

BEVEZETÉS

Az élő szervezetek közötti érintkezés a természetben inkább szabály, mintsem kivételes jelenség; a társas viszony az élővilág legáltalánosabb jellemzője. A különböző organizmusok érintkezésének és együttélésének típusai rendkívüli változatosságot mutatnak, amelyek között sok esetben nem is lehet éles határvonalat húzni. A mindkét fél számára előnyös szimbiózis, a csak az egyik félre hatással lévő kommenzalizmus és antibiózis, vagy a mindkét partner szempontjából hátrányos versengés mind e kapcsolatok formái, csakúgy, mint az egyik félnek hasznot, a másiknak viszont kárt jelentő zsákmányolás és élősködés.

Az élősködés jelensége az életet a kezdetek óta végigkíséri. Bizonyos szempontból parazitáknak tekinthetjük már a minden élőlény genomjában előforduló mozgékony genetikai elemeket, amelyek a gazda replikációs rendszerét kihasználva képesek másolódni. A legegyszerűbb élő szervezetek, a vírusok, amelyek néhánytól több száz génnel is rendelkezhetnek, már szabályozni képesek saját szaporodásukat és rendkívüli változékonyságukkal könnyen alkalmazkodnak a megváltozott körülményekhez. A vírusokon kívül hagyományosan mikroparazitáknak tekintik még a viroidokat, prionokat, az élősködő baktériumokat, gombákat és protistákat. A makroparaziták közé a parazita állatok és növények tartoznak.

A parazita növények azon tulajdonsága, hogy képesek más növényeket tápanyagforrásként használni, hosszú evolúciós folyamat eredménye. A zárva termők evolúciója során legalább nyolcszor váltak ki

a fő fejlődési útvonalból. Ennek köszönhetően az élősködő növények ma 16 növény család tagjai közül kerülnek ki. Az általánosan elfogadott modell szerint e folyamatnak három fő állomása volt. Először egy kezdeti szimbionta vagy parazita kapcsolat jött létre, amelynek során kialakult a szívógyökér és kapcsolatot hozott létre a gazdanövényvel. Az ily módon a gazdájukkal együttélő növények a szelekció folyamán fokozatosan elvesztették a számukra fölöslegessé vált tulajdonságaikat: csökkent, majd megszűnt a gazdából is felvehető tápanyagok szintézise és ugyanígy a kihasználatlan szervek (gyökér, levél) is folyamatos redukción estek át. A harmadik lépésben a paraziták komplex módon is adaptálódtak az élősködő életmódhoz: életciklusukat a gazdához igazították és különböző mechanizmusokat fejlesztettek ki a gazda védekezőrendszerének kijátszására. Valószínűleg ez a fázis vezetett a mai változatos parazita növényvilág kialakulásához (Searcy 1970; Searcy és MacInnis 1970).

Az élősködő életmód létrejöttének és fennmaradásának titka a rendkívül gyors alkalmazkodóképesség. Közismert például egyes vírusok nagyfokú változékonysága, de szintén alkalmazkodóképességének köszönheti széles elterjedését számos magasabbrendű multigazdás parazita is. A nagyfokú alkalmazkodás egyik kulcsa a genetikai változékonyságban rejlik. A molekuláris genetikai módszerek segítségével az utóbbi évtizedekben lehetővé vált a parazita növények genomjának vizsgálata is. Az élősködő zárvatermők meglepően sok különbséget mutatnak legközelebbi nem-parazita rokonaikhoz képest. Genomjuk általában kisebb méretű és a repetitív szekvenciaelemek számában is csökkenést tapasztalhatunk. Ugyancsak jelentős redukciót

találunk a plasztiszgének és a sejtmagi riboszómális gének elemzésekor. Mivel e változások nagyobb méretűek, mint azt a filogenetikai elemzések alapján várhatnánk, számos kutató arra következtet, hogy a vizsgált holoparazita növényekben (epifagus, aranka) a molekuláris evolúció számottevően gyorsabb, mint nem-parazita rokonaikban.

A megváltozott feltételekhez történő alkalmazkodás (akár az ember által megváltoztatott körülményekhez is) sokszor szinte a szemünk előtt, evolúciós léptékkal mérve „pillanatok alatt” is végbemehet. Ennek ékes példája az arankamag felszínének megváltozása. A jó minőségű maglucerna előállításának elengedhetetlen előfeltétele az arankamagmentes szaporítóanyag használata. Az aranka magvak kiválogatására a 60-as évektől fogva az úgynevezett „vasporos-mágneses” tisztítást alkalmazzák. A módszer lényege, hogy a szőrös felületű arankamag a rátapadó vasreszelék miatt mágnes segítségével a sima lucernamagtól jól elkülöníthető. Napjainkban e módszer további sikeres alkalmazását veszélyezteti, hogy az utóbbi években felbukkant és egyre terjedőben van az arankának egy sima magfelületű ökotípusa is.

Az élősködő növények tehát nemcsak sajátos életmódjuk miatt, hanem evolúciós szempontból is sok érdekességet tartogatnak a kutatók számára. Számos egyedülálló tulajdonságuk dacára e növénycsoport azonban egészen az utóbbi pár évtizedig méltatlanul mellőzött volt. Vizsgálatukban az igazán jelentős eredmények csak az utóbbi negyedszázadban születtek. A parazita növények (és az ellenük való védekezési lehetőségek) iránt hirtelen megnövekedett érdeklődés hátterében két jelenség áll. Az első a kukoricakultúrát komolyan veszélyeztető boszorkányfű (*Striga asiatica*) megjelenése volt az USA-

ban az 50-es évek közepén, amelynek hatására egy nagyszabású nemzeti kutatási program indult a boszorkányfű elleni védekezés kidolgozására. A másik az Afrikában a 70-es és 80-as évekre már rendkívül égető problémává vált - és a média által is egyre nagyobb nyilvánosságot kapott - éhínség volt. A termésátlagokat jelentősen csökkentő parazita gyomok tanulmányozásával, számos konferencia és publikáció megjelenésével e növénycsoport világszerte is egyre inkább a kutatások homlokterébe került.

A parazita növényekkel kapcsolatos kutatások kezdete Magyarországon is a 60-as évekre tehető. A hazánkban előforduló arankafélék előfordulásának és terjedésének felmérése, valamint az arankamagvak csírázási sajátosságainak vizsgálata Czímber Gyula vezetésével indult el. A 90-es évek elején indultak meg a parazita kapcsolat molekuláris folyamatainak megismerését célzó kutatások korszerű molekuláris biológiai technikák alkalmazásával. A gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban dr. Lados Miklós és kutatócsoportja kezdte el a lucerna és a kisaranka között kialakuló parazita kapcsolat tanulmányozását. Szakdolgozóként 1992-ben kapcsolódtam be a csoport munkájába, majd később PhD hallgatóként kezdtem el foglalkozni a parazita együttélés vizsgálatával. Jelen dolgozatom az azóta eltelt időszakban végzett munkám egy részének eredményeit öleli fel.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A parazita növényekről általában

Habár pontos adataink nincsenek, becslések szerint a zárvatermő növények mintegy 1%-a, körülbelül 3000 növényfaj folytat élősködő életmódot (Kujit 1969; Atsatt 1983). Közös vonásuk, hogy mindegyikük szoros kapcsolatot épít ki gazdanövényével, mivel életük folyamán teljesen vagy részlegesen gazdanövényeik tápanyagaira vannak utalva. A kapcsolódás szerve a szívógyökér vagy hausztórium (a latin *haurire* = inni, meríteni igéből), amelynek feladata, hogy a gazdanövény szállítóedénynyaláb-rendszeréhez csatlakozzon és onnan a vizet és a tápanyagokat elvonja.

A parazita növényeket számos szempont szerint osztályozhatjuk. Leggyakrabban azonban a gazdára szorultság mértéke és a gazdához való kapcsolódás helye szerint osztjuk fel őket. Előbbi szerint teljes- (holo) és fél- (hemi) parazitákat, utóbbi szerint gyökér- és szárparazitákat különböztetünk meg. A holoparaziták klorofillal nem rendelkező, tehát önálló fotoszintézisre nem képes növények, életük során minden tápanyag tekintetében teljesen gazdájukra vannak utalva. Ebbe a csoportba sorolható a parazita növények mintegy 20%-a (Press és Graves 1995), például az aranka fajok (*Cuscuta* spp.) és a boszorkányfű (*Striga* spp.). A többséget alkotó hemiparaziták ezzel szemben levéllel és klorofillal rendelkeznek, tápanyagszükségletük egy részét maguk állítják elő (*Viscum* spp.). Vannak olyan paraziták, amelyek természetes életciklusukhoz nem igénylik feltétlenül gazdanövény jelenlétét

(fakultatív paraziták), míg mások (pl. arankák) gazdanövényük nélkül életképtelenek (obligát paraziták). A gazdához való kapcsolódás tekintetében szár-, és gyökérparazitákat (szádorfélék, vicsorgó) különíthetünk el. Utóbbiak a parazita zárvatermők mintegy 60%-át teszik ki.

Elterjedésük rendkívül széles, megtalálhatjuk őket a trópusi éghajlaton ugyanúgy, mint jóval a sarkkörön túl (*Pedicularis dasyantha*). Alkatuk szerint az élősködő növények szintén sokfélék lehetnek. Fákat (pl. a *Santalaceae* család tagjai) ugyanúgy találhatunk köztük, mint cserjéket (fagyöngyök) és lágyszárúakat (arankák). Számos fajukat gyógyfűként (*Euphrasia*, *Pedicularis* fajok), vagy orvosi készítményként is felhasználják (*Striga asiatica*, *Cuscuta reflexa*). Élettartamukat tekintve lehetnek évelők, vagy alig pár hónapig élő egyévesek.

Az élősködő növények gazdaspecificitás szempontjából is rendkívül változatos képet mutatnak. Számos fajnak (*Castilleja* spp., *Olex* spp.) nagyon széles, akár több 100 fajból álló gazdaköre is lehet, míg mások kizárólag egy gazdát képesek megfertőzni. Erre példa az *Orobanchaceae* családba tartozó *Epifagus virginiana*, amely kizárólag a *Fagus grandifolia* bükkfajon képes élősködni, vagy néhány epiparazita fagyöngy (*Viscaceae*), amelynek csak más fagyöngy fajok szolgálhatnak gazdául.

1.2. Az aranka fajok jellemzése

A *Cuscuta* nemzetségbe (*Convolvulaceae*, *Solanales*, *Rosidae*, *Dicotyledonopsida*, *Angiospermatophyta*) több, mint 150 faj tartozik, amelyek közül mintegy 20 fordul elő szántóföldi gyomként.

Legismertebbek ezek közül a legszélesebb földrajzi elterjedésű nagy aranka (*C. campestris* Yuncker), a szintén nagyobb termetű, főleg Ázsiában élő *C. reflexa* (Roxb.), *C. monogyna* (Vahl), *C. japonica* (Choisy) és komlóképző aranka (*C. lupuliformis* Krock.), a mediterrán eredetű kakukkfűfojtó aranka (*C. epythimum* L.), valamint az Európában legszélesebb körben elterjedt közönséges aranka (*C. europea* L.) és a kozmopolita herefojtó- vagy kisaranka (*C. trifolii* Bab. et Gibs.). Hazánkban a lenfojtó aranka előfordulását írták le először a felvidéken 1595-ben, a kisaranka vörös herében okozott kártételéről pedig elsőként Pethe Ferenc számolt be 1805-ben.

1. ábra. A kisaranka (*Cuscuta trifolii* Bab. et. Gibs.) élősködése és kártétele lucernán (*Medicago sativa* L.)

Az arankák sárga, vagy narancssárga színű lágyszárú növények (1. ábra). A holoparaziták közé sorolják őket, de tulajdonképpen átmenetet képeznek a hemi- és holoparaziták között, mivel számos fajuk (*C. trifolii*, *C. reflexa*) tartalmaz kis mennyiségű klorofillt és csekély mértékű fotoszintetikus aktivitást is mutat (Hibberd és mtsai 1998). Leveleik pikkelyszerűvé redukálódtak, gyökérrel csak a csíranövénykéik rendelkeznek, amely a gazda megtalálásáig a vízfelvételt és a növény támasztását szolgálja. Gazdakörük néhány kivételtől eltekintve (*C. epilinum* Weihe) rendkívül széles, közel 100 fajt foglal magába (Czímber 1999). A termesztett növényeken kívül a ruderalis területeken élő legtöbb gyomot is képesek fertőzni, illetve azokon áttelelni.

2. ábra. Az aranka életciklusa Graham és mtsai (1979) nyomán

Az aranka fajok magvainak nagy része (65-77%) kemény héjú (Czímber 1969). A szántóföldön 8-10 évig is megőrzik csírázókéességüket, de laboratóriumi körülmények között tárolt magvak között találtak már 50 év múltán csírázó nagyaranka magot is (Czímber 1999). Megfelelő körülmények között az arankamag a talaj felső rétegében a gazdanövény jelenlététől függetlenül kicsírázik (Hunyadi 1988, Lados 1998). Az aranka növények életciklusuk első szakaszában a legsérülékenyebbek. A viszonylag kevés tápanyagforrással rendelkező kis méretű magból kibújó fonalszerű csíranövénykének ekkor kell rövid idő alatt (5-10 nap) gazdanövényre találnia és azon működőképes kapcsolatot létrehoznia. Rotációs mozgást végezve keresi meg gazdanövényét (2. ábra), majd annak szárára rátekeredve húsztórúmot fejleszt. Az aranka növekedése rendkívül gyors, hajtásai 5-10 cm-t is növekedhetnek egy nap alatt. Pár hét alatt egyetlen növény is nagy területeket képes elfertőzni, virágozni és termést érlelni. Magva zöld állapotban is csíráképes.

1.2.1. Az aranka fajok gazdasági jelentősége

Az aranka fajok világszerte rendkívül elterjedtek. Hazánkban a mezőgazdaságilag művelt területek mintegy 15-20%-a fertőzött arankamaggal (Béres Imre személyes közlése). Számos gazdaságilag fontos növényt képes megtámadni, amelyek közül a cukorrépa és lucerna kultúrákban okozott kár a legjelentősebb. Cukorrépában az arankafertőzés akár 23-41%-os gyökértömeg- és 1,3-2,6%-os

cukortartalom veszteséggel is járhat (Stojšin és mtsai 1991). Takarmányhasznosítású lucernakultúra zöldtömegében 10-20%-os, de nem megfelelő védekezés esetén a második évben már akár 57%-os zöldtömeg veszteséget is okozhat (Dawson 1989).

A fertőzött lucerna takarmányként történő hasznosítása során számolnunk kell azzal, hogy az aranka minden része mérgező kuszcutin glikozidot tartalmaz. *Cuscutával* 60-70 %-ban szennyezett takarmány tartós és tömeges etetése a lovak, szarvasmarhák, valamint a sertések gyomor- és bélgyulladását, makacs hasmenését és idegrendszeri zavarait, súlyos esetben elhullását okozhatja.

A legnagyobb gazdasági kárral az aranka lucernamag kultúrákban való előfordulása jár. Magyarország az elmúlt évtizedekben a világ legjelentősebb lucernamag exportőrei közé tartozott, számos piaci és gazdasági tényező miatt az utóbbi években lucernamag exportunk jelentősen csökkent. Ennek egyik oka, hogy a hazánkban termesztett magvak nem feleltek meg a szigorú piaci tisztasági előírásoknak. Az arankamag a lucernamag szállítmányokban karantén magnak számít, így az ellenőrzés során már a mintában talált egyetlen szem arankamag is a szállítmány kizárását jelentheti. Szántóföldi szemlék során az arankával fertőzött területet a lucernamag-termesztésből évekre kivonják. További gondot jelent, hogy az arankamagok tisztítása (vasporos mágneses tisztítás) a nagyon apró magméret és az utóbbi években megjelent sima felületű arankamag miatt csak részben megoldott.

Az arankák kevésbé ismert hatása hogy számos, gazdasági növényeinket károsító vírusnak vektorául szolgálhatnak (Noordam 1973; Roos és Aldrich 1988). A jelenség gazdasági jelentőségét nagyon nehéz

megbecsülni, mivel az átviteli folyamat nehezen nyomonkövethető. A legtöbb vírus ugyanis anélkül jut át a parazitán, hogy azon látható tüneteket vagy növekedésbeli zavarokat okozna. A vírussal fertőzött és a talajban évekig elfekvő arankamag pedig a betegségek terjesztésében és évenkénti kiújulásában játszhat szerepet.

1.3. A parazita növények szívógyökerének kialakulása, szerepe

A paraziták az életműködésükhöz elengedhetetlenül fontos tápanyagokhoz egy külön erre a célra módosult szerv, a szívógyöker (hausztórium) segítségével jutnak hozzá. A szívógyökernek három funkciója van: a gazdanövényen való megtapadás, a behatolás, valamint a víz- és tápanyagfelvétel biztosítása (Visser és Dörr 1987; Stewart és Press 1990).

A parazita növények szívógyökerének fejlődése a környezetből érkező ingerek hatására indul el. Bár eddig csak kevesen vizsgálták a hausztórium kialakulását indukáló körülményeket, az eredmények nagy többsége azt mutatja, hogy számos faj hausztóriumának fejlődését különböző kémiai anyagok befolyásolhatják. Yoder (1997) két fakultatív gyökérparazita, a *Triphysaria eriantha* és *T. versicolor* hausztórium-indukcióját tanulmányozva megállapította, hogy azok saját és egymás gyökereivel érintkezve nem fejlesztenek szívógyökeret. Megfigyelései alapján feltételezi, hogy a parazitában létezik egy „fajspecifikus felismerő rendszer”, amely képes felismerni saját gyökerét és amelynek működése összefüggésbe hozható a gazdából vagy a parazitából származó jelemolekulákkal. Számos kutató kimutatta, hogy a

hausztóriumfejlődést a gazda által kibocsátott vegyületek indukálhatják (Estabrook és Yoder 1998). Ezeket a jelemolekulákat a parazita már kis koncentrációban (10^{-8} - 10^{-10} mol/m³) is képes érzékelni. Több ilyen inducer molekulát kémiaiailag is jellemeztek (Chang és Lynn 1986; Steffens és mtsai 1986; Netzly és mtsai 1988; Albrecht és mtsai 1999), amelyek általában a kinon és flavon típusú vegyületek különbözően szubsztituált származékai. Ezen anyagok többnyire fajspecifikusak, így valószínűleg szerepük lehet a gazdaspecificitás meghatározásában is.

Az aranka szívógyökereinek fejlődése mesterségesen növényi hormonok alkalmazásával váltható ki. Exogén citokinin hatására *de novo* hausztórium indukálódik mind a gazdanövényen élősködő *Cuscuta reflexa* növényeken, mind annak izolált szár részletein (Paliyath és mtsai 1978; Tsivion 1978) és a folyamat más növényi hormonokkal (auxin, gibberellinsav, etilén, abszcizinsav) gátolható (Paliyath és mtsai 1979; Ramasubramaniam és mtsai 1988). A hausztóriumfejlődés kezdeti szakaszában alkalmazott citokinin elősegíti a szívógyökér-kezdemények hausztóriumokká való fejlődését. Adenin vagy annak származékai pl. AMP vagy cAMP ugyancsak elősegítik a szívógyökerek képződését (Gupta és Singh 1982). Gupta és Singh (1985) feltételezik, hogy amikor az aranka körbetekeredik a gazda szárán, a gazdanövény érintkező részein citokinin akkumulálódik és ennek hatására indukálódnak a hausztóriumok. A szívógyökerek behatolása során nagy proteáz és RNáz (Gupta és Singh 1983), valamint a sejtfal degradációban szerepet játszó (Nagar és mtsai 1984) enzimaktivitás mutatható ki az arankában, ami feltehetően hozzájárul a gazdanövény sejtjeinek leépüléséhez. E leépülési folyamat révén is keletkezhetnek újabb citokininnek, amelyek a parazita

növénybe transzlokálódva elősegíthetik a hausztóriumképződés továbbvitelét.

Cuscuta esetében még nem határoztak meg gazdanövényből származó inducer molekulát. Ismert azonban, hogy a *C. europea* hajtásai különbséget képesek tenni ugyanazon gazdanövény jó, illetve kevésbé kielégítő tápanyagellátottságú hajtásai között. Kelly (1992) egybibés galagonyán (*Crataegus monogyna*) folytatott kísérleteinél azt tapasztalta, hogy a parazita hajtásai előbbi esetben „elfogadó”, míg az utóbbinál „elutasító” magatartást tanúsítanak, mielőtt még a gazdanövényen szívógyökereket fejlesztenének és így bármilyen tápanyagot felvennének. A szerző valószínűnek tartja, hogy az aranka a gazdanövény felületén található másodlagos anyagcseretermékekből „következtet” a hajtások tápláltsági szintjére. Nincs azonban bizonyíték arra nézve, hogy e molekulák hatással lennének a szívógyökér fejlődésére.

Újabb eredmények azokat a feltételezéseket látszanak alátámasztani, amelyek nem tartják szükségesnek inducer molekula jelenlétét az aranka hausztóriumának fejlődéséhez. Tada és mtsai (1996) *Cuscuta japonica* hajtásain hausztórium fejlődést tudtak kiváltani sötétvörös fénnel (740 nm) való megvilágítás hatására. A hausztórium fejlődése akkor is bekövetkezett, ha a gazdanövény szárát üvegbottal helyettesítették. A sötétvörös fény hatását vizsgálva azt is kimutatták, hogy valószínűleg a fitokróm B pigmentrendszernek van szerepe a szívógyökér iniciációjában. Üveglapok közé tett hajtásokat többször egymás után váltakozó sötétvörös és vörös fénnel (660 nm) megvilágítva, majd sötétben nevelve, csak akkor tapasztaltak hausztórium fejlődést, ha az utolsó megvilágítás sötétvörös fénnel történt (Furuhashi és mtsai 1997).

Mindezek alapján valószínű, hogy a hausztórium fejlődéséhez kettős stimulus, sötétvörös fény és megfelelő érintési inger együttes alkalmazása is elegendő, és nincs szükség további inducerekre.

3. ábra. A szívógyökér mikroszkópos képe. A parazita szívógyökerei áthatolnak a gazdanövény epidermiszén és az edénnyalábokhoz csatlakoznak.

A szívógyökér kialakulása a megfelelő indukció után két lépésben történik. Kezdetben prehausztóriumot hoz létre a növény, mely csak felületi képződmény. Ennek csúcsából a pollentömlőhöz hasonló, ún. kereső (searching) hifa hatol a gazda sejtközötti járataiba, amely a szállítónyalábok elérése után azokat körbevée ujjszerű kinövéseket fejleszt és tapadó (absorbing) hifává alakul (Dörr 1972). Végül a hifában ellentétes irányban differenciálódó háncs és farész összeköti a partnernövények edénnyalábjaikat (Israel és mtsai 1980; Dörr, 1990) és kialakul a valódi hausztórium (3. ábra). A gazdanövényből ezután az aranka, a hausztórium nagy szívóereje segítségével, a vizet és a benne oldott ásványi anyagokat, ill. szerves makromolekulákat (Haupt és mtsai 2001) átveszi. A tápanyagok áramlását az arankák szívógyökerében egy különleges sejtcsoport, az ún. transzfer sejtek is segítik, amelyek a gazda háncsrészával szomszédos parenchima sejtekből alakulnak ki (Dörr 1975; Lamont 1982) és nagy hatékonysággal tudják felvenni a gazda apoplasztjában szállított oldatokat (Wolswinkel 1978a,b). A hausztóriumban zajló enzimátikus folyamatokat vizsgálva Wolswinkel és Ammerlaan (1983) magas invertáz enzim aktivitást mért, amely enzim a hausztórium környezetében található szacharóz hidrolizálása révén lokálisan alacsony turgort hoz létre és így a gazda floemjében szállított

tápanyagok a hausztórium felé áramlanak (passzív transzport). Más kutatások valószínűsítik, hogy a szívógyökérben a passzív tápanyagáramlás (Raven 1983) mellett aktív transzport (Wolswinkel 1985) is folyik, illetve, hogy az aranka szívógyökere képes szelektálni a felveendő tápanyagok között (Lamont 1983; Jeschke és mtsai 1994a,b).

1.4. A fertőzött gazdanövény növekedésélettani válaszreakciói a parazita támadásra

A gazdanövények válaszreakciói a fertőzések során nagyon változatos képet mutatnak. A növénypusztulástól kezdve a növekedési rendellenességeken át egészen a tünetmentességig minden variációval találkozhatunk. A tünetek súlyossága számos tényező függvénye, befolyásolhatja a parazita mérete, növekedési erélye, metabolikus aktivitása, de a gazda rendelkezésre álló tápanyagforrások és a gazda fejlettségi állapota is döntő lehet. Az esetek túlnyomó többségében a gazdanövény által felvett és termelt tápanyagmennyiség nem fedezi mindkét partner szükségleteit, így tehát a vízért, a szerves ionokért és a metabolitokért folytatott verseny a legegyszerűbb magyarázata a gazdanövényben bekövetkező változásoknak (Whitney 1972; Knutson 1979; Fer és mtsai 1990). Drennan és El Hiweris (1979) azonban elsőként jelentős változásokat mutattak ki a növekedési hormonok és inhibitorok koncentrációjában *Striga*-val fertőzött cirok szöveiben. Kettéosztott cserépben végzett kísérleteikben kimutatták, hogy a *Striga* akkor is hasonló csökkenést okozott a gazda növekedésében, ha a fertőzés a gyökérrendszernek mindössze 30%-ára korlátozódott. Ez a megfigyelés azt

jelzi, hogy még a teljesen egészséges gyökérrendszer sem képes kompenzálni a korlátozott fertőzés hatását, mivel a parazita az egyszerű tápanyagelvonásnál valószínűleg sokkal közvetlenebb hatással van a gazda növekedési folyamataira. Később más paraziták vizsgálatával több szerző is megerősítette, hogy a gazdanövény tüneteiert (internódiumok kiterjedésének csökkenése, funguszos sarjhajtások megjelenése, virágkezdemények hiánya) nem elsősorban a parazita okozta tápanyagveszteség, mint inkább az élősködőnek a gazda metabolikus folyamatainak egyensúlyára gyakorolt zavaró hatása a felelős (Musselmann 1980; Glatzel 1987; ter Borg és van Ast 1991; Cechin és Press 1993).

A parazita fertőzés a gazdanövény felépítésére is jelentősen hat. Dörr és mtsai (1977) *Alectra vogelii*-vel fertőzött növényeken kimutatták, hogy a szívógyökér behatolásának környezetében fokozott laterális gyökérnövekedés tapasztalható. Számos más esetben is tapasztalták, hogy a gazdanövény gyökér-szár aránya a fertőzött növényekben megnő (összefoglaló táblázat: Press és Graves 1995), amelynek valószínűleg a fertőzéssel megnövekedett vízigény fedezése a feladata.

A parazita által a gazdanövényen előidézett növekedésélettani változások háttérében génexpressziós változások is állnak, amelyeket részletesen az 1.5.2. fejezet tárgyal.

1.5. A parazita kapcsolat vizsgálata molekuláris módszerekkel

Bár az élősködő növények és a növényi gazda-parazita kapcsolat tudományos igényű tanulmányozása már több évtizedre nyúlik vissza (Kujit 1969), a biológia - és ezen belül is a molekuláris biológiai

módszerek - rendkívül gyors fejlődésével csak napjainkban vált lehetővé a partnernövényekben zajló folyamatok molekuláris szintű vizsgálata. A parazita kapcsolat hatására a partnernövényeken megfigyelhető fiziológiás és morfológiai változások hátterében génexpressziós folyamatok állnak. Valószínűleg számos gén termékére van szüksége a parazitának a sikeres fertőzési folyamathoz (pl. szívógyökér létrehozása, működtetése), ugyanakkor a fertőzést követően a gazdanövényben a védekezési folyamatokban szerepet játszó gének kifejeződésére számíthatunk. A parazita kapcsolat létrejötte tehát feltételezhetően mindkét partnerben génexpressziós szinten is tetten érhető (Yoder 1999).

1.5.1. Génexpressziós változások a parazitában

Az élősködő növények sajátos életmódja feltételezi, hogy génkészletük is kisebb-nagyobb mértékben eltér más növényekétől. A genetikai különbségek alatt azonban valószínűleg nem elsősorban új gének megjelenését kell sejtenünk, hanem inkább a nem parazita növényekben is fellelhető struktúr- és szabályozógének mutációk által megváltozott felépítésű és/vagy működésű változatait (Haberhausen és mtsai 1992; Bommer és mtsai 1993; Haberhausen és Zetsche 1994; Press és Graves 1995). Így a parazita növények molekuláris genetikai folyamatait vizsgáló kutató joggal számíthat arra, hogy más növényi génekkel kapott hasonlóságok alapján következtethet a munkája során azonosított gének feltételezett funkciójára.

A parazita növényekben zajló folyamatok közül a gazdanövény felismerése és megtámadása során bekövetkező génexpressziós

változásokat eddig csak kevesen vizsgálták. Delavault és mtsai (1998) a gyökérparazita *Triphysaria versicolor* gyökerét kezelték a gazdanövények (*Arabidopsis thaliana*, *Trifolium repens*) gyökérkivonatával. A kezelt és kezeletlen gyökerek génexpressziós mintázatát összehasonlítva azonosítottak egy gént, amelynek expressziója a gazdanövények gyökérkivonatának hatására a gyökérben mintegy háromszorosára emelkedett. A szekvenciaadatok elemzése során megállapították, hogy a gén az aszparagin-szintáz géncsalád tagja. Az aszparagin a növényekben kedvező C/N aránya miatt többek között a szerves nitrogén mobilizációjában vesz részt. A szerzők ezért feltételezik, hogy a parazitában a megemelkedett expresszió következtében megjelenő többlet aszparagin a gazdanövényből történő nitrogén tápanyag-transzportban játszik fontos szerepet.

Ugyancsak *T. versicolor* gyökeréből izoláltak Matvienko és mtsai (2001) két kinon-oxidoreduktáz gént (*TvQR1*, *TvQR2*). E gének expressziója a *Triphysaria* gyökerében egy, a *Striga* hausztórium fejlődését kiváltó kinon típusú vegyület, a DMBQ hatására többszörösére emelkedik. Több parazita és nem parazita rokon faj DMBQ kezelést követő vizsgálata során úgy találták, hogy a *TvQR2* minden fajban, míg a *TvQR1* csak a parazitákban mutat emelkedett expressziót. A gének homológjainak ismeretében a szerzők feltételezik, hogy a *TvQR2* a rizoszférában található allelopatikus kinonok detoxifikálásában, a *TvQR1* pedig a parazita szívógyökerének fejlődését irányító folyamatokban bír fontos szereppel.

Subramaniam és mtsai (1994) *Cuscuta reflexa*-val végeztek kísérleteket. Az élősködő szárán citokininnel (benzil-adenin) hausztórium-

kezdemények kialakulását indukálták. A szívógyökér-kezdeményeket hordozó szárból cDNS klóntárat készítettek, amelyből citokinin indukcióra megjelenő klónokat izoláltak. E klónok szekvenciáját az adatbankokkal összevetve megállapították, hogy az egyik cDNS egy prolinban gazdag fehérjét (PRP) kódol (Subramaniam és Mahadevan, 1994), amely a kukorica embrióban, illetve paradicsom fiatal termésében kifejeződő génekhez mutat homológiát. A másik cDNS egy citokróm *b₅*-öt kódoló génből származik. A szerzők feltételezik, hogy az izolált cDNS-ek által reprezentált fehérjéknek a hausztórium fejlődésében lehet szerepe.

A közelmúltban Tada és mtsai (2000) számoltak be egy, a hausztóriumfejlődéssel összefüggő génről. Gazdanövénye nélkül növény *Cuscuta japonica* sötétvörös fény és érintési stimulus egyidejű alkalmazásával hausztóriumok képződését indukálták, majd a génexpressziós mintázatot összehasonlították az indukálatlan kontrollal. Így izoláltak egy cDNS-t (CJHSP17), amelynek szintje a hajtásokban a hausztóriumfejlődést kiváltó ingereket követően a kimutathatósági szint alá csökken. A gén egy alacsony molekulatömegű (17 kDa) fehérjét kódol, amely a hősokk proteinekkel mutat közeli rokonságot. Mivel a *CJHSP17* expressziója újra megemelkedik, ha a hausztóriumfejlődést gátolják, a szerzők valószínűsítik, hogy a géntermék eltűnése indikátorként hathat azokra a fiziológiai és fejlődési változásokra, amelyek a parazita viselkedés előfeltételei.

1.5.2. A parazita fertőzés által kiváltott génexpressziós válaszok a gazdanövényben.

A parazita támadás hatására a gazdában bekövetkező génexpressziós változásokat először ismert gének promóter régiójának vizsgálatával tanulmányozták. Joel és Portnoy (1998) olyan transzgenikus dohánynövényeket fertőztek vajvirággal (*Orobancha aegyptiaca*), amelybe előzőleg beépítették egy patogenezis hatására indukálódó (pathogenesis-related – „PR”) gén β -glükoronidáz (GUS) jelzőgénnel összeépített promóterét. A parazita fertőzés helyén erős promóteraktivitásra utaló kék szín megjelenését észlelték, míg a nem fertőzött növényi részekben nem tapasztaltak elszíneződést. Hasonló eredményre jutottak Westwood és mtsai (1998) is, egy másik, szintén a védekezési folyamatok során indukálódó paradicsom eredetű gén, a 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reduktáz (*HMGR*) promóterének GUS fúziós vizsgálata során. Megállapították, hogy a dohányban a vajvirág szívógyökerének behatolási helyén a gén expressziója már a behatolást követő 1 napon belül megemelkedik és fertőzés ideje alatt tartósan magas marad.

Mindmáig az egyetlen gént, amelynek kifejeződése egy parazita növény (boszorkányfű) támadásának hatására emelkedik meg, nagy büdöskéből (*Tagetes erecta*) izolálták Gowda és mtsai (1999). Bár ezen a növényen a *Striga* nem tud működőképes parazita kapcsolatot kialakítani (inkompatibilis kapcsolat), hausztóriumai mégis megtámadják a növény gyökerét, amelyre az a környező sejtek gyors apoptózisával válaszol. Az *NRSA-1* (non-host resistance to *Striga asiatica*) gén expressziója a büdöske gyökerében a parazita támadás helyén a támadást követő 5 napon belül megemelkedik, miközben a gyökér többi részén expressziója alacsony marad. A gén homológjainak vizsgálata alapján a szerzők valószínűsítik, hogy a gén által kódolt fehérje nem annyira a patogén felismerésében, mint

inkább a védekező folyamatok aktiválásában és/vagy szabályozásában játszhat szerepet.

Meglepő módon eddig egyetlen gént sem írtak le, amely a gazdanövényben kompatibilis parazitafertőzést követően indukálódik. A lucerna-aranka kapcsolat tanulmányozásával ilyen gének izolálására és jellemzésére nyílik lehetőség.

1.5.3. A génexpressziós különbségek kimutatásának általános módszerei.

A DNS szerkezetének felfedezésével és a centrális dogma megalkotásával szinte egyidejű az a feltételezés, hogy az élet sokszínűségéhez a gének változatossága mellett azok finoman szabályozott megnyilvánulása is hozzájárul. Ma már tudjuk, hogy a gének kifejeződésében nemcsak a transzkripciós folyamatok, hanem számos más (poszttranszkripciós, poszttranszlációs) esemény is szerepet játszik. Ennek ellenére a transzkripciós változásokból legtöbbször megbízhatóan következtethetünk egy gén expressziós változásaira is.

A molekuláris biológiai módszerek ugrásszerű fejlődése az eltelt másfél évtizedben lehetővé tette, hogy a génexpressziós különbségeket közvetlenül is nyomon tudjuk követni. A már ismert gének transzkripciós változásainak kimutatása napjainkban szinte önálló iparágga nőtte ki magát (DNS chipek automatizált gyártása, kiértékelése), amely előrevetíti a következő évtizedekben egy genetikára támaszkodó orvostudomány megjelenését. A különböző sejttípusok, egészséges és beteg szövetek, vagy akár egy parazita által megtámadott illetve nem

fertőzött növény génexpressziós mintázatának összehasonlítása fontos információkkal szolgálhat a sejtekben zajló molekuláris és biokémiai folyamatok feltárásához és megértéséhez.

Az expressziós különbségeket mutató ismeretlen gének izolálását célzó technikák (kimerítéses hibridizáció, differenciál-hibridizáció) elsőként a génkönyvtárak megjelenésével tűntek fel. Az utóbbi években a PCR alapú módszerek kerültek előtérbe, mint a cDNS AFLP, vagy a differential display. E technikák számos előnnyel rendelkeznek a korábbiakhoz képest: az összehasonlításhoz nem kell génkönyvtárat készíteni, így kevesebb kiindulási mintából gyorsabban kapunk értékelhető eredményt. Mivel PCR alapúak, érzékenységük is nagyobb, alkalmazásukkal már néhány kópiás különbség is láthatóvá tehető. Éppen ebből fakadnak azonban hátrányaik is: a megjelenített különbségek sokszor nem csak egy génterméket takarnak, amelyek között a gondos tisztítási és válogatási lépéseket követően is viszonylag magas a téves pozitívok aránya. További nehézséget jelent, hogy a kiválasztott cDNS-eket klónozni kell, illetve, hogy azok csak ritkán teljes hosszúságúak, ezért teljes változatuk megismeréséhez további molekuláris módszerek alkalmazása szükséges.

Munkánk során egyik feladatunk az alapállapotú lucerna és aranka szöveteknek a parazita régióval történő, transzkripciós szintű összehasonlítása volt. Célunk elérésére a nagy érzékenységgű differential display-t és a könnyebben értékelhető differenciál-hibridizációt választottuk. E két eltérő technika alkalmazásával kívántuk megvalósítani a különbséget mutató cDNS-ek minél egyértelműbb detektálását és kiválasztását.

1.6. A lucerna-kisaranka parazita kapcsolat, mint modellrendszer

A *Cuscuta* genusba tartozó fajok a növényi élősködés vizsgálatának lehetséges modellnövényei. Rendkívül széles földrajzi elterjedésük és gazdasági jelentőségük önmagában is indokoltá teszi vizsgálatukat. Gyors növekedésük (Szatala és Gimesi 1965), rövid regenerációs ciklusuk, nagy reprodukciós képességük, valamint könnyű üvegházi fenntarthatóságuk és szaporításuk mind laboratóriumi alkalmazásuk mellett szól. Kedvező genetikai tulajdonságaik (diploiditás, kis genomméret) pedig különösen alkalmassá teszi az aranka fajokat a növényi élősködés molekuláris szintű tanulmányozására. A modellrendszer további előnye, hogy a lucerna (és közeli rokona, a diploid *M. truncatula*) a mezőgazdasági növények közül az egyik legrégebben tanulmányozott, genetikailag jól jellemzett faj. Az utóbbi évek kutatásai és az előrehaladott genomszekvenálás eredményeképpen egyre részletesebb géntérkép (Kiss és mtsai 1993; Bell és mtsai 2001) és mintegy 120 ezer EST szekvencia (Kiss György Botond személyes közlése; Györgyey és mtsai 2000) áll rendelkezésünkre, amely megkönnyíti a parazita kapcsolat vizsgálata során előtérbe kerülő gének és környezetük tanulmányozását.

1.7. A környezeti hatások érzékelése a növényekben és az ellenük való védekezés

A növények a környezet változásaira érzékenyen reagálnak. Mivel – ellentétben az állatokkal – nem tudnak elmenekülni a számukra

kedvezőtlen körülmények elől, a túléléshez jól működő felismerő- és védekezőrendszert fejlesztettek ki. Az e téren végzett kutatások igazolták, hogy a növények a környezeti stresszek széles skáláját képesek érzékelni és azokra választ adni (Knight 2000).

Az utóbbi évek kutatásainak köszönhetően egyre részletesebb információkkal rendelkezünk a környezeti stresszek hatására a növényekben zajló folyamatokról. A környezeti és hormonális változásokat a sejtmembránban található receptorfehérjék érzékelik. A bennük keletkező, ún. elsődleges szignál a sejtben különböző útvonalakon jut el a sejtmagig. Egy részüket a receptortól kiinduló foszforilációs kináz kaszkád közvetíti, míg más részük másodlagos hírvivő (secondary messenger) molekulák közvetítésével erősödik fel és válik értelmezhető jellé. E jelátviteli utak a sejtben bonyolult hálózatot alkotnak; számos ponton keresztezhetik egymást, és szinergista ill. antagonista hatással bírhatnak, valamint nagy mértékben függenek a sejt belső állapotától is. A környezeti hatások által kiváltott génexpressziós változások tehát minden esetben a külső folyamatok és a sejt belső állapotának hatására létrejövő jelátviteli folyamatok eredményeként következnek be. A gének szabályozásának további lehetőségét kínálja, hogy a legtöbb stressz számos jelátviteli utat képes egymással párhuzamosan bekapcsolni, illetve, hogy a különböző stresszek is sokszor azonos útvonalakat aktiválnak (Braam és mtsai 1997; Trewavas és Malhó 1998; Gong és mtsai 1998; McAinsh és Hetherington 1998; Bowler és Fluhr 2000).

Jelenleg nincsenek pontos ismereteink a parazita által a gazdanövényben előidézett jelátviteli folyamatokról. Valószínű azonban,

hogyan a parazita támadás is számos ilyen útvonalat aktivál. Az élősködő megtapadása a gazdán, a szívógyökerek behatolása, a tápanyagok és a víz elszívása, valamint az ezeket kísérő hormonális változások egyenként is kiválthatják a gazda különböző védekező reakcióit. Ezek során az abiotikus és hormonális hatásokhoz nagyon hasonló, azokkal részben, vagy teljesen átfedő jelátviteli útvonalak és ezáltal a védekezésben szerepet játszó gének kapcsolhatnak be.

Mivel ismereteink a különböző abiotikus stresszek és szignálmolekulák által a növényekben kiváltott válaszreakciókról az utóbbi évtizedben jelentősen bővültek, a parazita hatását vizsgáló kutatónak jó kiindulási alapot jelenthet ezek tanulmányozása. A következő fejezetekben röviden a növényekben zajló érzékelési és védekezési folyamatokról, valamint az ezekben fontos szerepet játszó génekről esik szó a dolgozat szempontjából lényeges megvilágításban.

1.7.1. A Ca^{2+} szerepe az érzékelésben és a Ca^{2+} -kötő fehérjék

A sejtmembránban keletkező szignálok jelentős részét a citoszolban másodlagos hírvivő molekulák közvetítik. E molekulák között kulcsszereppel bír a kétértékű kalcium ion. Számos környezeti hatásra a sejt belső tárolóiból (ER, vakuólum), illetve a sejtmembránban lévő csatornafehérjéken keresztül (Yue és mtsai 2001) a sejten kívüli térből szabad Ca^{2+} ionok áramlanak a citoplazmába (Knight és mtsai 1991; Campbell 1996), így a citoszolban hirtelen megnő a Ca^{2+} ionok koncentrációja. A koncentrációváltozást a citoszolban Ca^{2+} -kötő fehérjék (kalmodulinok, kalmodulin-szerű proteinek) érzékelik és alakítják jellé: a

felszabadult Ca^{2+} ionok az EF-hand struktúrákhoz kötődve megváltoztatják a fehérje másodlagos szerkezetét és ez a kalcium-kalmodulin komplex a sejtben számos célmolekulát (pl. kinázok) aktivál, amelyek további kölcsönhatásokkal „láncreakció-szerűen” közvetítik a szignált a sejtmagig (Zielinski 1998).

A kalmodulinok elsődleges szerkezete nagymértékben konzervált az eukarióta világban. Általában kis méretű, kb. 17 kDa nagyságú fehérjék. Harmadlagos szerkezetük súlyzóra emlékeztet, amelyben a két globuláris domént egy α -hélix linker régió kapcsolja össze. Ez a szerkezet nagyfokú rugalmasságot biztosít a molekulának, amely a más proteinekkel való kölcsönhatásokban játszik fontos szerepet. A növényi kalmodulinok négy Ca^{2+} -kötő doménnel, ún. EF-handdel rendelkeznek (Roberts és Harmon 1992; Zielinski 1998). Az EF-hand struktúra központi része 12 aminosavból áll, amelyek a térben hurkot (loop) alkotnak és a Ca^{2+} ionok megkötését végzik. Ezt mindkét oldalról további 10-12 aminosavból álló α -hélixek (E és F) határolják. Egy EF-hand hurokban a Ca^{2+} ionok pentagonális bipiramis szerkezetet alakítanak ki. A Ca^{2+} megkötésében a 12 aminosavból csak hat (az 1, 3, 5, 7, 9 és 12-es pozícióban lévő) vesz részt. Ezen aminosavak cseréje a kötőképesség elvesztéséhez, vagy annak megváltozásához vezethet, megnövelheti például a loop más fémionokhoz (pl. Mg^{2+}) való affinitását (Nakayama és mtsai 2000).

Bár a kalmodulinok önmagukban nem rendelkeznek enzimaktivitással, a sejtekben többféle funkciójuk is lehet. Legfőbb szerepük az, hogy a fent említett módon kulcsszerepet játszanak a sejt érzékelési folyamataiban; a citoszolikus Ca^{2+} szint változásának hatására különböző jelátviteli útvonalakat kapcsolnak be, amely végül a

génexpressziós mintázat megváltoztatása révén hozzásegíti a növényt, hogy a környezeti hatásokhoz minél hatékonyabban alkalmazkodjon (Campbell 1996). Számos szerző felveti ugyanakkor, hogy a kalmodulinoknak éppen hatékony Ca^{2+} -kötő képességüknél fogva fontos szerepe lehet a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció szabályozásában is. Mivel a stressz hatására a citoszolban hirtelen megnövekedett Ca^{2+} szint elérheti a citotoxikus értéket is, valószínű, hogy e fehérjéknek a szabad Ca^{2+} megkötése által fontos detoxikáló szerepe is van (Gilroy és mtsai 1987). Ez a folyamat hozzásegítheti továbbá a sejtet, hogy mielőbb visszaállhasson a stressz előtti ionkoncentráció (Gilroy és mtsai 1986; Braam 1992a), és így az készen állhasson az újabb stresszek érzékelésére. A kalmodulinoknak ezenkívül szerepük lehet még az ioncsatornák szabályozásában (Kung és mtsai 1992), valamint mikrotubulusok elrendeződésének szabályozásában is (Cohen és Klee 1988).

1.7.2. A „PR” gének és a PR10 géncsalád

A kedvezőtlen környezeti változások védekező reakciók beindulását eredményezik, amelyek az élettani, morfológiai és biokémiai válaszok mellett jelentős génexpressziós változásokat is jelentenek. Az abiotikus stresszek mellett a növények a szabadban számos biotikus stressznek is ki vannak téve (gombás és bakteriális fertőzések, parazita növények, állati kártevők). A védekezési mechanizmusok bekapcsolása számos gén indukcióját foglalja magába (összefoglaló: Hammond-Kosack és Jones 1997), amelyek közül legismertebbek a fenilpropanoid szintézis út

enzimeit (fenilalanin-ammonia-liáz (PAL), salkon-szintáz (CHS), salkon-izomeráz (CHI), stb.) kódoló gének. E másodlagos anyagcsereútvonal beindításával számos antimikrobiális hatású (fitoalexinek) és sejtfalerősítő (lignin) anyagot szintetizál a növény. Ezek mellett a patogének elleni szerkezeti „védőgátak” erősítésében fontos szereppel bírnak a hidroxiprolinban gazdag glikoproteinek (HRGP) és peroxidázok. A kitináz és pektináz a patogének sejtfalának degradációjában, a β -1,3 glükánáz és lipoxigenáz enzimek pedig a fertőzésre adott válaszok továbbvitelében játszanak szerepet. A patogén fertőzésre válaszoló gének többségének funkciójáról azonban nincsenek pontos ismereteink.

Bár a patogén támadások, vagy az ahhoz hasonló körülmények során indukálódó gének fehérjetermékei mind felépítésükben, mind funkciójukban gyökeresen eltérhetnek egymástól (Dixon és Lamb 1990; Dixon és mtsai 1994), azokat összefoglaló néven PR (pathogenesis-related; patogenezissel összefüggő) géneknek nevezzük (van Loon és mtsai 1994). E géncsalád tagjai a növényekben széles körben elterjedtek. Stresszmentes körülmények között csak nyomnyi mennyiségben termelődnek, de koncentrációjuk sokszorosára nő patogén támadások és más stresszek hatására. Az utóbbi évtizedben leírt nagyszámú és sokféle PR fehérje miatt a PR gének osztályozásában a kezdeti 5 családon kívül (PR 1-5) további 6 család (PR 6-11) létrehozása vált szükségessé (van Loon és mtsai 1994). A 11 család tagjainak száma ma már 100 fölött van, amelyek többsége extracelluláris protein: megtermelődése után kikerül a sejtből és ott fejt ki hatását.

Külön családba (PR-10) tartoznak a kisebbséget alkotó sejten belüli (intracelluláris - IPR) fehérjék. E család első képviselőit Somssich és

mtsai (1986; 1988) petrezselyemből izolálták. Azóta számos növényfajban felfedezték már őket, többek között a kétszikű borsóban (Fristensky és mtsai 1988; Chiang és Hadwiger 1990), burgonyában (Matton és Brisson 1989), babban (Walter és mtsai 1990), szójában (Crowell és mtsai 1992) és lucernában (Breda és mtsai 1996), valamint az egyszikű aszparátuszban (Warner és mtsai 1992), liliomban (Huang és mtsai 1997) és cirokban (Lo és mtsai 1999) is. E fehérjék közel azonos nagyságúak (kb. 16 kDa) és egymással nagyfokú homológiát mutatnak, ezért feltételezhetően valamennyien egy közös ősből alakultak ki.

A géncsalád képviselői a legtöbb növényben több kópiában fordulnak elő (Iturriaga és mtsai 1994; Wang és mtsai 1999) és indukciójukat a stresszek széles skálája képes kiváltani. Mindez azt sugallja, hogy e gének a növényben fontos szereppel bírhatnak a káros környezeti hatások elleni védekezésben, bár az általuk kódolt fehérjék biológiai funkciójáról jelenleg csak sejtéseink vannak. A géncsalád egyes tagjai a zeller (Breiteneder és mtsai 1995), illetve különböző fák pollenjében található allergén fehérjékhez (Breiteneder és mtsai 1989) mutatnak hasonlóságot. Számos PR10 fehérje ribonukleáz aktivitással rendelkezik (Walter és mtsai 1996; Bufe és mtsai 1996), és mint ilyen, feltételezhetően szerepe van a sejten belüli degradációs és érési folyamatokban (Moiseyev és mtsai 1994; Moiseyev és mtsai 1997).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A növényi élősködés molekuláris alapjainak megértését célzó kutatások 1992-ben kezdődtek meg a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Molekuláris Genetikai Intézetében dr. Lados Miklós vezetésével. Modellrendszerül a hazai mezőgazdaság egyik legjelentősebb pillangós takarmánynövényét, a lucernát és élősködőjét, a herefojtó arankát választották. Az arankafajok (és általában a parazita növények) molekuláris vizsgálata világszerte újkeletű témának számít, ezért a kutatócsoportra várt a más növényekre már széles körben alkalmazott alapvető technikák kidolgozásának és adaptálásának feladata is. A kutatások ezért két irányban indultak el. A csoport célja egyfelől az aranka laboratóriumi (üvegházi és *in vitro*) körülmények közötti fenntartásának kidolgozása volt, amely egyúttal alapul szolgált a későbbi génbeviteli transzformációs kísérletekhez. Ezzel párhuzamosan korszerű molekuláris genetikai technikák alkalmazásával megindult a lucerna-aranka kapcsolat molekuláris tanulmányozása is. Jómagam 1996-ban kapcsolódtam be az élősködés molekuláris biológiai hátterének vizsgálatába.

Munkám célkitűzései a következők voltak:

- Olyan lucerna és/vagy aranka eredetű gének azonosítása, amelyek expressziója megváltozik a parazitakapcsolat kialakulása során.

- Az izolált gének jellemzése elsődleges szerkezetük alapján, valamint feltételezett szerepük előrejelzése más növényekből ismert homológiák felhasználásával.
- Az azonosított gének expressziós analízise: a parazitizmus során fellépő, és más, természetes körülmények között gyakori abiotikus és biotikus stresszek, valamint hormonális változások hatásának vizsgálata az izolált gének kifejeződésére.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Felhasznált anyagok

3.1.1. Vegyszerek

Kísérleteinkhez, ahol azt külön nem jelöltük, a Sigma, Serva és Reanal cégektől vásárolt vegyszereket használtuk. A restrikciós endonukleázokat a Fermentas és Promega cégektől szereztük be.

3.1.2. Baktériumtörzsek

A klónozási munkákhoz az *Escherichia coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) törzsét (Hanahan 1983) használtuk.

A patogén kezelés során a *Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae* és a *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* növénypatogén törzsekkel dolgoztunk. A baktériumtörzseket RE. Stahl (University of Florida) és J. Schmidt (INRA, Versailles) szíves hozzájárulásával Prof. Robert Esnault (Gif-Sur Yvette, Franciaország) bocsátotta rendelkezésünkre.

3.1.3. Táptalajok

Az *E. coli* bakteriális és fág munkákhoz LB és NZY komplett táptalajt (Sambrook és mtsai 1989) használtunk, amelyet a megfelelő anyagokkal (MgCl₂, antibiotikumok, X-gal, IPTG) egészítettünk ki.

A növénypatogén baktériumokat antibiotikum-mentes YDA táptalajon (10g/L glükóz, 5g/L élesztőkivonat, 5g/L pepton), 30°C-on növesztettük.

3.1.4. Primerek

Munkánk során a primereket az alkalmazott technikáknak megfelelően választottuk meg.

<u>Technika</u>	<u>primer neve</u>	<u>szekvenciája</u>	<u>hossza (nt)</u>
Differential display	H-T ₁₁ G	5'- aag ctt ttt ttt ttt g -3'	16
	H-T ₁₁ C	5'- aag ctt ttt ttt ttt c -3'	16
	H-AP1	5'- aag ctt gat tgc c -3'	13
	H-AP2	5'- aag ctt cga ctg t -3'	13
	H-AP3	5'- aag ctt tgg tca g -3'	13
	H-AP4	5'- aag ctt ctc aac g -3'	13
	H-AP5	5'- aag ctt agt agg c -3'	13
	H-AP6	5'- aag ctt gca cca t -3'	13
5' – RACE	CM1	5'- att cgg agc gac tca tca tc -3'	20
	CM2	5'- aga atc agc atc aac gtt tc -3'	20
	PR1	5'- gta att agg gtt tgc cac gac g -3'	22
	PR2	5'- ccc tgt tcc tcc tac caa gc -3'	20
Szekvencia-meghatározás	T7	5'- aat acg act cac tat agg gcg -3'	21
	T3	5'- att aac cct cac taa agg gaa c -3'	22
	SK	5'- tct aga act agt gga tcc ccc -3'	21
	KS	5'- cga ggt cga cgg tat cga taa g -3'	22

3.1.5. Munkánk során használt és létrehozott plazmidok

pBluescript II SK+ (Stratagene) Általános klónozó vektor
pGEM-T Easy (Promega) Általános klónozó vektor
pTB15 pSK::*EcoRV* A PPRG1 cDNS DD-vel azonosított 3' vége (213 bp)
pTB16 pSK::*EcoRV* A PPRG1 cDNS RACE-vel azonosított 5' vége (397 bp)
pTB21 pSK::*EcoRV* A PPRG2 cDNS DH-val azonosított 3' vége (599 bp)
pTB50 pSK::*EcoRV* A PPRG2 cDNS DH-val azonosított 3' vége (552 bp)
pTB215 pGEM-T Easy A PPRG2 cDNS RACE-vel azonosított 5' vége (343 bp)

3.2. A növények kezelése

3.2.1. Növények nevelése üvegházban és fitotronban

A Kompolton gyűjtött aranka (*Cuscuta trifolii*, Bab. et Gibbs) és lucerna (*Medicago sativa* bv. *Verko* L.) magvakat Dr. Bócsa Iván, a Gödöllői Agrártudományi Egyetem Fleischman Rudolf Intézetének professzora bocsátotta rendelkezésünkre. A magvakat a felhasználásig sötétben, 4-6°C-on tároltuk.

A lucerna magvakat Florasca „B” típusú virágföldbe vetettük 1-1,5 cm mélyre. A gombás fertőzések megakadályozására a talajt a vetéssel egyidőben és 3 héttel utána Previcur 607 (hatóanyag: propamocarp) 0,15%-os oldatával kezeltük. Az üvegházban tartott növényeknél tavasztól őszig nem alkalmaztunk mesterséges megvilágítást. A fitotronban tartott növényeket normál körülmények (16/8 h fény/sötét fotoperiódus, 80% relatív páratartalom és 23±2°C) mellett neveltük.

Az aranka magvak kemény héját csíráztatás előtt 20 percig cc. H_2SO_4 -ben való áztatással távolítottuk el, a magvakat desztillált vízben 5-7-szer alaposan mostuk, majd nedvesített szűrőpapíron petri csészében, szobahőmérsékleten, sötétben csíráztattuk (Bakos és mtsai 1995). A csírázó magvakat naponta kiemeltük és az üvegházban nevelt fiatal (4-8 hetes) lucerna növénykéik közelébe helyeztük, ahol azok további növekedésük során megtalálták gazdanövényeiket.

3.2.2. A növényi minták gyűjtése

4. ábra. A kisaranka és a lucerna között kialakuló parazita kapcsolat. A keretezett részek a vizsgálatokhoz használt különböző szöveti mintákat jelzik: I. Egészséges lucerna növény, II. A szívógyökeret is tartalmazó aranka-lucerna minta, III. A lucernával még nem érintkező, szívógyökérrel nem rendelkező aranka.

A differential display-hez és differenciál hibridizációhoz használt növénytípusokat üvegházban nevelt növényekről gyűjtöttük.

Az arankával nem érintkező lucerna minta (I) csak a lucerna szárát tartalmazta, a nem parazitáló aranka mintába (III) csak a más aranka szárákkal sem érintkező, intenzív növekedésben lévő arankahajtást gyűjtöttük. A parazita régiót (II) tartalmazó minta kizárólag a két növény egymással szorosán érintkező, kifejtett hausztóriumot is tartalmazó szárdarabjait foglalta magába (4. ábra).

A stresszkezelések során a kezelt lucerna növénykéik hármas összetett leveleit gyűjtöttük. A megfelelő inkubációs idő elteltével a levélkéket az eltávolítást követően azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és felhasználásig $-70^{\circ}C$ -on tároltuk.

3.2.3. Stresszkezelések

A gének különböző kémiai anyagokra (fitohormonok, szignálmolekulák) bekövetkező transzkripciós változásait fiatal, 6-10 hetes, lucerna hajtásokon vizsgáltuk. Az egészséges lucerna hajtások 3-4 összetett levélkét tartalmazó felső részét levágtuk, és olyan Eppendorf csövekbe állítottuk, amelyek tetejét és alját előzőleg eltávolítottuk. Ezután a hajtáskákat steril desztillált vízbe állítottuk és egy éjszakán át hagytuk akklimatizálódni. Másnap reggel a növények mozgatása nélkül a vizet óvatosan eltávolítottuk és a kezeléshez használt anyagok 100 μ M-os oldatára cseréltük. A só és ozmotikus stresszhez NaCl 2%-os illetve PEG6000 10-30%-os oldatát használtuk. A mintákat ezután az ábrákon feltüntetett inkubációs idők elteltével gyűjtöttük.

A mechanikai stresszkezeléseket cserepes növényeken, üvegházban végeztük az alábbiak szerint: *Érintés*: a levélkéket 20-szor egymás után gyengéden két ujjal 1 mp-re megfogtuk, majd 1 mp-re elengedtük. *Eső*: a növényeket 200 ml desztillált vízzel kb. 50 cm-ről permeteztük, amíg a cseppecskék a levelek 80-90%-án megjelentek. *Szél*: 1000 W-os hajszárítóval a leveleket kb. 1 m-ről nem melegített levegővel 1 percig fűjtük. *Sebzés*: a levélkéket egyenként érszorító csipesszel háromszor megfogtuk, hogy az látható sebet hagyjon.

A hideg (4°C) és hőkezelést (42°C) megelőzően 2 napig a cserepes növényeket fitotronban a fent leírt normál körülmények között tartottuk, majd a hőmérsékletet 10-15 perc alatt a kívánt hőfokra változtattuk és a kezelés teljes ideje alatt ott tartottuk.

A patogén kezelések során 6 hetes lucernanövénykének leveleit a fonák felől injekciós fecskendő segítségével infiltráltuk O/N növesztett *Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae* és *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* baktériumkultúrák 10 mM-os $MgCl_2$ -ban felvett, kb. 10^9 sejt/ml töménységű szuszpenziójával. Indukciós kontrollként steril oldatot használtunk. A fertőzött leveleket a feltüntetett időpontokban gyűjtöttük be.

Minden kezelést legalább két ismétlésben, az indukciós körülmények változatlanul hagyásával végeztünk el. A kezelések folyamán fokozottan ügyeltünk arra, hogy a növények más, zavaró hatásnak ne legyenek kitéve!

3.3. Műveletek nukleinsavakkal

3.3.1. RNS tisztítása növényi szövetekből

A totál RNS mennyiséget a növényi szövetekből Verwoerd és mtsai (1989) módszerével tisztítottuk. A növényi szöveteket folyékony nitrogénben elporítottuk, 0,2 M Na-acetát (pH 5,0), 1%-os SDS, 10 mM EDTA oldat és fenol 1:1 arányú keverékével, majd 2-szer fenol-kloroform (1:1) eleggyel, végül kloroformmal extraháltuk és 1 tf 10 M LiCl-dal kicsaptuk. A csapadékot 2,5 M LiCl-ban és 2-szer 75%-os etanolban mostuk, szárítottuk és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.3.2. Növényi össz-DNS tisztítása

A növényi szövetek össz-DNS-ét a Shure és mtsai (1983) által leírt módon izoláltuk.

3.3.3. Plazmid DNS tisztítás

A vizsgálatokhoz szükséges plazmid DNS-t az „alkalikus lízis” módszerével tisztítottuk (Birnboim és Doly 1979). A szekvencia meghatározáshoz használt DNS oldatból RN-áz A enzimmal degradáltuk az RNS-t (37°C 30 perc), majd a DNS-t egy órán keresztül jégen tartva 13%-os PEG6000, 1,6 M NaCl oldattal csaptuk ki, 75%-os etanolban kétszer mostuk, szárítottuk és 20-50 µl desztillált vízben oldottuk vissza.

3.3.4. Emésztés restrikciós endonukleázokkal

A bakteriális plazmid DNS-eket 10-20 µl reakciótérfogatban a gyártó által javasolt pufferben 37°C-on 1-2 órán át emésztettük. A növényi össz-DNS mintákat 200 µl reakciótérfogatban 100-150 U enzimmal egy éjszakán át inkubáltuk.

3.3.5. DNS fragmentumok elválasztása

A restrikciós emésztés és a PCR során keletkező DNS fragmentumokat 1%-os agaróz gélen választottuk el 1 mg/l etídium-bromidot tartalmazó TBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM bórsav, 20 mM EDTA) pufferben és UV fényben tettük láthatóvá.

3.3.6. DNS izolálása agaróz gélből

A kívánt DNS fragmentumokat az agaróz gélből a QIAEX II Gel Extraction Kittel (QIAGEN) izoláltuk a gyártó utasításait követve.

3.3.7. A polimeráz láncreakció (PCR – polymerase chain reaction)

Munkánk során a PCR reakciókhoz - amikor rendelkezésünkre állt - a gyártók által előírt kondíciókat alkalmaztuk. A többi esetben a reakciókat 30-50 µl végtérfogatban 1-100 ng DNS templátot, 1,5 mM MgCl₂-ot, 30-50 pmol primert, 0,4 mM dNTP mixet, megfelelő puffert és 1 U Taq polimeráz enzimet (Promega) tartalmazó eleggyel végeztük. A reakcióelegyet a denaturálás (5 perc 95°C) után 30-35 ciklusban 94°C-on 30 mp-ig, 50°C-on 30 mp-ig és 72°C-on 1 percig inkubáltuk, majd 72°C 10 perces elongáció után 4°C-on tároltuk.

3.3.8. PCR termékek klónozása

A PCR során kapott fragmentumokat *EcoRV* restrikciós endonukleázzal emésztett pSK+ vektorba építettük. A PCR reakció után a kapott terméket feltöltöttük (a kész PCR reakcióhoz 2 µl 10 mM dNTP keveréket és 5 U Klenow enzimet adtunk, majd 37°C-on 30 percig inkubáltuk), és szétválasztás (agaróz gélelektroforézis) után a gélből visszaizoláltuk. A fragmentumokból kb. 100 ng-ot a vektorral 1-10 vektor-fragment moláris arányban összekevertünk és 10 µl

végtérfogatban rATP jelenlétében 1 U T4 ligáz enzimmel egy éjszakán keresztül 8°C-on ligáltunk.

3.3.9. Plazmid DNS bejuttatása baktérium sejtekbe

A transzformáláshoz használt *E. coli* DH5 α kompetens sejteket Inoue és munkatársai (1990) módszere szerint készítettük és 100 μ l -es aliquotokban felhasználásig –70°C-on tároltuk. A transzformálás során a sejteket a bejuttatandó plazmid DNS-sel összekevertük, 30 percig jégen tartottuk majd 42°C-on 30 mp-ig hősokkoltuk és további 5 percig jégen inkubáltuk. Az X-galt és IPTG-t tartalmazó szelektív szilárd táptalajra szélesztés előtt 40 percig antibiotikum-mentes folyékony tápoldatban 37°C-on regeneráltuk a sejteket. A felnőtt kolóniákat másnap a kék-fehér szelekció segítségével válogattuk szét.

3.3.10. DNS szekvencia meghatározása

A DNS klónok nukleotid-sorrendjét Sanger és mtsai (1977) dideoxi-terminációs módszerével a SequiTherm Cycle Sequencing Kittel (Epicentre, USA) határoztuk meg. A reakciókat 6%-os poliakrilamid gélen TBE pufferben választottuk el, majd a gél 3MM Whatmann papíron 2 órán keresztül szárítottuk és egy éjszakán át X-Omat AR (Kodak, Rochester, NY, USA) filmre exponáltuk. A leolvasott szekvenciaadatokat a Genetics Computer Group (Wisconsin, USA)

programcsomagjával, valamint a FASTA (Pearson és Lipman 1988) és BLAST (Altschul és mtsai 1997) programokkal analizáltuk.

3.3.11. Differential display

A differential display-hez (Liang és Pardee 1992) a fent leírtak alapján izolált totál RNS mintákból indultunk ki. Mintánként 10 µg RNS-t 10 U RQ DN-ázzal (Promega Corporation, UK) kezeltünk (37°C 30 perc), majd felhasználásig 300 ng-os aliquotokban liofilizálva –70°C-on tároltuk. A differential display-hez az RNA Image Kit-et (GenHunter Corporation, Nashville, USA) használtuk és mindenben a gyártó által leírt protokoll alapján jártunk el. Az első szál cDNS szintézishez a kitben található HT₁₁G és HT₁₁C horgony (anchor) primereket használtuk, az ezt követő PCR reakcióhoz pedig 6 arbitrary primert (H-AP1-től H-AP6-ig). A továbbiakban a szekvenálásnál leírtak szerint jártunk el. Exponálás előtt a röntgenfilmet alaposan rögzítettük és orientáltuk. Előhívás után a különbséget mutató fragmentumokat a gélből visszaizoláltuk (10 perc forralás desztillált vízben, kicsapás) és ismételt PCR reakcióban felszaporítottuk őket.

3.3.12. cDNS klóntár készítése, amplifikálása és szabadítása

A cDNS szintézishez 5 µg mRNS mintából indultunk ki, amelyet a lucerna-kisaranka parazita kapcsolatból származó összRNS mintából Oligotex-dT mRNA Kittel (QIAGEN) tisztítottunk. A cDNS klóntár készítése, amplifikálása és szabadítása során a ZAP-cDNA (Stratagene,

San Diego, CA) Kitet a gyártó előírásainak megfelelően alkalmaztuk. Az átlagos inszertméret megállapításához a PCR reakciókban az SK és KS primereket és a 3.3.7. fejezetben leírt kondíciókat alkalmaztuk. A felszaporított klóntár titerét meghatároztuk, majd a fáguszuspenziót 7% DMSO hozzáadása után 1 ml-es aliquotokban -70°C-on tároltuk. A szabadítás után kapott plazmidkeveréket 100 ng/ml koncentrációjúra hígítottuk és ebből 1 µl-t használtunk a differenciál-hibridizációt megelőző transzformáláshoz.

3.3.13. 5' – RACE (rapid amplification of cDNA ends by PCR)

A csonka cDNS-ek hiányzó, 5' végét e módszerrel (Frohman és mtsai 1988; Harvey és Darlison 1991) azonosítottuk. A klónok ismert bázissorrendje alapján a cDNS-ekre azok 5' vége felé író 20-26 nukleotidból álló rövid indítószekvenciákat (primereket) terveztünk. A *PPRG1* esetében a külső primerrel (CM1) a parazita kapcsolatból származó totál RNS-ből reverz transzkripciót, majd terminális transzferázzal elvégzett „farkazás” után első kör PCR-t, illetve a belső primerrel (CM2) második kör PCR-t végeztünk. A *PPRG2* esetében a cDNS klóntárból végeztük az első kör PCR-t (PR1 és SK primerekkel), majd a belső primerrel (PR2) a második kör PCR-t. Mindkét esetben a második PCR reakciókból kapott termékek közül a megfelelő nagyságúakat klónoztuk és szekvenáltuk.

3.3.14. DNS fragmentumok radioaktív jelölése

A hibridizációs próbaként használt DNS fragmentumokat α -³²P-dATP-vel jelöltük a random priming (Feinberg és Vogelstein 1983) módszerével. Az első szál cDNS próbákat 10 µg totál RNS-ből kiindulva Sambrook és munkatársai (1989) szerint készítettük.

3.4. Hibridizációs technikák

3.4.1. Differenciál-hibridizáció

A differenciál-hibridizációhoz a bakteriofágokból szabadított plazmid DNS-t tartalmazó baktériumok közül kék-fehér szelekcióval kiválasztottuk az inszertet tartalmazó klónokat, majd a kolónia hibridizációnál leírtak szerint jártunk el. A mintákat tartalmazó membránokat mindhárom vizsgált mRNS populációból (3.2.2. fejezet) szintetizált jelölt első szál cDNS próbával hibridizáltuk. Két hibridizáció között a radioaktív próbát a filterről 0,1%-os SDS-ben történő 3 perces forralással távolítottuk el.

3.4.2. DNS-DNS „Southern” hibridizáció

A restriktációs endonukleázokkal emésztett növényi össz-DNS mintákat 0,8%-os agaróz gélben választottuk el, majd denaturálás (2x20perc 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) és neutralizálás (2x20 perc 0,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH=8) után 10xSSC pufferben Zeta-Probe nylon membránra (Bio-Rad) blottoltuk (Southern 1975) és 80°C-on 2 órás sütéssel (Sambrook és mtsai 1989), majd UV crosslinkkel fixáltuk. A hibridizációt random priminggel jelölt próba DNS-sel, Church pufferben (Church és Gilbert

1984) 20 órán keresztül végeztük 65°C-on, majd ugyanezen a hőmérsékleten 2-szer 30 percig 0,1% SDS, 2xSSC oldatával mostuk. A hibridizációs képeket Hyperfilmen (Amersham) tettük láthatóvá és az Adobe Photoshop program (Adobe Systems) segítségével formáztuk és feliratoztuk.

3.4.3. DNS-RNS „northern” hibridizáció

Mintánként 20 µg totál RNS-t megfelelő kezelés után 1%-os denaturáló formaldehides agaróz gélen választottunk el (Sambrook és mtsai 1989), majd 20 percig 10xSSC-ben mostuk. A blottolást és a hibridizációt a Southern hibridizációnál leírt módon végeztük. Specifikus próbaként a TB16 (*PPRG1*) és a TB21 (*PPRG2*) klónok jelölt inszertjeit használtuk.

3.4.4. A „reverse northern” hibridizáció

A PCR termékeket 3 ismétlésben 1%-os agaróz gélen elválasztottuk, blottoltuk, majd a filtereket a különböző szöveti mintákból származó első szál cDNS próbákkal a 3.4.1. fejezetben leírtak szerint hibridizáltuk.

3.4.5. Kolónia hibridizáció

A baktérium kolóniákat nylon membránnal lefedett szilárd táptalajra tettük és egy éjszakán át 37°C-on növesztettük. A felnőtt kolóniákat feltártuk (7' 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl; 2×5' 0,5 M Tris pH 7,5, 1,5 M

NaCl; 2' 2×SSC), majd a Southern hibridizációnál leírt módon fixáltuk és hibridizáltuk.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. A *PPRG* (*plant-parasite responsive gene*) gének izolálása

A parazitizmus molekuláris genetikai hátterének vizsgálatához elengedhetetlen az élősködésben szerepet játszó gének izolálása és jellemzése. Munkánk során a lucerna (*Medicago sativa* L.) és a kisaranka (*Cuscuta trifolii* Bab. et Gibs.) modellrendszerből olyan gének azonosítása volt a célunk, amelyek a gazdanövényben és/vagy az élősködőben a fertőzés hatására megváltozó expressziójukkal utalnak esetleges szerepükre a parazitakapcsolat létrejöttében illetve fenntartásában. Ennek érdekében két különböző technika segítségével vizsgáltuk az érintetlen és fertőzött gazdanövényben, valamint a parazitában bekövetkező transzkripciós változásokat. Az expressziós különbséget mutató gének kiemelése és jellemzése során kapott eredményeket részletezik az alábbi fejezetek.

4.1.1. A *PPRG1* izolálása

4.1.1.1. A TB15 izolálása differential display-vel

Mivel munkánk kezdeti szakaszában nem állt rendelkezésünkre a parazita régióból készült cDNS klóntár, az expressziós különbségek kimutatására a differential displayt választottuk. A reakciókhoz három különböző szöveti mintát használtunk. Az érintetlen lucerna szárból, a nem parazitáló arankából és a mindkét növényt tartalmazó parazita régióból (4. ábra) totál-RNS-t tisztítottunk. A reverz transzkripciót és a PCR reakciókat két horgony (anchor) primer (H-T₁₁C és H-T₁₁G), illetve

hat véletlenül kikötődő (arbitrary) primer (H-AP1 – H-AP6) felhasználásával végeztük el. A reakciók kiértékelése során csak a 100 - 400 bp nagyságú fragmentumokat vettük figyelembe, mivel az ennél kisebb fragmentumok viszonylag nehezen kezelhetők és közöttük a téves pozitívak aránya is nagyobb. Ebben a mérettartományban összesen 42 olyan fragmentumot izoláltunk, amelyek a vizsgált szövetekben expressziós különbséget mutattak. E fragmentumokat a PCR-rel történt felszaporítást követően reverz northern hibridizációval teszteltük. A hibridizációs kép alapján 13 fragmentumot választottunk ki klónozásra. Mivel az izolált, PCR-rel felszaporított fragmentumok többféle cDNS-t is reprezentálhatnak, a cDNS-ek sokféleségét a klónozást követően azok kereszthibridizációjával ellenőriztük: az egy fragmentumból származó párhuzamos klónokat nylon membránra blottoltuk, majd e klónok inszertjeit sorban hibridizációs próbaként használva néztük a klónok egymással mutatott azonosságát. Megállapítottuk, hogy a 13 fragmentum mintegy 20 féle cDNS-t reprezentál. Az ellenőrző northern hibridizációban a 20 klón közül 12 adott értékelhető jelet, a parazita fertőzésének hatására pedig egy klón (TB15) mutatott expressziós változást. E klón mRNS szintje a kezelt lucerna és aranka szövetekhez képest számottevően megemelkedik a parazita régióban (5. ábra). Mivel a partnernövények érintetlen szöveiben csak a lucerna mintában észleltünk alig kimutatható expressziót, feltételeztük, hogy a TB15 cDNS megtalálható a lucernában.

Megállapítottuk, hogy a TB15 klón egy 213 bp hosszúságú fragmentumot tartalmaz, amelyben egy 59 aminosavból álló nyitott leolvasási keretet (ORF), egy rövid 3' nem-transzlálódó régiót, valamint

5. ábra. A TB15 cDNS northern analízise. Érintetlen lucernában (M) alacsony, míg a parazita régióban (P) magas mRNS szintet mutattunk ki. Arankában (C) nem kaptunk kimutatható hibridizációt. A gélre felvitt RNS-ek mennyiségét a 28S riboszómális RNS (rRNS) etídium-bromidos festése mutatja.

az eukarióta cDNS-ek 3' végére jellemző poliA farkat találtunk. Mivel a bázissorrend nem tartalmazott transzlációs startkodont (ATG), feltételeztük, hogy az izolált fragmentum nem a teljes hosszúságú cDNS, hanem annak 3' végével fed át. Ezért szükségessé vált a teljes hosszúságú cDNS hiányzó 5' végének izolálása és jellemzése is.

4.1.1.2. A TB16 izolálása 5'-RACE módszerrel

A cDNS hiányzó darabjának kiemeléséhez a TB15 klón inszertjének ismert bázissorrendje alapján két, a cDNS 5' vége felé író primert (CM1 és CM2) terveztünk. Ezek segítségével a parazita régióból származó mRNS populációból reverz transzkripció és PCR segítségével számos fragmentumot szaporítottunk fel, amelyek közül a legnagyobbakat klónoztuk és szekvenáltuk. A leghosszabb fragmentum (397 bp) nukleotid-sorrendjéből megállapítottuk, hogy az a megfelelő leolvasási keretben tartalmaz egy transzlációs start kodont, 34 nukleotidra az 5' végtől. A klón a TB16 jelölést kapta (6. ábra).

6. ábra. A *PPRG1* klónozása. A differential display primerekkel (1,2) kiemelt TB15 szekvenciája alapján két, 5' irányba író nested primert (3,4) terveztünk. Ezek felhasználásával izoláltuk a TB16-ot (5'-RACE), majd a teljes hosszúságú szekvenciát az átfedő részek segítségével illesztettük össze. A nyíllal jelölt primerek: H-T₁₁G (1), H-AP6 (2), CM1 (3), CM2 (4).

A TB15 és a TB16 klónok inszertjeinek 40 bázis hosszúságú átfedő része alapján összeállítottuk a teljes cDNS bázissorrendjét (I. függelék). A teljes hosszúságú cDNS a *PPRG1* (plant-parasite responsive gene 1) nevet kapta (Génbanki azonosító: AJ295608).

4.1.1.3. A *PPRG1* jellemzése elsődleges szerkezet alapján

A teljes hosszúságú PPRG1 cDNS 570 nukleotidból áll, amelyen a 35-ik nukleotidtól induló ORF egy 167 aminosav hosszúságú, 19,2 kDa nagyságú fehérjét kódol. A PPRG1 fehérjén 3 teljes szekvenciájú EF-hand motívum található (13-25, 49-61 és 118-130. aminosavak), amelyek jellemző másodlagos térszerkezetét a fehérje számítógépes elemzése is kimutatta (7. ábra).

7. ábra. A PPRG1 fehérje aminosavsorrend alapján előrejelzett másodlagos szerkezete. A fehérjén a három, eltérő hidrofilitású „konszenzus” EF-hand mellett megtalálhatjuk a negyedik, feltételezett EF-handet, a rövid linker régiót, valamint a C-terminális felőli hidrofób farkat is.

A PPRG1 feltételezett funkciójának „előrejelzéséhez” a cDNS származtatott aminosavsorrendjét összehasonlítottuk a számítógépes adatbankokban található szekvenciákkal. Számos Ca^{2+} -kötő fehérjével (kalmodulinok, kalmodulin-rokon fehérjék, pollen allergének) kaptunk hasonlóságot (II. függelék). Aminosav szinten a legnagyobb homológiát (59%) egy lúdfűből (*Arabidopsis thaliana*) izolált érintés-indukálható kalmodulin-rokon génnel (*TCH2*) és egy olajfa (*Olea europea*) pollenből izolált allergén fehérjével (*Pca23*) kaptuk (8. ábra). A TCH2 fehérje 161 aminosavból áll és négy feltételezett Ca^{2+} -kötő EF-handet tartalmaz

(Braam és Davis 1990). A Pca23 feltételezhetően a pollenben zajló Ca^{2+} -függő jelátviteli folyamatokban bírhat szereppel (Ledesma és mtsai 2000).

8. ábra. A PPRG1 fehérje és homológjai. Rövidítések: TCH2 (Braam & Davis 1990), Pca23 (Ledesma és mtsai 2000), CaM (a konszenzus kalmodulin aminosavsorrend a Swiss-Prot fehérje adatbázisból).

A PPRG1 protein központi részén a kalmodulinokra általánosan jellemző rövid összekötő (linker) régió található. Ismert, hogy PPRG1-gyel legközelebbi rokon TCH2 egy 10 aminosav hosszúságú linkert tartalmaz. Khan és mtsai (1997) a TCH2 összehasonlító modellezésével megállapították, hogy a fehérje egy hélix linker régió segítségével összekötött két globuláris doménből áll, és szerkezetét valószínűleg egy diszulfid híd is stabilizálja. Ez alapján elképzelhető, hogy a PPRG1 fehérje a TCH2-höz és a legtöbb kalmodulinhoz hasonlóan súlyzó alakú.

A PPRG1 fehérje C terminális végén egy 17 aminosav hosszúságú erősen hidrofób aminosavakból (izoleucin (I) és tirozin (Y)) álló farkat találunk. A cDNS szokatlanul rövid, mindössze 20 bp hosszúságú 3' nemtranszlálódó (UTR) régiójában megtalálható a poliadenilációs szignál (AAUNNN), illetve az mRNS-re destabilizáló hatással lévő (Gutiérrez és mtsai 1999) downstream (DST) motívum (ATAGTT) is (I. függelék).

Meglehetősen szokatlan a Ca^{2+} -kötő fehérjék között a PPRG1 szerkezetében található három EF-hand struktúra. A kalmodulinok és a Ca^{2+} -kötő fehérjék általában páros számú EF hand doménnel rendelkeznek, amelyek a fehérje középső részét alkotó linker régió két oldalán, megközelítőleg szimmetrikusan helyezkednek el (kalmodulinok

esetében 2-2). Ezzel szemben, míg a PPRG1 fehérje N-terminálisán megtalálható mindkét EF-hand, a C-terminálison motívumkereső programok segítségével csak egy EF-handet találunk. Az EF-handek szekvenciájának ismeretében azonban egy, a konszenzus EF-handre erősen emlékeztető aminosavsorrendet fedezhetünk fel a 82-94 aminosavak között is. E „negyedik” EF-handben megtalálhatóak az 1-es, 12-es illetve 13-as pozíciókban elhelyezkedő invariáns D, E és L/F aminosavak, amelyek jelenléte miatt elképzelhető, hogy ez a régió is fémion kötőhelyként funkcionálhat. A „szokványos” EF-handhez viszonyítva az egyetlen fontos eltérés, hogy a 84-es pozícióban a szokványos G helyett a nagyobb negatív töltéssel bíró D aminosavat találjuk. Ez azt sugallja, hogy ez a régió a Ca^{2+} ion mellett más fémionok (pl. Mg^{2+}) megkötésére is képes lehet (Moncrief és mtsai 1990).

Az elsődleges és másodlagos szerkezetből nem tudunk biztonsággal az EF-handek ionkötési képességére következtetni. A PPRG1 EF-hand struktúráinak működőképességére utalhat - ha közvetve is - a PPRG1-hez nagyfokú homológiát mutató Pca23 fehérje vizsgálata. E proteinről Ledesma és mtsai (2000) megállapították, hogy a fehérjén található 4 potenciális Ca^{2+} -kötő EF-hand képes a Ca^{2+} megkötésére, és a fehérje ezáltal konformációs változáson megy át. A Ca^{2+} megkötése során általános jelenség, hogy az eltérő hidrofilitású EF-handek eltérő ionkötési affinitással rendelkeznek és így azok a citoszolikus Ca^{2+} felszabadulásakor meghatározott sorrendben telítődnek a szabad Ca^{2+} ionokkal. Mivel a PPRG1 fehérjén található EF-handek hidrofilitása is eltérő erősséget mutat, elképzelhető, hogy az egyes EF-handek Ca^{2+} -kötő képessége is különböző lehet.

Szintén szokatlan tulajdonsága a PPRG1 fehérjének a kalmodulinokhoz viszonyítva a molekula közepén található linker régió rövidsége (65-70 as). Ez a régió a kalmodulinokban egy „hajlékony csukló” szerepét tölti be, amely lehetővé teszi, hogy a molekula két vége kölcsönhatásba léphessen más fehérjékkel (Crivici és Ikura 1995). E régió rövidsége a PPRG1 proteinben felveti, hogy célmolekuláinak köre jóval szűkebb lehet, mint hosszabb összekötő régióval rendelkező homológjaié.

A PPRG1 fehérje C-terminális végén található hidrofób farok meglelte általános a kalmodulinok között és feltételezések szerint fontos szerepet játszik a molekula működésében (Zielinski 1998). Mivel a kalmodulinok és célfehérjék közötti kapcsolódás túlnyomó többsége hidrofób kölcsönhatás (Crivici és Ikura 1995), valószínű, hogy a PPRG1 protein C-terminális része a molekula más fehérjékkel kialakítandó kölcsönhatásaiban bír jelentős szereppel. Másik lehetőség, hogy - mivel hasonló struktúrák találhatók egyes membránhoz kötött EF-hand fehérje szerkezetében is (Bartling és mtsai 1993) - a hidrofób rész a PPRG1 fehérje esetleges membránhoz történő horgonyzásában játszhat szerepet.

4.1.2. A *PPRG2* izolálása és jellemzése

4.1.2.1. cDNS klóntár készítése

A differential display-vel folytatott kísérletek során meggyőződünk arról, hogy további vizsgálatainkhoz célszerű a parazita régióból egy reprezentatív cDNS klóntár létrehozása is. Bár a cDNS klóntár érzékenységben elmarad a PCR alapú differential displayhez képest,

technikai okokból azonban számos előnnyel rendelkezik. Ezek között leglényegesebb a téves pozitív klónok DD-hez képest viszonylag alacsony aránya, illetve, hogy egy klónban csak egyféle inszert található, így elkerülhetőek a DD segítségével izolált fragmenteknél szükséges klónozási és szelekciós lépések. További előny, hogy a cDNS klóntár létrehozása során alkalmazott pozicionális klónozás miatt a vektorba épített cDNS fragmentumok irányultsága azonos, így azok 3' és 5' vége szekvenálás nélkül is elkülöníthető egymástól.

A klóntár létrehozásához a partnernövényeket tartalmazó aktív parazita régióból tisztított mRNS-t használtuk. Az *in vitro* pakolás után a fágokat tartalmazó elegyet titráltuk és megállapítottuk, hogy $\sim 10^6$ rekombináns fágot kaptunk, amelyeket az amplifikálás során $3,6 \times 10^{10}$ fág/ml koncentrációjúra dúsítottunk fel. A kék-fehér szelekcióval becsült inszert nélküli tarfoltok aránya $<3\%$ -nak adódott. A klóntár átlagos inszertméretét 20 véletlenszerűen kiválasztott plakkon ellenőriztük. A PCR reakciók során felszaporított termékek átlagos nagysága ~ 640 bp-nak bizonyult, ami egy átlagos növényi cDNS klóntár inszertméretének felel meg.

4.1.2.2. A TB21 és TB50 izolálása differenciál hibridizációval

A parazita régióból létrehozott cDNS klóntár birtokában megkezdhattuk a klóntárban található klónok átválogatását. A differenciál-hibridizációt a parazita régió, valamint az érintetlen lucerna és aranka száraz első szál jelölt cDNS-ével végeztük. A vizsgálandó fragmentumokat a fágkönyvtár kiszabadításából kapott, kék-fehér

szelekcióval előzetesen kiválogatott bakteriális klónok tartalmazták. 1200 baktériumtelep ellenőrzése után 13 klónt emeltünk ki, ezek közül a reverse northern hibridizációban két klón (TB21 és TB50) mutatott expressziós különbséget, amelyet northern hibridizációban is visszaigazoltunk (9. ábra).

9. ábra. A TB21 és TB50 cDNS northern analízise. A parazita régióban (P) mindkét esetben emelkedett expressziót tapasztaltunk, míg kezeletlen lucerna (M) és aranka (C) mintában az mRNS szint a kimutathatósági határ alatt volt.

A klónok nukleotid sorrendjét meghatároztuk, és azt tapasztaltuk, hogy az 599 illetve 552 bp hosszúságú fragmentumok (10. ábra) nagyfokú homológiát mutatnak egymáshoz. A kódoló részben és azon kívül mindössze négy (2-2) nukleotid eltérést tapasztaltunk, amelyek azonban a kódoló rész aminosavsorrendjében nem okoztak változást. Ez alapján feltételezzük, hogy a két klón vagy a tetraploid lucerna egy génjének duplikálódott és egymással funkcionálisan azonos alléljeiről vagy egy géncsalád két egymással nagyon hasonló tagjáról származik. Elképzelhető ugyanakkor az is, hogy a klónok ugyanazon gént reprezentálják, és a köztük lévő különbségek a cDNS klóntárkészítés során lezajlott *in vivo*, illetve *in vitro* DNS szintetizálási folyamatokra vezethetők vissza. A klónok szekvenciájának elemzésével megállapítottuk, hogy a megfelelő ORF-ben egyik sem tartalmaz transzlációs startkodont. Az adatbankokkal történt összehasonlítás során kapott számos homológ cDNS elemzése alapján úgy becsültük, hogy a hosszabb csonka cDNS (TB21) 5' végéről mintegy 40-45 aminosavnyi (120-135 nt) kódoló rész hiányozhat. A következő lépés tehát a teljes cDNS szekvenciájának meghatározása volt.

4.1.2.3. A TB215 izolálása a cDNS klóntárból

Mivel a teljes cDNS méretét a homológ szekvenciák alapján az 5' nem-kódoló rész nélkül kb. 750 bp-ra becsültük, a klóntár átlagos inszertméretének ismeretében valószínűnek tűnt, hogy a csonka cDNS-ek által reprezentált gén teljes hosszúságú változata is megtalálható a cDNS klóntárban. A hiányzó rész izolálásához a *PPRG1* esetében alkalmazott 5'-RACE technika egy módosított változatát alkalmaztuk. A két csonka cDNS szekvenciája alapján két 5' vég felé író primert (PR1 és PR2) terveztünk (10. ábra).

10. ábra. A *PPRG2* klónozása. A cDNS klóntárból izolált két fragmentum homológ részei alapján 5' irányba író nested primereket (1,2) terveztünk. Ezek felhasználásával izoláltuk a TB215-öt, majd a teljes hosszúságú szekvenciát az átfedő részek segítségével illesztettük össze. A nyíllal jelölt primerek: PR1 (1), PR2 (2), SK

A két fragmentum közötti erős homológia miatt feltételeztük, hogy a cDNS-ek egyetlen, vagy két nagyon közeli rokon gént reprezentálnak és ezért ezek hiányzó 5' végei is nagyfokú azonosságot mutatnak. Így e primereket úgy terveztük, hogy azok mindkét cDNS-hez teljes homológiát mutassanak. A bankot alkotó klónok fragmentjeinek azonos irányultsága miatt (ld. 4.1.2.1. fejezet) szembeíró primerként cDNS-ek 5' végénél található SK primert használtuk. A második „kör” PCR reakció után a várt mérettartományban található fragmentumokat klónoztuk és a két leghosszabbat (291 és 343 bp) szekvenáltuk. A fragmentumok teljes szekvencia-azonosságot mutattak egymással és a hosszabbon (TB215) megtaláltuk a transzlációs start helyet is. A csonka cDNS-ekkel való

átfedés alapján összeállított teljes hosszúságú cDNS-t PPRG2-nek neveztük el (Génbanki azonosító: AJ320476).

4.1.2.4. A *PPRG2* jellemzése elsődleges szerkezet alapján

A teljes hosszúságú *PPRG2* cDNS 800 nukleotidból áll és egy 157 aminosav hosszú, 16,6 kDa nagyságú peptidet kódol. A cDNS 5' végén 73, 3' végén 239 bp-nyi nem-kódoló rész található. Ez utóbbin két AAUAAA poliadenilációs szignált (758. és 763. bázisoknál) illetve egy DST-szerű motívumot (657-663 bp) azonosítottunk (III. függelék).

A kódoló rész elemzése során egy Betv1 motívumot találtunk (88-120 as), amelyet először a nyírfa (*Betula pendula*) pollenjében található allergén hatású fehérjéknél írtak le (Breiteneder és mtsai 1989). Ez a motívum számos, egymással szerkezetileg sok hasonlóságot mutató növényi fehérjében fellelhető, amelyek mindegyikéről ismert, hogy a patogén támadásokra beinduló védekező reakciók során halmozódnak fel (Breiteneder és Ebner 2000). Mivel a *PPRG2* megnövekedett expressziós szintjét mi is egy biotikus stressz hatására mutattuk ki, feltételeztük, hogy a *PPRG2* fehérje rokonságban állhat a Betv1 motívumot tartalmazó más fehérjékkel. Ezt az adatbankokkal történt összehasonlítás is igazolta: aminosav szinten nagyfokú (55-76%) homológiát kaptunk különböző növényfajokból származó PR proteinekkel (IV. függelék). Megállapítottuk, hogy a *PPRG2*-vel legnagyobb azonosságot mutató fehérjék a PR proteinek 10-es családjába tartoznak.

11. ábra. A PPRG2 fehérje és homológjai. Rövidítések: MsPR10-1 (Breda és mtsai 1996) MtPR10-1 (Gamas és mtsai 1998), Srg1 (Truesdell és Dickman 1997), Drrg49-c (Chiang és Hadwiger 1990), Sam22 (Crowell és mtsai 1992), AB17pea (Iturriaga és mtsai 1994), Luplu18 (Sikorski és mtsai 1998)

Mivel e géncsalád tagjai többek között az általuk kódolt peptidek hossza (155-160 as) és a Betv1 motívum révén a többi PR családtól jól elkülöníthetőek, valószínűnek látszik, hogy a PPRG2 protein e géncsalád új tagja (11. ábra).

4.2. A *PPRG* gének jellemzése

4.2.1. A *PPRG* gének kópiaszámának meghatározása

A *PPRG* gének expressziójának vizsgálata előtt a génekkel első lépésben Southern hibridizációt végeztünk. A kísérletnek kettős célja volt. Egyrészt meg kívántuk állapítani, hogy azok melyik partnernövényből származnak, másrészt választ kívántunk kapni arra is, hogy e gének hozzávetőleg hány kópiában vannak jelen a genomban. A hibridizációt az anyag és módszer fejezetben leírtak szerint végeztük. A *PPRG1*-re specifikus próbaként a TB16, a *PPRG2* esetében pedig a TB21 klónok inszertjeit alkalmaztuk. Mindkét hibridizáció esetében több hibridizáló jelet kaptunk a különböző enzimekkel emésztett lucerna összDNS mintákhoz (12. ábra). Egyik esetben sem láttunk hibridizációt az arankából származó összDNS-hez. Ez alapján megállapítottuk, hogy mindkét cDNS a lucernából származik, amelyet már a northern hibridizációs eredmények alapján is valószínűsíthettünk.

A lucerna összDNS mintákhoz kapott számos hibridizáló jel azt jelenti, hogy a *PPRG* géneknek több homológja is található a lucerna genomjában. Mivel a fenti kísérlet alapján a hibridizáló fragmentumok homológiájának fokát nem tudjuk megállapítani, azt sem lehet eldönteni, hogy a *PPRG* gének több kópiában, vagy géncsaládok tagjaként vannak jelen a genomban. Utóbbi a *PPRG2* esetében valószínűnek látszik, mivel eddig a PR10 géncsalád több tagját (*MsPR10-1*, *Srg1*, *pUM90-1*) is leírták már lucernában és igazolták, hogy azok egy géncsalád tagjai (Truesdell és Dickman 1997).

12. ábra. A *PPRG* gének Southern analízise. A TB16 (*PPRG1*) és TB21 (*PPRG2*) próbával kapott hibridizációs képek. Alkalmazott enzimek (a) I-*EcoRV*, II-*EcoRI*, III-*HindIII* (b) I-*EcoRI*, II-*HindIII*. Mindkét esetben számos hibridizáló fragmentumot mutattunk a lucerna genomikus DNS-ben. Az *EcoRI* enzimmel emésztett aranka DNS (Cus) nem adott hibridizációs jelet. Az autoradiogrammon előforduló sötét elszíneződések a próba DNS aspecifikus kötődésének eredményei.

A *PPRG1* gén esetében nem ismerünk olyan megfelelően homológ lucerna (és pillangós) géneket, amelyek a géncsalád tagjai lehetnének. Emiatt elképzelhető az is, hogy a *PPRG1* gén több kópiában fordul elő a tetraploid genomban, illetve, hogy egy új, néhány tagot számláló géncsalád első izolált képviselője a lucernában.

4.2.2. A *PPRG* gének alapexpressziója a lucerna szövetekben

Az *PPRG* gének expressziós analízisének megkezdése előtt meghatároztuk e gének alapexpressziós szintjét lucerna szövetekben. A mintákat növényházban, stresszmentes körülmények között nevelt lucernákról gyűjtöttük. A *PPRG1* alacsony transzkripció szintet mutatott

a szárban, levélben és virágban, gyökérben és zöld csigában (a lucerna éretlen termése) pedig a kimutathatósági határ közelében volt (13. ábra).

13. ábra. A *PPRG* gének expressziója az alapállapotú lucerna szöveteiben. Szöveti minták: Gyökér (Gy), Szár (Sz), Levél (L), Virág (V), Zöld csigatermés (T).

A *PPRG2* próbával ugyancsak alacsony mRNS szintet detektáltunk szárban, levélben és virágban, de viszonylag magas értékeket kaptunk a gyökér és zöld csigatermés esetében. Eddig már több PR10 génről írtak le hasonló expressziós mintázatot. A *PPRG2*-höz magas homológiát mutató, levélben patogén-indukálhatónak bizonyult *MtPR10-1* (Gamas és mtsai 1998) és *MsPR10* gén (Breda és mtsai 1996) esetében, valamint a szója *SAM22* génjének (Crowell és mtsai 1992) vizsgálatakor mutattak ki magas expressziót gyökérben. Úgy tűnik tehát, hogy a géncsalád más tagjaihoz hasonlóan a *PPRG2* szervspecifikus megnyilvánulást is mutat.

4.2.3. A *PPRG* gének expressziója a lucernában arankafertőzés hatására

A *PPRG* géneket aranka fertőzés hatására megemelkedő expressziójuk alapján izoláltuk (5. és 9. ábra). Mivel akkor célunk csupán a megemelkedett mRNS szint kimutatása volt, az ellenőrző northern hibridizációkhoz 3-14 napos parazita régiókból izolált RNS-t használtunk. Ezek kísérletek azonban nem nyújtottak támpontot a *PPRG* gének expressziós kinetikáját illetően. Ezért a *PPRG* gének expressziós analízisének első lépéseként arankafertőzést követően vizsgáltuk e gének kifejeződésének időbeli változását. Azt tapasztaltuk, hogy a parazita

támadásának hatására mindkét gén expressziója már a harmadik napon jelentősen megemelkedett és a vizsgált időszakban tartósan magas maradt (14. ábra).

14. ábra. A *PPRG* gének időbeli indukciója aranka fertőzés hatására. A parazita támadás során mindkét gén expressziója konstansan magas marad. A számok a parazitakapcsolat kialakulásától eltelt napokat jelölik.

A folytonosan magas mRNS szint jelzi, hogy a lucerna számára a *PPRG* gének termékeinek jelenléte fontos lehet a parazita támadás észlelése és/vagy a védekezési folyamatok során.

4.2.4. A *PPRG* gének expressziós analízise

A növények környezeti stresszekre számos gén indukálásával válaszolnak. Ismert azonban, hogy a különböző stresszekre adott válaszfolyamatokban sokszor ugyanazon gének vesznek részt. Ennek többféle oka is lehet: egyrészt a különböző stresszek hasonló fiziológiai változásokhoz vezethetnek a növényben (szárazság és sóstressz vagy sebzés és rovarrágás), másrészt eredhet abból is, hogy a növényi stresszgének tárháza véges és így számos gén által kódolt peptid többféle védekezési út része is lehet (Baron és Zambryski 1995). Ezek közé tartozik a Ca^{2+} -kötő fehérjék és a PR proteinek nagy része is. Mindezek alapján feltételeztük, hogy a *PPRG* gének expressziójának emelkedését nem csak az arankafertőzés, hanem az azt kísérő, és más abiotikus stresszek, valamint az ezekkel összefüggő jelmolekulák is indukálhatják, ezért megvizsgáltuk azok hatását a *PPRG* gének transzkripciójára.

4.2.4.1. Mechanikai stresszek hatása a *PPRG* gének transzkripciójára

Irodalmi adatok alapján már számos gén ismeretes, amelynek expresszióját a különböző mechanikai hatások befolyásolják (León és mtsai 1998). A *PPRG* génekkel nagyfokú hasonlóságot mutató gének között is találunk ilyeneket. Többféle mechanikai hatásra is indukálódik például a *PPRG1*-gyel rokon *TCH2* (Braam és Davis 1990), vagy a *PPRG2*-vel azonos géncsaládba tartozó *Srg1* (Truesdell és Dickman 1997) és *Sam22* (Crowell és mtsai 1992) gén. A *PPRG* gének expressziós

változásait négy, a természetben gyakran előforduló mechanikai stimulus, a szél, eső, sebzés és érintés hatására vizsgáltuk.

A *PPRG1* gyors és erős indukcióját tapasztaltuk eső, sebzés és érintés hatására (15. ábra). Eltérően azonban a *TCH2* géntől, a szélkezelésre nem tudtunk megváltozott expressziót kimutatni. Megfigyeltük továbbá, hogy a *PPRG1* indukciója az egyes kezelésekre eltérő kinetikát mutat. Míg sebzés hatására az mRNS szint már 15 perccel a kezelés után eléri maximumát, az érintést és az esőt követően ez 30 illetve 60 perc múlva következik be. Különbséget találtunk az mRNS-szint csökkenésében is. A maximális indukciót követően leggyorsabban (30 perc) az eső kezelés után csökken alapszintre a *PPRG1* mRNS mennyisége. Érintés esetében a csökkenés mértéke lassúbb, a leghosszabb lecsengési időt pedig sebzés hatására észleltük.

15. ábra. Mechanikai ingerek hatása a *PPRG1* expressziójára. A számok a kezelés kezdetétől eltelt órákat, a csillagok az mRNS felhalmozódásának maximumát jelölik.

Hasonlóan a *PPRG1*-hez, a *PPRG2* sem mutatott indukciót szél hatására (16. ábra). Gyors mRNS-szint emelkedést tapasztaltunk azonban eső és sebzés hatására, míg az érintés utáni expresszió emelkedés csak hosszabb idő (1 óra) elteltével következett be és az a vizsgált időszak alatt állandó magas szinten maradt.

A fenti kísérletek azt mutatják, hogy az általunk alkalmazott mechanikai stresszek közül a szél kivételével mindegyik befolyással volt a *PPRG* gének expressziójára. Az mRNS szint változásának kinetikája a különböző kezeléseket követően azonban feltűnő eltéréseket mutatott. *PPRG1* esetében mind az mRNS szint emelkedésének gyorsaságában, mind

lecsengésében összefüggést ismerhetünk fel a kezelések növényi szövetekre gyakorolt károsító hatásával. A legkisebb károsító hatású szél nem befolyásolta az expressziót, a hasonlóan kis hatással bíró eső után az indukció maximuma a kezelést követő 60 percnél figyelhető meg. A viszonylag erős behatást jelentő érintést illetve a látható szöveti károsodásokat okozó sebzést követően az indukció maximuma 30 illetve 15 perc elteltével következik be. Hasonló, de ellenkező előjelű folyamatot látunk az indukciót követő mRNS szint csökkenésben is: leggyorsabban az eső kezelés után áll vissza az alapszintű *PPRG1* mRNS szint, míg érintés és sebzés hatására mindez egyre lassabban következik be.

Több esetben is leírták már, hogy bizonyos Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziója függhet a környezeti hatás erősségétől. A *PPRG1*-gyel közeli rokonságot mutató érintés-indukálható *TCH2* génről Braam és Davis (1990) megállapították, hogy expressziójának mértéke arányban van az érintések számával. Azóta világossá vált, hogy a legtöbb növényi sejt nem a „mindent vagy semmit” elvét alkalmazza a környezeti stimulusok érzékelésében, hanem a válaszok erőssége számos esetben korrelációt mutat a behatás nagyságával (McAinsh és Hetherington 1998).

A *PPRG1* fehérjét korábban mint lehetséges Ca^{2+} -kötő fehérjét jellemeztük (4.1.1.3. fejezet). Irodalmi adatok alapján számos hasonló fehérje ismert, amelyek génjének expressziója különféle mechanikai hatásokra megnövekedik (Braam és Davis 1990; Gawienowski és mtsai 1993; Bergey és Ryan 1999). Más kísérletek ugyanakkor fényt derítettek arra is, hogy a növényi sejtek citoplazmájában a Ca^{2+} szintje mechanikai stresszek következtében hirtelen és jelentősen megemelkedhet (Knight és

mtsai 1991; Knight és mtsai 1993). Mindezek fényében nem meglepő, hogy a *PPRG1* indukciója kiváltható mechanikai stresszekkel. Mint a korábbiakban is említettük, a Ca^{2+} -kötő fehérjéknek legalább kétféle szerepe lehet a sejtben: funkcionálhatnak jelátviteli utak alkotórészeként (Zielinski 1998), valamint közreműködhetnek a stresszhelyzetek miatt felborult homeosztatikus Ca^{2+} -szint helyreállításában (Gilroy és mtsai 1987). Jelenleg nem tudjuk megmondani, hogy a *PPRG1* fehérjének van-e szerepe a jelátviteli utak beindításában, vagy a sejt más egyéb folyamataiban. A *PPRG1* gén stresszeket követő gyors és nagymértékű indukciója azonban sejtetni engedi, hogy e fehérje fontos szereppel bírhat a sejtek mechanikai stresszek hatására lezajló folyamataiban és felveti annak valószínűségét is, hogy az arankafertőzés mechanikai stresszet is jelent a lucerna számára.

Hasonlóan a *PPRG1*-hez, a különböző hatásokra a *PPRG2* is eltérő indukciót mutatott. Ez esetben azonban sem az indukcióban, sem az mRNS-szint csökkenésében nem tudunk az előzőekhez hasonló, a stresszek feltételezett szövetkárosító hatásával összefüggő, korrelációt kimutatni. A *PPRG2* mRNS-szint változásai nagyon hasonló képet mutattak eső és sebzés hatására. Mindkét esetben gyors indukciót, majd szintén gyors mRNS-szint csökkenést tapasztaltunk (16. ábra).

E jelenségre jelenleg még nem tudunk részletes magyarázattal szolgálni. Elképzelhető viszont, hogy a *PPRG2* regulációját nem a stressz szövetkárosító hatása, hanem annak jellege befolyásolhatja. Az eső és sebzési stressz közös vonása, hogy a behatást kiváltó inger a kezeléssel nem szűnik meg teljesen: a növény egész felületén vízcseppek maradnak, illetve a leveleken ejtett sebek is sokáig láthatóak. Mindez hozzájárulhat

a *PPRG2* gyors mRNS-szint emelkedéséhez. Ugyanakkor érintés esetén, amikor a kiváltó inger már a kezelés befejezésével egyidőben megszűnik, a *PPRG2* indukciója időben eltolódva következik be.

16. ábra. Mechanikai ingerek hatása a *PPRG2* expressziójára. A mintavételek időpontját órákban adtuk meg.

A növényi stresszgének expressziós vizsgálatánál számos alkalommal megfigyelték, hogy azok indukciója a különböző stresszek hatására mind időben, mind mértékében jelentős eltéréseket mutathat (Baron és Zambryski 1995). Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki (1993) az *Arabidopsis* dehidratációra indukálódó (*rd*) génjeit vizsgálva következtettek arra, hogy e gének eltérő indukciója a különböző jelátviteli utakkal van összefüggésben. Hasonló jelenséget írtak le León és mtsai (1998) a sebzés- és jázminsav-indukálható gének vizsgálatakor. Mindezek alapján lehetséges, hogy a *PPRG2* eltérő indukciós mintázata is a különböző mechanikai stresszek következtében bekapcsoló, eltérő szabályozási útvonalakra vezethető vissza.

4.2.4.2. Szignálmolekulák és abiotikus stresszek hatása a *PPRG1* transzkripciójára

A növények és paraziták közötti kölcsönhatások kialakulása során számos jel utal arra, hogy mindkét partnerben hormonális változások zajlanak. Az aranka szárán például citokininnel hausztóriumfejlődés indukálható, míg a folyamatot más hormonok (auxin, gibberellinsav, abszcizinsav) gátolják (Ramasubramaniam és mtsai 1988). A citokininek

és auxinok nagy valószínűséggel szerepet játszanak a gazdanövény kortikális sejteinek xilém elemekké történő differenciálódásában, amikor a parazita fertőzés során a partnernövények szállítónyalábjai között kialakul a vízben oldott tápanyagok folytonos áramlását biztosító csatorna (Aloni 1995). Ismert ugyanakkor, hogy az aktív hausztórium igen nagy koncentrációban tartalmaz abszcizinsavat, amely valószínűleg a gazdanövényből származik és nagyban elősegíti a parazita hatékony szacharózfelvételét (de Bock és Fer 1992). Az abszcizinsavnak fontos szerep juthat továbbá a gazdanövényben a parazita által okozott vízveszteség érzékelésében is. A jázminsav (JA) illetve annak származékai (pl. MeJA) sebzés ill. parazita támadás hatására a sérült részen *de novo* szintetizálódnak (Creelman és mtsai 1992; Albrecht és mtsai 1993) és a sebzésre adott válaszfolyamatok szabályozásában bírnak fontos szereppel (Hildmann és mtsai 1992; Seo és mtsai 2001), a szalicilsav (SA) pedig a paraziták behatolását követően szabadul fel és központi szerepet játszik a helyi védekező reakciókban, valamint több patogenezisre válaszoló (PR) gén expresszióját szabályozza (Durner és mtsai 1997).

E hormonális változások valószínűleg számos gén expressziójára hatással vannak. Megvizsgáltuk e fitohormonok hatását a *PPRGI* kifejeződésére. Kísérleteinkben használt szignálmolekulák közül expressziós változást csak abszcizinsav (ABA) kezelés hatására tapasztaltunk, auxin (2,4-D), citokinin (kinetin), valamint SA és MeJA hatására nem mutattunk ki emelkedett mRNS szintet (17. ábra).

A *PPRGI* gén a sebzésindukálható gének közé tartozik (15. ábra). E gének vizsgálata a különböző növényfajokban az utóbbi években

megegerősítette azt a korábbi feltételezést, hogy indukciójuk több jelátviteli útvonalon keresztül is bekövetkezhet. Mind paradicsomban, mind *Arabidopsis*-ban több sebzés-indukálható gént is leírtak, amelyek nem mutatnak indukciót JA hatására (O'Donnel és mtsai 1998; Titarenko és mtsai 1997). További megfigyelés, hogy a sebzett paradicsom növénykének génexpressziós mintázata eltér a helyi és szisztémikus szövetekben, amely nem magyarázható egyetlen JA-függő útvonallal (Lightner és mtsai 1993). A sebzés-indukálható gének szabályozása e növényekben tehát legalább két eltérő (JA-függő és JA-független) útvonalon keresztül történik (León és mtsai 1998; León és mtsai 2001). Lucerna esetében mindeddig nem azonosítottak olyan sebzés-indukálható géneket, amelyek indukciója bizonyítottan JA-független útvonalakon valósulna meg. Kísérleteink alapján úgy tűnik, hogy a *PPRG1* az első, lucernában leírt sebzés-indukálható gén, amelynek indukciójában a JA nem játszik szerepet.

17. ábra. A *PPRG1* expressziójának változásai abiotikus stresszek és szignálmolekulák hatására. A számok a kezelés kezdetétől a mintavételig eltelt órákat jelölik. Hibridizációs próbaként a TB16 szolgált.

Az ABA kezelés a *PPRG1* tranziens expresszióját okozta. Bár a növények a kezelés teljes ideje alatt érintkeztek a hormonnal, mégsem tapasztaltunk folyamatos emelkedett expressziót. A kezelést kezdetét követő fél óra múlva az mRNS szint a kontrollhoz képest jelentősen megnőtt, majd fokozatosan az alapértékre csökkent. Ez a megfigyelés jelzi, hogy egyedül az ABA jelenléte nem elegendő a magas expressziós szint fenntartásához.

A PPRG1 proteint elsődleges szerkezete alapján Ca^{2+} -kötő fehérjeként valószínűsítettük. Ismert ugyanakkor, hogy az ABA hatással van a sejtek citoszolikus Ca^{2+} -szintjére. Bár kísérleteinkben nem mértük közvetlenül a sejtek Ca^{2+} -szintjét, számos irodalmi adat utal rá, hogy ABA megjelenésének hatására a szabad Ca^{2+} mennyisége átmenetileg sokszorosára nőhet a citoszolban (McAinsh és mtsai 1992; Curvetto és mtsai 1994; Leung és Giraudat 1998). Mivel a hormon folyamatos jelenléte is csak tranziens expresszió-emelkedést okoz, elképzelhető, hogy a *PPRG1* indukcióját nem közvetlenül az ABA jelenléte váltja ki, hanem az az ABA kezdeti koncentrációváltozása által a sejtekben előidézett Ca^{2+} felszabadulás következménye. Az indukciót követő állandóan magas ABA koncentráció már nem jelent környezetváltozást a sejt számára és a homeosztatikus értékre visszaálló citoszolikus Ca^{2+} -szint nem teszi szükségessé a Ca^{2+} -kötő fehérjék *de novo* szintézisét.

Mivel az ABA a növényekben számos környezeti stressz hatására felszabadulhat, a *PPRG1* ABA indukálhatósága a gén más stresszek, így a kedvezőtlen ozmotikus viszonyok iránti érzékenységet is előrevetíti. A vízhiány, amely talán a leggyakrabban előforduló stressz a növények számára, a parazita támadásának is velejárója. A rövid életű paraziták – akárcsak az aranka – nem érdekeltek gazdanövényük fenntartásában. Gyors terjedésük és rövid életsiklusuk révén gazdájuk gyors pusztulása alatt is elegendő idejük van arra, hogy újabb növényeket támadjanak meg, illetve életsiklusukat befejezzék. E paraziták ezért „takarékoskodás nélkül” használják fel gazdanövényeik erőforrásait, mindent csakis önnön reprodukciós eredményességük növelésének szolgálatába állítva (Press és Graves 1995). Így az arankák gyors növekedésük és intenzív

életfolyamataik révén nagy mennyiségben vonják el gazdanövényüktől a vizet és az abban oldott ásványi sókat. Mivel a szárparaziták minden vízhez gazdanövényükből jutnak hozzá, az arankafertőzés következtében a lucernában vízhiány lép fel, amit a gyökerek megnövekedett vízfelvétele sem képes kompenzálni. A vízhiány hatását a *PPRG1* transzkripciójára lucerna növénykéek 2%-os NaCl-dal, valamint polietilén-glikol (PEG6000) különböző koncentrációjú oldataival való kezelésével modelleztük.

A northern blot analízis az ABA kezeléshez hasonló, tranzien্স kinetikát mutatott: a *PPRG1* mRNS szintje a PEG kezelés hatására többszörösére emelkedett, majd visszatért az alapszintre (17. ábra). Ugyanezt tapasztaltuk NaCl hatására is. E két stressz indukciós képét összehasonlítva az ABA kezeléssel, különbséget találunk az indukció gyorsaságában. Míg ABA kezelés hatására a maximális mRNS szintet a kezelés kezdetétől eltelt 30 perc múlva észleltük, ugyanezt a vízháztartást érintő stresszek esetében mintegy 30 perccel később, az 1 órás időmintában tapasztaltuk.

Jól ismert jelenség, hogy a vízháztartást kedvezőtlenül befolyásoló hatásokra a növény endogén ABA szintje megemelkedik (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki 1997). Ezért elképzelhető, hogy a *PPRG1* indukciója nem közvetlenül a vízvesztesség, hanem a PEG és sókezelés hatására megemelkedő endogén ABA szint következménye. Ez magyarázatul szolgálhat az mRNS felhalmozódásának eltolódására is: míg a PEG és sókezelés által indukált endogén ABA-szint emelkedés csak időben késve jelentkezik, az exogén úton alkalmazott ABA azonnal kifejtheti hatását. Az ABA közvetlen részvételét támasztja alá az a

megfigyelés is, hogy a *PPRG1* indukciójában sem mennyiségi, sem időbeli különbség nem mutatkozik a különböző koncentrációjú PEG oldatokkal történő kezeléseket követően; mivel mindhárom kezelést ABA felszabadulás követ, a hormon által kiváltott indukció is minden esetben egységes képet mutat.

Mint a fenti kísérletekből is kitűnik, a *PPRG1* indukcióját számos abiotikus hatás és fitohormonok is előidézhetik. E stresszek döntő többsége bizonyítottan kapcsolatba hozható a sejtek megemelkedett citoszolikus Ca^{2+} szintjével (Knight 2000), amelynek - a Ca^{2+} -kötő fehérjéken keresztül - kulcsszerepe van a környezetből érkező szignálok felerősítésében és továbbításában. Számos kísérlet bizonyította, hogy a stresszválasz kiváltásához a növényben nem kell feltétlenül a stressznek bekövetkeznie, hanem az a sejtek Ca^{2+} szintjének mesterséges megemelésével is kiváltható (Braam 1992b; McAinsh és mtsai 1995). Ez a megfigyelés vezetett bennünket arra, hogy megvizsgáljuk a *PPRG1* mRNS szintjének változását kívülről adott Ca^{2+} hatására. Lucernanövénykéket 100 mM-os CaCl_2 oldattal kezeltünk, majd időmintákban néztük az mRNS szint változását a kezelt növények leveleiben.

A *PPRG1* indukciója 1 óra elteltével volt észlelhető, amely a kezelés ideje alatt folyamatosan - a felvett Ca^{2+} mennyiségének emelkedésével fokozatosan - erősödött. Korábban említettük, hogy a Ca^{2+} -kötő fehérjéknek a jelátviteli utak szabályozásán kívül a sejtekben többféle szerepe is lehet (1.7.1. fejezet). A *PPRG1* fokozatosan és tartósan megnövekedő mRNS szintje azt sejteti, hogy a Ca^{2+} -koncentráció megemelkedésével arányban a sejtekben nagyobb mennyiségű *PPRG1*

fehérjére van szükség. Ezért valószínű, hogy a *PPRG1* fehérje a sejtekben a szabad Ca^{2+} ionok mennyiségének szabályozásában, annak homeosztatikus értékén tartásában bírhat fontos szereppel.

A *PPRG1* abiotikus hatásokra mutatott érzékenysége azt sugallja, hogy e génnek általános szerepe lehet a környezeti hatások érzékelésében. Ezért a *PPRG1* expresszióját az arankafertőzést nem kísérő, de természetes körülmények között gyakran előforduló stresszekre – hideghatásra és emelt hőmérsékletre - is megvizsgáltuk. Ismert, hogy a növények környezetük hőmérsékletének változására számos gén expressziójának megváltoztatásával reagálnak (Mohapatra és mtsai 1988; Mohapatra és mtsai 1989). Ez többek között számos Ca^{2+} -kötő fehérjét (Braam 1992b; Polisensky és Braam 1996) és PR proteint (Tronsmo és mtsai 1993; Hon és mtsai 1995; Antikainen és Griffith 1997) kódoló gént is érint. Kísérleteinkben a lucerna növénykéket fitotronban hideg (4°C) és meleg (42°C) kezelésnek vetettünk alá, és 6 órán keresztül mintavételezéssel követtük nyomon a *PPRG1* expresszióját. Hidegkezelés hatására - hasonlóan más stresszekhez (pl. sebzés, érintés) - rendkívül gyors expresszió-emelkedést tapasztaltunk: a gén indukciója már a kezelés kezdetétől számított 15 perc múlva látható volt (17. ábra). Eltérően azonban a más abiotikus stresszeknél tapasztalt kinetikától, hidegkezelés hatására nem tranziens emelkedést tapasztaltunk, hanem a *PPRG1* mRNS szintje a kezelés kezdetét követően 6 óra múlva is magas szinten maradt.

Régóta ismert, hogy a hidegkezelés a növényekben az endogén ABA-szint növekedését idézi elő (Chen és mtsai 1983; Mohapatra és mtsai 1987), valamint hatással van a Ca^{2+} -függő jelátviteli utakra is (Minorsky

1985; Knight és mtsai 1991; Monroy és Dhindsa 1995; Knight 2000). Mivel azonban a külső inger hatására bekövetkező endogén ABA-szint emelkedéséhez el kell telnie bizonyos időnek, a *PPRG1* hideg hatására bekövetkező gyors expresszió-emelkedése valószínűleg nem magyarázható hormonális okokkal. Sokkal valószínűbb, hogy a hideg által kiváltott indukció - közvetlenül a citoszolikus Ca^{2+} -koncentráció megemelésével - ABA-független szignálutakon valósul meg, ahogy azt más növényeknél is leírták (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki 1997). Ezt a feltételezést látszik alátámasztani az indukciók kinetikájának összehasonlítása is. A *PPRG1* hormonális indukciója azt mutatta, hogy az ABA kezelés csak tranziens expresszió-emelkedéshez vezet akkor is, ha a növények a kísérlet teljes ideje alatt ki vannak téve a hormon hatásának. Így a hideg hatására tapasztalt konstansan magas *PPRG1* mRNS-szint szintén arra utal, hogy az ABA és a hideg a *PPRG1* expresszióját nem azonos jelátviteli utakon keresztül szabályozza.

Érdemes megemlíteni, hogy a mechanikai stresszek szintén a *PPRG1* tranziens expresszió-emelkedésében nyilvánultak meg (15. ábra). Dohányon végzett kísérleteikkel van der Luit és mtsai (1999) igazolták, hogy a hidegkezelés illetve a szél eltérő Ca^{2+} -függő jelátviteli utak bekapcsolásához vezet. Mindezek alapján valószínűnek tűnik, hogy a *PPRG1* szabályozása legalább két jelátviteli útvonalon valósul meg: egyikük a gén tranziens, másikuk annak konstans expresszió-emelkedését idézi elő. Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy a Southern blot analízis a *PPRG1* gén több kópiáját mutatta ki a lucerna genomjában. Így az eltérő jelátviteli utak mellett az is elképzelhető, hogy az indukciós különbségeért az egyes kópiák eltérő szabályozása is felelős.

Hőkezelés hatására a *PPRG1* mRNS szintjében nem figyeltünk meg számottevő változást. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy hőstressz esetén szintén megfigyelhető a citoszolikus Ca^{2+} emelkedése (Braam 1992b; Biyaseheva és mtsai 1993; Gong és mtsai 1998). Ismert ugyanakkor, hogy ez a változás nincs feltétlenül hatással minden Ca-kötő fehérjére. Több szerző is egyetért abban, hogy e szignál specificitása a Ca^{2+} felszabadulásának helyétől, mértékétől ill. kinetikájától is függ (összefoglaló: Trewavas és Malhó 1998). A *PPRG1* hideg és hő hatására mutatott eltérő viselkedése összhangban van azokkal a dohányon végzett megfigyelésekkel, amelyek szerint a hő- és a hidegstressz különböző jelátviteli utakat használ, vagy a stressz során a sejtben eltérő Ca^{2+} -forrást mobilizálnak (Gong és mtsai 1998).

4.2.4.3. Szignálmolekulák és abiotikus stresszek hatása a *PPRG2* transzkripciójára

A *PPRG2* fehérje a PR fehérjék közé tartozik. Mivel e géncsalád tagjait már számos növényfajban leírták és jellemezték (Bowles 1990) indukciós körülményeiről is bővebb ismeretekkel rendelkezünk. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy e gének indukcióját nemcsak különféle biotikus stresszek (pl. bakteriális és virális fertőzések), hanem abiotikus hatások széles skálája is kiválthatja. Kísérleteinkben - a *PPRG1*-hez hasonlóan - a *PPRG2* expressziós változásait is megvizsgáltuk abiotikus stresszek és növényi hormonok hatására.

Az általunk vizsgált növényi hormonok közül csak a MeJA és az ABA befolyásolta a *PPRG2* expresszióját (18. ábra). MeJA hatására a gén mRNS

szintje már fél óra elteltével jelentősen megemelkedett és 2 óráig magas szinten maradt, három óra elteltével azonban az alapértékre állt vissza. A MeJA tehát - a mechanikai stresszekhez hasonlóan - képes befolyásolni a *PPRG2* expresszióját. A MeJA a növényekben a sebzés elsődleges mediátora, így elképzelhető, hogy a *PPRG2* sebzést követő indukciójában (16. ábra) is szereppel bír.

Kísérleteink azt mutatják, hogy az általunk izolált *PPRG* gének sebzés hatására megfigyelhető indukciója részben, vagy teljesen eltérő szignálutak közvetítésével valósul meg. Bár sebzésre mindkét gén expressziója megemelkedik, sebzés nélküli MeJA kezeléssel csak a *PPRG2* indukciója váltható ki. Valószínű tehát, hogy a *PPRG1* sebzést követő indukciója MeJA-független, míg a *PPRG2* indukálása MeJA-val összefüggő jelátviteli útvonal(ak)on történhet. Az eltérő szabályozási útvonalak léte utal a két gén sebzést követően mutatott eltérő indukciós kinetikájára is. Ez alapján tehát elképzelhető, hogy a lúdfűhöz és a paradicsomhoz hasonlóan a lucernában is több jelátviteli úton valósul meg a sebzés-indukálható gének szabályozása.

18. ábra. A *PPRG2* expressziójának változásai abiotikus stresszek és szignálmolekulák hatására. A számok a kezelés kezdetétől a mintavételig eltelt órákat jelölik. Hibridizációs próbaként a TB21 szolgált.

A szalicilsav a növényekben a többnyire elősködők támadásának következtében szabadul fel, és hatással van számos patogenezissel összefüggő gén expressziójára. A PR10 géncsalád több tagjáról - a

PPRG2-vel nagyfokú homológiát mutató *MsPR10*-ről és a szója *Sam22* génjéről - is ismert, hogy expressziójuk SA kezelésre megváltozik. Kísérleteinkben SA kezelés hatására nem tapasztaltuk a *PPRG2* expressziójának megváltozását. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a *PPRG2* szabályozása SA-független szignálútvonalon keresztül is megvalósulhat, és így eltérhet a géncsalád más tagjaitól.

Számos, a PR10 családba tartozó fehérje génjéről írták le eddig, hogy ABA hatására indukálódik (Luo és mtsai 1992; Wang és mtsai 1999). Az ABA kezelés a *PPRG2* transzkripciójára is hatással volt: 30 perc elteltével emelkedett mRNS szintet tapasztaltunk, amely később visszaállt az alapszintre. A *PPRG2* ABA kezelés hatására tehát tranzienst aktivációt mutatott, ugyanakkor az aranka fertőzés a gén konstansan magas mRNS szintjét idézte elő (4.2.3. fejezet). Ez a megfigyelés jelzi, hogy - bár a parazitizmus folyamán a vízvesztés következtében előálló ABA emelkedés szerepet játszhat a *PPRG2* indukciójában - a gén parazita támadás hatására tapasztalt tartósan magas expressziójának fenntartása más, ABA független jelátviteli utakon valósul meg.

A parazita növény támadásának következtében fellépő vízhiányt ez esetben is a *PPRG1*-nél leírt módon - PEG és NaCl segítségével - modelleztük. Mind PEG, mind NaCl kezelés hatására megnövekedett expressziót tapasztaltunk. A PEG kezelés alatt a *PPRG2* mRNS szintje különböző mértékű és gyorsaságú változást mutatott. 10 és 20%-os PEG oldat hatására csak 1 óra elteltével tudtunk emelkedett expressziót kimutatni. A 30%-os oldat már 30 perc elteltével látható indukciót eredményezett. NaCl hatására a gén indukciója csak a kezelés kezdetét követő 2 óra múlva következett be, amely 1 óra elteltével tovább

erősödött. A gén indukciója a vizsgált időtartamon (0-3 h) belül tehát mindkét kezelést követően tartósan magas maradt.

Az arankafertőzéshez hasonlóan a vízvesztés hatására tapasztalt konstans expresszió-emelkedés is megerősíteni látszik, hogy a *PPRG2* regulációja nincs kizárólagos összefüggésben a megemelkedő endogén ABA szinttel. Ha a gén szabályozása a vízvesztés hatására kizárólag ABA-függő jelátviteli útvonalakon történne, PEG kezelést követően is tranziens indukciót tapasztaltunk volna. Valószínű tehát, hogy a *PPRG2* szabályozása ABA-független útvonalakon is megvalósulhat. Ezt támasztja alá az is, hogy a *PPRG2* indukciója a 30%-os PEG kezelést követően már 30 perc elteltével kimutatható. Abban az esetben, ha a *PPRG2* gén szárazságindukciója kizárólag ABA-függő jelátviteli útvonalon valósulna meg, szükségképpen az indukció későbbi megjelenésével kellene számolnunk. Az indukció gyors megjelenése tehát szintén egy ABA-független jelátviteli útvonal részvételét sejteti a *PPRG2* szabályozásában.

Bár a napokon át tartó vízhiány expressziós hatásának vizsgálatára a fenti kísérletekkel nem nyílik mód, valószínű, hogy a vízháztartást érintő stresszeket és az arankafertőzést egyaránt a *PPRG2* konstans expresszió-emelkedése kíséri. Így felvetődik annak a lehetősége, hogy a gén aranka által okozott tartós indukciója az élősködés során fellépő vízhiány következménye, és elképzelhető, hogy a két folyamat által beindított jelátviteli folyamatok egymással azonos, vagy részben azonos szignálutak mentén valósulnak meg.

A hidegkezelés szintén kiválthatja az endogén ABA szintjének emelkedését. Hideg hatására azonban - a PEG kezeléshez hasonlóan -

tartós expresszió-emelkedést kaptunk, amely az ABA kezeléshez viszonyítva időben eltolódva következett be. Míg ABA hatására már a kezelés 30. percében megemelkedett mRNS szintet tapasztaltunk, ugyanezt a hidegkezelés során csak két óra elteltével figyeltük meg. A *PPRG1*-gyel ellentétben tehát ebben az esetben nem kizárt, hogy a *PPRG2* indukcióját a hideg hatására felszabaduló endogén ABA idézi elő. Eltérés mutatkozik azonban a két indukció kinetikájában: az ABA átmeneti, míg a hidegkezelés konstansan magas mRNS szintet eredményez. Ez jelzi, hogy - bár a *PPRG2* gén kezdeti indukciójában szerepet játszhat a megemelkedett endogén ABA szint - a későbbi konstansan magas expresszióért azonban minden bizonnyal más mechanizmusok felelősek. Valószínű tehát, hogy a *PPRG2* regulációjában legalább két, egymástól részben vagy teljesen különböző jelátviteli útvonal vesz részt.

Hőstressz esetén az indukciós kép sok hasonlóságot mutat a hidegstresszre adott válaszhoz. Egyik kezelés esetében sem tapasztalunk nagymértékű mRNS-szint emelkedést közvetlenül az indukciót követően, hanem az mindig időben eltolódva következik be. További közös vonás, hogy az indukció egyik esetben sem tranzienst, a megemelkedett mRNS szint a kezelés kezdetétől számított 6 óra múlva is kimutatható. A két indukció kinetikájában különbséget mindössze az mRNS-szint emelkedésében találunk: a hőkezelés 30-adik percétől kezdődően a *PPRG2* mRNS szintjében enyhe emelkedés mutatkozik. Az emelkedés csekély mértéke azonban nem nyújt biztos támpontot arra nézve, hogy ez esetben valódi expresszió-emelkedésről vagy csupán az alapállapotú szövetekben előforduló természetes ingadozásról van-e szó. A mindkét

kezelés hatására 3 és 6 óra elteltével kimutatható erős indukció azonban arra utal, hogy a *PPRG2* regulációja mindkét stresszt követően hasonló jelátviteli útvonalakon mehet végbe.

A CaCl_2 kezelés a *PPRG2* tranziens indukcióját eredményezte: a gén mRNS szintje a kezelés második órájában emelkedett meg, majd 1 óra elteltével visszatért az alapszintre. A *PPRG2* gén folyamatos indukcióját tehát nem tudjuk kiváltani a Ca^{2+} -szint megemelésével. Ehhez hasonlóan nem volt képes a konstansan magas expresszió kiváltására a MeJA és az ABA kezelés sem (18. ábra).

A növényben károsodást okozó stresszek számos jelátviteli útvonalat kapcsolnak be, amelyeknek csupán egy szeletéért felelősek a stresszhatásra felszabaduló szignálmolekulák. A *PPRG2* átmeneti indukcióját kiváltó ABA, MeJA és CaCl_2 mindannyian abiotikus stresszek mediátorai. E jelmolekulák nem okoznak fiziológiai károsodást a növény életfolyamataiban, mivel jelenlétük csupán közvetetten utal a stresszek bekövetkezésére. A sókezelés, szárazság, hőmérsékleti behatások, illetve az arankafertőzés ugyanakkor kedvezőtlenül befolyásolják a növény életfolyamatait és hosszútávon annak pusztulásához vezetnek. Alkalmazásuk - szignálmolekulákkal ellentétben - a *PPRG2* tartósan magas expresszió-emelkedését vonja maga után. Ezért elképzelhető, hogy a *PPRG2* tranziens illetve tartósan magas expresszióját eltérő szabályozási folyamatok irányítják. Amíg a szignálmolekulák által beindított jelátviteli folyamatok csupán a *PPRG2* tranziens indukcióját eredményezik, addig az abiotikus stresszek által szabályozott szignálok a gén tartós indukciójához vezetnek, ami arra

utal, hogy a *PPRG2* folyamatos indukciójának kiváltása az általunk vizsgált szignálmolekuláktól független jelátviteli út(ak)on történik.

4.2.4.4. Patogén fertőzés hatása a *PPRG* gének expressziójára

A növényi stresszgének indukcióját a különböző abiotikus stresszeken kívül számos biotikus stressz is kiválthatja. Ezek közül a legnagyobb gazdasági jelentőséggel bíró és egyben a legalaposabban tanulmányozott terület a növényi patogének által előidézett válaszok vizsgálata. Mára már több növényfajból is számos gén (PR gének) vált ismertté, amelyek expressziójára hatással van a patogén támadás. A PR10 családba tartozó *PPRG2* pillangósokban található homológjai nagy részéről kimutatták, hogy azok patogén fertőzéssel indukálhatóak (Chiang és Hadwiger 1990; Esnault és mtsai 1993; Breda és mtsai 1996; Gamas és mtsai 1998). Kimutatták azt is, hogy a patogén fertőzés a kalmodulinok expressziójára is hatással lehet (Heo és mtsai 1999; Yamakawa és mtsai 2001). Ez alapján valószínűsítettük, hogy a *PPRG* gének indukciója nemcsak arankafertőzésre, hanem patogének hatására is bekövetkezhet. Kísérleteinkben két baktériumtörzset használtunk: A *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* inkompatibilis, míg a *Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae* kompatibilis fertőzést képes kialakítani lucernán (Esnault és mtsai 1993).

A *PPRG1* mRNS szintjében többszöri ismételts eredményeként sem tudtunk hibridizációs jelet kimutatni (nem közölt adat). Ez alapján elképzelhető, hogy a patogén fertőzés nincs hatással a *PPRG1* transzkripciójára. Mivel azonban az inokuláció során többféle

mechanikai stressz (sebzés és érintés) is éri a növényt, a korai időmintákban (1 h) joggal vártuk volna a *PPRG1* gén indukcióját. Ebből kiindulva lehetséges, hogy az indukció elmaradása labortechnikai okokra vezethető vissza, és fennáll a valószínűsége, hogy a továbbiakban a hibridizáció körülményeinek változtatásával pontosabb képet kapunk a patogén fertőzés hatásáról.

19. ábra. A *PPRG2* expressziójának northern analízise inkompatibilis és kompatibilis patogén fertőzésének hatására. Hibridizációs próbaként a TB21 szolgált.

A *PPRG2* indukcióját mindkét baktériummal történt fertőzés előidézte (19. ábra). Legkorábban a kezelést követő 3 óra elteltével tapasztaltunk jelentősen megemelkedett mRNS szintet, ami a kezelés ideje alatt konstansan magas maradt. Hasonlóan tartós expressziót e patogének hatására már a *PPRG2* több homológjánál is leírtak: Breda és mtsai (1996) a *M. sativa* *MsPR10* génjének, Gamas és mtsai (1998) a *M. truncatula* *MtPR10-1* génjének vizsgálatakor.

A *PPRG2* indukciójának vizsgálatánál már korábban felmerült, hogy a gén expressziós kinetikája összefüggésben lehet a stresszek jellegével: az élettani károsodást okozó kezelések hatására folyamatos expresszió-emelkedést tapasztaltunk, míg a szignálmolekulák csak a gén tranziens aktivációját idézték elő. A patogén fertőzés a *PPRG2* konstans aktivációját okozta, amely szintén alátámasztja ezt a megfigyelést. A jelenséget korábban Breda és munkatársai (1996) is megfigyelték a lucerna *MsPR10* génjének vizsgálatakor: *Pseudomonas* fertőzés hatására a gén konstans, SA kezelésre pedig annak tranziens indukcióját tapasztalták.

A *PPRG2* konstans indukciója tehát számos, az élettani folyamatokat károsan befolyásoló hatásra bekövetkezik. E stresszek egy részének (sóstressz, hő- és hidegkezelés, arankafertőzés) közös vonása, hogy a növény vízháztartását kedvezőtlenül befolyásolják. Mivel a növényben fellépő vízhiány (PEG kezelés) egyedül is elegendő a *PPRG2* tartós indukciójához, elképzelhető, hogy az e stresszek során tapasztalt konstans expresszió-emelkedés az általuk előidézett vízhiány következménye.

Valószínű, hogy a vízvesztésen kívül más folyamatok is szerepet játszhatnak a *PPRG2* tartós indukciójában. Erre utal a patogén fertőzés következtében fellépő indukció. Több növényben is kimutatták, hogy sok PR gén expressziója jórészt az edénynyalábokra korlátozódik (Carr és mtsai 1987; Stanford és mtsai 1990; Zhu és mtsai 1993; Breda és mtsai 1996). Ennek oka, hogy néhány növénypatogén baktérium – mint pl. a burgonyafélék hervadását és a banán Moko betegségét okozó *Pseudomonas solanacearum*, vagy a keresztesek feketetrohadását előidéző *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* – a szállítóedény-nyalábokban olyan mértékben felszaporodhat, hogy meggátolja a víz és a tápanyagok transzportját (Agrios 1997). Bár elképzelhető, hogy hasonló fertőzést a fentiekkel rokon baktériumfajok is előidézhetnek, az általunk használt baktériumtörzsek esetében nem írtak le hasonló jelenséget. A lucerna levelekbe infiltrált baktériumok már röviddel a fertőzést követően (3 h) előidézték a *PPRG2* indukcióját, amely idő nem elegendő a vízháztartást befolyásoló mértékben történő elszaporodásukhoz. Mivel a *Pseudomonas* a lucernával kialakított inkompatibilis kapcsolata miatt nem képes a gazdanövényben számottevő mértékben elszaporodni, a gén

későbbi magas mRNS szintje szintén nem lehet a megváltozott vízháztartás következménye. Sokkal valószínűbb tehát, hogy a *PPRG2* indukciója a baktériumok megjelenésének és nem az általuk okozott vízhiánynak a következménye.

Bár a baktériumtörzsek egyike kompatibilis, másika inkompatibilis kapcsolatot alakít ki a gazdanövénnel, a két patogén által kiváltott indukció között nem tapasztaltunk számottevő eltérést. Patogén fertőzést követően több esetben is megfigyelték, hogy számos védekező reakció mind kompatibilis, mind inkompatibilis fertőzést követően aktiválódik (Heath 2000). Úgy tűnik tehát, hogy a *PPRG2* transzkripciója elsősorban a kórokozók jelenlététől és nem a parazita kapcsolat jellegétől függ, ezért feltételezhető, hogy a vizsgált idő alatt mindkét fertőzés azonos, vagy egymással kapcsolatban lévő védekezési útvonalakon keresztül szabályozza a *PPRG2* megnyilvánulását. Mivel ezek a jelátviteli utak - az abiotikus hatásokhoz hasonlóan - konstans indukciót okoznak, elképzelhető, hogy a patogén- és abiotikus stresszindukálható szignálutak egymással átfedést mutatnak.

Bár a fenti kísérletek nem adnak elegendő támpontot a *PPRG* gének szabályozásában szerepet játszó mechanizmusok alaposabb feltérképezéséhez, annyi bizonyos, hogy expressziójuk - hasonlóan a legtöbb stresszgénhez - többféle kontroll alatt áll. E rendkívül érzékeny mechanizmusok igazítják számos gén kifejeződését a folyamatosan változó körülményekhez, amely a hatékony alkalmazkodás és túlélés elengedhetetlen feltétele.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Irodalmi adatok alapján mindeddig nem ismertünk olyan géneket, amelyek a gazdanövényben egy parazita növény fertőzésére válaszolnak. Munkánk során ezért olyan gének vizsgálatát tűztük ki célul, amelyeknek expressziója a fertőzés hatására megváltozik. Modellrendszerül a kisaranka (*Cuscuta trifolii* Bab et. Gibs.) és a lucerna (*Medicago sativa* L.) együttélését választottuk. A dolgozatban szereplő főbb eredményeket az alábbiakban foglalom össze:

- Differential display és differenciál-hibridizáció segítségével két gént izoláltunk, amelyek mRNS szintje a parazita régióban tartósan megemelkedik.
- Megállapítottuk, hogy mindkét gén a lucernából származik és több kópiában található a genomban.
- A PPRG1 a kalmodulinokkal, a PPRG2 a PR10 családba tartozó fehérjékkel mutat rokonságot.
- Northern hibridizációkkal megvizsgáltuk e gének expressziós sajátságait. Megállapítottuk, hogy a PPRG gének expresszióját számos hatás befolyásolhatja.
- A *PPRG1* expressziója arankafertőzés, illetve hidegkezelés és CaCl_2 hatására tartósan megemelkedik, mechanikai stresszek,

ABA, vízhiány és sóstressz pedig a gén tranziens indukcióját okozzák. Emelt hőmérséklet és MeJA hatására nem tapasztaltunk expresszióváltozást.

- A *PPRG2* expresszióját mechanikai stresszek és MeJA is előidézik. Környezeti stresszekre (sóstressz, hő- és hidegkezelés, aranka- és patogénfertőzés) a gén tartós indukcióját, a stresszek során felszabaduló szigálmolekulák (ABA, CaCl_2) hatására pedig tranziens megnyilvánulását tapasztaljuk.
- A PPRG gének az első jellemzett szekvenciák, amelyet kompatibilis növényi gazda-parazita kapcsolatból izoláltak.

Summary

Over 3000 species of flowering plants utilise a parasitic mode of nutrition, yet basic knowledge about the physiology, biochemistry and genetic background of their parasitic interaction is limited. Dodder, a holoparasitic flowering annual plant commonly parasites legume crops including alfalfa. Our group investigates the molecular background of the plant parasitism. The model system for studying the plant-parasite relationship is the dodder-alfalfa interaction, since this host is one of the most important legumes in Hungarian agriculture.

The aim of my work was: Isolation and characterization of genes/DNA fragments specifically expressed during the process of parasitism in haustoria and/or stem cells of host or parasite plant, respectively. To isolate parasitism-specific clones cDNA library was constructed from poly-A RNA molecules isolated from the region of alfalfa stem parts where *Cuscuta trifolii* had been attached and haustoria developed, and screened by differential hybridization. In addition differential display was applied on mRNA samples isolated from (i) alfalfa stem which was never attached by dodder, (ii) dodder containing no haustoria and (iii) the parasite region, containing haustoria, alfalfa and dodder stem.

Several fragments were identified and tested in reverse northern and northern hybridization and two of them were selected for further experiments. After identifying of 5' regions by RACE, full-length cDNAs were designated as *PPRG* for "plant parasite responsive genes". Homology searches and secondary structure analysis revealed that the *PPRG1* shows substantial homology to genes encoding calmodulin-

related proteins and pollen allergens from various plant species. *PPRG2* has high similarity to pathogenesis-related (PR) proteins from different legumes. Computer analysis of *PPRG2* protein detected a Betv1 motif characteristic for the members of PR10 gene family.

Southern hybridization proved that *PPRG* genes are derived from alfalfa and several copies are present in the alfalfa genome. Using northern hybridization low basic transcript levels of *PPRG1* were detected in stem, leaf and flower, while considerably lower levels of the mRNA were found in root and crop. *PPRG2* mRNA is also present in low amount in many of steady-state alfalfa tissues, and in high amount in root and crop indicating that *PPRG2* has an organ-specific regulation.

For detailed analysis of their expression northern analysis was performed. Results indicated that expression of *PPRG* genes could be regulated by a variety of stimuli.

Our experiments showed constant increase of *PPRG1* mRNA level following dodder infection, cold stress and CaCl_2 treatment; however, transient induction could be observed for mechanical stresses, ABA, dehydration and salt stress. No induction was detected following heat stress and MeJA.

Induction of *PPRG2* occurs for mechanical stresses and MeJA as well. Environmental stresses (dehydration, salt stress, temperature changes, infection with dodder and bacteria) trigger a constant increase, mediator molecules trigger transient increase in *PPRG2* mRNA level.

PPRG genes are the first characterized sequences isolated from a compatible host-parasite plant interaction.

6. TOVÁBBI MUNKÁK, JAVASLATOK

Munkánk során a növényi parazitizmus genetikai hátterét molekuláris technikák alkalmazásával vizsgáltuk. A lucerna-kisaranka modellrendszerben olyan géneket izoláltunk, amelyek expressziója a lucernában aranka fertőzés hatására jelentősen megemelkedik, és tartósan magas marad. Megállapítottuk, hogy e gének több kópiában vannak jelen a lucerna genomjában és expressziójukat az arankafertőzésen kívül még számos más biotikus és abiotikus stressz is szabályozza.

A lucerna-aranka parazita kapcsolat molekuláris alapú tanulmányozásának ez a dolgozat csupán egyik állomása. A vizsgálatok jövőben feltehetőleg több szálon is tovább folytatódhatnak.

A *PPRG* gének további vizsgálata során elsősorban azok szerepéről szeretnénk közelebbi ismereteket szerezni. Bár a gének funkcióját a más növényekben található homológok alapján bizonyos mértékig előrejelezhetjük, valódi bizonyítékot csak az antiszensz növények vizsgálatával nyerhetünk. Mivel a lucerna hatékony genetikai transzformációja már régóta megoldott, ennek segítségével tervezzük a *PPRG1* és *PPRG2* különböző hosszúságú antiszensz fragmentjeivel stabil transzformáns lucerna vonalak létrehozását. E vonalak esetleges fenotípusos és biokémiai sajátosságai, vad típustól eltérő vagy azzal megegyező stresszérzékenysége mind támpontul szolgálhat a *PPRG* gének funkciójának karakterizálásában.

Céljaink között szerepel, hogy a dolgozatban is alkalmazott technikák segítségével további géneket izoláljunk és jellemezzünk. Ezek között

különös figyelmet fordítanánk a parazitából származó gének vizsgálatára. Mivel a parazitában lezajló változások és kivált azok genetikai háttere mindmáig kevésbé ismert, az arankából származó gének vizsgálata nagyban hozzájárulhatna ezek megismeréséhez.

A parazita génjeinek ismeretében lehetőség kínálkozna a molekuláris biológiában az utóbbi néhány évben leírt és széles körben tanulmányozott génszabályozási mechanizmusok gyakorlati alkalmazására a parazita elleni védelemben. Transzgenézissel olyan lucernanövényeket állíthatnánk elő, amelyek az aranka számára létfontosságú génekre specifikus faktorokat (antiszensz, ill. kettős szálú DNS darabokat) termelnek és azt a parazita számára felvehető formában szekretálják. E molekulák az arankába kerülve hatékonyan gátolhatják az élősködő génműködését, amely végül a parazita pusztulásához vezet. A módszer egyik előnye, hogy a génspecifikus faktorok megfelelő kiválasztásával képesek lehetünk fajspecifikus gátlás kialakítására, így a növény felhasználása során nem kell számolnunk a bioaktív anyagok termelésénél fellépő toxicitási problémákkal.

Az arankából izolált gének funkciójának elemzéséhez elengedhetetlen azok *in vivo* tanulmányozása. A vizsgálni kívánt, módosított aranka gének visszajuttatásának előfeltétele azonban egy jól működő, hatékony aranka-transzformációs rendszer kidolgozása. Ezt a munkát Bakos Ágnes az aranka kalluszkultúra és az *in vitro* regeneráció folyamatának kidolgozásával indította el. Kutatócsoportunk azóta mind Agrobaktérium-közvetítette, mind biolisztikus módszerrel sikeres génbeviteli kísérleteket végzett arankán. E transzformációs rendszer a jövőben

hatékony segítséget jelent majd az újonnan izolált aranka gének vizsgálatában.

Az új gének izolálása mellett a parazita fertőzés más génekre gyakorolt hatását is tanulmányozzuk. Számos különböző lucerna gén (*CHS*, *IFR*, *MMK4*, stb.) expressziójának változását vizsgáljuk az arankafertőzést követően. Mivel e gének többnyire jól jellemzettek és sokuk funkciójáról is rendelkezünk adatokkal, tanulmányozásukkal a gazdanövény ismert védekezési és anyagcsereútvonalainak a fertőzést követő válaszfolyamatokban való részvételéről kaphatunk képet.

Az aranka-rezisztens lucernakultúrák előállításában nagy előrelépést jelenthet az ismert és újonnan izolált gének promóterének vizsgálata. Bár a *PPRG* gének aktivációját sokféle stressz előidézheti, promóterük – ill. az újonnan izolált gének promótereinek - vizsgálata és módosítása alkalmassá teheti őket az arankának ellenálló lucernaállományok előállításában történő felhasználásra. Arankafertőzésre specifikusan válaszoló promóter(ek) használatával elérhetnénk, hogy a parazita támadásának hatására a gazdanövény fitotoxikus anyagok termelését indítsa be. Így - hasonlóan a patogén támadásra bekövetkező hiperszenzitív reakcióhoz - az arankával fertőzött lucerna növény még azelőtt elpusztulna, mielőtt rajta az aranka megerősödne, és a szomszédos növényeket megfertőzné. Ily módon az aranka-rezisztens lucernanövény nemesítéséhez szükséges további erőfeszítések mellett e „populációs hiperszenzitív reakció” segítségével újabb megoldás kínálkozna a hazai lucernaállományok aranka-mentesítésére.

Az aranka - és általában a parazita növények - elleni védekezési lehetőségeink jelenleg igen korlátozottak. A „hagyományos” védekezési módszereket (pl. kemikáliák alkalmazása, rezisztens növények keresztezéses nemesítése) a jövőben hatékonyan kiegészíthetik a molekuláris genetikai eszközök segítségével nemesített növények és az ezekhez kapcsolódó új eljárások. Ezek kidolgozásának és hatékony alkalmazásának azonban nélkülözhetetlen előfeltétele a parazitában és gazdanövényében bekövetkező folyamatok megismerése és megértése. Jelenlegi kutatásaink - a partnernövényekben a parazitizmus folyamán szerepet játszó gének izolálása, expressziójuk tanulmányozása, a különböző szövettenyésztési és génbeviteli eljárások kifejlesztése - mind az élősködés biológiájának pontosabb megismerését célozzák és reményeink szerint a jövőben hozzájárulnak a paraziták elleni sikeres védekezési stratégiák kidolgozásához.

7. PUBLIKÁCIÓK

Referált folyóiratban megjelent közlemények:

Borsics T., Bakos Á., Hunyadi K. és Lados M. (1999) A növényi parazitizmus genetikai hátterének vizsgálata a lucerna (*Medicago sativa*) és a kisaranka (*Cuscuta trifolii*) modellrendszerben. *Növényvédelem* **35(1)**, 3-8

Borsics T., Lados M. (2001) cDNA cloning of a mechanical/abiotic stress-inducible calmodulin-related gene from dodder-infected alfalfa. *Plant, Cell & Environment* **24 (6)**, 649-656.

Bakos Á., **Borsics T.**, Toldi O., Babos K. és Lados M. (2000) Evidence for somatic embryogenesis during plant regeneration from seedling-derived callus of dodder (*Cuscuta trifolii* Bab. et Gibs). *Plant Cell Reports* **19**, 525-528

Borsics T., Mihálka V., Oreifig AS., Bárány I., Lados M., Nagy I., Jenes B. és Toldi O. (2001) Methods for genetic transformation of the parasitic weed dodder (*Cuscuta trifolii* Bab. et Gibs) and for PCR-based detection of early transformation events. *Plant Science* (Közlésre elfogadott publikáció)

Borsics T., Lados M. (előkészületben) Cloning and characterisation of a new dodder/abiotic stress-inducible PR10 cDNA from alfalfa.

Poszterek:

Borsics T., Lados M. (1998) A lucerna (*Medicago sativa*) és az aranka (*Cuscuta trifolii*) között kialakuló parazitizmus molekuláris genetikai alapjainak vizsgálata. *A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 3. Munkaértekezlete*, Sárospatak

Borsics T., Bakos Á., Lados M. (1999) A növényi parazitizmus vizsgálata a lucerna-kisaranka modellrendszerben. *IV. Magyar Genetikai Kongresszus*. Siófok

Borsics T., Lados M. (2000) A parazitizmus során megnyilvánuló cDNS-ek izolálása és jellemzése lucernából aranka fertőzés hatására. *A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 5. Munkaértekezlete*, Sopron

Borsics T., Lados M. (2000) Isolation and characterization of two novel cDNAs from dodder infected alfalfa. ISPMB 6th International Congress of Plant Molecular Biology. Poszter S31-09. Québec, Kanada, 2000. június 18-24.

Előadások:

Borsics T., Bakos Á., Hunyadi K. és Lados M. (1997) A növényi parazitizmus génexpressziós mintázatának vizsgálata a lucerna (*Medicago sativa*) és kisaranka (*Cuscuta trifolii*) modellrendszerben. III. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely

Borsics T., Hunyadi K., Bakos Á. és Lados M. (1997) A növényi parazitizmus génexpressziós mintázatának vizsgálata a lucerna (*Medicago sativa*) és kisaranka (*Cuscuta trifolii*) modellrendszerben. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest.

Bárány I., **Borsics T.** és Lados M. (1999) *In vitro* szövettenyésztési, regenerációs és transzformációs rendszer kidolgozása a lucerna (*Medicago sativa*) és a kisaranka (*Cuscuta trifolii*) modellrendszerében. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest.

Borsics T., Lados M (2000) Isolation and characterization of two novel cDNAs from dodder infected alfalfa. ISPMB 6th International Congress of Plant Molecular Biology. Québec, Kanada, 2000. június 23.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek, Dr. Orosz László Professzor Úrnak és Dr. Béres Imrének munkám során nyújtott támogatásukért, valamint dr. Lados Miklósnak, aki a téma szülőatyjaként elsősorban a munka indulásakor nyújtott segítséget.

Köszönet illeti Kalocsai Évát, Maszlag Editet és Sugatagi Henriettát a kitűnő technikai asszisztenciáért és Takács Gábort a fotózási munkákért.

Köszönöm Dóczi Róbertnek és Dr. Silhavy Dánielnek a dolgozat írása, valamint Dr. Bánfalvi Zsófiának és Dr. Toldi Ottónak a publikációk készítése során nyújtott hasznos tanácsaikat.

És végül, de nem utolsósorban, köszönöm szüleimnek türelmüket és odaadó támogatásukat.

9. A DOLGOZATBAN IDÉZETT IRODALMAK JEGYZÉKE

Agrios NG. (1997) Plant Pathology (4th Edition). *Harcourt Academic Press USA*

Albrecht H., Yoder JI., Phillips DA. (1999) Flavonoids promote haustoria formation in the root parasite *Triphysaria versicolor*. *Plant Physiol.* **119**(2), 585-592

Albrecht T., Kehlen A., Stahl K., Knofel HD., Sembdner G., Weiler EW. (1993) Quantification of rapid, transient increases in jasmonic acid in wounded plants using a monoclonal antibody. *Planta* **191**, 86-94

Aloni R. (1995) The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Edited by Davies PJ. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 531-546

Altschul SF., Madden TL., Schaffer AA., Zhang J., Zhang Z., Miller W. és Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389-3402

Antikainen M. és Griffith M. (1997) Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. *Physiol. Plant.* **99**, 423-432

Atsatt PR. (1983) Host-parasite interactions in higher plants. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, 12C New Series (eds Lange OL, Nobel PS, Osmond CB and Ziegler H) *Springer-Verlag Berlin*, 519-535

Bakos Á., Fári M., Toldi O. és Lados M. (1995) Plant regeneration from seedling derived callus of dodder (*Cuscuta trifolii* Bab. et Gibs.) *Plant Sci.* **109**, 95-101

Baron C. és Zambryski PC. (1995) The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Ann. Rev. Gen.* **29**, 107-129

Bartling D., Bülter H., Weiler EW. (1993) *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel member of the EF-Hand superfamily of calcium-binding proteins. *Plant Physiol.* **102**, 1059-1060

Bell CJ., Dixon RA., Farmer AD., Flores R., Inman J., Gonzales RA., Harrison MJ., Paiva NL., Scott AD., Weller JW., May GD. (2001) The *Medicago* Genome Initiative: a model legume database. *Nucl. Acids Res.* **29**, 114-117

Bergey DR. és Ryan CA. (1999) Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol. Biol.* **40(5)**, 815-823.

Birnboim HC. és Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7(6)**, 1513-1523

Biyaseheva AE., Molotkovskii YG. Mamonov LK. (1993) Increase of free Ca^{2+} in the cytosol of plant protoplasts in the response to heat stress as related to Ca^{2+} homeostasis. *Russian Plant Physiol.* (English Translation) **40**, 540-544

De Bock F. és Fer A. (1992) Effects of abscisic acid on the transfer of sucrose from host, *Pelargonium zonale* (L.) Aiton, to a phanerogamic parasite, *Cuscuta reflexa* Roxb. *Australian Plant Physiol.* **19**, 679-691

Bommer D., Haberhausen G., Zetsche K. (1993) A large deletion in the plastid DNA of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa* concerning two ribosomal proteins (rpl2, rpl23), one transfer RNA (trnI) and an ORF2280 homologue. *Curr. Genet.* **24(1-2)**, 171-176

ter Borg SJ. és van Ast A. (1991) Soil moisture, root architecture and broomrape (*Orobancha crenata*) infestation in faba bean (*Vicia faba*). In: *Progress in Orobancha Research* (eds. Wegman K. and Musselman LJ.). Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, 278-292

Bowler C. és Fluhr R. (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Sci.* **5(6)**, 241-246

Bowles DJ. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 873-907 Review

Braam J. (1992a) Regulation of expression of calmodulin and calmodulin-related genes by environmental stimuli in plants. *Cell Calcium.* **13(6-7)**, 457-463

Braam J. (1992b) Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in cultured *Arabidopsis* cells: induction by calcium and heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89(8)**, 3213-3216

Braam J. és Davis R.W. (1990) Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* **60(3)**, 357-364

Braam J., Sistrunk ML., Polisensky DH., Xu W., Purugganan MM., Antosiewicz DM., Campbell P., Johnson KA. (1997) Plant responses to environmental stress: regulation and functions of the *Arabidopsis* TCH genes. *Planta* **203**, S35-S41. Review

Breda C., Sallaud C., el-Turk J., Buffard D., de Kozak I., Esnault R., Kondorosi A. (1996) Defense reaction in *Medicago sativa*: a gene encoding a class 10 PR protein is expressed in vascular bundles. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9(8)**, 713-719

Breiteneder H, Ebner C. (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106(1 Pt 1)**, 27-36 Review

Breiteneder H., Pettenburger K., Bito A., Valenta R., Kraft D., Rumpold H., Scheiner O., Breitenbach M. (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* **8(7)**, 1935-1938

Breiteneder H., Hoffmann-Sommergruber K., O'Riordain G., Susani M., Ahorn H., Ebner C., Kraft D., Scheiner O. (1995) Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens. *Eur. J. Biochem.* **233(2)**, 484-489

Bufe A., Spangfort MD., Kahlert H., Schlaak M., Becker WM. (1996) The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta* **199(3)**, 413-415

Campbell NA. (1996) Biology. 4th Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. Menlo Park, California USA.

Carr JP., Dixon DC., Nikolau BJ., Voelkerding KV., Klessig DF. (1987) Synthesis and localization of pathogenesis-related proteins in tobacco. *Mol. Cell Biol.* **7(4)**, 1580-1583

- Cechin I. és Press MC. (1993) Nitrogen relations of the sorghum-*Striga hermonthica* host-parasite association: growth and photosynthesis. *Plant, Cell Environ.* **16**, 237-247
- Chang, M. és Lynn, DG. (1986) Haustoria and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *J. Chem. Ecol.* **12**, 561-579
- Chen HH., Li PH., Brenner ML. (1983) Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiol.* **71**, 362-365
- Chiang CC. és Hadwiger LA. (1990) Cloning and characterization of a disease resistance response gene in pea inducible by *Fusarium solani*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3(2)**, 78-85
- Church GM. és Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81(7)**, 1991-1995
- Cohen P. és Klee CB. (1988) Calmodulin, Molecular Aspects of Cellular Regulation. *New York, Elsevier*.
- Creelman RA., Tierney ML., Mullet JE. (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89(11)**, 4938-4941
- Crivici A. és Ikura M. (1995) Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Structure* **24**, 85-116
- Crowell DN., John ME., Russell D., Amasino RM. (1992) Characterization of a stress-induced, developmentally regulated gene family from soybean. *Plant Mol. Biol.* **18(3)**, 459-466
- Curvetto N., Darjania L., Delmastro S. (1994) Effect of ABA on free cytosolic calcium as measured in a population of protoplasts isolated from guard cells of *Vicia faba*. *Biocell* **18**, 75-81

Czímber Gy. (1969) A *Cuscuta campestris* Yuncker magvainak keményhéjúsága és a keményhéjú magvak herbicidrezisztenciája. *Mosonmagyaróvári Agrártud. Főisk. Közlem.* **12(5)**, 3-12

Czímber Gy. (1999) Veszélyes tizenkettő: Az aranka fajok (*Cuscuta* spp). *Gyakorlati Agroforum* **2**, 43-47

Dawson JH. (1989) Dodder (*Cuscuta* spp) control is established in alfalfa (*Medicago sativa*) with glyphosate and SC-0224. *Weed Tech.* **3**, 552-559

Delavault P., Estabrook E., Albrecht H., Wrobel R., Yoder J.I. (1998) Host-root exudates increase gene expression of asparagine synthetase in the roots of a hemiparasitic plant *Triphysaria versicolor* (Scrophulariaceae). *Gene* **222(2)**, 155-162

Dixon RA. és Lamb CJ. (1990) Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 339-367

Dixon RA., Harison MJ., Lamb CJ. (1994) Early events is the activation of plant defense responses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **32**, 479-501

Dörr I. (1972) Der Anschluß der *Cuscuta*-Hyphen an die Siebröhren ihrer Wirtspflanzen. *Protoplasma* **67**, 123-137

Dörr I. (1975) Development of transfer cells in higher parasitic plants. In: *Phloem Transport*, (eds Dainty JJ, Gorham PR, Srivastava LM és Swanson CA), *Plenum Press*, New York, 177-186

Dörr I. (1990) Sieve elements in haustoria of parasitic angiosperms. In: Behnke HD., Sjolund RD., eds. *Sieve elements – comparative*

structure, induction and development. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 239-256

Dörr I., Visser JH., Albers F. (1977) On the parasitism of *Alectra vogelii* Benth. (Scrophulariaceae). II Origin of lateral roots in the contact area of the haustorium. *Zeitschrift Pflanzenphysiol.*, **85**, 349-359

Drennan DSH. és El Hiweris SO. (1979) Changes in growth regulating substances in *Sorghum vulgare* infected with *Striga hermonthica*. In *2th International Symposium on Parasitic Weeds*, eds Musselmann LJ., Worsham AD., Epple Raleigh RE. North Carolina State Univ. 144-155

Durner J., Shah J., Klessing DF. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **2**, 266-274

Esnault R., Buffard D., Breda C., Sallaud C., el Turk J., Kondorosi A. (1993) Pathological and molecular characterizations of alfalfa interactions with compatible and incompatible bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae* and *Pseudomonas syringae* pv. *lisi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6(5)**, 655-664

Estabrook EM. és Yoder JI. (1998) Rhizosphere signalling between parasitic angiosperms and their hosts. *Plant Physiol.* **116**, 1-7

Feinberg AP. és Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132(1)**, 6-13

Fer A., Benharrat L., Rey L., Renaudin S. (1990) About some effects of the parasitism of *Cuscuta lupuliformis* Krock, on *Vicia sativa* L.: incidence on the biomass and on the content in several important mineral elements. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. **310**, Série III, pp. 113-120

Fristensky B., Horovitz D., Hadwiger LA. (1988) cDNA sequences for pea disease response genes. *Plant Mol. Biol.* **11**, 713-715

Frohman MA., Dush MK., Martin GR. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85(23)**, 8998-9002

Furuhashi K., Tada Y., Okamoto K., Sugai M., Kubota M., Watanabe M. (1997) Phytochrome participation in induction of haustoria of *Cuscuta japonica*, a holoparasitic flowering plant. *Plant Cell Physiol.* **38(8)**, 935-940

Gamas P., de Billy F., Truchet G. (1998) Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, MtN1 and MtN13, encoding products homologous to plant defense proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11(5)**, 393-403

Gawienowski MC., Szymanski D., Perera IY., Zielinski RE. (1993) Calmodulin isoforms in *Arabidopsis* encoded by multiple divergent mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **22(2)**, 215-225

Gilroy S., Hughes WA. és Trewavas AJ. (1986) The measurement of intracellular calcium levels in protoplasts from higher plant cells. *FEBS Lett.* **199**, 217-221

Gilroy S., Hughes WA. és Trewavas AJ. (1987) Calmodulin antagonists increase free cytosolic calcium levels in plant protoplasts *in vivo*. *FEBS Lett.* **212**, 133-137

Glatzel G. (1987) Haustorial resistance, foliar development and mineral nutrition in the hemiparasitic mistletoe *Loranthus europeus* Jacq. (Loranthaceae). *Parasitic Flowering Plants, Proceedings of the 4th*

International Symposium on Parasitic Plants, Marburg: Phillips Universität pp. 253-262

Gong M., van der Luit AH., Knight MR., Trewavas AJ. (1998) Heat-shock induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiol.* **116**, 429-437

Gowda BS., Riopel JL., Timko MP. (1999) NRSA-1: a resistance gene homolog expressed in roots of non-host plants following parasitism by *Striga asiatica* (witchweed). *Plant J.* **20(2)**, 217-230

Graham JH., Forsheiser FI., Stuteville DL., Erwin DC. (1979) A compedium of alfalfa diseases. The American Phytopathological Society Press, Minnesota

Gupta A. és Singh M. (1982) Mechanism of parasitisation by *Cuscuta reflexa*: Formation of haustoria by adenine and derivatives. In *Proceedings of 51st Annual Meeting of Society of Biological Chemists* (India) at Chandigarh, Nov.18-20, 192-193

Gupta A. és Singh M. (1983) Mechanism of parasitisation by *Cuscuta reflexa*: RNase activity in the haustorial region of *Cuscuta* and infected host tissues. *Physiol. Plant.* **58**, 523-526

Gupta A. és Singh M. (1985) Mechanism of parasitism by *Cuscuta reflexa*: Distribution of cytokinins in different regions of the parasite vine. *Physiol. Plant.* **63**, 76-78

Gutiérrez AR., Macintosh CA., Green JP. (1999) Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends Plant Sci.* **4(11)**, 429-438

Györgyey J., Vaubert D., Jimenez-Zurdo JL., Charon C., Troussard L., Kondorosi A., Kondorosi E. (2000) Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 62-71

Haberhausen G., Valentin K., Zetsche K. (1992) Organization and sequence of photosynthetic genes from the plastid genome of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. *Mol. Gen. Genet.* **232**(1), 154-161

Haberhausen G. és Zetsche K. (1994) Functional loss of all *ndh* genes in an otherwise relatively unaltered plastid genome of holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. *Plant Mol. Biol.* **24**(1), 217-222

Hammond-Kosack KE. és Jones JDG. (1997) Plant disease resistance genes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 575-607

Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557

Harvey RJ. és Darlison MG. (1991) Random-primed cDNA synthesis facilitates the isolation of multiple 5'-cDNA ends by RACE. *Nucl. Acids Res.* **19**(14), 4002

Haupt S., Oparka KJ., Sauer N., Neumann S. (2001) Macromolecular trafficking between *Nicotiana tabacum* and the holoparasite *Cuscuta reflexa*. *J Exp Bot.* **52**(354), 173-177

Heath MC. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**(4), 315-319 Review

Heo WD., Lee SH., Kim MC., Kim JC., Chung WS., Chun HJ., Lee KJ., Park CY., Park HC., Choi JY., Cho MJ. (1999) Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of

plant disease resistance responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(2), 766-771

Hibberd JM., Bungard RA., Press MC., Jeschke WD., Scholes JD., Quick WP. (1998) Localization of photosynthetic metabolism in the parasitic angiosperm *Cuscuta reflexa*. *Planta* **205**, 506-513

Hildmann T., Ebner M., Pena-Cortes H., Sanchez-Serrano JJ., Willmitzer L., Prat S. (1992) General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* **4**, 1157-1170

Hon W-C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok YC., Yang DSC. (1995) Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* **109**, 879-889

Huang JC., Chang FC., Wang CS. (1997) Characterization of a lily tapetal transcript that shares sequence similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (IPR) proteins. *Plant Mol. Biol.* **34**(4), 681-686

Hunyadi K. (1988) Szántóföldi gyomnövények és biológiájuk. *Mezőgazdasági Kiadó*, Budapest

Inoue H., Nojima H., Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**(1), 23-28

Iturriaga EA., Leech MJ., Barratt DH., Wang TL. (1994) Two ABA-responsive proteins from pea (*Pisum sativum* L.) are closely related to intracellular pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **24**(1), 235-240

Israel S., Dörr I., Kollmann R. (1980) Das Phloem der Haustorien von *Cuscuta*. *Protoplasma* **103**, 309-321

Jeschke WD., Rath N., Baumel P. (1994a) Modelling the flow and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. and its host *Lupinus albus* L. I. Methods for estimating net flows. *J. Exp. Bot.* **45**, 791-800

Jeschke WD., Rath N., Baumel P. (1994b) Modelling the flow and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. and its host *Lupinus albus* L. II. Flows between host and parasite and within the parasited host. *J. Exp. Bot.* **45**, 801-812

Joel DM. és Portnoy VV. (1998) The angiospermous root parasite *Orobanche* L. (*Orobanchaceae*) induces expression of a pathogenesis related (PR) gene in susceptible tobacco roots. *Ann. Bot.* **81**, 779-781

Kelly CK. (1992) Resource choice in *Cuscuta europaea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 12194-12197

Khan AR., Johnson KA., Braam J., James MN. (1997) Comparative modeling of the three-dimensional structure of the calmodulin-related TCH2 protein from Arabidopsis. *Proteins* **27(1)**, 144-153

Kiss GB., Csanadi G., Kalman K., Kalo P., Okresz L. (1993) Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Mol. Gen. Genet.* **238**, 129-137

Knight H. (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cyt.* **195**, 269-324.

Knight MR., Campbell AK., Smith SM., Trewavas AJ. (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352(6335)**, 524-526

Knight MR., Read ND., Campbell AK., Trewavas AJ. (1993) Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins. *J. Cell. Biol.* **121(1)**, 83-90

Knutson DM. (1979) How parasitic seed plants induce disease in other plants. *Plant Disease: An advanced treatise*, (Eds.: Horsfall JG. és Cowling EB.). *New York Academic* **4**, 293-312

Kujit J. (1969) The Biology of Parasitic Flowering Plants. *University of California Press*, Berkeley

Kung C., Preston RR., Maley ME., Ling KY., Kanabrocki JA., Seavey BR., Saimi Y. (1992) In vivo Paramecium mutants show that calmodulin orchestrates membrane responses to stimuli. *Cell Calcium* **13(6-7)**, 413-425

Lados M. (1998) Effect of temperature, pH and host plant extracts on the germination of *Cuscuta trifolii* and *C. campestris*. *Acta Agr. Hung.* **46(4)**, 317-325

Lamont B. (1982) Mechanisms for enhancing nutrient uptake in plants with particular reference to Mediterranean South Africa and Western Australia. *Botanical Rev.* **48**, 597-689

Lamont B. (1983) Mineral nutrition of misletoes. In: *The Biology of Misletoes* (eds Calder M. and Bernhardt P.). Academic Press, Australia 185-204

Ledesma A., Villalba M. és Rodriguez R. (2000) Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca^{2+} -binding protein from olive pollen with allergenic activity. *FEBS Lett.* **466(1)**, 192-196

León J., Rojo E., Titarenko E., Sanchez-Serrano JJ. (1998) Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways

are differentially regulated by Ca^{2+} /calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **258(4)**, 412-419

León J., Rojo E., Sánchez-Serrano JJ. (2001) Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* **52**, 1-9

Leung J. és Giraudat J. (1998) Absciscic acid signal transduction. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 199-222

Liang P. és Pardee A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257(5072)**, 967-971

Lightner J., Pearce G., Ryan CA., Browse J. (1993) Isolation of signaling mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Mol. Gen. Genet.* **241(5-6)**, 595-601

Lo SC., Hipskind JD., Nicholson RL. (1999) cDNA cloning of a sorghum pathogenesis-related protein (PR-10) and differential expression of defense-related genes following inoculation with *Cochliobolus heterostrophus* or *Colletotrichum sublineolum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12(6)**, 479-489

van Loon LC., Pierpoint WS., Boller T., Conejero V. (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**, 254-264

van der Luit AH., Olivari C., Haley A., Knight MR., Trewavas AJ. (1999) Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* **121(3)**, 705-714

Luo M., Liu JH., Mohapatra S., Hill RD., Mohapatra SS. (1992) Characterization of a gene family encoding absciscic acid- and

environmental stress-inducible proteins of alfalfa. *J. Biol. Chem.* **267**(22), 15367-15374. Erratum in: *J. Biol. Chem.* (1995) **270**(2), 986

Matton DP. és Brisson N. (1989) Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2**(6), 325-331

Matvienko M., Wojtowicz A., Wrobel R., Jamison D., Goldwasser Y., Yoder JI. (2001) Quinone oxidoreductase message levels are differentially regulated in parasitic and non-parasitic plants exposed to allelopathic quinones. *Plant J.* **25**(4), 375-387

McAinsh MR., Brownlee C. és Hetherington AM. (1992) Visualising changes in cytosolic-free calcium during the response of stomatal guard cells to abscisic acid. *Plant Cell* **4**, 1113-1122

McAinsh MR., Webb AAR., Taylor JE., Hetherington AM. (1995) Stimulus-induced oscillations in guard cell cytoplasmic free calcium. *Plant Cell* **7**, 1207-1219

McAinsh MR. és Hetherington AM. (1998) Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems. *Trends Plant Sci.* **3**, 32-36

Minorsky PV. (1985) A heuristic hypothesis of chilling injury in plant: A role for calcium as the primary physiological transducer of injury. *Plant Cell Environ.* **8**, 75-94

Mohapatra SS., Poole RJ., Dhindsa RS. (1987) Cold acclimation freezing resistance and protein synthesis in alfalfa (*Medicago sativa* L. cultivar Saranac). *J. Exp. Bot.* **38**, 1697-1703

Mohapatra SS., Poole RJ., Dhindsa RS. (1988) Abscisic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. *Plant Physiol.* **87**, 468-473

- Mohapatra SS., Wolfrain L., Poole RJ., Dhindsa RS. (1989) Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold-acclimation-specific genes of alfalfa. *Plant Physiol.* **89**, 375-380
- Moiseyev GP., Beintema JJ., Fedoreyeva LI., Yakovlev GI. (1994) High sequence similarity between a ribonuclease from ginseng calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases. *Planta* **193(3)**, 470-472
- Moiseyev GP., Fedoreyeva LI., Zhuravlev YN., Yasnetskaya E., Jekel PA., Beintema JJ. (1997) Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses. New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins. *FEBS Lett.* **407(2)**, 207-210
- Moncrief ND., Kretsinger RH., Goodman M. (1990) Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *J. Mol. Evolution* **30**, 522-562
- Monroy AF. és Dhindsa RS. (1995) Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C. *Plant Cell* **7(3)**, 321-331
- Musselmann LJ. (1980) The biology of *Striga*, *Orobanch*e and other root parasitic weeds. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**, 463-489
- Nagar R., Singh M., Sanwal GG. (1984) Cell wall degrading enzymes in *Cuscuta reflexa* and its hosts. *J. Exp. Bot.* **35**, 1104-1112
- Nakayama S., Kawasaki H., Kretsinger R. (2000) Evolution of EF-hand Proteins. Házi dolgozat. Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, USA

Netzly DH., Riopel JL., Ejeta G., Butler LG. (1988) Germination stimulants of witchweed (*Striga asiatica*) from hydrophobic root exudate of sorghum (*Sorghum bicolor*). *Weed Sci.* **36**, 441-446

Noordam D. (1973) Transmission of viruses by *Cuscuta* (dodder). In: Identification of plant viruses (Methods and experiments). *Centre for Agricultural Publishing and Documentation*. Wageningen. 175-176

O'Donnell PJ., Truesdale MR., Calvert CM., Dorans A., Roberts MR., Bowles DJ. (1998) A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *Plant J.* **14**(1), 137-142

Paliyath G., Maheshwari R., Mahadevan S. (1978) Initiation of haustoria in *Cuscuta* by cytokinin application. *Curr. Sci.* **47**, 427-429

Paliyath G., Lakshmi Murthy HK., Maheshwari R., Mahadevan S. (1979) Cytokinin induced haustoria formation in *Cuscuta*. Abstract 223, 10th Int. Conf. Plant Growth Subst., Madison, WI.

Pearson WR. és Lipman DJ. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**(8), 2444-2448

Polisensky DH. és Braam J. (1996) Cold-shock regulation of the *Arabidopsis* TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiol.* **111**(4), 1271-1279

Press MC. és Graves JD. (1995) Parasitic plants. *Chapman & Hall*, London, UK

Ramasubramaniam TS., Paliyath G., Rajagopal I., Maheshwari R., Mahadevan S. (1988) Hormones and *Cuscuta* development: In vitro induction of haustoria by cytokinin and its inhibition by other hormones. *J. Plant Growth Reg.* **7**, 133-144

Raven JA. (1983) Phytophages of xylem phloem: a comparison of animal and plant sap-feeders. *Adv. Ecol. Res.* **13**, 135-234

Roberts MD. és Harmon CA. (1992) Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 375-414

Roos U-P, Aldrich HC. (1988) Intracellular localization and morphology of rhabdovirus-like particles in dodder (*Cuscuta* sp.). *Canad. J. Bot.* **66**, 2499-2504

Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York

Sanger F., Nicklen S., Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**(12), 5463-5467

Searcy DG. (1970) Measurements by DNA hybridization *in vitro* of the genetic basis of parasitic reductions. *Evolution* **24**, 207-219

Searcy DG. és MacInnis AJ. (1970) Measurements by DNA renaturation of the genetic basis of parasitic reduction. *Evolution* **24**, 796-806

Seo HS., Song JT., Cheong JJ., Lee YH., Lee YW., Hwang I., Lee JS., Choi YD. (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**(8), 4788-4793

Shinozaki K. és Yamaguchi-Shinozaki K. (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* **115**, 327-334

Shure M., Wessler S., Fedoroff N. (1983) Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell* **35(1)**, 225-233

Sikorski MM., Szlagowska AE., Legocki AB. (1998) Structure of *Lupinus luteus* genes Ypr10.1a and Ypr10.1b encoding two homologs of pathogenesis-related proteins of PR10 class. *Plant Physiol.* **116(3)**, 1192-1193

Somssich IE., Schmelzer E., Bollmann J., Hahlbrock K. (1986) Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding „pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2427-2430

Somssich IE., Schmelzer E., Kawalleck P., Hahlbrock K. (1988) Gene structure and in situ transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley. *Mol. Gen. Genet.* **213(1)**, 93-98

Southern EM. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98(3)**, 503-517

Stanford AC., Northcote DH., Bevan MW. (1990) Spatial and temporal patterns of transcription of a wound-induced gene in potato. *EMBO J.* **9(3)**, 593-603

Steffens JC., Lynn DG., Riopel JL. (1986) An haustorial inducer for the root parasite *Agilis purpurea*. *Phytochem.* **25**, 2291-2298

Stewart GR. és Press MC. (1990) The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. *Ann. Rev. Plant. Mol. Biol.* **41**, 127-151

Stojsin V., Maric A., Jovic B. (1991) Harmfulness of *Cuscuta campestris* Yunck. on sugar beet under varying mineral nutrition. *Plant Prot. (Zastita Bilja)* **42**, 357-363

Subramaniam K. és Mahadevan S. (1994) The cDNA sequence of cytochrome b₅ associated with cytokinin-induced haustoria formation in *Cuscuta*. *Gene* **149(2)**, 375-376

Subramaniam K., Ranie J., Srinivasa BR., Sinha AM., Mahadevan S. (1994) Cloning and sequence of a cDNA encoding a novel hybrid proline-rich protein associated with cytokinin-induced haustoria formation in *Cuscuta reflexa*. *Gene* **141(2)**, 207-210

Szatala Ö. és Gimesi A. (1965) Az aranka (*Cuscuta*) biológiája és az üzemi védekezés módszerei. *Károlyi Mihály Mezőgazdasági Könyvtár és Dokumentációs Központ*

Tada Y., Sugai M., Furuhashi K. (1996) Haustoria of *Cuscuta japonica*, a holoparasitic flowering plant, are induced by the cooperative effects of far-red light and tactile stimuli. *Plant Cell Physiol.* **37(8)**, 1049-1053

Tada Y., Wakasugi T., Nishikawa A., Furuhashi K., Yamada K. (2000) Developmental regulation of a gene coding for a low-molecular-weight heat shock protein during haustorium formation in the seedlings of a holoparasitic plant, *Cuscuta japonica*. *Plant Cell Physiol.* **41(12)**, 1373-1380

Titarenko E., Rojo E., Leon J., Sanchez-Serrano JJ. (1997) Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115(2)**, 817-826

Trewavas AJ. és Malhó R. (1998) Ca²⁺ signalling in plant cells: the big network! *Curr. Opin. Plant Biol.* **1(5)**, 428-433

Tronsmo AM., Gregersen P., Hjeljord L., Sandal T., Bryngelsson T., Collinge DB. (1993) Cold-induced disease resistance. In: Fritig B., Legrand

M. (eds), Mechanisms of Plant Defence Responses (abstract). *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, 369

Truesdell GM., Dickman MB. (1997) Isolation of pathogen/stress-inducible cDNAs from alfalfa by mRNA differential display. *Plant Mol. Biol.* **33(4)**, 737-743

Tsivion Y. (1978) Possible role of cytokinins in non-specific recognition of a host and in early growth of haustoria in the parasitic plant, *Cuscuta campestris*. *Bot. Gaz.* **139**, 27-31

Verwoerd TC., Dekker BM., Hoekema A. (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucl. Acids Res.* **17(6)**, 2362

Visser J. és Dörr I. (1987) The haustorium. In: *Parasitic Weeds in Agriculture*, Vol.1: *Striga*, (ed. Musselman LJ.), *CRC Press, Boca Raton*, 91-106

Walter MH., Liu JW., Grand C., Lamb CJ., Hess D. (1990) Bean pathogenesis-related (PR) proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. *Mol. Gen. Genet.* **222(2-3)**, 353-360.

Walter MH., Liu JW., Wünn J., Hess D. (1996) Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (Ypr10) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. *Eur. J. Biochem.* **239(2)**, 281-293

Wang CS., Huang JC., Hu JH. (1999) Characterization of two subclasses of PR-10 transcripts in lily anthers and induction of their genes through separate signal transduction pathways. *Plant Mol. Biol.* **40(5)**, 807-814

Warner SA., Scott R., Draper J. (1992) Isolation of an asparagus intracellular PR gene (AoPR1) wound-responsive promoter by the inverse polymerase chain reaction and its characterization in transgenic tobacco. *Plant J.* **3**(2), 191-201

Westwood JH., Yu X., Foy CL., Cramer CL. (1998) Expression of a defense-related 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene in response to parasitization by *Orobanch* spp. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**(6), 530-536

Whitney PJ. (1972) The carbohydrate and carbon balance of beans (*Vicia faba*) attacked by broomrape (*Orobanch crenata*). *Ann. Appl. Biol.* **70**, 59-66

Wolswinkel P. (1978a) Phloem unloading in stem parts parasitised by *Cuscuta*: The release of ^{14}Ca and K^+ to the free space at 0°C and 25°C. *Physiol. Plant.* **42**, 167-172

Wolswinkel P. (1978b) Accumulation of phloem mobile mineral elements at the site of attachment of *Cuscuta europaea* L. *Zeitschrift Pflanzensphysiol.*, **86**, 77-84

Wolswinkel P. (1985) Phloem unloading and turgor-sensitive transport: factors involved in sink control of assimilate partitioning. *Physiol. Plant.* **65**, 331-339

Wolswinkel P. és Ammerlaan A. (1983) Sucrose and hexose release by excised stem segments of *Vicia faba* L. The sucrose specific stimulating influence of *Cuscuta* on sugar release and the activity of acid invertase. *J. Exp. Bot.* **34**, 1516-1527

Yamaguchi-Shinozaki K. és Shinozaki K. (1993) The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-

specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **238**, 17-25

Yamakawa H., Mitsuhashi I., Ito N., Seo S., Kamada H., Ohashi Y. (2001) Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur. J. Biochem.* **268(14)**, 3916-3929

Yoder JI. (1997) A species-specific recognition system directs haustorium development in the parasitic plant *Triphysaria* (Scrophulariaceae). *Planta.* **202(4)**, 407-413

Yoder JI. (1999) Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant-plant interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2(1)**, 65-70. Review.

Yue L., Peng JB., Hediger MA., Clapham DE. (2001) CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* **410(6829)**, 705-709

Zhu Q., Doerner PW., Lamb CJ. (1993) Stress induction and developmental regulation of a rice chitinase promoter in transgenic tobacco. *Plant J.* **3**, 203-212

Zielinski RE. (1998) Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 697-725