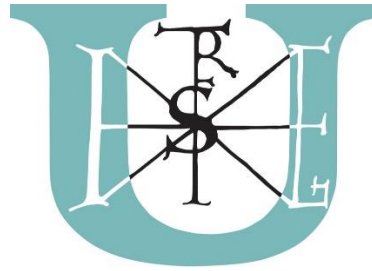


Doktori (PhD) értekezés tézisei

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 Kóréletani 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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

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 kifejleszteniük, 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 hatékonyan bizonyulhat különféle biotróf életmódú patogénekkal szemben, ugyanakkor nekrotrof 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 sejtközötti 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 sejtközötti 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.

Mindezek miatt, doktori dolgozatom célkitűzései a következők voltak:

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 transzgenikus 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* (*Rhizobium radiobacter*) baktérium elektroporációs módszerének optimalizálása a laboratóriumi munkák hatékonyabbá tétele céljából.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A felhasznált növények és a fertőzésre használt kórokozó

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

Fertőzőanyagként az *Alternaria brassicicola* MUCL20297 törzset használtuk, mely egy káposztáról izolált nekrotrof gomba kórokozó (Thomma és mtsai 1998).

Fertőzéshez 5-6 hetes, rövidnappalon (12h fény/12h sötét) nevelt növényeket használtunk, melyek levélfelületét 5×10^5 konídium/ml gomba konídium szuszpenzióval permeteztük.

Mutáció és transzgén hatásának igazolása qPCR-rel

Prx33 Salk T-DNS inszerciós *Arabidopsis* növényünkben a mutáció hatásának igazolására, valamint H4 transzgénikus *Arabidopsis*-ban 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

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

A *PRX33* és *PRX34* gének együttes vizsgálatához a Tobacco Rattle Virus (TRV) alapú géncsendesítési technikát használtuk, mely független módszer a SALK 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 vírusvektrokat (*Arabidopsis* Biological Resource Center, STOCK: CD3-1039) módosítottunk és használtunk.

A *PRX33* és *PRX34* géneket csendesítő plazmidokat (*TRV-GFP-PRX*) *Agrobacterium tumefaciens* MOG301 (Hood és mtsai 1993) baktériumba transzformáltuk elektroporálással. Az elektroporáláshoz saját, általunk optimalizált protokollt használtunk.

A VIGS plazmidokat tartalmazó *Agrobacterium* törzsekkel agroinfiltrációt végeztünk zöld fluoreszcens fehérjét kódoló *mGFP-ER* gént (Haseloff és mtsai 1997) expresszáló transzformáns, hosszú nappalos körülmények között nevelt *Arabidopsis*-okon. Az agroinfiltrációt Burch-Smith és mtsai (2006) módszere alapján végeztük, kisebb változtatásokkal.

A géncsendesítés sikerességét a növényeken UV lámpával ellenőriztük, a géncsendesítés mértékét pedig valós idejű PCR-rel határoztuk meg, ahol a célgének mRNS szintjét mértük MOCK és *A. brassicicola* fertőzést követően.

***Alternaria brassicicola* fertőzést követő génindukciós időpontok meghatározása**

A sejtfa-peroxidázok esetében szeretnénk megismerni, hogy a növényi immunválasz mely szakaszában vesznek részt és pontosan mikor aktiválódnak *A. brassicicola* fertőzése során. Ennek céljából vizsgáltuk vad típusú növényekben a *PRX33*, *PRX34* sejtfa-peroxidázokat kódoló gének transzkriptum szintjét *A. 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 ismétlésben 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.

Kórtani vizsgálatok

Az *A. brassicicola* gombafertőzés tüneteinek számszerűsítésére a klorotikus és nekrotikus tüneteket mutató levélfelületet viszonyítottuk az egész levélfelülethez. Ehhez minden genotípusból (*prx33*, *rboh1*, 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.

A fertőzés során keletkező hidrogén-peroxid detektálásához DAB (3,3'-Diaminobenzidine) festést alkalmaztunk. Növényanyagként 2 napos, *Alternaria brassicicola*-val fertőzött egész növényeket használtunk. 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 szintelenítő oldatban való 1 napos áztatással eltávolítottuk a szintesteket a növényekből, hogy láthatóvá váljon a DAB festékkel megfestett hidrogén-peroxid.

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 származó levelet vágunk 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 AlphaImager Mini gél dokumentációs 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

***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 génaktivitás és a szenescencia kapcsolata

Összefüggést feltételezünk a levelek kora és az általunk vizsgált gének (*RbohD*, *PRX33*, *PRX34*) expressziós aktivitása között, így megmértük az *Arabidopsis* Col-0 növények *RbohD*, *PRX33*, *PRX34* génjeinek 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

Agrobaktérium elektroporálásának optimalizálása

Az elektroporálás optimalizálásához az *Agrobacterium tumefaciens* MOG301 (Hood és mtsai 1993) törzset használtuk. Adott mennyiségű 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..

A leghatékonyabb elektroporáció elérése érdekében különböző beállítási módokat használtunk. Három feszültséget, 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.

Kétféle táptalaj, a SOC és LB folyékony táptalajok hatását hasonlítottuk össze.

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

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

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

A kinőtt telepeket megszámoztuk és transzformációs hatékonyságot számoltunk belőlük, melyet a CFU (colony forming unit)/ μ g plazmid DNS formában tüntettünk fel.

3. EREDMÉNYEK

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

A *prx33* Salk T-DNS inszerció mutáns *Arabidopsis* növényekkel 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.

Eredményeink alapján a *prx33* mutáns egy knock down mutáns, melyben az általunk vizsgált sejtfal-peroxidáz gén igen alacsony szinten működik a vad típushoz képest.

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. Saját eredményeink alapján a H4 transzgénikus *Arabidopsis*-t nem tartottuk a legmegfelelőbbnek vizsgálatainkhoz, mivel a *PRX34* gén transzkriptum szintje nem csökkent statisztikailag szignifikánsan a vad típushoz képest.

***PRX33* és *PRX34* gének csendesítése VIGS módszerrel**

Vírus-indukálta géncsendesítéssel (VIGS) sikeresen létrehoztunk *PRX33* és *PRX34* géneket csendesítő konstrukciókat és géncsendesített *Arabidopsis* növényeket. A VIGS működését a növények mRNS szintjének megméréssel igazoltuk kontroll körülmények között és *Alternaria brassicicola* fertőzés után 24 órával is. A géncsendesítésnek köszönhetően minden körülmény között jóval alacsonyabb volt a *PRX33* és *PRX34* gének mRNS terméke, mint a kontrollként használt *TRV-GFP* növényekben.

***Alternaria brassicicola* fertőzésre kialakuló génindukciók**

Eredményeink azt mutatják, hogy a két sejtfal-peroxidáz működése már a fertőzés utáni korai időpontokban beindul (6 óra), az idő előrehaladtával pedig fokozatosan nő a génexpresszió és végül 24 óra elteltével tetőzik. 24 óra után viszont csökken a génaktivitás.

***Alternaria brassicicola* gomba okozott tünetek értékelése**

A *prx33* és *rbohD* mutáns *Arabidopsis* növényeket, valamint a *TRV-GFP-PRX* géncsendesített *Arabidopsis* növényeket és a kontrolljaikat (Columbia, *TRV-GFP*) *A. brassicicola* nekrotrof gombakórokozóval fertőztük és a fertőzést követő 10. napon értékeltük a tüneteket. A 33-as sejtfal-peroxidáz mutáns növényeinken a kontrollokhoz képest kevesebb nekrotikus léziót és kevesebb sejtelhalást tapasztaltunk. 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 számszerűsítés eredménye is, miszerint a *PRX33* és *PRX34* gén csökkent működésének köszönhetően kevesebb roncsolódott szövet keletkezett a kontrollokhhoz képest.

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

A DAB festésnek köszönhetően megállapítottuk, hogy a 33-as sejtfa-peroxidáz enzim valóban hozzájárul a fertőzés hatására indukálódó extracelluláris 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 növényekhez képest

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 kontrollokhhoz képest alacsonyabb fluoreszcens jelet tudtunk kimutatni, ezzel megegyezően tehát alacsonyabb hidrogén-peroxid mennyiséget is.

***Alternaria brassicicola* gomba biomassza mennyiségének meghatározása**

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 *A. brassicicola* relatív biomassza mennyisége a kontrollokhhoz képest tehát a gomba kolonizációjában gátlás lépett fel.

Génműködés és a levél életkorának kapcsolata

Mind a három általunk vizsgált gén (*PRX33*, *PRX34* és *RBOHD*) alapexpressziója (fertőzés nélküli állapotban) az öregedő levelekben volt a legmagasabb, a legfiatalabb levelekben pedig a legalacsonyabb. Fertőzés hatására viszont a három levélemelet közül a középső szintben mértük a legmagasabb génaktivitást az *RBOHD* és *PRX33* gének esetében, a *PRX34*-nél pedig az alsó és középső levélemeletben mért transzkriptum szintje azonosan magas volt. Ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy noha a három levélemelet közül fertőzésre a legfiatalabb levelek relatív génextpressziós szintje a legalacsonyabb, a fertőzetlen növények között mért

alapexpresszióhoz képest 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 aktiválódnak leginkább az általunk vizsgált gének.

A PRX33 és PRX34 génekkel kölcsönható gének

10 előzetesen kiválasztott SALK T-DNS mutáns *Arabidopsis* vonal közül, *A. brassicicola* gombával történő fertőzés során 6 genotípust választottunk ki, melyek fogékonyabbnak bizonyultak a gombafertőzésre Columbia vad típushoz képest. Ezek az *ein2*, *nia2*, *nho1*, *jar1*, *mpk6* és *npr1* mutánsok voltak. A hat kiválasztott mutánsban a *PRX33* és *PRX34* gének transzkriptum szintjét mértük és hasonlítottuk össze a vad típusban mért eredményekkel MOCK és 24 órás fertőzéses körülmények között. A megvizsgált mutánsok közül az *nho1* és *jar1* mutánsokban mért génexpressziós szint tért el jelentős mértékben a Columbiától a *PRX33* és *PRX34* gének esetében.

Egy másik megközelítés során olyan géneket választottunk ki, melyek fehérje termékéről megállapították, hogy fizikai kölcsönhatást létesítenek az RBOHD-val (Geisler-Lee és mtsai. 2007, Jones és mtsai. 2014). Két kiválasztott mutáns esetében jelentős eltérést tapasztaltunk az *A. brassicicola* gomba tüneteiben a vad típusal 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 *rboh1* mutánsal, mivel 7 nappal az *A. brassicicola* fertőzése után nagymértékű sejtelhalás volt megfigyelhető a leveleken.

Agrobaktérium elektroporációjának optimalizálása

Munkánk során sikerült kidolgoznunk egy módszert, melyben a korábbi protokollokhoz képest jelentősen lecsökkentettük az elektroporálás idejét, de az egyszerűség és rövidség ellenére hatékonyan és megbízhatóan végezhető.

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.

MOG301 baktériumtörzsön vizsgáltuk a kétszeri valamint háromszori elektroporálást. Azt tapasztaltuk, hogy a többszöri elektroporáció nem növeli statisztikailag szignifikáns módon a transzformált sejtek számát.

Kétféle táptalaj közül a SOC táptalaj összetétele megfelelőbb a baktériumok növekedéséhez elektroporáció után, mivel az LB táptalajban inkubált baktérium szuszpenzió szétszélesztése után kevesebb transzformált sejtet tudunk számolni.

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.

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.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

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* nekrotrof 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 *JARI*-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.

5. ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Impakt faktoros folyóiratcikkek

Kámán-Tóth, E., Dankó, T., Gullner, G., Bozsó, Z., Palkovics, L., & Pogány, M. (2018). Contribution of cell wall peroxidase-and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species to *Alternaria brassicicola*-induced oxidative burst in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*. (in press) **IF 4,18**

Kámán-Tóth, E., Pogány, M., Dankó, T., Szatmári, Á., & Bozsó, Z. (2018). A simplified and efficient *Agrobacterium tumefaciens* electroporation method. *3 Biotech*, 8(3), 148. **IF 1,49**

Miklós Pogány, Tamás Dankó, Evelin Kámán-Tóth, Ildikó Schwarczinger, Zoltán Bozsó (2015). Regulatory Proteolysis in *Arabidopsis*-Pathogen Interactions. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 16:(10) pp. 23177-23194. **IF 3,25**

Lektorált folyóiratban (MTA listás) megjelent közlemények

Kámán-Tóth Evelin, Palkovics László, Pogány Miklós (2016). *Alternaria* fajok által okozott kórfolyamatok élettana és molekuláris biológiája növényekben. *NÖVÉNYVÉDELEM* 52:(11) pp. 557-566.

Konferencia összefoglalók

Tóth E, Nagy VA, Bozsó Z, Pogány M (2015) Reaktív oxigén fajtákat termelő enzimrendszerek és az etilén kölcsönhatása *Arabidopsis* sejtek kórfolyamataiban. 61. Növényvédelmi Tudományos Napok Konferenciakiadványa, Budapest, p.51.

Tóth E, Nagy VA, Bozsó Z, Pogány M (2014) Reaktív oxigén fajtákat termelő alternatív enzimrendszerek szerepének vizsgálata *Arabidopsis* sejtek megbetegedésében és a rezisztenciában. 60. Növényvédelmi Tudományos Napok Konferenciakiadványa, Budapest, p. 111

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Baker CJ and Orlandi EW (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*. 33: 299–321.
2. 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.
3. Burch-Smith TM, Schiff M, Liu Y, and Dinesh-Kumar SP (2006): Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 142: 21–27.
4. 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.
5. Frederickson Matika DE and Loake GJ (2013): Redox Regulation in Plant Immune Function. *Antioxidant Redox Signaling*. 21: 1373-1388.
6. 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.
7. Glazebrook J (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 205–227.
8. 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.
9. 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.
10. Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS and Hoekema A (1993): New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2: 208-218.
11. 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.
12. 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.
 13. Mahmood T, Zar T and SM Saqlan M (2008): Multiple pulses improve electroporation efficiency in *Agrobacterium tumefaciens*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 11:15.
 14. 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