor G (2016). Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect? *Plant Cell Environ*. 39: 951–964.

49. Frederickson Matika DE and Loake GJ (2013): Redox Regulation in Plant Immune Function. *Antioxidant Redox Signaling*. 21: 1373-1388.
50. Gaffney T, Friedrich L, Vernooi B, Negrotto D, and Nye G (1993): Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON*. 261: 754-754.
51. Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H and Ryals J (1993): Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*. 261:754-756.
52. Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman FJ and Dommes J (2002): Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*. 37: 263–285.
53. Geisler-Lee J, O'Toole N, Ammar R, Provart NJ, Millar AH and Geisler M (2007): A predicted interactome for Arabidopsis. *Plant Physiology*. 145: 317-329.
54. Gelvin BS (2003): *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 67: 16–37.
55. Gheysen G, van Montagu M and Zambrysky P (1987): Integration of *Agrobacterium tumefaciens* DNA (T-DNA) involves rearrangements of target plant DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 84: 6169-6173.
56. Glazebrook J (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 205–227.
57. Greenberg JT and Yao N (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interaction. *Cell Microbiology*. 6:201-211.
58. Haffner E, Karlovsky P, Splivallo R, Traczewska A and Diederichsen E (2014): ERECTA, salicylic acid, abscisic acid, and jasmonic acid modulate quantitative disease resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Verticillium longisporum*. *BMC Plant Biology*. 14.1: 85.
59. Hamilton A, Voinnet O, Chappel L and Baulcombe D (2002): Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO Journal*. 21(17): 4671–4679.
60. Han L, Li GJ, Yang KY, Mao G, Wang R, Liu Y and Zhang S (2010): Mitogen activated protein kinase 3 and 6 regulate Botrytis cinerea induced ethylene production in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 64(1): 114-127.
61. Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC and Hodge S (1997): Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark

- transgenic *Arabidopsis* plants brightly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 94 (6): 2122–2127.
62. Hayward A, Padmanabhan M and Kumar DSP (2011): Virus-Induced Gene Silencing in *Nicotiana benthamiana* and Other plant Species. Plant Reverse Genetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. vol.678.
 63. Hellens R, Mullineaux P and Klee H (2000): Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends in Plant Sciences. 5:446-451.
 64. Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C and Voinnet O (2003): Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. EMBO Journal. 22(17):4523-33.
 65. Hitzeroth II and van Zyl AR (2016): Transient expression of viral proteins in plants using *Agrobacterium tumefaciens*. Methods in Molecular Biology. 1404: 581-595.
 66. Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ and Schilperoort RA (1983): A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature. 303: 179–180.
 67. Hoffman T, Schmidt JS, Zheng X and Bent AF (1999): Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. Plant physiology. 119(3): 935-950.
 68. Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M and Schel IJ (1978): Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Molecular Genetics and Genomics. 163: 181-187.
 69. Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS and Hoekema A (1993): New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Research 2: 208-218.
 70. Huang S, Van Aken O, Schwarzländer M, Belt K and Millar AH (2016): The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress responses in plants. Plant Physiol. 171: 1551–1559.
 71. Humpherson-Jones FM (1989): Survival of *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola* on crop debris of oilseed rape and cabbage. Annals of Applied Biology. 115: 45–50.
 72. Jones DGJ and Dangl LJ (2006): The plant immune system. Nature. 444.7117:323
 73. Jones MA, Xuan Y, Xu M, Wang S-R, Ho H-C, Lalonde S, You HC, Sardi IM, Parsa AS, Smith-Valley E, Su T, Frazer AK, Pilot G, Pratelli R, Grossmann G, Acsaraya RB, Hu C-H, Engineer C, Villers F, Ju C, Takeda K, Su Z, Dong Q, Assmann MS, Chen J, Kwak

- MJ, Schroeder IJ, Albert R, Rhee YS and Frommer BF (2014): Border control—A membrane-linked interactome of *Arabidopsis*. *Science* 344: 711-716.
74. Joubert A, Bataille-Simoneau N, Champion C, Guillemette T, Hudhomme P, Iacomini Vasilescu B, Leroy T, Pochon S, Poupard P and Simoneau P (2011): Cell wall integrity and high osmolarity glycerol pathways are required for adaptation of *Alternaria brassicicola* to cell wall stress caused by brassicaceous indolic phytoalexins. *Cell Microbiology*. 13: 62–80.
 75. Kadota Y, Shirasu K, and Zipfel C (2015): Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant Cell Physiology*. 56: 1472–1480.
 76. Kang L, Li J, Zhao T, Xiao F, Tang X, Thilmony R, He S and Zhou JM (2003): Interplay of the *Arabidopsis* nonhost resistance gene *NHO1* with bacterial virulence. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U. S. A.* 100: 3519-3524.
 77. Kanwischer M, Porfirova S, Bergmüller E and Dormann P (2005): Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition and oxidative stress. *Plant Physiology*. 137: 713–723.
 78. Kärkönen A and Kuchitsu K (2015): Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry*. 112: 22-32.
 79. Kaur G, Sharma A, Guruprasad K and Pati PK (2014): Versatile roles of plant NADPH oxidases and emerging concepts. *Biotechnology Adventure*. 32: 551–563.
 80. Kawarazaki T, Kimura S, Iizuka A, Hanamata S, Nibori H, Michikawa M, Imai M, Abe M, Kaya H and Kuchitsu K (2013): A low temperature-inducible protein AtSRC2 enhances the ROS-producing activity of NADPH oxidase AtRbohF. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1833:2775–2780.
 81. Kim KH, Cho Y, La Rota M, Cramer R and Lawrence C (2007): Functional analysis of the *Alternaria brassicicola* nonribosomal peptide synthetase gene *AbNPS2* reveals a role in conidial cell wall construction. *Molecular Plant Pathology*. 8: 23–39.
 82. Kimura S, Kaya H, Kawarazaki T, Hiraoka G, Senzaki E, Michikawa M and Kuchitsu K (2012): Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca^{2+} -dependent activation of *Arabidopsis* NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca^{2+} and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823: 398–405.
 83. Kotnik T (2013): Lightning-triggered electroporation and electrofusion as possible contributors to natural horizontal gene transfer. *Physics of Life Review*. 10: 351-370.

84. Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y and Nomoto A (2001): Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Molecular Cell Biology*. 21: 6139–6150.
85. Kustrzeba-Wójcicka I, Siwak E, Terlecki G, Wolańczyk-Mędrala A and Mędrala W (2014): *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 47: 354–365.
86. Lagopodi LA and Thanassouloupoulos CC (1998): Effect of a leaf spot disease caused by *Alternaria alternata* on yield of sunflower in Greece. *Plant Disease*. 82: 41–44.
87. Lara-Ortíz T, Riveros-Rosas H and Aguirre J (2003): Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 50: 1241–1255.
88. Lawrence CB, Mitchell TK, Craven KD, Cho Y, Cramer RA and Kim KH (2008): At death's door: *Alternaria* pathogenicity mechanisms. *Plant Pathology*. 24: 101–111.
89. Levitt J (1980): Responses of Plant to Environmental Stresses. Academic Press, New York. 345.
90. Li X, Lin H, Zhang W, Zou Y, Zhang J, Tang X and Zhou JM (2005): Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *Proceeding of the National Academy of Sciences. U. S. A.* 102: 12990-12995.
91. Lin CH and Chung KR (2010): Specialized and shared functions of the histidine kinase- and HOG1 MAP kinase-mediated signaling pathways in *Alternaria alternata*, a filamentous fungal pathogen of citrus. *Fungal genetics and Biology*. 47: 818–827.
92. Lin CH, Yang SL and Chung KR (2011): Cellular responses required for oxidative stress tolerance, colonization, and lesion formation by the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in citrus. *Current Microbiology*. 62: 807–815.
93. Lin JJ (1995): Electrotransformation of *Agrobacterium*. *Methods of Molecular Biology*. 47: 171-178.
94. Liu Y and He C (2016): Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Reports*. 35: 995–1007.
95. Livak KJ and Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25:402–408.
96. Llorente F, Alonso-Blanco C, Sanchez-Rodriguez C, Jorda L and Molina A. (2005): ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are

- required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. Plant Journal. 43: 165–180.
97. Logemann, E, Birkenbihl RP, Ülker B and Somssich I E (2006): An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol. Plant Methods 2, 16.
 98. Lorenzo O, Piqueras R, S´anchez-Serrano JJ and Solano R (2003): ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. Plant Cell. 15:165–78.
 99. Lu H, Zou Y and Feng N (2010): Overexpression of *AHL20* negatively regulates defenses in *Arabidopsis*. Journal of Integrated Plant Biology. 52: 801-808.
 100. Lu M, Tang X and Zhou J-M (2001): *Arabidopsis NHO1* is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria. The Plant Cell. 13: 437-447.
 101. Lu R, Martin-Hernandez MA, Peart RJ, Malcuit I and Baulcombe CD (2003): Virus-induced gene silencing in plants. Methods. 30: 296–303.
 102. Maeda K, Houjyou Y, Komatsu T, Hori H, Kodaira T and Ishikawa A (2010): Nonhost resistance to *Magnaporthe oryzae* in *Arabidopsis thaliana*. Plant Signaling Behavior 5: 755-756.
 103. Mahmood T, Zar T and SM Saqlan M (2008): Multiple pulses improve electroporation efficiency in *Agrobacterium tumefaciens*. Electronic Journal of Biotechnology. 11:15.
 104. Main GD, Reynolds S and Gartland JS (1995) Electroporation protocols for *Agrobacterium*. Methods in Molecular Biology. 44: 405-412.
 105. Marino D, Dunand C, Puppo A, and Pauly N (2012): A burst of plant NADPH oxidases. Trends in Plant Sciences. 17:9–15.
 106. Mattanovich D, Rüker F, Machado AC, Laimer M, Regner F, Steinkellner H, Himmler G and Katinger H (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. Nucleic Acids Research 17: 6747.
 107. Mayer AM, Staples RC and Gil-ad NL (2001): Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. Phytochemistry. 58: 33–41.
 108. McCormac AC, Elliott CM and Chen FD (1998): A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. Molecular Biotechnology. 9: 155-158.
 109. Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K and He SY (2006): Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. Cell. 126: 969-980.

110. Mersereau M, Pazour GJ and Das A (1990): Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene*. 90: 149-151.
111. Mersmann S, Bourdais G, Rietz S and Robatzek S (2010): Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiology*. 154: 391–400.
112. Mishra NS, Tuteja R and Tuteja N (2006): Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry Biophysics*. 452(1):55-68.
113. Molina L and Kahmann R (2007): An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *The Plant Cell*. 19: 2293–2309.
114. Morita Y, Hyon GS, Hosogin N, Miyata N, Nakayashiki H, Muranaka Y, Inadan N, Park P and Ikeda K (2013): Appressorium-localized NADPH oxidase B is essential for aggressiveness and pathogenicity in the host-specific, toxin-producing fungus *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Molecular Plant Pathology*. 14: 365–378.
115. Mou Z, Fan W and Dong X (2003): Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*. 113:935–44.
116. Nakagami H, Pitzschke A and Hirt H (2005): Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in plant science*. 10: 339-346.
117. Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E and Jacquot JP (2007): Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 129: 185–195.
118. Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Gazcia B, Queval G and Foyer HC (2012): Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment*. 35(2): 454-484.
119. O'Brien JA, Daudi A, Finch P, Butt VS, Whitelegge JP, Souda P, Ausubel MF and Bolwell GP (2012): A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiology*. 158: 2013-2027.
120. O'Donnell PJ, Calvert C, Atzom R, Wasternack C, Leyser HMO and Bowles D (1996): Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*. 274: 1914-1917.
121. Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, Yumoto F, Kimura S, Kadota Y, Hishinuma H, Senzaki E, Yamagoe S, Nagata K, Nara M, Suzuki K, Tanokura M and Kuchitsu K (2008): Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 283: 8885–8892.

122. Oide S, Moeder W, Krassnoff S, Gibson D, Haar H, Yoshioka K and Turgeon BG (2006): NPS6, Encoding a Nonribosomal Peptide Synthetase Involved in Siderophore-Mediated Iron Metabolism, Is a Conserved Virulence Determinant of Plant Pathogenic Ascomycetes. *The Plant Cell*. 18: 2836–2853.
123. Okazaki S, Tachibana T, Naganuma A, Mano N and Kuge S (2007): Multistep disulphide bond formation in Yap1 is required for sensing and transduction of H₂O₂ stress signal. *Molecular Cell*. 27: 675–688.
124. Osmond CB, Austin MP, Berry JA, Billings WD, Boyer JS, Dacey JWH, Nobel PS, Smith SD and Winner WE (1987): Stress physiology and the distribution of plants. *Bioscience*. 37: 38–48.
125. Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S and Klessig DF (2007): Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*. 318: 113–116.
126. Pogány M, von Rad U, Grün S, Dongó A, Pintye A, Simoneau P, Bahnweg G, Kiss L, Barna B and Durner J (2009): Dual Roles of Reactive Oxygen Species and NADPH Oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria* Pathosystem. *Plant Physiology*. 151: 1459–1475.
127. Rao MV, Lee H-I, Creelman RA, Mullet JE and Davis KR (2000): Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell*. 12:1633–1646.
128. Ratcliff GF, MacFarlane AS, Baulcomba CD (1999): Gene Silencing without DNA: RNA-Mediated Cross-Protection between Viruses. *Plant Cell*. 11: 1207–1215.
129. Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, Inze' D and Mittler R (2002): Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant Journal*. 32: 329–342.
130. Roach T, Colville L, Beckett RP, Minibayeva FV, Havaux M and Kranner I (2015): A proposed interplay between peroxidase, amine oxidase and lipoxygenase in the wounding-induced oxidative burst in *Pisum sativum* seedlings. *Phytochemistry*. 112: 130–138.
131. Robert-Seilantantz A, Grant M and Jones JDG (2011): Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATESALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology*. 49:317–43.
132. Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner H-J and Hunt MD (1996): Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*. 8: 1809–1819.

133. Sánchez-Rodríguez C, Estévez JM, Llorente F, Hernández-Blanco C, Jordá L, Pagán I, Berrocal M, Marco Y, Somerville S and Molina A (2009): The ERECTA receptor-like kinase regulates cell wall-mediated resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 22: 953-963.
134. Schoof H, Zaccaria P, Gundlach H, Lemcke K, Rudd S, Kolesov G, Arnold R, Mewes HW and Mayer KF (2002): MIPS *Arabidopsis thaliana* Database (MAtdB): an integrated biological knowledge resource based on the first complete plant genome. *Nucleic Acids Research*. 30(1):91-3.
135. Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel CA and Mi HM (2008): Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Physiology*. 331: 433–441.
136. Siefertmann- Harms D (1987): The light- harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiologia Plantarum*. 69(3): 561-568.
137. Singh A, Kao TH and Lin JJ (1993): Transformation of *Agrobacterium tumefaciens* with T DNA vector using high-voltage electroporation. *Focus*. 15: 84-87.
138. Soyulu S, Brown I and Mansfield JW (2005): Cellular reaction in *Arabidopsis* following challenge by strains of *Pseudomonas syringae*: from basal resistance to compatibility. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66:232-243.
139. Spanu P and Boller T (1989): Ethylene biosynthesis in tomato plants infected by *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*. 134(5): 533-537.
140. Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelijs JP, Van Pelt JA, Mueller MJ Buchala AJ, Métraux J-P, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X and Pieterse CM (2003): NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *Plant Cell*. 15: 760–770.
141. Staswick P and Tiryaki I (2004): The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16:2117–27.
142. Staswick PE, Tiryaki I and Rowe ML (2002): Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell*. 14: 1405-1415.
143. Stepanova AN and Alonso JM (2009): Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology*. 12:548–55.
144. Sultana N, Florance HV, Johns A and Smirnoff N (2015): Ascorbate deficiency influences the leaf cell wall glycoproteome in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environment*. 38: 375–384.

145. Szigeti Z (1998): Növények és a stressz. Növényélettan. A növényi anyagcsere. ELTE Eötvös Kiadó. Budapest.
146. Takagi D, Takumi S, Hashiguchi M, Sejima T and Miyake C (2016): Superoxide and singlet oxygen produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition. *Plant Physiology*. 171: 1626–1634.
147. Takahashi T, Shibuya H and Ishikawa A (2016): ERECTA contributes to non-host resistance to *Magnaporthe oryzae* in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 1390-1392.
148. Takemoto D, Tanaka A and Scott B (2007): NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genetics and Biology*. 44: 1065–1076.
149. Thomashow MF, Panagopoulos CG, Gordon MP and Nester EW (1980): Host range of *Agrobacterium tumefaciens* determined by the Ti plasmid. *Nature*. 283:794-796.
150. Thomma BPHJ (2003): *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*. 4: 225–236.
151. Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA and Broekaert WF (1998): Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 95: 15107–15111
152. Thomma BPHJ, Eggermont K, Tierens KFJ and Broekaert WF (1999): Requirement of functional Ethylene insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*. 121: 1093–1101.
153. Torii N, Mitsukawa T, Oosumi Y, Matsuura R, Yokayama RF, Whittier Y and Komeda Y (1996): The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *The Plant Cell*. 8: 735–746.
154. Torres MA, Dangl JL and Jones JDG (2002): *Arabidopsis* *gp91 phox* homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defence response. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 99: 517–522.
155. Torres MA, Jones GDJ and Dangle LJ (2005): Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*. 37: 1130 – 1134.

156. Torres MA, Jones JDG and Dangl JL (2006): Reactive oxygen species signaling in response to pathogen. *Plant Physiology*. 141: 373-378.
157. Truman W, de Zabala MT and Grant M (2006): Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defense responses during pathogenesis and resistance. *Plant Journal*. 46: 14-33.
158. Tu Z, He G, Li KX, Chen MJ, Chang J, Chen L, Yao Q, Liu DP, Ye H, Shi J and Wu X (2005): An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8(1): 113-120.
159. Ursini F, Maiorino M and Forman JH (2016): Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox biology*. 8: 205–215.
160. Vranová E, Inzé D and Breusegan VF (2002): Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1227-1236.
161. Walters DR (2000): Polyamine in plant-microbe interactions. *Physiological Molecular Plant Pathology*. 57: 137–146.
162. Wang XF, Li ZA, Tang KZ and Zhou CY (2010): First report of *Alternaria* brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Yunnan province, China. *Plant Disease*. 94: 375.
163. Waters VL (1999): Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Frontiers in Bioscience*. 4: 433–456.
164. Welinder KG, Justesen AF, Kjaersgard IVH, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM and Dourou L (2002): Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*. 269: 6063–6081.
165. Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D and Van Camp W (1997): Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO journal*. 16 (16): 4806-4816.
166. Wise AA, Liu Z and Binns AN (2006): Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Methods in Molecular Biology*. 343: 43-53.
167. Xu P, Zhang Y, Kang L, Roossinck MJ and Mysore KS (2006): Computational Estimation and Experimental Verification of Off-Target Silencing during Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Plant Physiology*. 142(2): 429-440.
168. Yang SL and Chung KR (2012): The NADPH oxidase-mediated production of hydrogen peroxide (H₂O₂) and resistance to oxidative stress in the necrotrophic pathogen *Alternaria alternata* of citrus. *Molecular Plant Pathology*. 13: 900–914.

169. Yang SL, Lin CH and Chung KR (2009): Coordinate control of oxidative stress tolerance, vegetative growth, and fungal pathogenicity via the AP1 pathway in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74: 100–110.
170. Yanofsky M, Lowe B, Montoya A, Rubin R, Krul W, Gordon M and Nester E (1985): Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics*. 201:237-348.
171. Yao Y, He RJ, Xie QL, Zhao XH, Deng XM, He JB, Song L, He J, Marchant A, Chen X-Y and Wu A-M (2017): ETHYLENE RESPONSE FACTOR 74 (ERF74) plays an essential role in controlling a respiratory burst oxidase homolog D (RbohD)-dependent mechanism in response to different stresses in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. 213: 1667–1681.
172. Yi SY, Shirasu K, Moon JS, Lee S-G and Kwon S-Y (2014): The activated SA and JA signaling pathways have an influence on flg22-triggered oxidative burst and callose deposition. *PLoS ONE*. 9.2: e88951.
173. Yoda H, Fujimura K, Takahashi H, Munemura I, Uchimiya H and Sano H (2009): Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host- and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant Molecular Biology*. 70: 103-112.
174. Zamone PD (2001): RNA interference: listening to the sound of silence. *National Structural Biology*. 8(9):746-50.
175. Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L and Chai J (2007): A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe*. 1:175-185.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Pogány Miklósnak, hogy a Növényvédelmi Intézetben belül lehetővé tette a doktori témám kivitelezését és biztosította a kutatás megvalósításához szükséges feltételeket. Köszönöm neki, hogy témavezetésével irányította a munkámat, segítségére és tanácsaira mindig számíthattam.

Köszönöm Dr. Palkovics Lászlónak, hogy a Kertészettudományi Doktori Iskolában elvállalta a belső témavezetői szerepet.

Dr. Bozsó Zoltánnak is köszönettel tartozom a génszabványi munkákban nyújtott segítségéért, a megannyi szakmai tanácsáért, valamint hogy kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzá. Ezen kívül köszönöm neki, hogy az Agrobaktérium elektroporálásának optimalizálását irányította és lehetővé tette.

Köszönöm a munkám során nyújtott támogatást a Növényvédelmi Intézet összes munkatársának, férjemnek és családomnak, nélkülük dolgozatom nem valósult volna meg.