

VESZPRÉMI EGYETEM
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
Növényvédelmi Intézet

Alprogramvezető:
DR. HORVÁTH JÓZSEF
MTA rendes tagja

Témavezető:
DR. KIRÁLY ZOLTÁN
MTA rendes tagja

**AZ OXIGÉN AKTÍV FORMÁI ÉS AZ ANTIOXIDÁNSOK
SZEREPE A NÖVÉNYI NEKROTIKUS TÜNETEK
KIALAKÍTÁSÁBAN ÉS
A SZISZTEMIKUS SZERZETT REZISZTENCIÁBAN**

Készítette:
KECSKÉS ADRIANNA

Keszthely
2001

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	6
1.1. CÉLKITŰZÉS	10
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	12
2.1. AZ OXIGÉN AKTÍV FORMÁI.....	12
2.1.1. Szuperoxid gyök.....	14
2.1.2. Hidrogén-peroxid	15
2.1.3. Hidroxil gyök	16
2.1.4. Az oxigén egyéb aktív formái	17
2.2. ENZIMEK, ENZIMRENDSZEREK ÉS NEM ENZIMATIKUS ANTIOXIDÁNSOK.....	21
2.2.1. Szuperoxid-dizmutáz.....	22
2.2.2. Aszkorbát, aszkorbát-peroxidáz	23
2.2.3. Glutation, glutathion-peroxidáz, glutathion S-transzferáz.....	27
2.2.4. A karotinoidok és az α -tokoferol	28
2.2.5. Kataláz	30
2.3. AZ OXIGÉN AKTÍV FORMÁINAK LEHETSÉGES KELETKEZÉSI HELYE ÉS MÓDJA, KÓRFOLYAMATBAN BETÖLTÖTT SZEREPE	31
2.3.1. Antimikrobiális aktivitás	32
2.3.2. Sejthalál indukálása.....	33
2.3.3. Génaktiválás.....	36
2.3.4. Indukált sejtfal megszilárdítás.....	36
2.3.5. Az oxigén aktív formáinak szerepe a szisztémikus szerzett rezisztenciában	36
2.4. NÖVÉNY – VÍRUS KAPCSOLAT	46
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	49
3.1. NÖVÉNYEK, MIKROORGANIZMUSOK ÉS ANYAGOK	49
3.1.1. Növények	49
3.1.2. Mikroorganizmusok	50

3.1.3.	Anyagok	52
3.2.	NÖVÉNYKÍSÉRLETI ÉS ANALITIKAI MÓDSZEREK	52
3.2.1.	A különböző kísérletek beállításai.....	52
3.2.2.	Szalicilsav kezelés.....	54
3.2.3.	Mintavétel	55
3.2.4.	Gélelektroforézis	56
3.2.5.	Szuperoxid-dizmutáz mérése	58
3.2.6.	Enzimaktivitások fotometriás mérése.....	58
3.2.7.	A sejthalál kimutatása	62
3.2.8.	A hidrogén-peroxid kimutatása és koncentrációjának meghatározása ...	63
3.2.9.	A szuperoxid gyök kimutatása	64
3.2.10.	Mono-dehidroaszorbát gyök meghatározása elektronspin rezonancia spektroszkópiával	64
3.2.11.	Flavonoidok vizsgálata vékonyréteg-kromatográfiával	65
3.2.12.	A TMV koncentrációjának meghatározása	66
3.2.13.	Az alkalmazott statisztikai eljárások	68
4.	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	69
4.1.	MONO-DEHIDROASZORBÁT GYÖK VIZSGÁLATA DOHÁNY MOZAIK VÍRUS ÁLTAL FERTŐZÖTT DOHÁNYNÖVÉNYEKBEN	69
4.1.1.	A dohány mozaik vírus okozta szöveti nekrotizáció	69
4.1.2.	A mono-dehidroaszorbát gyök felhalmozódása dohány mozaik vírusfertőzött dohánynövényekben.....	72
4.1.3.	A szisztémikus szerzett rezisztenciával rendelkező, dohány mozaik vírussal fertőzött dohánylevelek mono-dehidroaszorbát gyök akumulációja ...	76
4.1.4.	A szisztémikus szerzett rezisztenciával rendelkező, fertőzetlen dohánylevelek mono-dehidroaszorbát gyök akumulációja.....	77
4.2.	SZUPEROXID GYÖK ÉS HIDROGÉN-PEROXID VIZSGÁLATA INKOMPATIBILIS ÉS KOMPATIBILIS GAZDA-PARAZITA KAPCSOLATOKBAN.....	79
4.2.1.	A szuperoxid gyök felhalmozódása.....	80
4.2.2.	A hidrogén-peroxid felhalmozódása	86

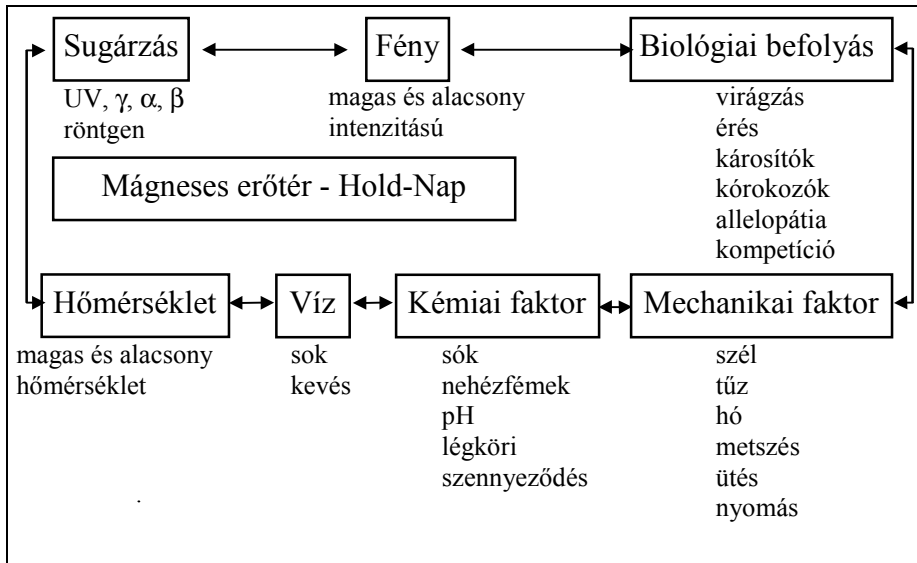
4.2.3.	A hidrogén-peroxid koncentrációja.....	88
4.3.	ENZIMATIKUS ÉS NEM ENZIMATIKUS ANTIOXIDÁNSOK VIZSGÁLATA	
	INKOMPATIBILIS ÉS KOMPATIBILIS GAZDA-PARAZITA KAPCSOLATOKBAN.....	89
4.3.1.	SOD izoenzimiek vizsgálata.....	90
4.3.2.	Az aszkorbát-peroxidáz aktivitásának vizsgálata uborkanövényeken....	92
4.3.3.	A peroxidáz enzim aktivitásának vizsgálata uborkanövényeken	95
4.3.4.	A glutation S-transzferáz aktivitásának vizsgálata uborkanövényeken..	97
4.3.5.	A glutation-reduktáz aktivitásának vizsgálata uborkanövényeken.....	97
4.3.6.	A kataláz aktivitásának vizsgálata uborkanövényeken.....	101
4.4.	A <i>CHENOPODIUM QUINOA</i> NÖVÉNYEKEN VÉGZETT VIZSGÁLATOK.....	103
5.	KÖVETKEZTETÉSEK.....	109
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	113
7.	SUMMARY.....	117
8.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	121
9.	IRODALOMJEGYZÉK	122

Gyakran alkalmazott rövidítések :

APX:	aszkorbát-peroxidáz
CMV:	uborka mozaik vírus (cucumber mosaic <i>cucumovirus</i>)
DAR:	dehidroaszkorbát-reduktáz
ELISA:	enzyme linked immunosorbent assay
ESR:	elektronspin rezonancia spektroszkópia
GR:	glutation-reduktáz
GST:	glutation S-transzferáz
H ₂ O ₂ :	hidrogén-peroxid
HR:	hiperszenzitív reakció
KAT:	kataláz
MDA [•] :	mono-dehidroaszkorbát gyök
mM:	millimoláris mennyiség = ezredmól oldott anyag/dm ³ oldat
µg:	mikrogramm
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NADPH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
<i>NahG</i> :	szalicilsav-hidroxiláz enzimet kódoló gén
NBT:	p-nitrotetrazólium kék
NO [•] :	nitrogén-monoxid gyök
OAF:	(Az) oxigén aktív formái
O ₂ ^{•-} :	szuperoxid gyök
¹ O ₂ :	szingulett oxigén
OH [•] :	hidroxil gyök
°C:	Celsius-fok
PAGE:	poli-akrilamid-gélelektroforézis
pH:	-log ₁₀ [H ₃ O ⁺]
POX:	peroxidáz
SOD:	szuperoxid-dizmutáz
SoMV:	chenopodium mozaik vírus (sowbane mosaic <i>sobemovirus</i>)
SzSzR:	szisztémikus szerzett rezisztencia
TMV:	dohány mozaik vírus (tobacco mosaic <i>tobamovirus</i>)
TNV:	dohány nekrosis vírus (tobacco necrosis <i>necrovirus</i>)
ZYMV:	cukkini sárga mozaik vírus (zucchini yellow mosaic <i>potyvirus</i>)

1. BEVEZETÉS

A növények, mint ahogy minden élőlény, életük során számos környezeti hatásra (szárazság, hőmérséklet-változás, légszennyeződés, kórokozókkal történő fertőződés, stb.) reagálnak. E hatások gyakran az optimális élet-körülmények megváltozását okozzák, ezzel alkalmazkodásra kényszerítik a növényeket. A hatás erősségétől függően látható vagy mérhető stressz szimptómák jelennek meg a növényen. A „stressz” Selye János által megfogalmazott definíciója szerint nem más, mint a szervezet nem-fajlagos válasza különböző stresszorok károsító hatása ellen. A stresszor hatására jelentkező tünetegyüttes pedig a generális adaptációs szindróma, amely magában foglalja a vészreakciót, a rezisztencia és a kimerülés szakaszát (Selye, 1975). Ezt a definíciót azonban manapság nem követik a kutatók, ma a stressz a stresszor fogalmával azonos fogalom. A stressz tehát a károsító tényező, a növény nem fajlagos válaszreakciója pedig a stressz-szimptóma. A növényekben fellépő stressz pontos meghatározása igen nehéz. A különböző genetikai arculattal rendelkező organizmusok más-más módon reagálnak a környezet változásaira. Nehéz meghatározni az egyes környezeti tényezők (1. ábra) hatásának a stressz kiváltásához elegendő szintjét, ahol az anyagcsere-folyamatok stressz anyagcsere-folyamatokba válnak át (Elstner és Osswald, 1994). A stressz anyagcsere-folyamatok általában oxidatív reakciókkal jellemezhetők. Az „oxidatív stressz” meghatározással gyakran találkozhatunk a szabad gyökökkel foglalkozó szakirodalomban, annak definícióját azonban kevesen



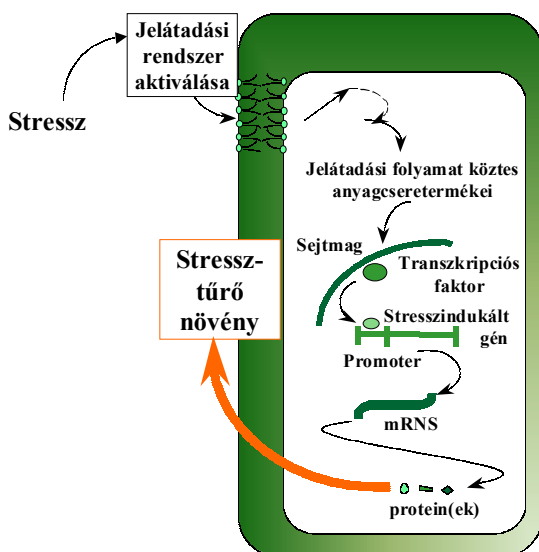
1. ábra A növényeket befolyásoló hét „stressz hatás” (Schlee, 1992 után)

fogalmazzák meg. Sies, aki 1985-ben megjelent „Oxidative Stress” c. könyvével ezt a kifejezést a tudományos fogalomtárba bevezette, csak 1991-ben, a könyv második kiadásának megjelentekor, fogalmazta meg lényegretörően, mit is jelent az oxidatív stressz: ez nem más, mint a prooxidánsok és az antioxidánsok közt fellépő, a prooxidánsok javára történő egyensúlyeltolódás, amely akár károsodáshoz is vezethet.

A növényi sejtben végbemenő oxidatív stressznek, attól függően, hogy milyen mértékű, többféle következménye lehet: alkalmazkodás, károsodás és stimuláció. A sejtek általában tolerálják az enyhébb oxidatív stresszt, amely gyakran az antioxidáns védelmi rendszer felülszabályozásában nyilvánul meg. Az alkalmazkodás folyamata magában foglalja a génexpresszióban történő változásokat (2. ábra), ami

megnövekedett antioxidáns védelemhez vezethet. Ugyanakkor az oxidatív stressz csökkentheti is az egyes gének átíródását.

Az oxidatív stresszt kiváltó, rendkívül reakcióképes szabad gyökök és prooxidáns tulajdonságú molekulák a sejt szinte bármilyen molekulájában kárt tehetnek, beleértve a ribonukleinsavakat, fehérjéket, lipideket. Sok esetben nem egészen világos, melyik molekula a legfontosabb célpontja a károsító ágenseknek, mivel a hatásukra beinduló folyamatok több helyen átfedik egymást. A károsítás következtében a sejt megduzzad és felhasad, a membránok integritásának megszűntével pedig bekövetkezik a sejthalál.



2. ábra Stressz indukálta növényi válasz egyszerűsített modellje (Taiz és Zeiger után, 1998)

A számos stressz közül a kórokozók (gomba, baktérium, vírus) fertőzése a legváltozatosabb és legbonyolultabb hatású. A fertőzés során a növény

számára a védekezés lehetőségei egyrészt adottak, másrészt indukálhatók. A többnyire összetett védekezés során a növény rendelkezik kémiai "fegyverzettel" (fitoalexinek, oxigén aktív formái és antimikrobiális fehérjék termelése), illetve szerkezeti gátak kialakítására (sejtfal megszilárdítása, ligninképződés és a sejtfal fehérjék immobilizációja) képes (Dixon *et al.*, 1994).

Az oxigén aktív formáinak termelődése számos gazda-parazita kapcsolat, valamint abiotikus stressz által előidézett folyamat során fokozódik. Továbbá sok szállal kapcsolódik a betegséggellenállósághoz, ezen belül a szisztémikus szerzett rezisztenciához (Asada, 1992; Lamb és Dixon, 1997; Mehdy, 1994; Greenberg, 1997).

Az oxigén aktív formái:

- mikrobagátló hatásúak *in vivo* (Király *et al.*, 1993),
- a szöveti szilárdságot növelő lignifikáció során nélkülözhetetlenek (Sticher *et al.*, 1997),
- indukálják a fitoalexinek és a kórfolyamattal-kapcsolatos fehérjék termelődését (Bi *et al.*, 1995; Levine *et al.*, 1994),
- serkentik a szalicilsav szintézisét, ezen keresztül indukálják a szisztémikus szerzett rezisztenciát (Bi *et al.*, 1995),
- kulcsfontosságúak a szöveti nekrózis kialakulásában pl. a hiperszenzitív reakcióban (Doke, 1983).

A felsorolásból kitűnik, az oxigén aktív formáinak arculata kettős: sok szempontból hasznos, sőt szükséges a növényi sejtek számára, de a sejthalál kiváltója is lehet. Ezért nagy jelentőségűek az őket közömbösítő, velük egyensúlyt tartó antioxidánsok. A növényekben antioxidáns molekulák és enzimek sora vesz részt az oxigén főlegben felhalmozódott

aktív formáinak méregtelenítésében. Feladatuk az, hogy az oxigén aktív formáinak a sejtek makromolekuláira gyakorolt káros hatását kivédjék (Van Kuijk *et al.*, 1987). Vitatott kérdés, hogy a szisztémikus szerzett rezisztencia biológiai és kémiai indukciója során növekszik-e az oxigén aktív formáinak szintje a növényekben (Lamb és Dixon, 1997). Ismert, hogy a szalicilsav kezelés önmagában nem indukálja a hidrogén-peroxid képződését, de ha a kezelést fertőzés követi, az oxigén aktív formáinak felhalmozódása korábban és nagyobb mértékben következik be (Fauth *et al.*, 1996; Kaur-Sawhney *et al.*, 1981; Shirasu *et al.*, 1997). Az eddigi adatok azt sugallják, hogy a szisztémikus szerzett rezisztencia biológiai és kémiai indukciója egyaránt a szövetek antioxidáns kapacitásának fokozódásához vezet (Fodor *et al.*, 1997; Levine *et al.*, 1994).

1.1. Célkitűzés

A szabad gyökökkel és antioxidánsokkal foglalkozó kórélettani szakirodalom mindaddig elsősorban a hiperszenzitív reakcióra, inkompatibilis gazda-parazita kapcsolatok vizsgálatára koncentrált, és csak érintőlegesen foglalkozott a kompatibilis kapcsolatokban betöltött szerepükkel. Sok esetben pedig csak a folyamatok *in vitro* bizonyításáig jutott. Különösen hézagosak az ismereteink az oxigén aktív formáival egyensúlyt tartó antioxidánsok ilyen irányú vonatkozásait illetően. Célunk többek között ezen hiányosság megszüntetése. Előzetes elgondolásunk alapján az oxigén aktív formáinak a nekrotikus tünetek kialakításában kulcsfontosságú szerepe van, ugyanakkor a nekrotikus tünetek kialakulása sokszor elengedhetetlen az indukált rezisztencia formák kiváltásában. Hangsúlyozni

kell, hogy a nekrotikus tünet jelezheti a növény fogékonyságát (pl. TNV) vagy kapcsolódhat a rezisztenciához is (pl. HR). Újabb vizsgálatok alátámasztják, hogy a HR nem oka csak velejárója a rezisztenciának (Cole *et al.*, 2001; Bendahmane *et al.*, 1991). Emiatt több vírus és növény kapcsolatát vizsgáltuk. Választásunkat az indokolta, hogy a vírushatású növényekben az oxigén aktív formáinak szerepe nem annyira összetett, mint a baktérium- és gombafertőzések esetében. Tudomásunk szerint az oxigén aktív formái a fent említett hatások közül csak a szalicilsav szintézisének és a hiperszenzitív reakció indukálásán keresztül hat a vírusok ellen. Az oxigén aktív formái közül a szuperoxid gyök, a hidrogén-peroxid valamint a mono-dehidroaszorbát mennyiségének változásait kísértük figyelemmel. Az antioxidánsok közül a szuperoxid-dizmutáz, kataláz, peroxidáz, glutation-reduktáz, glutation S-transzferáz, aszkorbát, aszkorbát-peroxidáz, és dehidroaszorbát-reduktáz volt vizsgálatunk tárgya.

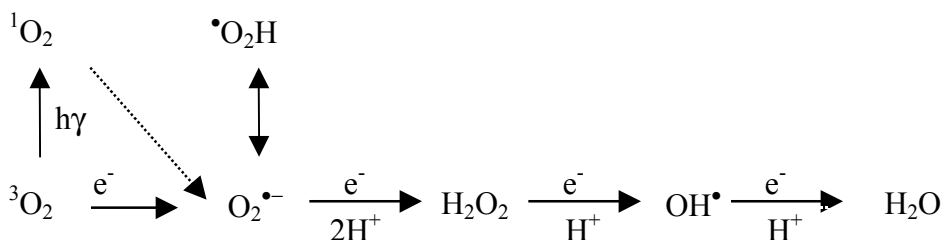
A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen szerepet játszanak az oxigén aktív formái a nekrotikus tünetek kialakításában ?
- Van-e szerepük a klorotikus tünetek megjelenésében, és ha igen, milyen ?
- Milyen az antioxidáns kapacitás a nekrotizált és klorotizált kifejező szövetekben ?
- A lokális és szisztémikus klorózis különbözik-e az antioxidáns kapacitás szempontjából?
- A különböző kórokozókkal indukált szisztémikus szerzett rezisztencia során hogyan változik az antioxidánsok kapacitása ?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az oxigén aktív formái

A legtöbb látható, vagy mérhető stressz tünet kapcsolatos az oxigén anyagcsere folyamatok megváltozásával, melynek során a heterolitikus (két elektron átvitelével járó) folyamatok helyett megnövekszik a homolitikus (egy elektron átvitelével járó) folyamatok mennyisége, és emiatt ún. szabad gyökök keletkeznek. Az oxigén aktív formái (ezután OAF) részben szabad gyökök, mint pl. a szuperoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$), és a hidroxil gyök ($\text{OH}^{\bullet}$), amelyek párosítatlan (extra) elektronnal rendelkeznek, részben olyan molekulák, amelyek reakcióik során szabad gyök képzésére képesek, mint pl. a hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a szingulett oxigén ($^1\text{O}_2$). Ezek a gyökök és molekulák a molekuláris oxigénből sorozatos redukcióval keletkeznek és elektronszerkezetüket tekintve átmenetet képeznek a legoxidáltabb dioxigén és a legredukáltabb állapotú víz között.



Képzésükre így minden aerob sejt képes, kis mennyiségű termelődésük az egészséges növényi szövetek sejtjeiben természetes folyamat. Az OAF keletkeznek kloroplasztiszokban a fotoszintetikus elektrontranszport során, mitokondriumokban, ahol az oxigén 4 %-a alakul át szuperoxiddá,

továbbá a citoplazmában lejátszódó enzimreakciók során. Az így keletkező OAF semlegesítésére a sejt antioxidáns kapacitással rendelkezik, amelyet antioxidáns enzimek és nem enzimatisz antioxidánsok képviselnek. A legjelentősebb aktív formákat az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat Az oxigén részlegesen redukált aktív származékai. A pár nélküli elektront a felső indexben lévő pont jelzi. Az R szerves csoportot jelöl

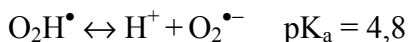
Szabad gyök	Molekula
szuperoxid, $O_2^{\bullet-}$	hidrogén-peroxid, H_2O_2
hidroxil, $OH^{\bullet}$	hipoklórossav, $HOCl$
peroxil, $RO_2^{\bullet}$	ózon, O_3
alkoxil, $RO^{\bullet}$	szingulett oxigén, 1O_2
hidroperoxil, $HO_2^{\bullet}$	szerves peroxid, $ROOH$
nitrogén-monoxid, $NO^{\bullet}$	salétromossav, HNO_2
nitrogén-dioxid, $NO_2^{\bullet}$	dinitrogén-trioxid, N_2O_3
	dinitrogén-tetroxid, N_2O_4
	peroxi-salétromossav, $ONOOH$
	szerves peroxinitrit, $ROONO$

A molekuláris oxigén önmaga nem túl reakcióképes, ennek magyarázata az, hogy két párosítatlan elektronja azonos spinű, a fent említett redukciók során elektronszerkezete azonban megváltozik, negatív töltést kap, s ezáltal rendkívül reakcióképesé válik. Reakcióképesége akkor is növekszik, ha ellentétes spinállású szingulett állapotra gerjesztődik. Így aztán számos élettani szempontból jelentős makromolekulát képes károsí-

tani (membránokat, fehérjéket, aminosavakat, nukleinsavakat, stb.). A nagy reakcióképesség azonban relatív fogalom. A szuperoxid gyök és a nitrogén-monoxid gyök kevésbé aktív, míg a hidroxil gyök szinte azonnal reakcióba léphet más molekulákkal. A többi származék reakcióképessége átmeneti (Darley-Usmar *et al.*, 1995).

2.1.1. Szuperoxid gyök

Molekuláris oxigénből egy-elektronos redukcióval szuperoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) anion keletkezik, ennek a reakciónak a végbemeneteléhez csekély energia bevitelre van szükség. Ezt az energiát az élő rendszerekben legtöbbször a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) szolgáltatja. A további redukciókhoz már nincs szükség extra energiára, a megfelelő reakciópartner jelenlétében spontán módon is lejátszódnak. Az élő sejtekben a szuperoxid gyök sav-bázis egyensúlyt alkot protonált formájával a hidroperoxil gyökkel ($\text{O}_2\text{H}^\bullet$), ez utóbbi forma lipofil, könnyebben behatol a membránok lipid kettősrétegébe, és így képes a káros lipidperoxidáció előidézésére.



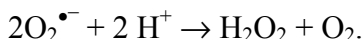
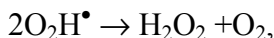
A szuperoxid gyök jelenléte a növényi szövetekben pH-függő (fiziológias pH esetén a szuperoxid nem túl reaktív). Az $1,0 \times 10^{-6}$ M-os szuperoxid oldatban a molekula felezési ideje ($t_{1/2}$) 6,5 pH értéknél 0,5 másodperc, míg 8,5 pH esetében 50 másodperc. Vizes oldatban annak kissé savas és semleges pH-ja esetén a szuperoxid gyök és protonált formája hidrogénperoxiddá (H_2O_2) és oxigénné (O_2) alakul át (Sutherland, 1991).



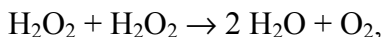
Ez a reakció lejátszódhat spontán dizmutáció útján, vagy szuperoxid-dizmutáz enzim katalizációja segítségével. Az enzim jelentős mértékben katalizálja a folyamatot, közreműködésekor 10^{10} -szer gyorsabb a reakció. Megjegyzendő, hogy a spontán dizmutáció is nagyon gyors, mégis csak nem minden szervezet rendelkezik olyan speciális enzimmal, vagy enzimrendszerrel, amely a dizmutációért felelős. Az enzim megtalálható a citoplazmában, a kloroplasztiszokban, a mitokondriumokban, sőt a plazmamembránon kívül is.

2.1.2. Hidrogén-peroxid

A szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) keletkezését jelentős mennyiségű hidrogén-peroxid (H_2O_2) képződés kíséri:

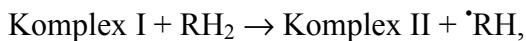


A hidrogén-peroxid aránylag stabil OAF, az oxigén többi aktív formája rövid időn belül hidrogén-peroxiddá alakul (Allan és Fluhr, 1997). Elektromosan semleges és kevésbé reaktív, képes tehát áthatolni a membránokon, így keletkezési helyéről más sejtekbe vándorolhat. A sejtekben keletkezett hidrogén-peroxid spontán módon vagy kataláz segítségével,



átalakulhat vízzé (H_2O) és molekuláris oxigénné (O_2) (Sutherland, 1991), vagy szubsztrátja lehet különböző peroxidázoknak, amelyek segítségével pl. a sejtfallszilárdító kovalens keresztkötések jönnek létre (Ilyama *et al.*, 1994), ugyanakkor fenoxil gyökök is képződnek:





A peroxidázok azon túl, hogy felhasználják a hidrogén-peroxidot, maguk is aktívan hozzájárulnak az OAF képzéséhez (Bestwick *et al.*, 1997; Bolter *et al.*, 1993; Vera-Estrella *et al.*, 1992). A hidrogén-peroxid továbbá átalakulhat a Halliwell-Asada cikluson (lásd 2.2.2 fejezet) keresztül is, közvetlen oxidálására néhány átmeneti fém is képes, ilyen a vas és réz is.

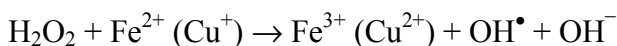
2.1.3. Hidroxil gyök

A legaktívabb az itt tárgyalt formák közül a hidroxil gyök ($\text{OH}^\bullet$), amely hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a szuperoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) direkt reakciójával (Haber-Weiss reakció) keletkezhet:

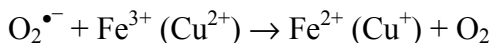


A növényi sejtekben, annak természetes állapota mellett ez a reakció lassan játszódik le és nem termelődik általa jelentős mennyiségű hidroxil gyök, 4,8-as pH optimuma miatt gyakorisága elhanyagolható.

Jelentős mennyiségű hidroxil gyök keletkezik azonban átmeneti fémek – vas (Fe^{2+}) és réz (Cu^{2+}) – oxidációja során (Fenton reakció).



Ez olyan ciklusreakció, ahol az oxidált ionok redukáló formájukat szuperoxiddal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) való reakció útján visszanyerik.



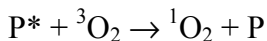
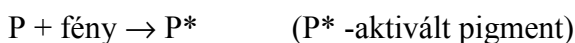
A hidroxil gyökök sejten belüli keletkezését elsősorban az átmeneti fémek hozzáférhetősége határozza meg (Gutteridge és Halliwell, 1994). A

hidroxil gyök az egyik legerősebb redukáló ágensként, irreverzibilis változásokat idéz elő a sejt makromolekuláiban, és megtámadja az organelleket. Felezési ideje 10^{-9} másodperces tartományba esik, így meghatározása és szerepének vizsgálata nem sok sikerrel járt ezidáig. A hidroxil gyök jelenléte azonban a növény-kórokozó kapcsolatokban, elsősorban a nekrotikus tünetek kialakításában betöltött szerepéért nem elhanyagolható.

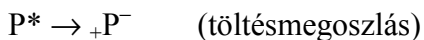
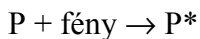
2.1.4. Az oxigén egyéb aktív formái

2.1.4.1. Szingulett oxigén

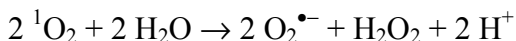
A membránokhoz kötött elektronszállítás során a fotoszintéziskor jelentős mennyiségű aktív oxigén képződik. Ha a fotoszintetikus elektronáramlás zavart szenved, a fényabszorpció révén gerjesztődött reakciócentrumok (P- pigmentek) az oxigénmolekuláknak adhatják át gerjesztési energiájukat, szingulett oxigént ($^1\text{O}_2$) képezve (Macpherson *et al.*, 1993).



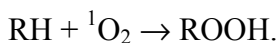
Ha a fotoszintézis során nem áll rendelkezésre elegendő nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADP) mint végső elektronakceptor, a ferredoxin-NADP-reduktáz az oxigént redukálja szuperoxiddá (Eltner és Frommeyer, 1978).



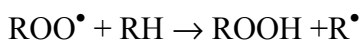
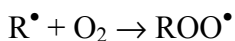
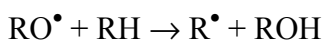
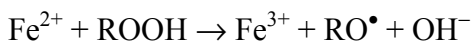
A szingulett oxigén a növényben gyorsan átalakul szuperoxiddá és hidrogén-peroxiddá (Foyer *et al.*, 1994).



Továbbá gyorsan reagál a legtöbb szerves molekulával (RH) is, különösen a kettős kötéseknél, szerves peroxidokat (ROOH) képezve.

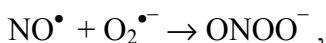
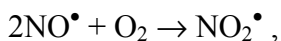


Ezeket a peroxidokat átmeneti fémek, pl. vas és réz (Fe^{2+} vagy Cu^+), redukálják alkoxil gyökké ($\text{RO}^\bullet$), mely gyökös láncreakció elindítására képes.



2.1.4.2. Nitrogén-monoxid gyök

Az utóbbi évek kutatási eredményei a nitrogén-monoxid gyök ($\text{NO}^\bullet$) kiemelkedő szerepét bizonyítják. A citoplazmában található nitrogén-monoxid szintáz által termelt nitrogén-monoxid gyök ($\text{NO}^\bullet$) (Allan és Fluhr, 1997; Ninnemann és Maier, 1996) szuperoxid gyökkel reagálva további OAF-at hoz létre (Millar és Day, 1997):

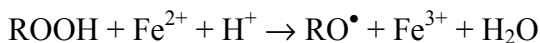
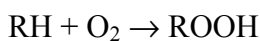


Delledonne *et al.* (1998) és Durner *et al.* (1998) munkáikban a nitrogén-monoxid gyök ($\text{NO}^\bullet$) hiperszenzitív reakcióban, valamint az egyes védelmi szerepet betöltő gének transzkripciójának aktiválásában játszott szerepét bizonyítják.

2.1.4.3. Egyéb formák

A biológiai membránokhoz kapcsolt elektrontranszport láncok és az oldható fázis kémiai reakciói révén számos más, az előzőekben nem vagy csak érintőlegesen említett OAF keletkezik. Ezek részben gyökök (lásd 1. táblázat), mint pl. a szerves ligandumot (R) tartalmazó fenoxil gyökök ($\text{RO}_2^\bullet$), alkoxil gyökök ($\text{RO}^\bullet$), nitrogén-dioxid gyökök ($\text{NO}_2^\bullet$), részben pedig molekulák pl. ózon (O_3), hipoklórossav (HOCl), szerves peroxidok (ROOH), salétromossav (HNO_2), stb.

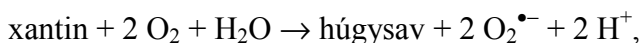
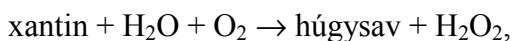
A lipoxigenáz a telítetlen zsírsavak (RH) bontásában vesz részt (Croft *et al.*, 1990). A termelődő zsírsav szabad gyök láncreakciót indíthat el (Elstner és Osswald, 1994).



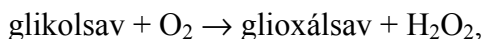
Az endoplazmatikus retikulum elektronszállító rendszere képes redukálva aktiválni a citokróm-P450-et. Amikor a xenobiotikumok méregtelenítésére szolgáló hidroxilezés átmenetileg nem jut szubsztráthoz, az aktivált citokróm-P450 az átmeneti fémeket redukálja, vagy OAF-ot képez (Elstner és Osswald, 1994). A citokróm-P450-reduktáz NADPH segítségével szemikinon szabad gyököket termel kinonok egyelektronos redu-

kálása révén (Ernster, 1986). A szemikininok az oxigénmolekulákból szuperoxidot képezve alakulnak vissza kinonokká.

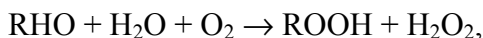
A plazmalemma tartalmaz NAD(P)H-oxidáz flavoproteineket, melyek szuperoxidot állítanak elő a plazmalemma külső, extracelluláris tér felé néző oldalán (Gestelen *et al.*, 1997; Morre *et al.*, 1993). A plazmamembránban lévő citokróm-b₅ az aszkorbátot elektrondonorként hasznosítja a transzmembrán elektronszállításhoz, miközben mono-dehidroaskorbát gyököt képez (Hideg *et al.*, 1997; Horemans *et al.*, 1994). A peroxiszómák és a glioxiszómák is tartalmaznak az OAF-okat képző rendszereket: a purin nukleotidok lebontásában szerepet játszó flavin-tartalmú xantin-oxidázt (Hille és Massey, 1985; Krenitsky *et al.*, 1972),



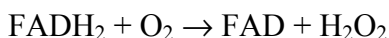
a fotorespiráció katalizátorát, a glikolsav oxidázt (Tolbert *et al.*, 1968),



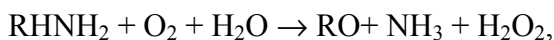
az aldehid-oxidázokat (Hille és Massey, 1985; Ori *et al.*, 1997),



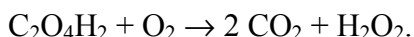
és a zsírsav β -oxidáció során keletkező redukált flavin-adenin dinukleotidokat (FADH₂) végoxidázát (Tolbert, 1981).



A sejtfalban találhatunk amin-oxidázokat (Allan és Fluhr, 1997; Federico és Angelini, 1986; Kaur-Sawhney *et al.*, 1981),



és oxálsav-oxidázokat (Lane *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995) is



2.2. Enzimek, enzimsziszterek és nem enzimatisus antioxiánsok

Az egészséges növény szöveti sejtjeiben az OAF-ok kismértékben mindig keletkeznek, felhalmozódásuk folytán „mérgezővé” válhatnak a sejt számára. Ez a folyamat többnyire akkor következik be, ha az OAF-nak gyors, nagy mennyiségű átmeneti képződése kikerül a biokémia reakciók ellenőrzése alól. A növényi sejtek azonban több antioxiáns tulajdonságú molekulával rendelkeznek az OAF-ot termelő folyamatok szabályozására és az OAF mérgetlenítésére (Van Kuijk *et al.*, 1987). Ide tartoznak a kismolekulájú nem enzimatisus antioxiánsok (aszorbát, glutation, E-vitamin, stb.), az egyes enzimek (szuperoxid-dizmutáz, aszorbát-peroxidáz, dehidroaszorbát-reduktáz, glutation S-transzferáz, glutation-reduktáz, kataláz, peroxidáz stb.), valamint több összetett enzimsziszter, amely képes hatékonyan védelmezni azokat a sejtalkotókat, amelyekben lokalizáltak.

A szingulett oxigén, a hidroxil gyök ($\text{OH}^\bullet$), alkoxil ($\text{RO}^\bullet$) és peroxil ($\text{ROO}^\bullet$) gyökök mérgetlenítése nem enzimek segítségével történik, mert gyorsabban reagálnak szomszédos molekulákkal (kevesebb, mint 10^{-8} másodperc), minthogy eldiffundálhatnának egy-egy specifikus mérgetlenítő enzimig. Az általuk okozott oxidatív stresszt csak kismolekulájú antioxiánsok csökkenthetik közvetlen reakcióba lépéssel. Az olyan viszonylag stabil OAF esetében, mint a szuperoxid gyök, peroxidok és epoxidok enzimek katalizálta mérgetlenítés is működik.

2.2.1. Szuperoxid-dizmutáz

A szuperoxid-dizmutáz (SOD) fém tartalmú enzim. Elsősorban a rendkívül reaktív hidroxil gyök ($\text{OH}^\bullet$) képződéséért felelős szuperoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) és hidrogén-peroxid (H_2O_2) koncentrációját befolyásolja. Az élő szervezetekben három alapvető formáját azonosították (Fridovich, 1974). Attól függően, hogy milyen fémet tartalmaz és hol fordul elő, megkülönböztünk Cu,Zn-SOD-ot, Mn-SOD-ot, Fe-SOD-ot. Cu,Zn-SOD a citoplazmában, a kloroplasztisz sztrómájában és extracellulárisan található (Ogawa *et al.*, 1996), Mn-SOD fellelhető a mitokondriális, gli- és peroxiszómális mátrixban, Fe-SOD pedig néhány növény család kloroplasztiszában (Bannister *et al.*, 1987) fordul elő. Az enzim a szuperoxid dizmutációját katalizálja, mely során hidrogén-peroxid és oxigén keletkezik (4. ábra /A). A szuperoxid dizmutáz jelentős antioxidáns, amit számos kísérlet igazol: Pl. élesztő SOD-hiány mutánsok túlérzékenyvé váltak az oxigénre (Van Loon *et al.*, 1986), Cu,Zn-SOD-ot nagyobb mennyiségben termelő transzgénikus növények pedig ellenállóbbak lettek különböző oxidatív stresszekkel szemben (Allen *et al.*, 1997), növények stressz toleranciája fokozható volt a Cu, Zn-SOD és a Mn-SOD egyidejű túltermelésével (Bowler *et al.*, 1992). Állati és baktérium sejtekben azonban, ahol megemelkedett aktivitását észlelték, a sejtek halálát okozta, ha a kataláz nem volt képes semlegesíteni a keletkezett hidrogén-peroxidot. Egyes feltételezések szerint a SOD képes a hidrogén-peroxidból a hidroxil gyök keletkezését is katalizálni, feltehetően ez a mechanizmus magyarázza a hidroxil gyöknek a membránköthött átmeneti fémektől távol eső károsítását (Yim *et al.*, 1990).

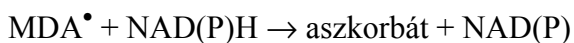
2.2.2. Aszkorbát, aszkorbát-peroxidáz

Az aszkorbát nagy mennyiségben van jelen a növényi szövetekben (a levelekben 1-5 mM-os, a kloroplasztiszokban 25 mM-os koncentrációban található), jelentős antioxidáns és metabolikus funkciókkal rendelkezik (Wheeler *et al.*, 1998). Központi szerepet játszik az OAF-fal szembeni védekezésben, a redox egyensúly szabályozásában, a sejtfal szintézisében, valamint a sejtek hosszanti megnyúlásában. Bár a mitokondriumok belső membránján keletkezik, mégis az egész sejten belül megtalálható. A sejtmembránokon keresztüli szállítását valószínűleg speciális szállítók végzik (Horemans *et al.*, 2000). Az aszkorbát a növényi szövetekben fiziológiás pH esetén negatív töltéssel rendelkező molekula (3. ábra), egyensúlyt tart fenn félig redukált (mono-dehidroaszkorbát) illetve teljesen oxidált formáival (dehidroaszkorbinsav). Képes közvetlenül reakcióba lépni a szuperoxiddal ($O_2^{\bullet-}$) és a hidroxil gyökkel ($OH^{\bullet}$), valamint a hidrogén-peroxidot (H_2O_2) aszkorbát-peroxidáz (APX) segítségével a Halliwell-Asada ciklusban átalakítani. Ez a ciklus (4. ábra /B) a hidrogén-peroxid lebontására szerveződött összetett rendszer (Foyer és Halliwell, 1976). (Újabban Foyer-Halliwell-Asada ciklusként említi a szakirodalom, nemcsak a két felfedezőjét, hanem működésének bizonyításáért legtöbbet tett kutatókat is megtisztelve ezzel.) Végeredményét tekintve a hidrogén-peroxid vízzé redukálódik NADPH felhasználásával. Az oxidált aszkorbát, azaz a dehidroaszkorbinsav (4. ábra/B), dehidroaszkorbát-reduktáz segítségével, glutation terhére regenerálódik; ez utóbbi regenerálódását a glutation-reduktáz és a NADPH biztosítja (Halliwell és Gutteridge, 1999). Az aszkorbát szabad gyökökkel történő direkt reakciói

során, ezek pl. a legkülönbözőbb stressz hatásokra keletkező szuperoxid gyök, a tokoferoxil gyök és a hidroxil gyök (Heber *et al.*, 1996), mono-dehidroaszorbát gyök (MDA[•]) képződik.

Az aszkorbát amellett, hogy direkt gyökfogó, elektrondonorként szolgál az aszkorbát-peroxidáz számára, amely a hidrogén-peroxidnak a kloroplasztiszból történő eltávolításáért felelős (Hossain *et al.*, 1984). A hidrogén-peroxid a Mehler reakció során keletkezik az I-es fotokémia rendszerben, ahol a szuperoxid gyök szuperoxid-dizmutáz segítségével alakul át (Robinson, 1988). A hidrogén-peroxid vízzé alakulásáért tehát az aszkorbát-peroxidáz is felelős, ezt az átalakulást víz-víz ciklusnak is nevezik, és nagyon fontos szerepe van a II-es fotokémiai rendszer túlzott elektronfelvételének gátlásában (Asada, 1999). Az aszkorbát-peroxidáz megtalálható a kataláz mellett a glioxiszómákban és a peroxiszómákban is (Yamaguchi *et al.*, 1995), a citoszolban és a kloroplasztisban, ahol a fő hidrogén-peroxid lebontó enzim (Asada, 1992). A borsóból származó aszkorbát-peroxidáz gént kifejező transzgénikus dohányokban az enzim aktivitása többszörösére nőtt, a növények pedig ellenállóbbak lettek az oxidatív stresszel szemben (Allen *et al.*, 1997).

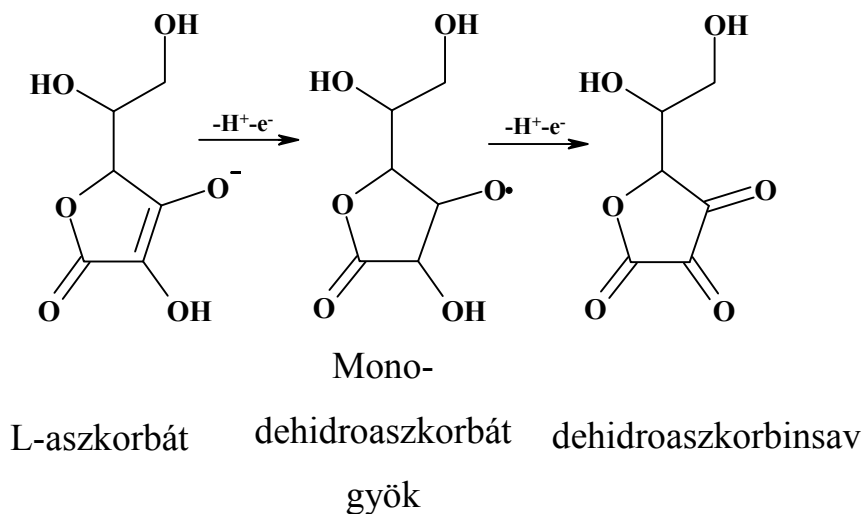
Az oxidált aszkorbát formák gyors regenerálódásához antioxidáns kapacitásra van szükség. A mono-dehidroszkorbát gyök aszkorbáttá történő regenerálódása történhet mind a NADPH-függő MDA-reduktáz segítségével, vagy nem enzimatikusan, ferredoxin segítségével (Asada, 1992).



Ugyan az MDA[•] relatívan a rövid életű gyökök közé tartozik, spontán is diszproporcionálódhat aszkorbáttá és dehidroaszorbinsavvá (4. ábra /C) (Bielski *et al.*, 1982).

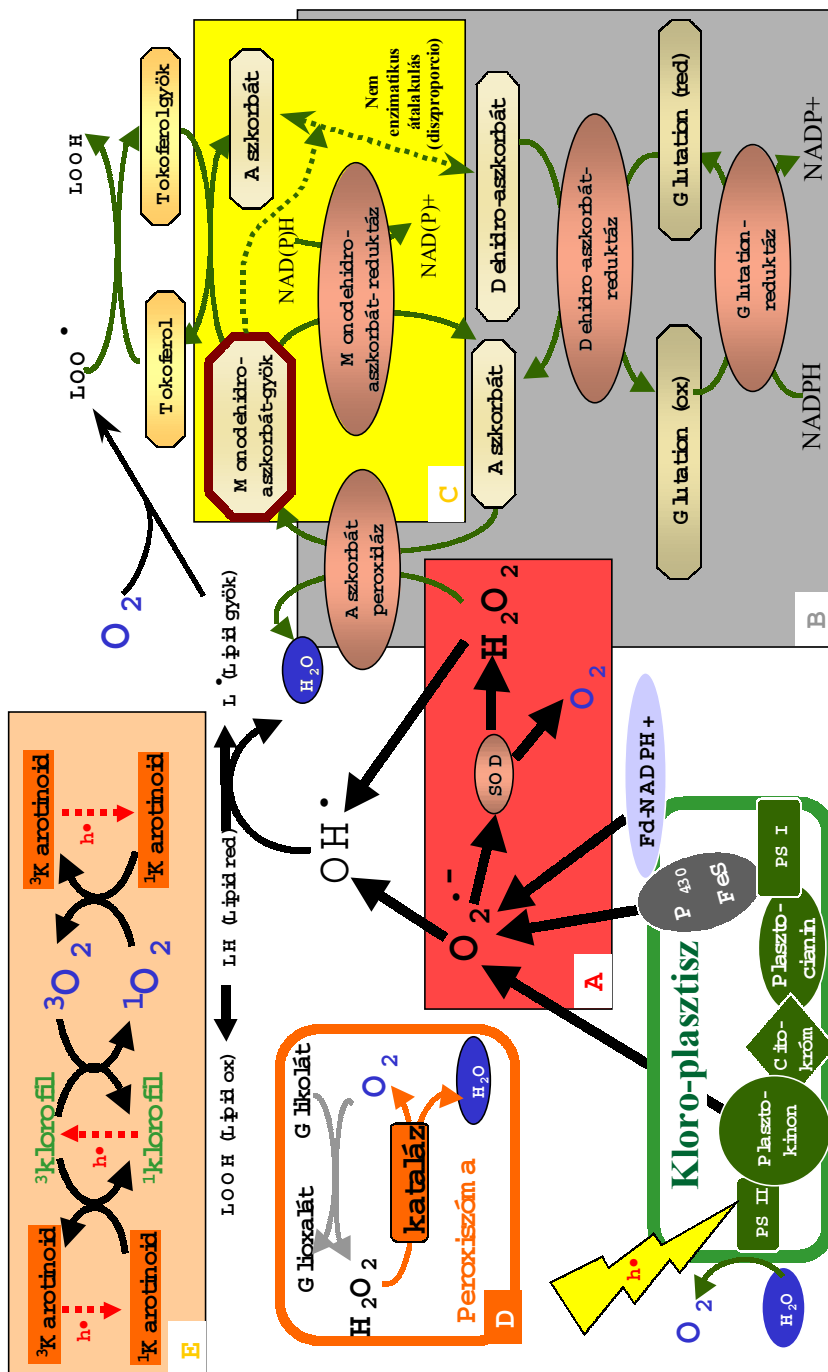
$2 \text{MDA}^{\bullet} \rightarrow \text{aszkorbát} + \text{dehidroaszkorbinsav}$

A dehidroaszkorbinsav pedig a glutation-függő dehidroaszkorbát-reduktáz segítségével tud visszaalakulni aszorbáttá (Hossain és Asada, 1984).



3. ábra Az aszorbát redox rendszer tagjai

Az elektronspin rezonancia spektroszkópia (ESR) az $\text{MDA}^{\bullet}$ egyik érzékeny vizsgálati módszere. Megnövekedett $\text{MDA}^{\bullet}$ mennyiséget ezzel a módszerrel először fenyőtűkben sikerült kimutatni, amikor a fotoszintetikus elektron transzportláncolatot parakvátal vagy aminotriazollal történő kezeléssel gátolták (Westphal *et al.*, 1992).



4. ábra Az OAF-ot semlegesítő folyamatok

Megemelkedett MDA[•] szintet találtak fény- vagy vízstressznek kitett növények leveleiben, öregedő levelekben (Heber *et al.*, 1996; Stegman *et al.*, 1993), valamint UV-B sugárzás (280-320 nm) hatására bablevelekben (Hideg *et al.*, 1997). Az MDA[•] mennyisége a sejtekben viszonylag alacsony, az aszkorbát oxidációja és redukciója illetve az MDA[•] diszproporcionálódása közt fennálló egyensúlyt szemlélteti. Másrésről az oxidatív stressz során az MDA[•] jelenléte elkerülhetetlen a sejtekben, mivel a keletkező oxidatív gyökök általában az aszkorbáttal reagálnak MDA[•] képzése közben. A fénytől függő MDA[•] ESR jele választ adhat a „víz-víz ciklusban” bekövetkező egyensúlyeltolódásra, míg a fénytől független MDA[•] képzése inkább az aszkorbát direkt gyökfogó funkciójának tulajdonítható (Heber *et al.*, 1996).

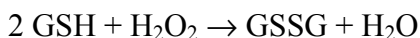
2.2.3. Glutation, glutation-peroxidáz, glutation S-transzferáz

A glutation redukált (GSH) és oxidált (GSSG) formája, valamint a glutation-reduktáz (GR) jelentős szerepet játszik a hidrogén-peroxid lebontásában, a citoszolban és a kloroplasztisban szerveződött összetett rendszerben a Halliwell-Asada ciklusban.

Az aszkorbát és glutation szintjének fenntartása kulcsfontosságú a Halliwell-Asada ciklus működésében. A benne résztvevő enzimek közül a GR szerepét tanulmányozták legmélyebben. GR-transzgént tartalmazó dohányok az oxidatív stresszel szemben ellenállóságot mutattak (Allen *et al.*, 1997; Aono *et al.*, 1991; Broadbent *et al.*, 1995). A transzformánsokban a redukált glutation szintje többszörösére nőtt. A GR- és a Cu,

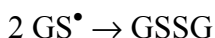
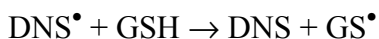
Zn-SOD-transzsgént egyaránt tartalmazó dohányok a szuperoxidot fejlesztő parakvátal szembeni toleranciája nőtt meg (Aono *et al.*, 1995). A GR-antiszensz génkonstrukció ezzel szemben egy parakvátra érzékeny fenotípust eredményezett.

A szeléntartalmú glutation-peroxidáz (GPX) enzim, a hidrogén-peroxid lebontásáért felelős az állati szövetekben a citoszolban és a mitokondriumban fordul elő.



Ezzel szemben a növényekben található GPX valószínű, hogy nem tartalmaz szelént és nem tartozik a stressz válaszra konstitutívan indukálódó enzimek közé. Szerepét tekintve pedig elsősorban a lipid- és alkil-peroxidok semlegesítéséért felelős (Horemans *et al.*, 2000).

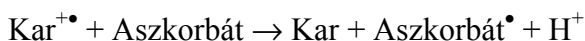
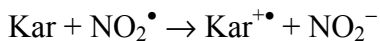
A glutation S-transzferáz (GST) a xenobiotikumok méregtelenítésében vesz részt. Transzsgénikus dohányok, melyek GST-aktivitása kétszeresére nőtt, herbicidek és oxidatív stressz iránt mutattak ellenállóságot (Allen *et al.*, 1997). Hasonlóan az aszkorbáthoz a glutation is képes enzimek közreműködése nélküli, közvetlen reakciókra, így hatékony gyökbefogó lehet (Gutteridge és Halliwell, 1994).



2.2.4. A karotinoidok és az α -tokoferol

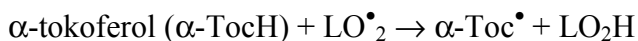
A karotinoidok (Kar) fontos szerepet játszanak a fotooxidatív stressz ellen a kloroplasztisz belső membránrendszerének védelmében (4. ábra). A gerjesztett klorofillmolekulák által képezett szingulett oxigént közömbö-

sítik (Siefermann-Harms, 1987), de a klorofillok fölös energiájának átvételével meg is előzik a szingulett oxigén képződését. A karotinoid antioxidánsok hierarchiája a következő (Mortensen és Skibsted, 1997): α -tokoferol > likopin > β -karotin > zeaxantin > lutein. A karotinoidok (Kar) közvetlenül reagálnak szabad gyökökkel, pl. nitrogén-dioxid gyökkel ($\text{NO}_2^\bullet$):

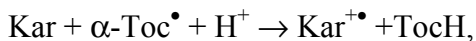


Diszproporcionálódás vagy aszkorbát segítségével regenerálódhatnak. A karotinoidok szabad gyökökkel történő reakciói többségében elméletiek és elsősorban *in vitro* igazoltak, hogy *in vivo* antioxidáns rendszerként milyen mértékű szerepet játszanak egyenlőre csak kevés esetben határozták meg (Halliwell és Gutteridge 1999).

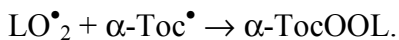
Mint nem enzimatisz antioxidáns, fontos még megemlíteni az E-vitamint (α -tokoferol), amely a membránok kettős lipidrétegében található, és védelmet nyújt a lipidperoxidáció ellen. Elsősorban a lipidperoxil gyökök ($\text{LO}_2^\bullet$) semlegesítésével, amely reakció során az E-vitaminból tokoferoxil szabad gyök keletkezik (Cadenas, 1989):



Az oxidált vitamin az aszkorbát-glutation ciklusban nyeri vissza redukáló képességét vagy további reakciókban vehet részt pl. a karotinoidokkal:



vagy újabb peroxil gyökkel reagál



Az α -tokoferol mennyisége a membránban igen kicsi, ezért kimagasló jelentőségű a tokoferoxil szabad gyök(α -Toc $\cdot$) gyors regenerálása aszkorbát közreműködése (4. ábra/ E) révén (Gutteridge és Halliwell, 1994).



2.2.5. Kataláz

A hidrogén-peroxidot (H_2O_2) vízzé (H_2O) és oxigénné (O_2) katalizáló vasporfirin proszтетikus csoportot tartalmazó enzim megtalálható a legtöbb aerob élő szervezetben. Jelentős szerepet játszik a peroxiszómák és a glioxiszómák hidrogén-peroxid szintjének csökkentésében (4. ábra/D), ahol főleg a fotorespiráció és a zsírsavak bontása során keletkező hidrogén-peroxid lebontásáért felelős (Tolbert, 1981). A kataláz disszociációs állandója magas, így kismennyiségű hidrogén-peroxid átalakításának katalizálásánál nem túl hatékony, pl.: ha 1 mg katalázt elegyítünk 10 mM-os hidrogén-peroxid oldattal, akkor 4000 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ / perc teljesítménnyel katalizálja a reakciót, míg ugyanennyi kataláz 10 μM -os hidrogén-peroxid oldatban csak 2 $\mu\text{mol/perc}$. Ebben az esetben valószínűleg más molekula veszi át szerepét. Az is lehetséges, hogy bizonyos stresszhelyzetekben amikor a NADPH igény nagy, a kataláz szerepe megnövekszik, pl. az antiszensz technológiával katalázhiányossá tett transzgénikus dohánynövényekre a nagyobb fényintenzitás letális hatású, míg gyenge fényintenzitás mellett nem szenvedtek károsodást (Chamnongpól *et al.*, 1996).

2.3. Az oxigén aktív formáinak lehetséges keletkezési helye és módja, kórfolyamatban betöltött szerepe

Miután számos tudományos dolgozat született az OAF kémiájáról, keletkezésükről és a sejt antioxidáns folyamatairól, kézenfekvővé vált a kérdés, hogy hol és hogyan keletkezik nagy mennyiségben az OAF?

Az OAF fertőzés-indukálta termelődéséről szóló első növénybiológiai tanulmány 1983-ban látott napvilágot (Doke, 1983), amely szuperoxid képződésről számolt be hiperszenzitív reakció során inkompatibilis és kompatibilis *Phytophthora infestans* rasszokkal fertőzött burgonyagumó szeletekben. A legintenzívebb OAF-termelés más esetekben is hiperszenzitív nekrotizáció során tapasztalható (Ádám *et al.*, 1989; Apostol *et al.*, 1989 ; Auch és Murphy, 1995 , Doke és Ohashi, 1988; Vera-Estrella *et al.*, 1992). Sejtszuszpenziók baktériumfertőzése után az OAF keletkezésének két fázisát, hullámát lehetett megkülönböztetni (Keppler *et al.*, 1989). Az első, rövid ideig tartó szakasz egy nem specifikus reakció következtében jön létre, amit szaprofiton, kompatibilis és inkompatibilis baktériumok egyaránt kiváltanak, míg a második fázis hosszabb, és kizárólag hiperszenzitív reakciót okozó fertőzésekre jellemző. Az inokulum baktériumszámának növelése ($10^7 \Rightarrow 10^8$ cfu/ml) maga után vonta az OAF mennyiségének növekedését az első fázisban, ugyanakkor a második fázisban azok csökkenése következett be (Baker *et al.*, 1993). Ez a ellentmondás az első fázisban megnövekedő antioxidáns kapacitás következménye. Az OAF képződéséért felelős folyamatok gazdanövénytől és kórokozótól függően nagyon változatosak lehetnek (Allan és Fluhr, 1997; Lamb és Dixon, 1997). A legtöbb esetben a peroxidázokat

és a NAD(P)H-oxidázokat teszik felelőssé az OAF termeléséért. A NAD(P)H-oxidázok aktiválásához fehérjefoszforiláció és kalcium szükséges (Baker *et al.*, 1993 ; Tavernier *et al.*, 1995).

A kloroplasztiszok mellett a mitokondriumok az OAF legnagyobb forrásai az eukarióta sejtekben. A mitokondriális citokróom-útvonal, mellett a növények rendelkeznek ún. alternatív légzési útvonallal is, amely fontos szerepet tölt be a mitokondriális OAF termelődésének szabályozásában. Az alternatív oxidáz gátlása antimycin A, mitokondriális elektron transzport gátló, segítségével drámai OAF termelődéshez (Maxwell *et al.*, 1999) vezet.

2.3.1. Antimikrobiális aktivitás

Az OAF egyik fontos szerepe a mikroorganizmusok károsítása. Az OAF antimikrobiális aktivitása régóta ismert. A növényi sejtek képtelenek mozgást végezni, körülvenni és beburkolni a kórokozót, ellentétben az immunrendszerrel rendelkező szervezetekkel. OAF termelésére azonban képesek. A hyperszenzitív reakció során robbanásszerűen felhalmozódó OAF koncentrációja hasonló mértékű, mint amennyi a kórokozók elpusztítására a humán neutrofil granulocitákban képződik (Dangl *et al.*, 1996). A szuperoxid és a hidrogén-peroxid közvetlen antimikrobiális hatással van baktériumokra és gombákra *in vitro* és *in vivo* egyaránt (El-Zahaby, 1995; Király *et al.*, 1993; Király *et al.*, 1997; Peng és Kuć, 1992). Elektronmikroszkópos felvételeken jól látható, hogy a hidrogén-peroxid a növényi sejtfalaknak csak a baktériumsejtekkel érintkező részein halmozódik fel, amikor *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

hiperszenzitív nekrozist idéz elő salátalevélben (Bestwick *et al.*, 1997). A hidrogén-peroxidnak ez a célzott felszaporodása a baktériumsejtekkel érintkező helyeken baktériumölő hatású lehet. Az árpalisztharmat (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) esetében is egysejtléziós hiperszenzitív reakció és az appresszóriumok körül lokalizált szuperoxid és hidrogén-peroxid mutatható ki 2,6-diklór-izonikotinsavval indukált szisztémikus szerzett rezisztencia hatására.

2.3.2. Sejthalál indukálása

A nekrotikus betegségtünetek egy része, pl. a hiperszenzitív reakció is, a genetikailag programozott sejthalál (Greenberg, 1997; Pennell és Lamb, 1997) következménye. Annak ellenére, hogy sokszor megfigyelhető párhuzam a sejthalál és az OAF azt megelőző felszaporodása között, nincs rá meggyőző bizonyíték, hogy az OAF ténylegesen szükséges a sejtek megöléséhez. Az orvosi szakirodalomban újabban az a legáltalánosabb álláspont, hogy az OAF hozzájárulhat a programozott sejthalál kiváltásához, de nem közvetlenül felelős érte (Jacobson, 1996). A növények vonatkozásában Greenberg (1997) hasonló véleményt hangoztat.

Amikor *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* inkompatibilis rasszával fertőztek szója sejtsuszpenziót, a hidrogén-peroxid koncentrációjának mesterséges fokozása növelte a sejthalál mértékét, míg annak gátlásakor a sejthalál is mérséklődött (Levine *et al.*, 1994). Noha a K252A protein-kináz inhibitorral teljességgel gátolni lehetett a hidrogén-peroxid felhalmozódást, a sejthalál mértéke csak felére csökkent, ami arra utal, hogy a hidrogén-peroxid nem az egyedüli sejthalál-aktiváló faktor (Glazener *et*

al., 1996). Ezzel szemben más megfigyelések arra engednek következtetni, hogy nem a hidrogén-peroxid, hanem a szuperoxid játszik jelentős szerepet a sejthalál indukálásában (Jabs *et al.*, 1996). A kórokozó fertőzése nélkül, spontán módon lokális léziókat képező *lsd1 Arabidopsis* mutánsban vizsgálták a sejthalál indukációjának mechanizmusát. Meglepő módon a kívülről bejuttatott szuperoxid és hidrogén-peroxid közül csak az előbbi váltotta ki a lézióképződést. A szuperoxidot termelő NAD(P)H-oxidáz gátlása 60-70 százalékkal szorította vissza a sejthalált.

Glazener *et al.* (1996) olyan baktériumtörzseket vizsgáltak, amelyek a *hrp* lokuszban bekövetkezett mutáció miatt nem okoznak hiperszenzitív sejthalált. Azt a meglepő felfedezést tették, hogy a *hrp*⁻ negatív mutánsok ugyanolyan mértékű oxidatív robbanást idéztek elő, mint a sejthalált okozó vad típus. Burgonya, szója és dohány sejtszuszenzióban egyaránt ez volt az eredmény. Az OAF felszaporodása tehát ez esetben nem idézett elő sejthalált.

A programozott sejthalál indukálói nem minden esetben okoznak emelkedést az OAF szintjében. Ide sorolható a szalicilsav is. Dohány izolált epidermiszében 500 μM szalicilsav sejthalált indukált, de OAF-felhalmozódás nélkül (Allan és Fluhr, 1997). Egy szalicilsav-hiányos szója sejtszuszenzióban a szalicilsav jelenléte (20 μM) önmagában nem vezetett nekrozishoz, ahogy önmagában az avirulens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* baktériummal való fertőzés után sem következett be sejthalál (Tenhaken és Rübel, 1997). Bekövetkezett azonban akkor, ha a szalicilsav és a baktérium egyszerre jelen voltak. A sejthalált azonban nem kísérte az OAF nagyobb arányú termelődése.

Az antioxidánsok nagyon hatásos védelmet nyújtanak az abiotikus oxidatív stresszekkel szemben. Nincs azonban meggyőző bizonyíték arra vonatkozóan, hogy védenek-e a fertőzés által indukált nekrosis ellen is. Aszkorbinsav 10 mM koncentrációjú oldatába helyezett dohányleveleken a TMV okozta hiperszenzitív nekrotizáció jelentősen csökkent, paprika-levél esetében azonban elmaradt a hatás (Farkas *et al.*, 1960). Dohány esetében is csak a léziószám csökkent az aszkorbinsav hatására, míg a lézióátmérő nőtt (Parish *et al.*, 1965). A citrinin is gátolta a nekrotizációt, de a TMV szaporodását és terjedését nem befolyásolta (Takusari és Takahashi, 1979). *Drechslera avenae*-vel fertőzött zab esetében 1 mM aszkorbinsav gátolta a klorotikus tünetek kialakulását (Gönner és Schlösser, 1992). Amikor szérum-albumin egy százalékos oldatával infiltráltak dohányleveleket, a *Pseudomonas pisi* és a *Pseudomonas syringae* okozta hiperszenzitív nekrosis csökkent (Király *et al.*, 1977). Doke (1983) szerint a dohány mozaik vírussal fertőzött Xanthi-nc leveleket szuperoxid-dizmutázt vagy katalázt tartalmazó oldatba helyezve késleltetni lehetett a nekrosisok kialakulását. A kezelt leveleken azonban némi késedelem után még nagyobb léziók jelentek meg, mint a kontroll leveleken. A karotinoid antioxidáns α -tokoferollal meg lehetett akadályozni a lipid peroxidációt az inkompatibilis baktériummal fertőzött szója sejtszuspenzió sejtjeiben (Tenhaken és Rübel, 1997). Habár a lipid peroxidok képződését sikerült teljesen visszaszorítani, a szójasejtek pusztulásának mértékét ez egyáltalán nem befolyásolta.

Barna és munkatársai (1993) a parakvát-rezisztens mutáns dohánynövényekben emelt szintű antioxidáns aktivitást állapítottak meg. A SOD, GST, GR és APX aktivitása és a glutation koncentrációja is magasabb

volt, mint a vad típusú dohányban. A mutáns széleskörű nekrotizis-ellenállóságát tapasztalták biotikus és abiotikus stresszek során.

2.3.3. Génaktiválás

Az OAF, de elsősorban a hidrogén-peroxid, fontos jelhordozók is egyben. A hidrogén-peroxid indukálja a GST-t és a glutation-peroxidázt (Levine *et al.*, 1994). A szuperoxidról pedig kimutatták, hogy szerepe van a petrezselyem fitoalexin szintézisének indukálásában. (Jabs *et al.*, 1997).

2.3.4. Indukált sejtfal megszilárdítás

Régóta ismert és bizonyított jelenség a kórfolyamat kezdetén bekövetkező sejtfal megszilárdítás, amely során a sejtfalfehérjék peroxidáz által katalizált keresztkötődéssel megszilárdítják a sejtfalat, és lassíthatják a kórokozó behatolását. Ez az oxidatív robbanás során keletkező hidrogén-peroxid által befolyásolt folyamat. (Bradley *et al.*, 1992).

2.3.5. Az oxigén aktív formáinak szerepe a szisztémikus szerzett rezisztenciában

2.3.5.1. A szisztémikus szerzett rezisztencia

A növények sokszor szisztémikus, az egész növényre kiterjedő választ adnak a lokális fertőzésekre, amely egy széles spektrumú, hetekig, hónapokig fennálló rezisztenciához vezet vírusok, baktériumok és gombák

ellen egyaránt (Ryals *et al.*, 1996). Az első fertőzés hatására kifejlődő, és a jövőben bekövetkező újabb fertőzések ellen ható rezisztenciát indukált rezisztenciának nevezzük (Kuc, 1982). Az egész növényben kialakul, ezért az indukált betegségellenállóság eme formáját szisztemikus szerzett rezisztenciának (SzSzR) nevezzük. Érdekessége, hogy a különböző kórokozók okozta fertőzések ugyanazt a típusú rezisztenciát idézik elő, ami azt sugallja, hogy a sokféle stressz reakció egy közös útra terelődik a növényi válasz kialakulása során (Dangl és Holub, 1997; Ryals *et al.*, 1996). Az SzSzR indukciója után azok a levelek is ellenállóvá válnak, amelyek csak később kezdenek kifejlődni (Bozarth és Ross, 1964). Ez arra utal, hogy az SzSzR-t jellemző megváltozott állapot a növény egészére kiterjed. A szerzett rezisztencia oltással is átvihető egyik növényről a másikra (Jenns és Kuc, 1979). Az ellenálló uborka alanyra oltott uborka, sárgadinnye és görögdinnye egyaránt ellenállóvá lett. Az indukció tovaterjedése a növényben megakadályozható volt a hancsrész folytonosságának megszakításával, ami azt bizonyította, hogy a rezisztenciát kiváltó jel az indukált levélből indul ki és a hancsrészben terjed (Guedes *et al.*, 1980). A sikeres indukció után még nincs azonnal észlelhető ellenállóság, sőt átmenetileg még fogékonyabb is lesz a növény. A konkrét gazda - parazita kapcsolattól függően vesz igénybe pár napot az SzSzR kialakulása (Ross, 1961b).

Annak ellenére, hogy már egy évszázada ismert jelenség, és a természetben fontos szerepet játszik a betegségek elleni védekezésben (Chester, 1933), a kórokozók által előidézett szerzett ellenállóságot mindeddig nem tudta a mezőgazdaság hasznosítani. Sem az SzSzR indukciójához szükséges inokulum kezelése, sem a növények mesterséges fertőzése nem

valósítható meg a gyakorlatban. Ezért a kutatások az SzSzR biokémiai mechanizmusának megismerését célozták meg. A legnagyobb eredmény ezen a téren, hogy a 90-es években megtalálták az SzSzR egyik természetes aktivátorát, a szalicilsavat, ami sok növény ellenállóképességének fokozásában működik közre (Delaney *et al.*, 1994; Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). Közvetlen antimikrobiális hatása nincs, de szöveti koncentrációjának növekedése több növényfajban elengedhetetlenül szükséges a SzSzR kialakulásához (Delaney *et al.*, 1994; Gaffney *et al.*, 1993). Ékes bizonyítékot szolgáltatott erre a szalicilsav-hidroxiláz enzim termelő transzgénikus dohány és *Arabidopsis*. Ez a bakteriális eredetű enzim rezisztenciát indukáló aktivitással nem rendelkező katechollá alakítja a szalicilsavat. A transzgénikus növényekben a fertőzések nem indukáltak az SzSzR-t, és romlott az általános védekezőképességük, sok, egyébként inkompatibilis kórokozóval szemben fogékonyá váltak.

2.3.5.2. Kórfolyamat-függő (*pathogenesis-related*) fehérjék

Az SzSzR jelensége szoros kapcsolatban áll a szalicilsav szintjének emelkedésével és a kórfolyamat-függő (*pathogenesis-related*) fehérjék felhalmozódásával (Van Loon, 1997). A kórfolyamat-függő fehérjéket TMV-vel fertőzött hiperszenzitíven válaszoló dohányokban mutattak ki először (Van Loon és Van Kammen, 1970). Jelenleg kilenc növénycsaládban, kétszikűekben és egyszikűekben ismert az előfordulásuk (Linthorst, 1991; Ryals *et al.*, 1996; Van Loon, 1997). Elsősorban az extracelluláris térben és a vakuólumokban halmozódnak fel. Mivel az

SzSzR-rel szoros korrelációban vannak, génjeiket az SzSzR-re jellemző géneknek is nevezik (Métraux *et al.*, 1989; Uknes *et al.*, 1992). Általánosan elfogadott ezen fehérjék felszaporodását az SzSzR jeleként értékelni (Ward *et al.*, 1991).

2.3.5.3. *Antioxidánsok és a szisztémikus szerzett rezisztencia*

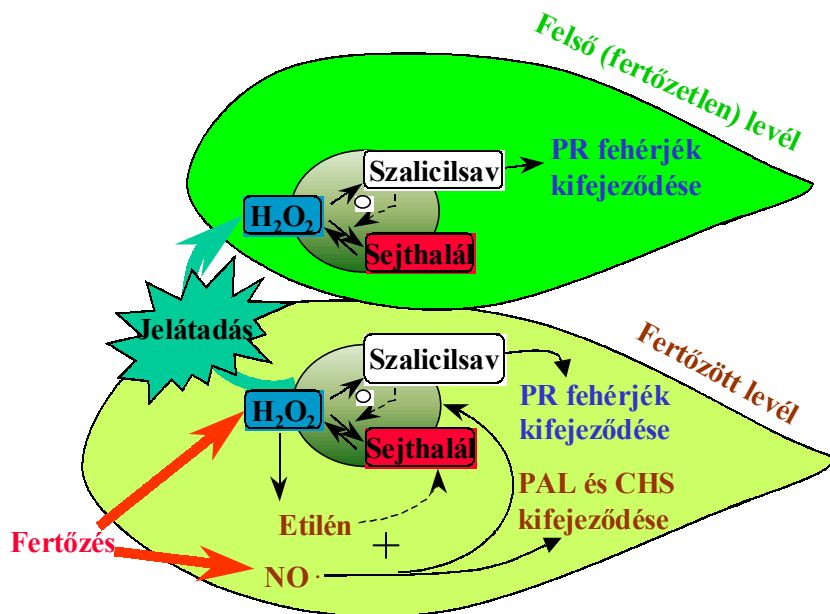
Sok adat támasztja alá, hogy az SzSzR biológiai és kémiai indukciója egyaránt fokozza az antioxidánsok aktivitását (Fodor *et al.*, 1997; Gullner *et al.*, 1995; Lamb és Dixon, 1997; Levine *et al.*, 1994). Az antioxidánsok aktiválódása önmagában mégsem ad magyarázatot az SzSzR-re. Ugyanakkor az SzSzR indukálása az OAF által is lehetséges. Hidrogén-peroxidot termelő glükóz/glükóz-oxidáz rendszer infiltrálása *Arabidopsis* levelekbe (Lamb és Dixon, 1997), valamint szuperoxidot képző parakvát vagy acifluorfén infiltrálása uborkalevelekbe úgyszintén SzSzR-t indukált (Strobel és Kuć, 1995). Az OAF-kezelés azonban nem tette ellenállóbbá a fertőzésekkel szemben a transzgénikus NahG növényeket (Neuenschwander *et al.*, 1995). Ez azt bizonyítja, hogy csak a szalicilsav szintézisének indukcióján keresztül tudja kifejteni az OAF a hatását. A hidrogén-peroxidról megállapították, valóban növeli a benzoésav-2-hidroxiláz enzim aktivitását, amely a szalicilsav benzoésavból történő képződését katalizálja (Leon *et al.*, 1995). Az SzSzR kialakulása antioxidánsok segítségével (Chen *et al.*, 1995) és prooxidánsok gátlásával gátolható (Lamb és Dixon, 1997), ami arra utal, hogy a szalicilsavon keresztül ugyan, de fontos szerepe lehet az OAF-nak az SzSzR kiváltásában.

2.3.5.4. Szalicilsav

Két évtizede ismert, hogy a szalicilsavas vagy aszpirines kezelés dohányban indukálja a kórfolyamat-függő fehérjéket és növeli az ellenállóságot egyes kórokozók, így a TMV ellen (White, 1979). A 90-es évek elején tárták fel, hogy dohány (Malamy *et al.*, 1990), uborka (Métraux *et al.*, 1990) és *Arabidopsis thaliana* (Uknes *et al.*, 1993) növények esetében, hogy a szalicilsav az SzSzR természetes szignálja. Paradicsom, szója (Raskin *et al.*, 1990), burgonya (Yu *et al.*, 1997), rizs (Silverman *et al.*, 1995) és árpa (Kogel *et al.*, 1995) esetében a szalicilsav szerepe nem egyértelmű. A TMV-vel fertőzött hiperszenzitíven reagáló dohányban szalicilsav halmozódik fel a fertőzött levélben (koncentrációja mintegy 50-80-szorosára nő), és némi késéssel szisztémikusan is, ahol 2-5-szörösére nő a mennyisége (Malamy *et al.*, 1990). Hasonló eredményeket kaptak dohány nekrosis vírussal vagy *Colletotrichum lagenarium*mal fertőzött uborka vizsgálatakor (Métraux *et al.*, 1990). Újabb eredmények alapján elmondható, hogy a szalicilsav egy illékony származéka, a metil-szalicilsav, a levegő útján is eljut a távolabbi levelekbe vagy a szomszédos növényekbe (Seskar *et al.*, 1998; Shulaev *et al.*, 1997).

Ellentmondásnak tűnik, hogy a szalicilsavas kezelés csak lokálisan, a kezelt levelekben indukál rezisztenciát, de a szalicilsav mégis az SzSzR szignálja, amely szisztémikus (5. ábra). A válasz igen egyszerű: nem a szalicilsav a szisztémikus szignál, de egy ismeretlen hatásra szisztémikusan serkentődik a termelése (Meuwly *et al.*, 1995), ezért a hatása szisztémikus. A legfrissebb eredmények szerint uborka esetében nem a fertőzetlen levelekben, hanem a szárban és a levélnyélben szinteti-

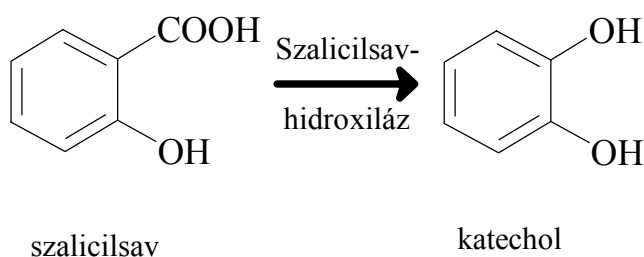
zálódik a szisztémikus indukcióért felelős szalicilsav (Smith-Becker *et al.*, 1998).



5. ábra A szalicilsav és a sejthalál indukciójának összefüggése (Van Camp, *et al.*, 1999)

A szalicilsav bioszintézise fenil-alaninból indul ki és halad fahéjsavon, orto-kumársavon és benzoesavon keresztül (Lee *et al.*, 1995; Smith-Becker *et al.*, 1998). A szalicilsav koncentrációjának csökkentése a fenil-alanin-ammónia-liáz gátlásával fogékonyságot indukált *Arabidopsis* növényekben a *Peronospora parasitica* inkompatibilis rasszával szemben (Mauch-Mani és Slusarenko, 1996). A szalicilsav szerepének mélyebb megértése végett genetikailag módosított *Arabidopsis thaliana*, majd Xanthi-nc dohánynövényeket hoztak létre a *Pseudomonas putida* szalicilsav-hidroxiláz génjének bevitelével. A szalicilsav-hidroxiláz a szalicilsa-

vat az SzSzR indukciója szempontjából inaktív katechollá alakítja (6. ábra). A katechol nem halmozódik fel a transzgénikus növényekben, hanem továbbalakul (Mur *et al.*, 1997). A *Pseudomonas putida* PpG7 törzséből a *nahG* (Delaney *et al.*, 1994), a NC1B9816 törzséből az *SH-L* szalicilsav-hidroxiláz gént (Bi *et al.*, 1995) izolálták.



6. ábra A szalicilsav-hidroxiláz katechollá alakítja át a szalicilsavat

A szalicilsav-hidroxiláz hatására alig mutatható ki szalicilsav a transzgénikus növényekben (Mur *et al.*, 1997; Vernooij *et al.*, 1994). A szalicilsav és az SzSzR kapcsolatáról további ismeretanyagot szolgáltatnak az *Arabidopsis* mutánsok. A *cim3* (Lawton *et al.*, 1993) és a *cpr1* (Bowling *et al.*, 1994) mutánsokban folyamatosan aktív az SzSzR. Magas bennük a szalicilsav koncentrációja, valamint a kórfolyamat-függő fehérjék szintje. A *cim3* és a *cpr1* rezisztenciáját a *nahG* gén letörte, bizonyítva ezzel, hogy a szalicilsav az, ami indukálja az ellenállóságot.

2.3.5.5. Szövetelhalás és a szisztémikus szerzett rezisztencia

Az SzSzR hatására a fertőzés okozta nekrotikus tünetek mérséklődnek, a TMV-fertőzött szalicilsavat lebontó NahG dohányokra pedig fokozott mértékű nekrotizáció jellemző (Delaney *et al.*, 1994). Az, hogy az SzSzR egyben nekrosis elleni rezisztencia is, abiotikus stresszek, pl. parakvát kezelés tolerálásában nyilvánul meg legszembetűnőbben (Király *et al.*, 1991; Strobel és Kuć, 1995). Ennek a jelenségnek a mechanizmusa nem tisztázott, mert érdekes módon a szalicilsav általában nem gátolja, hanem inkább serkenti a sejthalált.

A TMV-fertőzés okozta lézióképződés egy nekrosis előtti és egy nekrotikus szakaszra osztható. Kb. 4 órával a nekrotikus tünetek kialakulása előtt veszi kezdetét az OAF robbanásszerű felszaporodása (Mur *et al.*, 1997). A nekrotikus szakaszon belül megkülönböztethető egy gyors léziónövekedéssel jellemezhető iniciálási periódus és a léziónövekedés fokozatos csökkenésével meghatározható korlátozási fázis. A sejthalál a fertőzést követő 40 óra táján kezdődik egy 0,5 mm-nél kisebb átmérőjű területen, de a 48. óráig is elhúzódik a léziók keletkezése (Mur *et al.*, 1997). A nekrosisok megjelenése után az OAF felhalmozódása a léziók körül gyűrű alakban elhelyezkedő zónára jellemző (Doke és Ohashi, 1988; Mur *et al.*, 1997). A szalicilsav szintézisének emelkedése szorosan kapcsolódik a nekrotikus tünetek kialakulásához. A fertőzés utáni 42. órára kétszeresére nő a koncentrációja, de igazán csak a harmadik napra emelkedik meg jelentősen, közel százszorosára. A szalicilsav-hidroxilázt termelő transzgenikus növények léziói már eleve nagyobb átmérővel jelennek meg, és a későbbi növekedésük üteme is mintegy duplája a vad

típusú dohányban mértnek. Esetükben a léziók növekedése nem áll le, hanem a nekrózis tovább terjed a fertőzött levélről a szárra és a szomszédos levelekre is (Gaffney *et al.*, 1993; Mur *et al.*, 1997). Meglepő módon nem a szalicilsavszint 3. napi százszoros növekedése játszik döntő szerepet a lokális léziók méretének kialakításában, hanem a 2. napi kétszeres emelkedés (Mur *et al.*, 1997). A későbbi fázisban felhalmozódott szalicilsav feltehetően az SzSzR kialakításában vesz részt.

A szalicilsavval előkezelt Xanthi-nc növények esetében a léziók a kezdeti megjelenésükkor már kisebbek, mint a kezeletlen kontrollban, és a további növekedési ütemük is kisebb (White, 1979). Ezekben a növényekben a nekrotizáció hamarabb kezdődik el és gyorsabban zajlik le, de talán éppen ennek következtében lesznek kisebbek a léziók (Mur *et al.*, 1997). A szalicilsavat lebontó transzgénikus dohányokra a TMV-fertőzés után a nekrotizáció későbbi megjelenése és elhúzódása a jellemző, ami súlyosabb elhaláshoz vezet.

Irodalmi adatok alapján (Hammerschmidt és Kuć, 1982; Rasmussen *et al.*, 1991), miszerint a megfelelően megválasztott kórokozóval történő fertőzés már a tünetek kialakulása előtt működésbe hozza a szerzett rezisztencia specifikus jelátviteli mechanizmusát. Sem 24, sem 32 órával a fertőzés után nincs még visszafordíthatatlan sejtkárosodás, mert alkalmas beavatkozással (pl. a Ca^{2+} -csatornák La^{3+} -nal való blokkolásával) meg lehet előzni a sejthalál bekövetkezését. Tehát nem csak a nekrotizáció képes SzSzR-t indukálni.

Az SzSzR indukálásához tehát nincs szükség nekrózisra, elegendő a kórokozó felismerése is. A TMV-vel fertőzött hiperszenzitíven reagáló dohány alacsony parciális nyomású oxigén jelenlétében nem képez léziókat,

a vírusreplikáció és vírusterjedés azonban lokális léziók nélkül is gátolt, és a vírus gátlásával együtt az SzSzR is indukálódik (Mittler *et al.*, 1996). Nekrózist okozó kórokozókkal fertőzött, etilén iránt érzéketlen *Arabidopsis* mutánsok nekrotikus tünetei rendkívüli mértékben csökkentek, de az SzSzR ennek ellenére kialakult (Bent *et al.*, 1992; Lawton *et al.*, 1994).

Számos abiotikus oxidatív stressz, pl. parakvát, ózon, tömény sóoldat képes az SzSzR indukálására (Király *et al.*, 1991; Sandermann *et al.*, 1998; Strobel és Kuć, 1995).

Egyes *Arabidopsis* mutánsok levelein steril körülmények között is elhalt foltok jönnek létre, utánozva a nekrotikus tünetekkel járó betegséget. A spontán nekrózisos genetikailag programozott sejthalál következményei. Ilyenek az *lsd1-lsd7* sorozat tagjai, és az *acd2* (Ryals *et al.*, 1996). Érdeklőségük, hogy a fertőzés nélkül megjelenő léziók hatására is kialakul az SzSzR (Dietrich *et al.*, 1994; Weymann *et al.*, 1995). A spontán léziókat képező *lsd1* és *lsd6* *Arabidopsis* mutánsokban végbemenő sejthalál a szalicilsav képződésének függvénye (Ryals *et al.*, 1996). Ennek ellenére a vad típusú *Arabidopsis*okban és dohánynövényekben csak extrém magas koncentráció mellett tapasztaltak sejthalált szalicilsavkezelést követően. A magas fokú ellenállósággal bíró, szalicilsavat állandó magas szinten tartalmazó *cim* *Arabidopsis* mutánsokon sem láthatók még mikroszkopikus léziók sem (Ryals *et al.*, 1996). Ezzel szemben sejtszuszpenziók vagy izolált szövetek esetében a szalicilsav jelenléte elősegíti a sejthalál bekövetkezését (Allan és Fluhr, 1997; Fauth *et al.*, 1996; Kaur-Sawhney *et al.*, 1981; Shirasu *et al.*, 1997; Tenhaken és Rübel, 1997).

2.4. Növény – vírus kapcsolat

A vírusfertőzés kimenetelét elsősorban a vírusgenom és növényi genom kapcsolata határozza meg. A fertőzésre adott növényi válaszokat megjelenési formájuk alapján három csoportba sorolhatjuk. Ugyanazon rezisztencia formákat a növényi és vírusgenom közti különböző kölcsönhatások is kialakíthatnak. „Immunitásról” beszélhetünk, ha a fertőző vírus nem képes replikációra a növényi sejtben. Nincsenek látható tünetek. A rezisztencia ezen megjelenési formája sejt szinten fejeződik ki. Többféle mechanizmus vezethet ehhez a megjelenési formához. Pl. a növényben nincsenek olyan kompatibilis faktorok, amelyek lehetővé tennék a vírusreplikáz létrejöttét, vagy a növényi enzimek specifikusan lebontják a vírusproteineket és nukleinsavakat. „Korlátozás” esetén a vírusfertőzés csak az általa fertőzött sejtre, vagy néhány sejtre korlátozódik Pl. HR-t indukál, illetve nekrotikus léziókat okoz. De előfordulhat, hogy a gazdaszervezet komponensei inkompatibilisak a vírus mozgását elősegítő fehérjével és ez akadályozza meg a vírus tovaterjedését. Ez a rezisztenciaforma nem sejt szinten fejeződik ki. „Visszaszorításról” akkor beszélhetünk, ha a vírusreplikátumok a fertőzött sejtben alacsonyabb szinten fejeződnek ki mint egy fogékony gazdanövényben. Nagyon sok faktor kiválthatja ezt, aminek következtében a vírus replikációja vagy épp mozgása szignifikánsan csökken. A rezisztenciaforma kifejeződhet sejt szinten is, változatos tüneteket produkálva a tünetmentestől az enyhe tünetekkel rendelkezőkig. Egy másik besorolási forma szerint „passzív” vagy „aktív” formáját különböztetjük meg a vírusok elleni rezisztenciának. A passzív rezisztencia esetében a vírus valamely funkciójának gátlásáról

beszélünk, míg az aktív rezisztencia esetében a gazdaszervezet vírusellenes reakcióinak aktiválásáról van szó (Xiong, 1999).

Mint köztudott, a vírusok obligát sejten belüli paraziták, teljes mértékben a gazdanövénytől függ mind a replikációjuk, mind a növényben történő elterjedésük. Ha a fertőző vírus egy fogékony gazdában megtelepszik és replikálódásra azaz szaporodásra képes, akkor a megfertőzött sejtéből a plazmodezmákon keresztül újabb sejteket fertőz meg, valamint a szállítóedényrendszeren keresztül, leggyakrabban a floómen keresztül megkezdí a hosszabb távú mozgást a növényben. A vírusok mozgása a növényben két határozottan elkülönülő fázisra bontható. Az elsőben a kórokozó az iniciálisan megfertőzött epidermisz sejtekből a plazmodezmákon keresztül a szomszédos epidermisz sejtekbe, illetve a mezofillum sejtekbe, innen pedig a vaszkuláris rendszerbe jut- nem feltétlenül virion formájában. Ezt a fázist, amelynek utolsó lépése a vírus hancsrost sejtekbe jutása, lokális mozgásnak nevezik. A második fázis a vírus transzlokációja a floómben, melyet hosszú távú mozgásnak neveznek. Három lényeges feladat előtt áll tehát a növényben szisztemizálódni igyekvő vírus. Át kell jutnia az epidermisz illetve a mezofillum plazmodezmáin, a nyalábhüvely sejtek, a kísérősejtek és a hancsparenchima sejtek speciális plazmodezmáin a rostasejtekbe, és végül a floémárammal az új levelekbe jutva ki kell szabadulnia a vaszkuláris rendszerből. Megjegyzendő, hogy a floémparenchima sejtjeit összekötő plazmodezmák nagymértékben különböznek a mezofillumban illetve az epidermiszben találhatóktól. Ez alapján a növény védekező stratégiái többfélék lehetnek: vagy a replikációt vagy a kétféle elterjedési mód valamelyikét gátolja (mindkét mozgásforma feltétele a létező növé-

nyi transzport és kommunikációs utak valamint a gazdaszervezet részvétele) (Kim és Palukaitis, 1997).

A szalicilsav több védekezéssel kapcsolatos gén indukciójáért felelős. Ezen gének termékei közül számos esetben bebizonyosodott, hogy közvetlen hatásuk van az egyes kórokozó gombák és baktériumok ellen. De egyikről sem sikerült tisztázni, hogy milyen szerepe lehet a vírusok ellen kifejtett rezisztencia esetében. Az utóbbi évek kutatásai eredményei arra engednek következtetni, hogy a szalicilsav a vírus replikációját, illetve elterjedését egyaránt gátolhatja, azaz olyan inhibítorok termelődését indukálhatja, amelyek akadályozzák a replikációt vagy az elterjedést. Jelenlegi bizonyítékok alapján aszalicilsav a vírusreplikációra a TMV és PVX esetében (Naylor *et al.*, 1998), illetve a szisztémikus elterjedésre a CMV esetén lehet hatással (Chivasa *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 1999; Bergstrom *et al.*, 1982;).

Figyelemre méltó, hogy a vírus korlátozása nem igényli lokális léziók képződését. Érdekes párhuzam ez a mozaik tünetet mutató dohánylevelek ún. zöld szigeteinek viselkedésével, melyek vírusmentesek, és mesterségesen sem fertőzhetők meg TMV-vel (Murakishi és Carlson, 1976).

A hiperszenzitív reakciót adó dohánynövények esetében a fertőzéssel kiváltott SzSzR-indukció ellentmondó eredményeket szolgáltatott. Egyes szerzők azt tapasztalták, hogy az SzSzR hatására csökken a vírusreplikáció (Ross, 1966; Stein *et al.*, 1985), míg mások nem találtak ilyen összefüggést (Fraser, 1979; Sziráki *et al.*, 1980). Szalicilsavkezelés hatására azonban megfigyelhető a TMV sejtről-sejtre terjedésének és a vírus replikációjának a visszaszorulása is (Mur *et al.*, 1997; White *et al.*, 1983).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Növények, mikroorganizmusok és anyagok

3.1.1. Növények

Kísérleteinket a következő növényekkel végeztük:

Xanthi-nc dohány (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi-nc, a továbbiakban Xanthi-nc), amely rendelkezik a *Nicotiana glutinosa* dohányból származó *N* génnel, így dohány mozaik vírussal szemben (tobacco mosaic *tobamovirus*, TMV) rezisztens. Ez a rezisztencia HR megjelenésével nyilvánul meg, a vírus nem képes szisztemizálódni a növényekben. A NOVARTIS Mezőgazdasági Biotechnológiai Központja (Research Triangle Park, NC, USA) jóvoltából rendelkezésünkre állt a Xanthi-nc dohány genetikai transzformációjával előállított transzgénés NahG-10 dohánytörzs (ezután NahG), amely magas szinten termeli a *Pseudomonas putida* baktériumból származó *nahG* gén által kódolt szalicilsav-hidroxiláz enzimet. A szalicilsav-hidroxiláz a szalicilsavat katechollá (1,2-dihidroxi-fenol) alakítja, ezért a NahG képtelen felhalmozni a szalicilsavat (Gaffney *et al.*, 1993). Kísérleteinkbe a 8-10 hetes kort elért növényeket vontuk be.

A *Chenopodium quinoa* Wild. a libatopfélék (*Chenopodiaceae*) családjába tartozik. A Magyarországon nem őshonos *C. quinoa* a vírusdiagnosztikában gyakran alkalmazott növény. Kvantitatív vizsgálatokra alkalmas lokális és szisztemikus gazda (CHEQU/AHL, AHS). A kísérleteket 6-8 hetes, 6 lombleveles fejlettségi állapotú növényeken végeztük.

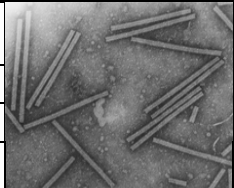
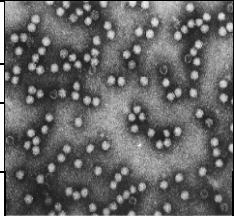
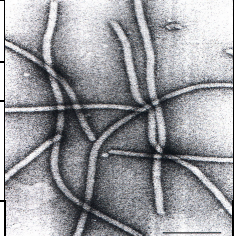
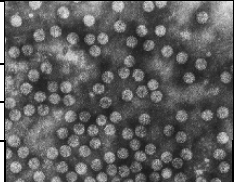
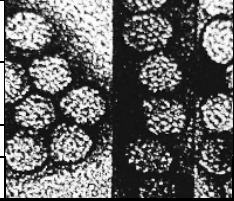
Az uborkanövények (*Cucumis sativus* L., Regal csemegeuborka fajtajelölt, Agro-veritas Kft.) az uborka mozaik vírussal szemben toleránsak. A növényeket 10 napos szikleveles állapotban, valamint 20 napos 2 lomb-leveles fejlettségi állapotban alkalmaztuk a kísérletekben.

Az itt felsorolt növényeket üvegházban neveltük normál körülmények között (16 h természetes megvilágítás / 8 h sötét periódus, 20-25°C hőmérsékleten).

3.1.2. Mikroorganizmusok

A különböző gazda-parazita kölcsönhatásokban a következő vírusokat alkalmaztuk (2. táblázat). A dohány mozaik vírus (tobacco mosaic *tobamovirus*, TMV/ egyszálú RNS-t tartalmaz, pálcika alakú) U1-es törzsét *Nicotiana tabacum* L. cv Samsun nn fogékony gazdanövényben tartottuk fenn. A tipikus mozaik tüneteket mutató növények leveleit Sörensen pufferben homogenáltuk (1g levél / 5ml pufferben), majd spatulával bedörzsöltük a növényekbe. A dohány nekrosis vírust (tobacco necrosis *necrovirus*, TNV/egyszálú RNS-t tartalmaz, izometrikus alakú) párhuzamosan dohányon (Xanthi-nc és Samsun) és babon (*Phaseolus vulgaris* WILLD. cv Red Kidney) egyaránt fenntartottuk. Dohányon HR-t okoz, míg babon lokális nekrosisokat és érnekrozist. Ezen vírusok esetében töményebb szuszpenziót alkalmaztunk (1g levél / 2 ml puffer). Uborkán (*Cucumis sativus* L.) és cukkinin (*Cucurbita pepo* L. var. giromontiina GREB., Black Beauty), valamint a *Cucurbitaceae* család más fajain, sütőtökön (*Cucurbita maxima* DUCH.) tartottuk fenn a

2. táblázat A kísérletekben alkalmazott vírusok és fenntartásuk.

vírus magyar neve és törzse, rövidítése (angol neve),	vírus elektron- mikroszkópos képe
genetikai állománya, vírus alakja	
vírus fenntartása növényben	
növényfertőzés: x g levél / 5ml Sörrensen pufferben	
dohány mozaik vírus U1-es törzse TMV U1 (tobacco mosaic <i>tobamovirus</i>)	
ss RNS vírus, pálcika alakú	
fenntartása: <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Samsun nn	
növényfertőzés: 1g levél / 5ml Sörrensen pufferben	
dohány nekrosis vírus TNV (tobacco necrosis <i>necrovirus</i>)	
ss RNS vírus, izometrikus alakú	
fenntartása: <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Samsun nn és Xanthi nc <i>Phaseolus vulgaris</i> WILLD. cv Red Kidney	
növényfertőzés: 1g levél / 2 ml Sörrensen pufferben	
cukkini sárga mozaik vírus 10-es törzse ZYMV-10 (zucchini yellow mosaic <i>potyvirus</i>)	
ss RNS vírus, fonál alakú	
fenntartása: uborkán <i>Cucumis sativus</i> L. és cukkinin (<i>Cucurbita pepo</i> L. var. giromontiina GREB., Black Beauty); sütőtökön (<i>Cucurbita maxima</i> DUCH.)	
növényfertőzés: 1g levél / 5ml Sörrensen pufferben	
uborka mozaik vírus U264-es törzse CMV-U264 (cucumber mosaic <i>cucumovirus</i>)	
ss RNS vírus, izometrikus alakú	
fenntartása: <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Samsun nn	
növényfertőzés: 1g levél / 5ml Sörrensen pufferben	
chenopodium mozaik vírus SoMV (sowbane mosaic <i>sobemovirus</i> .)	
ss RNS vírus, izometrikus alakú	
fenntartása: <i>Chenopodium quinoa</i>	
növényfertőzés: 1g levél / 5ml Sörrensen pufferben	

cukkini sárga mozaik vírust, annak ZYMV-10-el jelölt törzsét, (zucchini yellow mosaic *potyvirus*, ZYMV / egyszálú RNS-t tartalmaz, fonál alakú). Itt a TMV-nél alkalmazott töménységű szuszpenzióval végeztük az inokulációt. Az uborka mozaik vírus U264-es törzsét (cucumber mosaic *cucumovirus*, CMV / egyszálú RNS-t tartalmaz, izometrikus alakú) Samsun dohánynövényeken tartottuk fenn, az átoltásokat a TMV-nél alkalmazottak szerint végeztük (1g levél / 5 ml puffer). A chenopodium mozaik vírust (sowbane mosaic *sobemovirus*, SoMV / egyszálú RNS-t tartalmaz, izometrikus alakú) *Chenopodium quinoa*-án tartottuk fenn. Az átoltásokat a töményebb szuszpenzióval végeztük. A vírusok fenntartásánál alkalmazott Sörensen puffer 0,05 M-os foszfát puffer, amit hat rész Na_2HPO_4 -ből és négy rész KH_2PO_4 -ből készítettünk.

3.1.3. Anyagok

A kísérletekben végzett analitikai méréseknél alkalmazott ásványi sók, enzimek, oldatok analitikai minőségűek voltak. Részben a Reanal, részben Sigma és Fluka cégek termékei.

3.2. Növénykísérleti és analitikai módszerek

3.2.1. A különböző kísérletek beállításai

A tízhetes Xanthi-nc és NahG növényeket a TMV U_1 törzsével fertőztük. A fertőzéseket a fenntartásnál is alkalmazott töménységű szuszpenzióval

végeztük. A levelek felszínét egyenletesen karborundummal meghintettük, majd spatula segítségével bedörzsöltük a szuszpenziót. Először a sziklevel fölötti negyedik és ötödik valódi levelet fertőztük, hogy indukáljuk a rezisztenciát a felső levelekben. Két héttel később fertőztük az immár ellenállóvá lett hatodik és hetedik levelet. A fertőzött növényeket a mérések folyamán azokhoz a kontroll növényekhez hasonlítottuk, melyek leveleit a kísérlet beállításakor csapvízzel kezeltünk. A *C.quinoa* növényeket négy különböző vírussal fertőztük, TNV-vel, mely lokális nekروزisokat okoz a növényen, TMV-vel, mely szintén lokális nekروزist okoz, de kialakulásának ideje hosszabb, ZYMV-vel, mely lokális klorozist okoz, valamint SoMV-vel, mely szisztemizálódik a növényben, mozaik tünetet okozva. A hat lombleveles fejlettségi állapotú növények harmadik, negyedik levelét fertőztük, a felülfertőzéseket pedig egy hét elteltével az ötödik, hatodik levélszinten végeztük. A felülfertőzést mindig TNV-vel végeztük. A fertőzés módja megegyezik a fenntartásoknál leírtakkal. A nyolc napos uborkanövényeken, a következő vírusfertőzéseket végeztük el: TNV-lokális nekروزisokat okoz a növényen, ZYMV-szisztemikus klorozist, míg a CMV mozaik tünetek okoz, azonban ez utóbbi az uborka rezisztenciája miatt nem jelenik meg a növényeken. A felülfertőzéseket itt is TNV-vel végeztük, a két fertőzés között hét nap telt el. A fertőzések során a fenntartásokból a tipikus tünetek mutató növények leveleiből a fenntartásnál alkalmazott szuszpenziókat készítettük el, és azokkal fertőztünk. Minden esetben steril dörzsmozsarat és spatulát, valamint karborundumot alkalmazva. A kontroll növények levelét csapvízzel kezeltük.

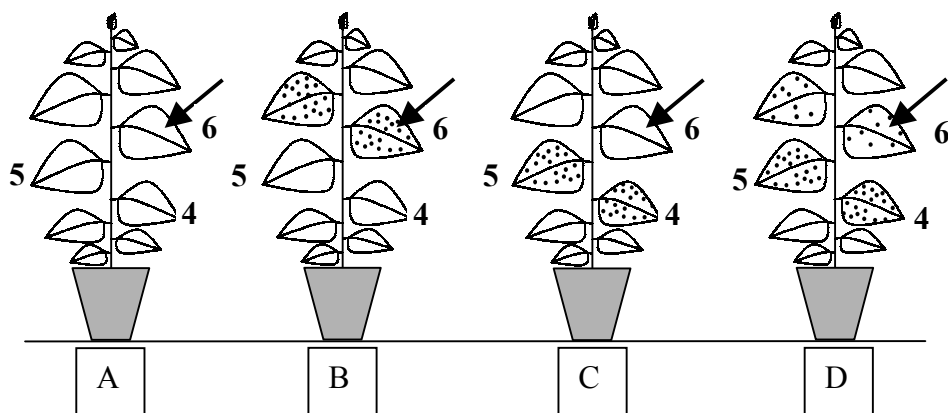
3. táblázat Az egyes növényeken végzett kísérletek beállításai.

növény	Vírus (első fertő- zés)	tünetek	Vírus (ismétlő fertőzés)
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Xanthi-nc	TMV U ₁	nekrotikus lézió (NI)	TMV U ₁
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Xanthi-nc NahG	TMV U ₁		TMV U ₁
<i>Chenopodium quinoa</i>	TNV	nekrotikus lézió (NI)	TNV
	TMV U ₁	nekrotikus léziót (NI) okoz, de kialakulásá- nak ideje hosszabb	
	ZYMV-10	klorotikus lézió (Chl)	
	SoMV	szisztémikus klorózis, mozaik tünet (M)	
<i>Cucumis sativus</i> L. Moringa fajtajelölt	TNV	nekrotikus lézió (NI)	TNV
	ZYMV	mozaik tünet (M)	
	CMV	mozaik tünet (M) de itt nem jelenik meg (uborka rezisztens)	

A kísérleti beállításoknál a 7. ábra szemléltetett variációkat alkalmaztuk. A mintavétel a hatodik levélből történt. Méréseket végeztünk az abszolút kontroll (A), az első fertőzésen átesett (B), az SzSzR-t kifejező növénye-
ken, azok fertőzetlen (C) és fertőzött (D) levelén.

3.2.2. Szalicilsav kezelés

Szalicilsav (2-hidroxi-benzoésav) nátriumsójának 800 µM töménységű vizes oldatát fecskendővel injekcióztuk a levéllemezbe (White, 1979). Annyi oldatot juttattunk be, amennyi telítette a sejtközüti járatokat. A kontroll leveleket vízzel injektáltuk.



7. ábra A vírusokkal történő fertőzések, kihívó fertőzések és a mintavétel helye: A- abszolút kontroll, B- első fertőzés, C- a fertőzött levél feletti rezisztencia által indukált, fertőzetlen levél, D- az SzSzR-t kifejező, indukált és fertőzött levél, a mintavétel helyét a nyíl szemlélteti.

3.2.3. Mintavétel

A mintavétel során ügyeltünk, hogy a fertőzött növény folyamataira jellemző mintát vegyünk. Az egyes folyamatok erőssége levélszintenként különbözhet, mint ahogy a vírussal való fertőzhetőség is levélszintenként változó. A növények kora is hatással van a vírusfertőzésre és a biokémiai jellemzőkre egyaránt. Ezért az összehasonlíthatóság érdekében az egyidős növények közül is mindig az azonos méretűeket válogattuk ki, és azonos levélemeleteken végeztük a kezeléseket is és a méréseket is. Mivel a kezeletlen növények példányai között is lehetnek jelentős eltérések az élettani folyamatokban, nagyszámú mintavételt tartottunk szükségesnek. A mintákat mindig a levélerek közti területekről vettük. A különböző vírus - gazda kapcsolatok tüneti megnyilvánulása befolyásolja a min-

tavétel időpontját és helyét. Az enzimaktivitások a lokális nekrotikus és lokális klorotikus tünetek esetében a fertőzési helyekhez közel eső szövetrészekben változnak jelentősebben, így a foltokat közvetlenül körülvevő még zöld szövetrészekből vettük a mintát.

3.2.4. Gélelektroforézis

A szuperoxid-dizmutáz (SOD) (E. C. 1.15.1.1) aktivitását poliakrilamid gélben történt elektroforézis és szelektív festés után denzitométerrel határoztuk meg (Fodor *et al.*, 1997). A módszer lehetőséget nyújtott a különböző izoenzimek elkülönítésére.

3.2.4.1. *Nyers enzimkivonat készítése*

A sejtmentes enzimkivonatot 0 - 4 °C közötti hőmérsékleten készítettük. A kezelt és a kontroll levelekből 0,5 g mintát vettünk, amit előhűtött dörzsmozsárba helyeztünk, folyékony nitrogénnel fagyasztottunk és mozsártörővel homogenáltunk, mintánként 2 ml 4 °C-os homogenáló pufferben. A homogenálásra szolgáló 0,1 M foszfát puffer (7,8 pH) 4 vegyes % vízdéköny polivinil-pirrolidon K 25-öt és 5 mM 2-merkapto-etanolt tartalmazott. A homogenátumot centrifugáltuk (12000g, 20 perc, 4 °C), és a felülúszót vittük fel a géltre.

3.2.4.2. *Fehérjetartalom mérése*

A kivonat fehérjetartalmát Bradford (1976) módszere alapján határoztuk meg. A Bradford-reagens úgy készült, hogy 50 mg Coomassie brilliant

kéket 25 ml 95 %-os etanolban feloldottunk, majd keverés közben 50 ml 85 %-os foszforsavat adtunk hozzá, végül 500 ml-re feltöltöttük desztillált vízzel és átszűrtük 4 réteg szűrőpapíron. A küvettába 1,5 ml Bradford-reagens, 1,5 ml desztillált víz és 20 µl felülúszó került, majd 595 nm hullámhosszon mértük a színreakciót Shimadzu UV 160A (Kyoto, Japán) típusú spektrofotométerrel. Marha szérum-albumin felhasználásával állítottunk fel kalibrációs görbét.

3.2.4.3. A minták futtatása a gélben

Az elektroforézist 10 %-os, 2 mm vastagságú és 120 mm hosszúságú lapgélben, natív körülmények között, 4 °C-on végeztük, függőleges állású készülékkel. Szeparáló gélünk 6,24 ml (30 % akrilamidból és 0,8 % bisz-akrilamidból álló) akrilamid oldatot, 2,4 ml 3 M-os (8,8 pH) TRIS-HCl oldatot, 12,56 ml desztillált vizet, 96 µl 10 %-os ammónium-peroxi-diszulfátot és 11 µl tetrametil-etilén-diamint tartalmazott. A gyűjtő gél 0,5 ml akrilamid oldatból, 1 ml 0,5 M-os (6,8 pH) TRIS-HCl oldatból, 2,5 ml desztillált vízből, 20 µl 10 %-os ammónium-peroxi-diszulfátból és 4 µl tetrametil-etilén-diaminból állt.

A gélre mintánként 40 µg fehérjét tartalmazó enzimkivonatot vittünk fel. A fehérjetartalom meghatározását Bradford (1976) módszere alapján végeztük. A futtató puffer 14,4 g glicint és 3,0 g TRIS-HCl-t tartalmazott (8,3 pH) literenként. A futtatást 1 órán keresztül 20 mA, majd mintegy 3 órán át 40 mA áramerősséggel végeztük. A vizsgálat során alkalmazott puffereket Davis (1964) szerint állítottuk össze.

3.2.5. Szuperoxid-dizmutáz mérése

A futtatást követően a gélen található SOD izoenzimeket Beauchamp és Fridovich (1971) negatív festési módszerével tettük láthatóvá. 50 ml 50 μ M (7,8 pH) Na-foszfát pufferben feloldottunk 1,13 mg riboflavint és 87,6 mg EDTA- Na_2 -t. A kapott oldatot két részre osztottuk, és az egyik felében feloldottunk további 40 mg p-nitrotetrazólium-kéket, majd leszűrtük és elegyítettük az oldat másik felével. A reagensek fényérzékenyek, ezért sötétben tartottuk az oldatokat. Az így nyert elegyben 30 percig ráztunk a SOD aktivitás vizsgálatára szánt géllel. Az előhívást a gél 10 percig történő megvilágításával végeztük (200 W, 30 cm). A megvilágítás hatására az egész gél lilára színeződött, kivéve a SOD-ot tartalmazó zónákat. A kvantitatív kiértékelést Shimadzu CS-930 (Kyoto, Japán) denzitométerrel végeztük 560 nm hullámhosszon. A SOD izoenzim aktivitása a denzitogram megfelelő görbéje alatti területtel arányos.

3.2.6. Enzimaktivitások fotometriás mérése

A peroxidáz (POX) (E. C. 1.11.1.7), kataláz (KAT) (E. C. 1.11.1.6), glutation S-transzferáz (GST) (E. C. 2.5.1.18), glutation-reduktáz (GR) (E. C. 1.6.4.2), aszkorbát-peroxidáz (APX) (E. C. 1.11.1.11) és dehidroaszkorbát-reduktáz (DAR) (E. C. 1.8.5.1) aktivitását Shimadzu UV 160A spektrofotométerrel mértük. A mérést ellenőrzött hőmérsékletű (25 °C) küvettaházban végeztük.

3.2.6.1. *Nyers enzimkivonat készítése*

A sejtmentes enzimkivonatot 0 - 4 °C közötti hőmérsékleten készítettük. A kezelt és a kontroll levelekből 0,5 g mintát vettünk, amit előhűtött dörzsmozsárba helyeztünk, folyékony nitrogénnel fagyasztottunk és mozsártörővel homogenáltunk, mintánként 3 ml hideg homogenáló pufferben. A homogenáló puffer 0,05 M-os TRIS-HCl puffer (7,8 pH), amely 7,5 vegyes % vízdéköny polivinil-pirrolidon K 25-öt és 1 mM EDTA-Na₂-t tartalmazott. A homogenátumot centrifugáltuk (12000g, 20 perc, 4 °C), és a felülúszót alkalmazzuk az aktivitások méréséhez. Az enzimkivonatokat a mérés teljes időtartama alatt jégen (jeges vízfürdő) tároltuk.

3.2.6.2. *Aszkorbát-peroxidáz*

Az APX aktivitásának mérése Nakano és Asada (1981) módszere alapján történt. A reakcióelegy 2,25 ml végtérfogata 2 ml 0,2 M-os TRIS-HCl puffert (7,8 pH), 100 µl 5,625 mM-os aszkorbinsav oldatot, 50 µl nyers növényi enzimkivonatot és 100 µl 11,25 mM-os H₂O₂ oldatot tartalmazott. Az aszkorbinsav fogyásából eredő abszorpcióváltozást kvarc küvettában 290 nm-en 3 percig mértük. A kontroll meghatározására szolgáló elegy nem tartalmazott H₂O₂-ot. Az aszkorbinsav moláris extinkciós koefficiense (ε) 290 nm-en $\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2.6.3. *Dehidroaszorbát-reduktáz*

A DAR aktivitásának mérése Asada (1984) módszere alapján történt. A reakcióelegy 2,3 ml végtérfogatában 2 ml 0,1 mM EDTA- Na_2 -t tartalmazó 0,05 M-os nátrium-foszfát puffert (6,5 pH), 100 μl 0,5 mM-os dehidro-aszorbinsav oldatot, 100 μl 1 mM-os redukált glutation oldatot (a dehidro-aszorbinsavat és a glutationt ugyanebben a pufferben oldottuk) és 100 μl nyers növényi enzimkivonatot tartalmazott. Az aszorbinsav ($\epsilon_{265} = 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) felszaporodása miatt bekövetkező abszorpcióváltozást 265 nm-en kvarc küvettában 3 percig mértük. A kontroll reakcióelegyet növényi kivonat nélkül készítettük. Az aktivitás számításánál a két mérés különbségét alkalmazzuk.

3.2.6.4. *Glutation-reduktáz*

A GR aktivitásának mérését Halliwell és Foyer (1978) módszere alapján végeztük, figyelembe véve Klapheck *et al.* (1990) módosításait. A reakcióelegy 2,5 ml végtérfogata 2 ml 0,2 M-os TRIS-HCl puffert (7,8 pH), 100 μl 2,4 mM-os NADPH-t, 300 μl 5 mM-os oxidált glutation oldatot és 100 μl nyers növényi enzimkivonatot tartalmazott. Az oxidált glutation ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) fogyásából eredő abszorpcióváltozást 340 nm-en 3 percig mértük. A kontroll aktivitást glutation hozzáadása nélkül állapítottuk meg.

3.2.6.5. *Glutation S-transzferáz*

A GST aktivitását Mauch és Dudler (1993) szerint határoztuk meg. A reakcióelegy 2,75 ml végtérfogatában 2 ml 0,1 mM EDTA- Na_2 -t tartalmazó 0,1 M-os nátrium-foszfát puffert (6,5 pH), 0,5 ml 20 mM-os, a fenti pufferben oldott redukált glutationt, 150 μl 18,3 mM-os, etanolban oldott 1-klór-2,4-dinitro-benzolt és 100 μl növényi kivonatot tartalmazott. Az 1-klór-2,4-dinitro-benzolból képződött konjugátum ($\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) koncentrációjának változását 340 nm hullámhosszon 3 percig mértük. A kontroll elegy nem tartalmazott növényi kivonatot.

3.2.6.6. *Kataláz*

A KAT aktivitását Aebi (1984) szerint mértük. A reakcióelegy 2,15 ml végtérfogatban 2 ml 0,1 M-os (6,0 pH) foszfát puffert, 100 μl 270 mM-os H_2O_2 oldatot és 50 μl növényi kivonatot tartalmazott. A H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 6450 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) fogyását 240 nm hullámhosszon kvarc küvettában 3 percig követtük nyomon. A kontroll elegy növényi kivonat nélkül készült.

3.2.6.7. *Peroxidáz*

A POX aktivitását fotometriásan guajakol szubsztrátum segítségével, Rathmell és Sequeira (1974) módszere alapján határoztuk meg. A reakcióelegy 2,45 ml végtérfogata 2,2 ml 0,1 M-os (6,0 pH) foszfát puffert,

100 µl 50 mM-os guajakolt, 100 µl 32,5 mM-os H₂O₂ oldatot és 50 µl növényi kivonatot tartalmazott. A guajakolból keletkező tetrakonjugátum ($\epsilon_{436} = 106,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) képződését 436 nm hullámhosszúságon 3 percig követtük nyomon. A kontroll elegy növényi kivonatot nem tartalmazott.

3.2.6.8. Aszkorbát-tartalom mérése

Az aszkorbát koncentrációját Wise és Naylor (1987) alapján fotometriánál mértük. A levélből 0,3 g-ot homogenáltunk az enzimm kivonatok készítésénél leírt módon 3 ml 1 M-os HClO₄ oldatban, majd a szuszpenziót centrifugáltuk (12000g, 20 perc, 4 °C). A felülúszóból 100 µl-t kivettünk és 2 ml borostyánkősav pufferhez (12,7 pH) adtuk. Az így nyert oldat pH-jának 5,5-6,5 között kell lennie. Az oldat extinkcióját az elegyítés után azonnal megmértük 265 nm-en. A mérés után 5 egység aszkorbát-oxidáz enzimet adtunk az oldathoz, és az extinkció csökkenését 265 nm-en követtük, amíg a minimumot el nem érte. A két mérés különbsége arányos az oldat aszkorbát tartalmával. Az aszkorbát ismert koncentrációjú oldatainak felhasználásával kalibrációs görbét készítettünk.

3.2.7. A sejthalál kimutatása

A fertőzött növény leveleiből levélkorongokat vágunk, amelyeket Evans-kék biológiai indikátor 0,5 %-os vizes oldatával infiltráltunk és 15 percig inkubáltunk. A főlegben lévő, meg nem kötött festéket csapvízzel mostuk ki a sejtközi járatokból fecskendő segítségével. Az Evans-

kék azokat a sejteket festi meg, amelyek membránjai olyan mértékben károsodtak, hogy nem képesek megakadályozni a festék behatolását a citoplazmába (Baker és Mock, 1994). Az eredményeket sztereomikroszkóppal vizsgáltuk, fényképezőgéppel rögzítettük.

3.2.8. A hidrogén-peroxid kimutatása és koncentrációjának meghatározása

A H_2O_2 jelenlétét a TMV-fertőzött dohánylevelekben szövettani festéssel is kimutattuk 0,1 %-os 3,3'-diaminobenzidin (3,8 pH) vákuuminfiltrálása révén (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). A leveleket 2 óra inkubáció után 0,15 % triklór-ecetsavat tartalmazó kloroform:etanol 1:5 arányú elegyében színtelenítettük el 24 óra alatt, majd 50%-os glicerinben tároltuk.

A hidrogén-peroxid mérésére használt módszer a xilenol narancs festék reakcióját használja fel, mely spektrofotométerrel detektálható (Marre *et al.*, 1998). Ezt az eljárást elsősorban az ún. sejtközi mosó folyadékban (IWF-ben) lévő H_2O_2 meghatározására használtuk. A desztillált víz segítségével nyert IWF-hez 1:1 arányban festéket tartalmazó elegyet adtunk (50mM H_2SO_4 , 500 μM FeSO_4 , 500 μM $(\text{NH})_2\text{SO}_4$, 200 mM szorbit, 200 μM xilenol narancs). A reakcióelegyet 25 °C-on 45 percig inkubáltuk. Az extinkciót 560 nm-en mértük, ismert H_2O_2 mennyiségekkel kalibrációs görbét készítettünk.

3.2.9. A szuperoxid gyök kimutatása

A TMV-vel fertőzött dohánylevelekben végbement sejthalál során termelődött szuperoxid kimutatására nitrotetrazóliumkék (2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-[3,3'-dimetoxi-4,4'-difenilén]-ditetrazóliumklorid) indikátort (NBT) használtunk Doke (1983) szerint. A 10 mM NaN_3 -ot tartalmazó 10 mM-os Na-foszfát pufferben 0,1 vegyes % NBT-t oldottunk fel sötétben (a festék fényérzékeny). Az NBT-ből a szuperoxiddal való reakciója után kékes színű vízzoldhatatlan formazán csapadék rakódik le. A színreakció azokat a helyeket jelzi, ahol a szuperoxid jelen volt. A fertőzött levelekből 2 cm átmérőjű korongokat vágunk ki és vákuum alatt infiltráltuk az NBT oldattal. A mintákat 15 percig szobahőmérsékleten fényben inkubáltuk, majd sztereomikroszkóp alatt lefényképeztük. A minták elszíntelenítését és tárolását a 3,3'-diaminobenzidines festésnél leírt módszert követve végeztük. Az NBT-festés szuperoxidra való szelektivitását úgy ellenőriztük, hogy szuperoxid-dizmutázt (1600 U ml^{-1}) vagy katalázt (2000 U ml^{-1}) kevertünk a festőelegybe.

3.2.10. Mono-dehidroaszkorbát gyök meghatározása elektronspin rezonancia spektroszkópiával

Az $\text{MDA}^\bullet$ ESR spektroszkópiás meghatározását Hideg *et al.* (1997) módszere alapján végeztük. A $4 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$ -es levéldarabokat a levelek közepéből vágtuk ki, megkerülve a fő levéleret, majd a levélszegmenseket fonákjukkal felfelé a mintatartóba helyeztük, amelyet végül az ESR ké-

szülékbe helyeztünk. Az MDA[•] szinteket X-sávú (kb. 9,2-9,6 GHz) ESR abszorpcióként Bruker EC-106 spektrométerrel detektáltuk az MDA[•]-ből képződő duplett jel alacsony térerősséghez tartozó csúcsánál. A kísérleti feltételek a következők voltak: 9,35 GHz mikrohullámú frekvencia, 2mW teljesítmény valamint 100 kHz-es modulációs frekvencia, 0,1 mT modulációs amplitúdó, 1 másodperces integrálási idő mellett. A sötétben mért MDA gyök alapszintjeinek meghatározásánál a mintákat 30 másodpercre a készülékbe helyeztük. A fény által kiváltott MDA gyök jelet optikai szálon át, KL-1500-as lámpával $220 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR fényerősséggel történt megvilágítás után mértük. A méréseket a levélszegmensek levágását követő 2 percen belül végeztük. Az MDA gyök relatív koncentrációit az alacsony térerősséghez tartozó derivált jel magasságából kaptuk meg.

3.2.11. Flavonoidok vizsgálata vékonyréteg-kromatográfiával

Isaken (1991) alapján történt a flavonoidok vizsgálata. A növénylevelek lg-ját 2 napon át, rázógépen (200 rpm), 25 °C-on 3 ml metanolban inkubáltuk, majd az így nyert növényi kivonatokat szilikagélén (Kieselgel 60, Merck, Németország) elválasztottuk. A kromatogramok kifejlesztéséhez a réteggel befedett lemez oldószert tartalmazó kádba helyeztük, melyet lefedtünk, valamint az edény oldalainak felületét az oldószerral átitatott szűrőpapírral befedtük. Az oldószer a kapilláris erők hatására a rétegben egyenletesen emelkedett, közben az alkotórészek a megoszlástól függő mértékben elmozdultak. A kifejlesztett kromatogramot megszáritottuk, majd az elválasztott anyagokat színreagenssel, láthatóvá tettük. A futatóelegy etilacetát : ecetsav : hangyasav : víz - 100 : 11 : 11 : 27 (v/v)

arányú elegye. A futtatást 40 °C-on történő szárítás követte, majd a reagens felvitele a vékonyréteg-lapra. A reagens minden esetben az 1%-os metanolban oldott 2-aminoetil-difenil-bórsav (w/v) volt. A szobahőmérsékleten történő szárítás után a lemezek tartósítása következett 5%-os PEG 400 etanolos oldatával. A polifenolokat UV-fényben detektáltuk, minőségi meghatározásuk R_f értékeik alapján történt. Az illető minta retenciós faktora (R_f) értéke nem más mint az anyag és az oldószerfront indulásponttól mért elmozdulásának a hányadosa. Az egyes mennyiségi meghatározásokat Shimadzu CS-930 denzitométeren ismert koncentrációjú standard flavonoid oldatok R_f értékeinek segítségével végeztük el. A standardokat a mintákkal együtt futtattuk.

3.2.12. A TMV koncentrációjának meghatározása

A dohánylevelekben a TMV koncentrációját ELISA szerológiai módszerrel mértük, Clark és Adams (1977) alapján.

Az ELISA szerológiai vizsgálat leírása:

1. lépés: 200 μ l 1 mg/l „coating-pufferben oldott protein-A (*Staphylococcus aureus*ból) felvitele az ELISA lemez üregeinek felületére, 4 órás inkubálás kb. 35 °C-on és végül mosás.
2. lépés: a TMV U₁ törzsére specifikus IgG antiszérum felvitele 500-1000 x-es hígításban (200-200 μ l /üreg), 4 órás inkubálás 35 °C-on, mosás.
3. lépés: minták felvitele
 - 0,4 g növényi mintát 2 ml kivonó pufferben homogenáltunk, majd centrifugáltunk (12000 g, 4°C, 6 perc)

- a mintákat az üregekbe mértük (200-200 µl)
 - inkubáció egy éjszakán át hűtőben 4 °C-on
 - mosás: 3-szor desztillált vagy csapvízzel, majd 2-szer PBS-Tween mosópufferrel.
4. lépés: második IgG réteg felvitele a 2. lépéssel egyező módon.
 5. lépés: 200 µl 4000 x hígítású protein-A-jelzőenzim konjugátum felvitele, 4 óra inkubálás 35 °C-on, mosás.
 6. lépés: az enzim szubsztrátjának felvitele
- Orto-fenilén-diamin szubsztrát elkészítése:
50 ml citromsav-foszfát pufferben sötétben, kevertetés mellett feloldunk 1 kapszula OPD-t
 - 50 ml bidesztillált vízben feloldunk 1 tableta Hyperolt (H_2O_2 oldatot kapunk)
 - a H_2O_2 oldatból 500 µl-t az OPD-oldathoz mérünk
 - az így nyert elegyből 150 µl-t bemérünk az ELISA lemez üregeibe
 - inkubálás 35 °C-on, a pozitív minták esetében rövid időn belül kifejlődik a színreakció
 - a szín kialakulása után üregenként 50 µl 4N H_2SO_4 oldattal leállítjuk a folyamatot
 - a lemezt ELISA-leolvasóval 492 nm-en értékeljük
 - a minták vírustartalmát ismert víruskoncentrációjú standardokhoz viszonyítjuk

A felhasznált oldatok elkészítése

A „coating”puffer 1,59 g Na_2CO_3 -ot, 2,93 g NaHCO_3 -ot és 0,2 g NaN_3 -ot tartalmazott 1 liter oldatban (pH = 9,6). A PBS oldat 7,2 g NaCl -ot, 0,3g KH_2PO_4 -ot, 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ -ot és 0,1g Merthiolátot (Na -2-[etil-

merkuri-merkaptó]-szalicilát) tartalmazott 1 liter oldatban (pH = 7,4). A PBS-Tween mosó puffer 0,5 ml Tween-20-at tartalmazott 1 liter hígított PBS oldatban. Az IgG puffer 1% marha szérum-albumint vagy közönséges tejport tartalmazó PBS-Tween oldat volt, melyet a tejpör szuszpendálása után több réteg szűrőpapíron átszűrtünk. A kivonó puffer 2 v% polivinil-pirrolidon tartalmú IgG puffer volt, a konjugátum puffer pedig azonos volt az IgG pufferrel. A citromsav-foszfát puffer 5,6 g citromsavat és 11,2 g Na_2HPO_4 -ot tartalmazott 1 literben (5,0 pH). Az alkali-foszfátáz szubsztrát puffer 97 ml dietanolamint, 0,2 g $\text{MgCl}_2(6\text{H}_2\text{O})$ -ot és 0,2 g NaN_3 -ot tartalmazott literenként (9,8 pH).

3.2.13. Az alkalmazott statisztikai eljárások

Legkevesebb három független kísérletet végeztünk minden esetben, és egy kísérlet során legalább 3 párhuzamos mérésre került sor. Az adatokat Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze. Az eltérést $P = 0,05$ szinten minősítettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. Mono-dehidroaszkorbát gyök vizsgálata dohány mozaik vírus által fertőzött dohánynövényekben

Az aszkorbát fontos, a szövetekben nagy mennyiségben megtalálható antioxidáns, direkt gyökfogó képessége folytán mono-dehidroaszkorbát gyök ($\text{MDA}^\bullet$) képződik. Az egészséges növényben az aszkorbát regenerálódása gyors, így e gyök enzimatikusan vagy diszproporcionálódás során visszaalakul aszkorbáttá. Az $\text{MDA}^\bullet$ nagymennyiségű és tartós felhalmozódása azonban az antioxidáns és prooxidáns egyensúly eltolódására utal. A kutatóknak megnövekedett $\text{MDA}^\bullet$ mennyiséget számos abiotikus stressz esetében sikerült kimutatni. Munkánk során a kórokozó okozta stressz következtében keletkező $\text{MDA}^\bullet$ mennyiségét vizsgáltuk.

4.1.1. A dohány mozaik vírus okozta szöveti nekrotizáció

A Xanthi-nc és a NahG dohányokat a TMV U1-es törzsével fertőztük. Két nappal a fertőzést követően az inokulált leveleken nekrotikus léziók alakultak ki. A léziók számát és méretét vizuálisan vizsgáltuk. A tünetek megjelenésének időpontjában nincs különbség a két dohánytípus között, a nekrozisok átmérője azonban a NahG esetében nagyobb, mint a Xanthi-nc-ben (4. táblázat), amit irodalmi adatok is igazolnak (Gaffney *et al.*, 1993).

4. táblázat A TMV-fertőzött Xanthi-nc és NahG dohányok nekrotikus lézióinak átmérője és cm²-kénti száma a fertőzést követő második napon

Az alsó levelek kezelése	TMV lézióátmérők a felső leveleken ± SD (mm)		Léziók száma cm ² -ként a felső leveleken ± SD	
	Xanthi-nc	NahG	Xanthi-nc	NahG
Puffer	1,26 ± 0,31	2,04 ± 0,39	6,89 ± 2,1	7,53 ± 2,44
TMV	0,56 ± 0,24	1,97 ± 0,40	3,76 ± 1,14	7,76 ± 2,05
TMV ismétlő inokuláció.	0,35 ± 0,11	nem mért adat	2,35 ± 0,65	nem mért adat

A mindkét dohánytípusban bekövetkező lokális hiperszenzitív nekrozis ellenére a víruslokalizáció a NahG-ben nem teljesen sikeres (Delaney *et al.*, 1994). A fertőzött levél körül elhelyezkedő szárrész is nekrotizálódhat, és a sejthalál áttérjedhet a szomszédos levelekre is. A Xanthi-nc esetében a nekrotizáció korlát nélküli terjedése nem tapasztalható. Irodalmi források szerint a sejthalál kiterjedése a vírus jelenlétével korrelációban van (Mur *et al.*, 1997). Fodor *et al.* (1997) mérései szerint a NahG dohányban 3 nappal a fertőzés után a TMV mennyisége 27-34 %-kal nagyobb, mint a Xanthi-nc-ben. Mur *et al.* (1997) szerint a nekrozisok körüli egy centiméteres gyűrűben, a szalicilsav-hidroxilázt tartalmazó transzgenikus dohányok esetében, nagyobb volt a TMV-koncentráció. A vírusreplikáció mértékét 22 és 32 °C-on ELISA segítségével vizsgáltuk (5. táblázat). A 22 °C-on tartott fertőzött növényeken nekrotikus léziók fejlődtek, míg magasabb hőmérsékleten a növények tünetmentesek maradtak. Ha azonban a hőmérsékletet 32 °C-ról 22 °C-ra csökkentettük, a növényeken nagy kiterjedésű, sokszor össze-

függő nekrozisok alakultak ki. A víruskoncentrációval egyenesen arányos extinkciókat az 5. táblázat szemlélteti. A magasabb hőmérsékleten tartott növényekben nagyobb a vírusszám, a köpenyfehérjét képzett vírusok száma; valószínűleg a vírus RNS mennyiségében nagyobb eltéréseket lehet kimutatni (Szécsi *et al.*, 1999), a nekrozis kialakulása mindkét növényben egyaránt gyorsabb. A 22 °C-on kezelt Xanthi-nc és NahG dohányok közötti különbségek jelentősebbek, mind a második, mind a negyedik napon. A Xanthi-nc növényekben a nekrozisok megjelenését (kb 36-39 óra) 3-5 órával megelőzően jelentős mennyiségű szalicilsav halmozódik fel, míg a NahG növényekben ez az emelkedés 1-2 órával a sejthalál előtt következik be és ötször kevesebb a megemelkedett szalicilsav mennyisége, mint a Xanthi-nc-ben.

5. táblázat A vírusköpenyfehérje felhalmozódás mértéke a 22 és 32 °C –on tartott Xanthi-nc és NahG növényekben, a vírusköpenyfehérje mennyisége egyenesen arányos az extinkcióval.

ELISA 492 nm-en mért extinkciós értékek				
Hőmérséklet	Napok száma	2	4	6
22°C	Xanthi-nc	0,045 ± 0,002	0,128 ± 0,011	0,132 ± 0,017
	NahG	0,048 ± 0,004	0,182 ± 0,012	0,147 ± 0,018
32°C	Xanthi-nc	0,078 ± 0,006	0,220 ± 0,016	0,198 ± 0,013
	NahG	0,099 ± 0,005	0,252 ± 0,011	0,225 ± 0,021

Ezek az eredmények részben alátámasztják a szalicilsav fontos szerepét a vírusok elleni rezisztenciában (Malamy *et al.*, 1992; Chaerle *et al.*, 1999).

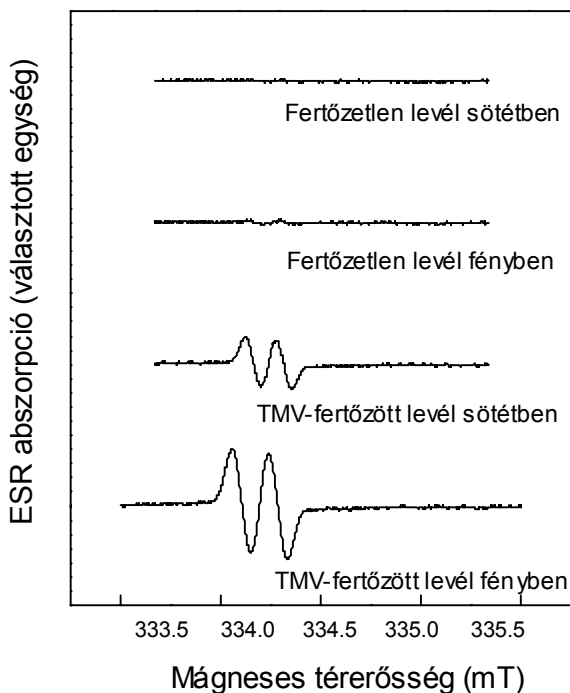
4.1.2. A mono-dehidroaszkorbát gyök felhalmozódása dohány mozaik vírusfertőzött dohánynövényekben

Az egészséges dohánynövények levelei kismennyiségű $\text{MDA}^\bullet$ -öt tartalmaznak (7. ábra/A, 8. ábra és 10. ábra/A). E gyök az élettani folyamatok során aszkorbátból keletkezik és azzá is alakul vissza, MDA -reduktáz és ferredoxin segítségével. A Xanthi-nc és NahG dohányok kontroll növényei között nem találtunk valódi eltéréseket az $\text{MDA}^\bullet$ képződését illetően (nem szemléltetett adatok). A TMV fertőzést, a látható tünetek megjelenésével párhuzamosan, az $\text{MDA}^\bullet$ nagymennyiségű felszaporodása követi, (7. ábra/B, 8. ábra és 10. ábra). Ez az emelkedés a Xanthi-nc-ben több százszoros, a NahG-ben, ahol a nekrotikus léziók kiterjedése is nagyobb, az $\text{MDA}^\bullet$ mennyisége is jelentősebben nő a Xanthi-nc-hez hasonlítva (9. ábra/ C és B). Ezek az eredmények az $\text{MDA}^\bullet$ és a szövetnekrozis közötti korrelációra utalnak, ami további bizonyítéka a TMV indukálta sejthalál és az oxidatív stressz közötti összefüggésnek (Doke és Ohashi, 1988). Az $\text{MDA}^\bullet$ állandósult megnövekedése utal az $\text{MDA}^\bullet$ és az aszkorbáttá történő redukció közötti egyensúlyvesztésre is (Heber *et al.*, 1996).

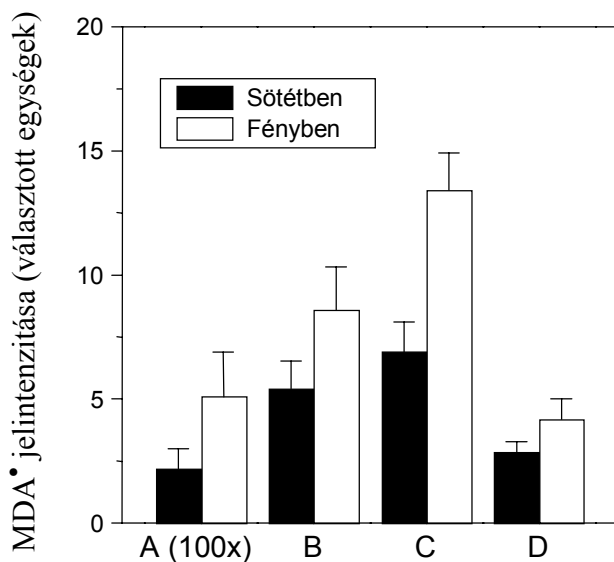
A megvilágítás során mért ESR jelek nagyobbak, mint a sötétben észleltek (8. ábra, 9. ábra és 10. ábra). Az $\text{MDA}^\bullet$ fény hatására bekövetkező növekedését az irodalomban is megtaláljuk (Heber *et al.*, 1996; Hideg *et al.*, 1997). A fertőzött levelek sötétben és fényben mért ESR jeleinek különbsége, meglepő módon, a kontrollhoz képest nem változott szignifikánsan. A mért MDA gyök jelek többségükben (60-70%) függetlenek a fénytől. Vonatkozik ez mind a kontroll, mind a fertőzött levelekre

(8. ábra, 9. ábra és 10. ábra), és arra utal, hogy a fotoszintetikus apparátus károsodása arányos a sejt többi részeinek károsodásával.

A fény által kiváltott $\text{MDA}^\bullet$ -képződés visszavezethető az elektronoknak az oxigénre majd az aszkorbinsavra kerülésével. A TMV fertőzés elsődlegesen a PS II-t károsítja (Hodgson *et al.*, 1989), valamint gátolja az elektronáramlást a kloroplasztiszban (Seo *et al.*, 2000).



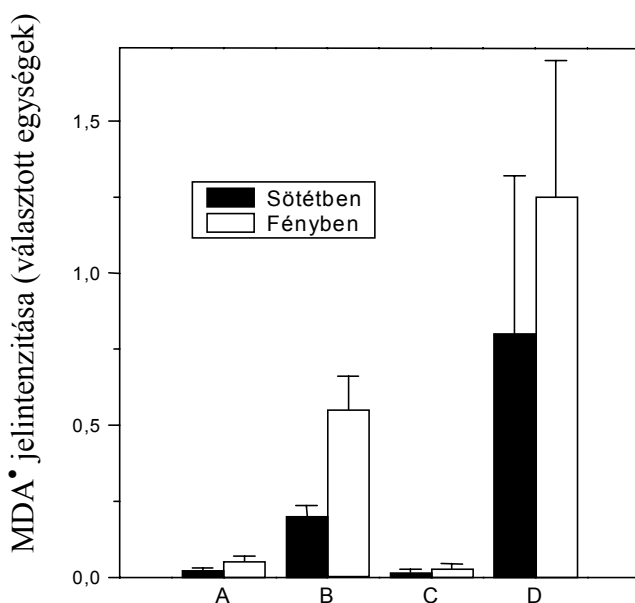
8. ábra A Xanthi-nc kontroll és fertőzött növényekben fényben és sötétben mért $\text{MDA}^\bullet$ ESR spektrumai 2 nappal a fertőzést követően



9. ábra Az MDA[•] szintje a TMV-fertőzött dohánylevelekben a fertőzést követő második napon. A mintavétel helye az alulról számított hatodik valódi levél. A- kontroll Xanthi-nc, B- fertőzött Xanthi-nc, C- fertőzött NahG, D- rezisztenciával (SzSzR) rendelkező fertőzött Xanthi-nc

Az elektrontranszport gátlása következtében csökken a redukált ferredoxin és NADPH mennyisége, amelyek felelősek az aszkorbátnak MDA[•] redukcióján keresztüli regenerálásáért. Ugyanakkor a PS II gátlása nem szükségszerűen felelős az MDA[•] mennyiségének növekedéséért, mivel az alacsonyabb sebességű elektrontranszport visszafogottabb szuperoxid termeléshez és APX-okozta MDA[•] képződéshez is vezet. Bár az APX nemcsak a kloroplasztiszokban, hanem más sejtorganellumokban is jelen van, az MDA[•] akkumulációjának mértéke arra utal, hogy képződésért inkább az OAF aszkorbáton keresztüli direkt átalakítása, nem pedig a

megnövekedett APX aktivitás a felelős. Eltekintve az előbb említett lehetőségektől, a TMV által károsított sejtek kloroplasztiszai is hozzájárulhatnak a fényfüggő, megnövekedett MDA[•] jel kialakulásához, a bennük képződő OAF és az aszkorbát kölcsönhatásával (Foyer *et al.*, 1994).



10. ábra Az MDA[•] gyök szintje a fertőzetlen felső levelekben. A mintavétel helye a hatodik valódi levél. A- kontroll Xanthi-nc, B- SzSzR indukciót követő 2. napon, C- az SzSzR indukciót követő 12. napon, D- a kétszeresen indukált (indukciót követő másodszori ún. erősítő-fokozó fertőzés-a 9. napon) Xanthi-nc fertőzetlen hatodik levele

Az MDA^{*} gyök által kiváltott ESR jel nagyobb része független a fénytől, ami arra utal, hogy az OAF képződése nem csak a kloroplasztiszban történik. Az OAF keletkezésének helyei ugyanúgy lehetnek a mitokondriumok, a citoplazma, vagy az apoplaszt illetve a vakuolum (Elstner és Osswald, 1994, Lamb és Dixon, 1997, Takahama *et al.*, 1999) is.

4.1.3. A szisztemikus szerzett rezisztenciával rendelkező, dohány mozaik vírussal fertőzött dohánylevelek mono-dehidroaszkorbát gyök akkumulációja

A Xanthi-nc dohány TMV-vel megfertőzött levelei fokozott ellenállóságot mutatnak, ha ismételt fertőzés éri őket. Ez a Ross (1961a) által leírt lokális szerzett rezisztencia jelensége. A Xanthi-nc-vel ellentétben a lokális szerzett rezisztencia nem alakul ki a NahG növényekben. A második TMV-fertőzés hatására a NahG növények ugyanolyan nagy nekrotikus foltokat képeznek, mint az első fertőzés során (Delaney *et al.*, 1994). Egy héttel a TMV-fertőzés után a Xanthi-nc növény nem fertőzött leveleiben, tehát szisztemikusan is kialakul a szerzett rezisztencia (Ross, 1961b).

Az SzSzR-rel rendelkező növények másodszeri, ún. kihívó fertőzése után a léziószám csökkenése általában csak akkor figyelhető meg, ha a rezisztenciának a tünetekre gyakorolt hatása nagyfokú. Evans-kék festéssel azonban a szabad szemmel nem látható mikroléziók is kimutathatók (Balázs *et al.*, 1976), melyeket ha szintén figyelembe veszünk, már nincs

csökkenés a léziók számában. Az SzSzR-t elsősorban a nekrotizisok átmé-
rőjének csökkenése jellemzi.

Két héttel az első fertőzést után a Xanthi-nc dohányokban észlelhető az SzSzR jelensége. A felülfertőzést követően vizsgáltuk a nekrotikus tüne-
teket (7. ábra/D és B). Az MDA[•] ESR jele ezekben a felülfertőzött leve-
lekben kisebb, mint a rezisztenciával nem rendelkező, fertőzött levelek-
ben (9. ábra/ D és B). Arra a következtetésre jutottunk, miszerint az MDA[•] alacsonyabb jele összefüggésben van a kisebb szövetnekrotizissal. Fodor *et al.*, (1997) előzetes eredményei alapján megnövekszik az antioxidáns kapacitás az SzSzR-rel rendelkező levelekben. Megnőtt a szuperoxid-dizmutáz, glutation S-transzferáz és a glutation-reduktáz en-
zimek aktivitása, valamint megemelkedett a redukált glutation mennyisé-
ge is az SzSzR-el rendelkező Xanthi-nc levelekben. Arra azonban nincs bizonyíték, hogy az ESR jel csökkenéséért a megemelkedett antioxidáns kapacitás, vagy a kisebb szövetnekrotizis a felelős.

4.1.4. A szisztémikus szerzett rezisztenciával rendelkező, fertőzetlen dohánylevelek mono-dehidroaszkorbát gyök akkumulációja

Bár az SzSzR mechanizmusa a mai napig nem tisztázott, többek közt az sem, hogy pontosan mi minden szükséges a kialakulásához, de az tény, hogy szalicilsavra szükség van (Durner és Klessig, 1995). A szalicilsav akkumulációját TMV-vel történő fertőzést követően mind lokálisan, mind szisztémikusan megfigyelték (Malamy *et al.*, 1990). Továbbá a szalicilsav az extracelluláris szuperoxid termelődését is stimulálja (Kawano *et al.*, 1998).

Ezen megfigyelésekkel kapcsolatosan ugyan kicsi, de szignifikáns különbségű MDA[•] ESR jelet mértünk (7. ábra/C, 10. ábra/B és A) a TMV indukálta SzSzR-t kifejező, de fertőzetlen Xanthi-nc levelekben. A jel intenzitása alacsony, de a kontrollhoz képest az eltérés még így is valódi a fent említett levelekben, mint ahogyan a TMV-fertőzött levelekben is (9. ábra/B és 10. ábra/B). Ez a megfigyelés alátámasztja Alvarez *et al.* (1998) vizsgálatait, miszerint a lokális fertőzés szisztémikus mikrooxidatív robbanást (burst) indukál a növény távolabbi fertőzetlen részeiben. Az MDA[•] szisztémikus felszaporodása a fertőzetlen levelekben az alsó leveleken kifejlődő nekrotikus tünetek megjelenésével egyidőben történik. 12 nappal a vírusfertőzést követően, amikor az SzSzR már megjelent a felső levelekben, azonban nem találtunk valódi különbséget az MDA gyök szintjében a felső fertőzetlen levelekben, a kontrollhoz viszonyítva (10. ábra/C és A). Úgy tűnik, hogy a szisztémikus mikrooxidatív robbanás (burst) átmeneti jelenség, amely megelőzi az SzSzR kifejlődését, amely általában 10 nappal az alsó levelek fertőzése után fejlődik ki. Ha a Xanthi-nc dohány alsóbb levelét 7 nappal az első fertőzés után újr fertőzzük erősebb rezisztencia jelenik meg. A fertőzetlen levelekben mért MDA[•] jel is nagyobb, ez az ún. fokozó fertőzés (az indukciót megismételjük - booster inoculation) eredményének tekinthető (10. ábra/D). Az MDA[•] szisztémikus akkumulációjával kapcsolatos eredményeink alátámasztják Alvarez *et al.* (1998) -nak az SzSzR mechanizmusáról alkotott elképzeléseit, bizonyították, hogy az *Arabidopsis* leveleinek avirulens baktériummal történő fertőzése másodlagos mikrooxidatív robbanást (burst) okoz a fertőzetlen levelekben, amit kevés mikrolézió (egysejt lézió) kialakulása is követ. Ez a modell felté-

telezi, hogy az elsődleges oxidatív robbanás (burst), amelyet a nekrotizáló kórokozó vált ki indukálja a szisztemikus választ, míg a távolabbi szövetekben fellépő másodlagos mikrooxidatív robbanás (burst) az SzSzR kialakulásáért felelős.

Ez a másodlagos mikrooxidatív robbanás (burst) a TMV-vel fertőzött Xanthi-nc távolabbi fertőzetlen, ám SzSzR-t kifejező leveleiben oka lehet az MDA[•] akkumulációjának. Az oxidatív stressz következményeként az antioxidáns védekező rendszer is aktiválódik. Halliwell és Gutteridge (1999) szerint az oxidatív stressz egyetlen bizonyítéka *in vivo* az antioxidánsok aktiválódása. Ezt Fodor *et al.* (1997) korábbi eredményeivel is igazolta, TMV-fertőzött Xanthi-nc-ben bizonyították, hogy az SzSzR indukciójának következményeként az antioxidáns rendszer jelentős mértékben aktiválódik.

Összefoglalva ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az antioxidáns kapacitás megnövekedése az MDA[•] által jelzett mikrooxidatív robbanás (stressz) következménye, valamint a távolabbi fertőzetlen levelekben megnövekedett MDA[•] szintje az SzSzR kialakulását jelzi.

4.2. Szuperoxid gyök és hidrogén-peroxid vizsgálata inkompatibilis és kompatibilis gazda-parazita kapcsolatokban

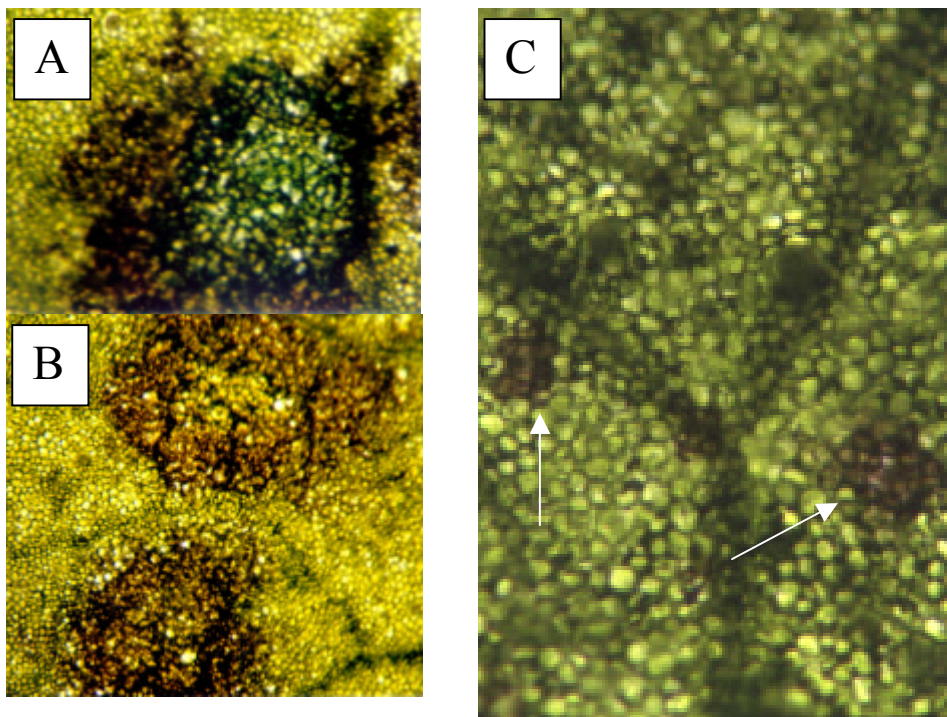
Chenopodium quinoa és uborkanövényeket különböző vírusokkal fertőztünk. Az egyes gazda-parazita kapcsolatok tüneti megnyilvánulásukban, illetve kompatibilitásukban különböztek részben. A kísérletekben alkalmazott kapcsolatokat a 3. táblázat szemlélteti. Vizsgáltuk a szuperoxid gyök és a hidrogén-peroxid képződését egyrészt az első alka-

lommal fertőzött levelekben, másrészt a már szisztemikus szerzett rezisztenciával rendelkező ismételt fertőzött levelekben.

4.2.1. A szuperoxid gyök felhalmozódása

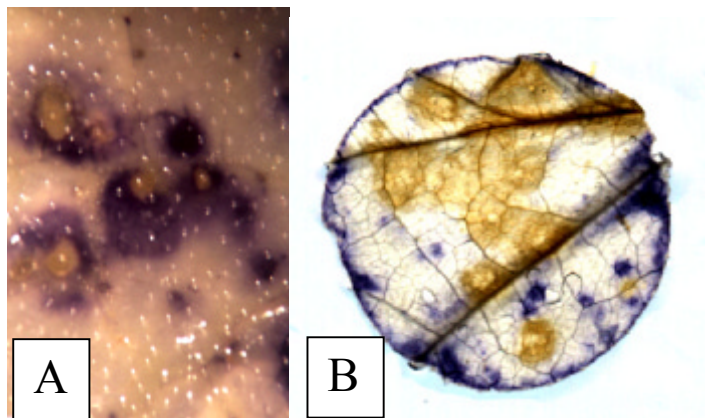
A szuperoxid gyök csak az elhaló sejtekben mutatható ki, és csak a nekrozissal járó gazda – parazita kapcsolatokat jellemzi. A lokális klorózis és a mozaik tünetek esetén nem mutatható ki szuperoxid felhalmozódás. Evans-kék festődés is csak a nekrozissal járó tünetekre jellemző. Az Evans-kékkel festődő egysejt-léziók megjelentekor, a TMV/TNV fertőzött növényekben (a fertőzést követően kb. 38-40 óra elteltével) a szuperoxid gyök felhalmozódása is megkezdődött. Először a gyök mennyisége nőtt meg, ezt követte a membránok áteresztővé válása (Evans-kék festődés), végül bekövetkezett a sejthalál. A fertőzött sejtől kiindulva a nekrosis kifejlődése során a szuperoxid gyök először csak néhány, a fertőzött sejt szomszédos sejtben mutatható ki (11. ábra/C), majd a fokozatosan térben táguló nekrosis körüli gyűrűben (11. ábra/A).

A nekrotikus folt növekedésének ideje alatt az elhalt középső rész körül gyűrű alakban elhelyezkedő sejtek sok szuperoxidot termeltek (12. ábra). A fertőzés későbbi szakaszában (4. nap után) a léziók növekedése lelassult, a körülöttük felszaporodott szuperoxid mennyisége csökkent, majd a teljesen kifejlett (előregedett) nekrosisok körül leállt.

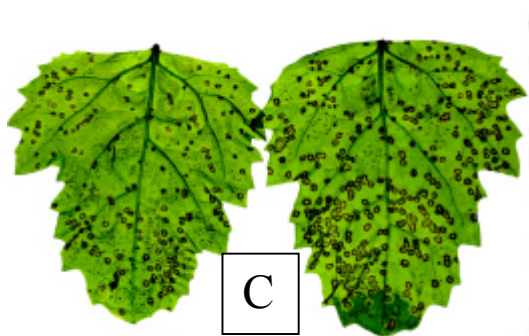
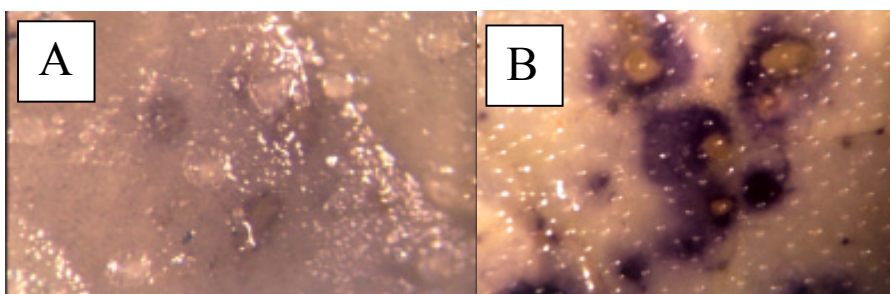


11. ábra A TMV-fertőzött és specifikusan festett *Chenopodium* levelek. Az A) képen Evans-kék és NBT kettős festés látható. A sötétkék színű Evans-kék a károsodott membránú sejteket festi, körülötte barna színű gyűrűt képez a szuperoxidra specifikus NBT. A nagyítás 40-szeres. NBT-festés látható a B) és C) képeken. Az A) és B) kép 3 nappal, a C) kép 40 órával a fertőzés után készült.

Az uborka esetében az SzSzR csak a TNV-vel fertőzött növényekben fejlődött ki. A CMV nem indukálta a rezisztenciát, míg a ZYMV-vel fertőzött növényekben a második fertőzéskor mérséklődött ugyan a TNV nekrotikus lézióinak nagysága, de ennek nem tulajdonítottunk jelentőséget, mivel az indukáló vírus is jelen volt a növényekben, illetve inkább lokális rezisztenciáról volt szó. Az SzSzR hatására a második fertőzés nekrotikus léziói kisebbek, és kevesebb szuperoxidot termeltek (13. ábra).



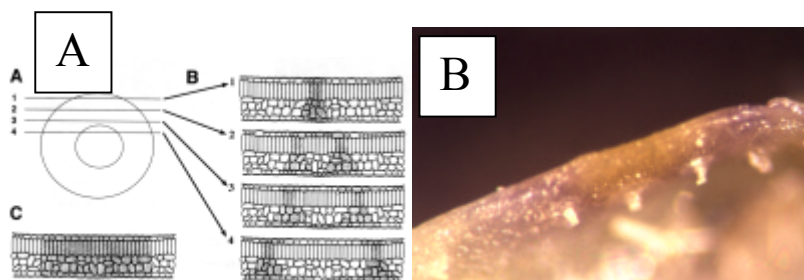
12. ábra A TNV-fertőzött uborkanövényekben az NBT festést követően a növényekből kivontuk a színanyagokat, így jól látszik a formazán lilás elszíneződése, A) fiatal, B) előregedett nekروزisok



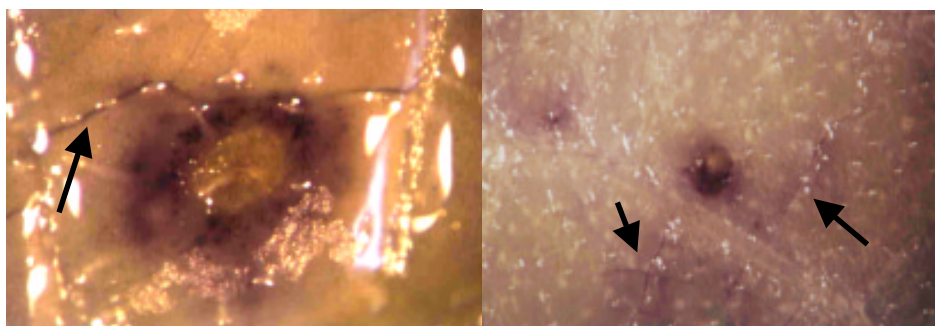
13. ábra NBT festés uborkán, A) rezisztenciával rendelkező növények felülfertőzése TNV-vel, B) kontroll növények vírusfertőzése, C) a *Chenopodium quinoa* TNV fertőzése SzSzR-el rendelkező (bal) és kontroll (jobb) leveleken

Szécsi *et al.* (1999) az *Aquorea victoria* medúzából származó zöld fluoreszcens fehérjének (green fluorescent protein, GFP) fúziós fehérjeként történő alkalmazásával, több idegen gént tartalmazó GFP-vel jelölt fertőző transzkriptumot készítettek. Fluoreszcens mikroszkóppal és immunocitokémiai módszerekkel vizsgálták a TMV *Nicotiana benthamiana*-n kialakult tüneteit, ezek segítségével sikerült képet alkotni a TMV nekrotikus léziójának sejt és szöveti szintű kialakulásáról. A GFP-vel jelölt TMV-MP:GFP (MP-movement protein, a vírus sejtben történő mozgásáért felelős fehérje) replikátumok nagy mennyiségben az erősen fluoreszkáló gyűrű szélén, míg a TMV- Δ C-GFP replikátumok (a köpenyfehérje helyére kerül a GFP) a gyengén fluoreszkáló gyűrű belsejében (felülnézetben korongot formázva) halmozódnak fel nagy mennyiségben. A gyűrű illetve korong ugyan fedi egymást, de a gyűrű sokkal nagyobb. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a TMV replikációjának a növényi szövetben térben és időben meghatározott formája illetve sorrendisége van. A vírus RNS akkumulációjának formája párhuzamba állítható a szuperoxidot termelő sejtek festődésével (lásd 14. ábra).

Továbbá érdekes az a megfigyelés, miszerint az uborkanövényeken a TNV okozta léziók közvetlen közelében gyakran a hajsztálerek is festődtek NBT-vel (15. ábra), ez magyarázható azzal, hogy az „A” szerotípusba tartozó TNV képes belépni a hajsztálerekbe, és ezáltal a babon okozott tipikus tünete a nekrotikus léziók mellett a hajsztálerek mentén kialakított érnekroízis, ami nagyban megkülönbözteti a „D” szerotípusba tartozó törzsektől. Az ereknek ez a típusú festődése az előregedő lézióknál már nem figyelhető meg.



14. ábra A) A vírus RNS akkumulációjának specifikus mintázata Szécsi *et al.*, (1999) nyomán, B) valamint a nekrotikus gyűrű NBT-vel történő festődése



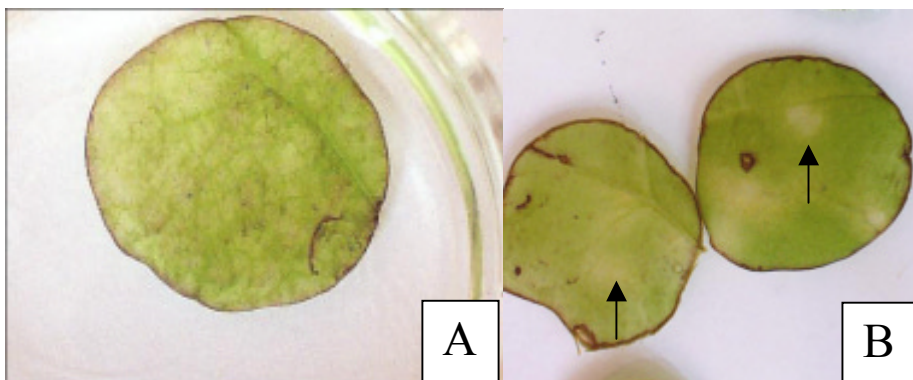
15. ábra A nekrozisok körüli hajsálerek festődése

Az alsó levelek TMV-fertőzése rezisztenciát indukált a felső levelekben, ami kisebb méretű léziókat eredményezett. Fontos elméleti összefüggésre mutat rá Chivasa *et al.*, 1997-es közleménye, amely a szalicilsav TMV akkumulációjára gyakorolt hatásáról szól, miszerint valószínű, hogy a szalicilsav gátolja a vírus RNS-függő RNS polimerázát. Az SzSzR során szisztémikusan korábban indukálódó és felhalmozódó szalicilsav gátolja a vírus replikációját, így a kevesebb számban képződő virionok kisebb méretű gyűrűben tudnak elterjedni, ez kisebb oxidatív stresszt okoz. A

szalicilsav ezen hatása gátolható szalicilhidroxámsavval (SHAM), amely vegyület többek között az alternatív oxidáz inhibitora is. Amikor a nekrotizáció mértéke a szerzett ellenállósággal rendelkező levelekben csökkent, a szuperoxid gyök mennyisége is csökkent, ez a visszaszoruló TMV RNS replikációjával is korrelációban állhat.

Fontos lehet még az az összefüggés, miszerint a vírus mozgásért felelős fehérjéje legnagyobb mennyiségben 13-16 óra között van jelen a szövetekben és a fehérje termelődése 30-40 óra között leáll. A szuperoxid felhalmozódásának ideje egybeesik ezzel az időszakkal (36-38 óra), a szöveti hőmérséklet növekedés ideje pedig 39 óra körül van (Chaerle *et al.*, 1999). Vizsgálataikban termográfiásan kimutatták a keletkező nekrosisok körüli hőmérséklet emelkedést, továbbá szalicilsav-termelődést a fertőzés prenekrotikus szakaszában. A hőmérséklet növekedéséért a szalicilsav által indukált sztómazáródást tették felelőssé. Mindenesetre a TMV szöveten belüli elterjedése és a szuperoxid felszaporodása között párhuzamot lehet vonni. A klorotikus léziót képző valamint a mozaik tünetekkel járó gazda-parazita kapcsolatokban nem sikerült szuperoxid felhalmozódást kimutatni, (16. ábra) ami az OAF második, specifikus hullámának hiányáról tanúskodik. Továbbá a sejthalált sem sikerült kimutatni, ami a sejtmembránok integritására utal.

Mindez a szuperoxid-felhalmozódás és a sejthalál ok-okozati összefüggését jelzi inkább. A szuperoxidnak a vírus elleni antimikrobiális, közvetlen hatása nem bizonyított, bár elméletben a szuperoxid az RNS molekulákkal is képes reakcióba lépni (Halliwell és Gutteridge, 1999). A szuperoxid gyűrű kialakulása és a felhalmozódó vírus RNS specifikus mintázata között is összefüggést feltételezhetünk

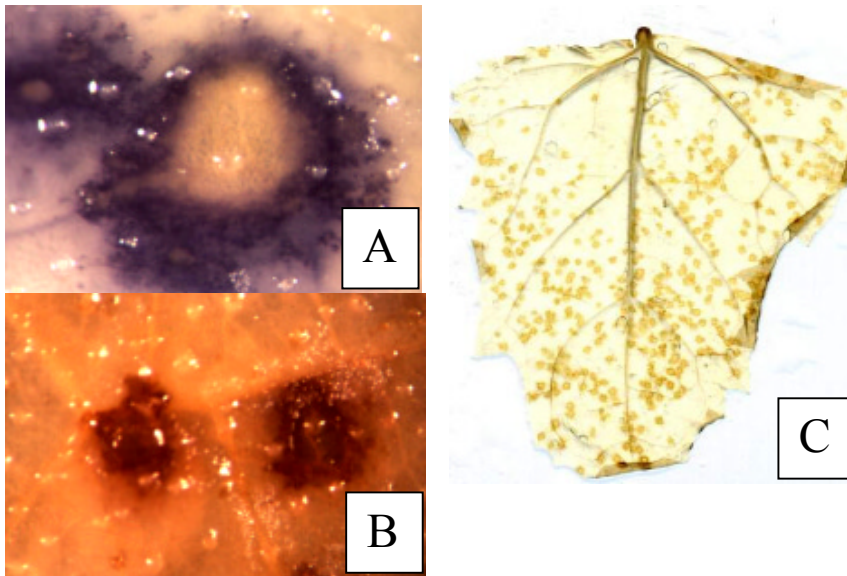


16. ábra A) NBT festés SoMV-vel és B) ZYMV-vel fertőzött *Chenopodium quinoa* növényeken, sem a mozaik tünet sem a klorotikus léziók nem festődtek

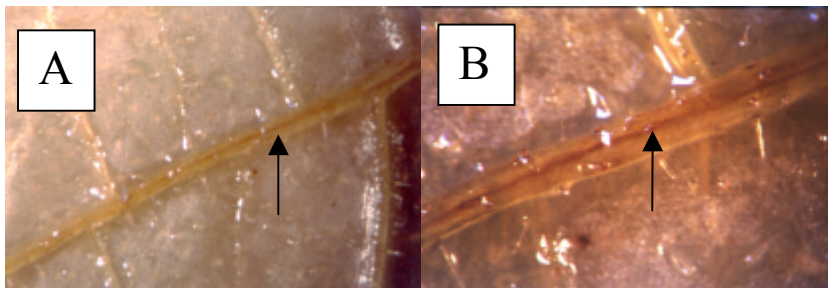
4.2.2. A hidrogén-peroxid felhalmozódása

A hidrogén-peroxid jelenlétét a szövetekben 3,3'-diaminobenzidin segítségével tettük láthatóvá. A szuperoxiddal ellentétben nem a nekrosis körüli sejtekben mutatható ki a H_2O_2 , hanem a lézió közepén (17. ábra). Ha a két festési eljárás (NBT, DAB) által megfestett azonos nagyítású léziók átmérőjét összehasonlítjuk (17. ábra) jól látható, hogy a hidrogén-peroxid csak a nekrosisokon belül halmozódik fel.

A TNV-vel és ZYMV-vel fertőzött növényekben megfigyelhető a főbb erek festődése (floém) is (18. ábra). A hidrogén-peroxid (gyűrűn belüli) felhalmozódása kapcsolatban állhat a vírusgenom átírásával, valamint a hidrogén-peroxid jelmolekulaként betöltött szerepével. Speciális egysejt festődést nem sikerült kimutatni a klorotikus léziókat illetve a mozaik tüneteket mutató, általunk vizsgált gazda-parazita kapcsolatokban.



17. ábra Hidrogén-peroxid kimutatása a növényi szövetekben 0,1 %-os 3,3'-diaminobenzidin segítségével. A vákuuminfiltrált leveleket 2 órás inkubáció után, a levél színanyagait kivonó elegybe helyeztük. A festésre a TNV-fertőzést követő második napon került sor, A) és B) uborka, felül első fertőzés NBT-festése, alul szintén első fertőzés DAB-festése látható, a két festési eljárás által megfestett léziók azonos nagyságúak, C) *Chenopodium quinoa* DAB-festése



18. ábra A levélerek festődése A) a ZYMV-fertőzött és B) a TMV-vel fertőzött uborkában

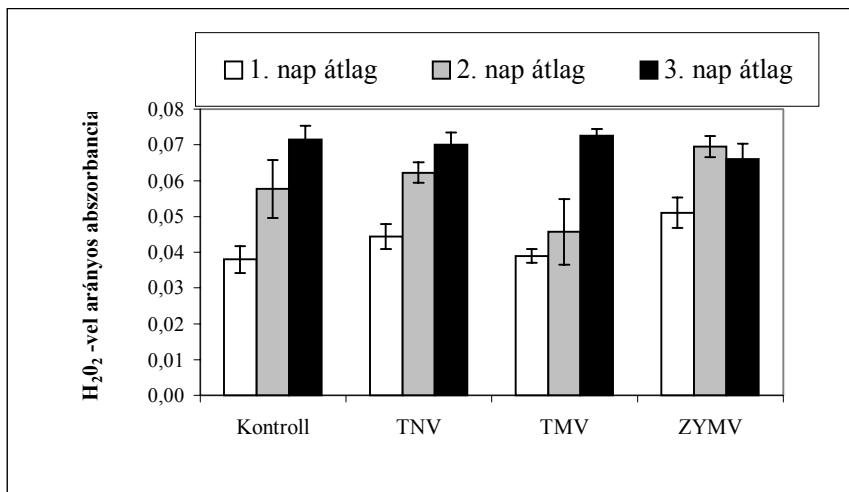
4.2.3. A hidrogén-peroxid koncentrációja

A hidrogén-peroxid szint változása több szempontból jelentős, egyrészt mert relatívan stabil az OAF típusain belül, továbbá az oxigén más aktív formái vizes oldatban rövid időn belül hidrogén-peroxiddá alakulnak át (Gutteridge és Halliwell, 1994). Másrészt a hidrogén-peroxid szerepe az egyes jelátadási folyamatokban nem elhanyagolható.

A TMV-fertőzött Xanthi-nc-ben és Nah-G-ben egyaránt a hidrogén-peroxid felhalmozódásának két szakaszát lehetett tapasztalni. Az első közvetlenül a fertőzést követően mintegy hat órán át tart, aminek vége egybeesik a vírus MP-fehérjének felszaporodásával. A második hullám a nekrotikus tünetek kialakulásához kapcsolódik, kezdete egybeesik a látható tünetek megjelenésével. Irodalmi adatok szerint az SzSzR indukciója után nem emelkedik a hidrogén-peroxid koncentrációja (Neuenschwander *et al.*, 1995) a Xanthi-nc-ben. Az alsó levelek TMV-fertőzése sem idézett elő változást a nem fertőzött felső levelek hidrogén-peroxid szintjében.

A fenti megfigyelések alapján vizsgáltuk a hidrogén-peroxid akkumulációját a *Chenopodium quinoa* növényekben a négy különböző vírussal történő fertőzést követő 1., 2. és 3. napon. A növények H_2O_2 koncentrációjában nem sikerült valódi különbségeket kimutatnunk, sem a fertőzést követő egyes napok, sem a különböző vírusfertőzések hatására. Itt kell megemlítenünk, hogy a hidrogén-peroxid DAB segítségével történő kimutatása során ezek a levelek halványabban festődtek. Irodalmi adatot a növényekben kimutatható hidrogén-peroxid mennyiségről nem találtunk. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a rendelkezésünkre álló módszer nem megfelelő érzékenységű. Sem Olson és Varner (1993), sem Marre *et*

al., 1998 módszerével nem sikerült valódi különbségeket (19. ábra) kimutatnunk.



19. ábra *Chenopodium quinoa* növényekben mért hidrogén-peroxid szintek a fertőzést követő 1.,2.,3. napon

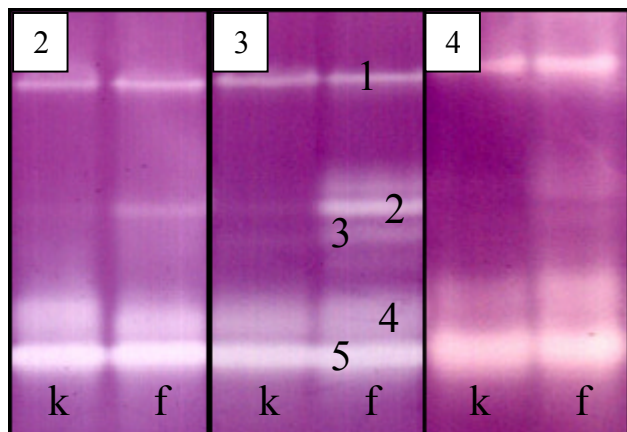
4.3. Enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok vizsgálata inkompatibilis és kompatibilis gazda-parazita kapcsolatokban

A prooxidánsokkal egyensúlyt tartó enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok aktiválódását vizsgáltuk mind a *Chenopodium quinoa*, mind az uborkanövényekben. A növényeket a 3. táblázatban leírtak alapján fertőztük különböző tüneteket okozó vírusokkal, majd összehasonlítottuk a nekrozissal és klorózissal végződő fertőzések során aktiválódo antioxidáns kapacitást.

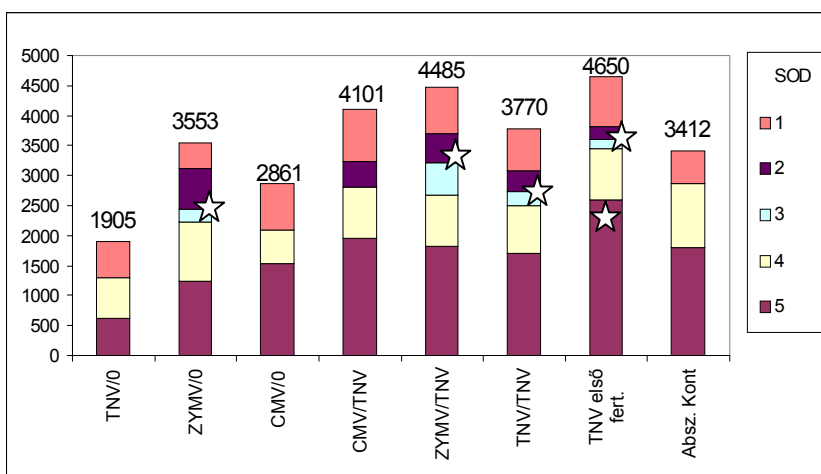
4.3.1. SOD izoenzimek vizsgálata

A SOD izoenzimek nyers kivonatát poliakrilamid gélekben vizsgáltuk. A gélelektroforézis során a *Chenopodium quinoa*-ban négy, míg az uborkában öt izoenzimet sikerült elválasztanunk. A gélben való vándorlásuk növekvő sebessége szerint az izoenzimeket számokkal jelöltük. A minták felvitele mindig a fehérjetartalom figyelembevételével történt. Az izoenzimek aktivitását a gélek specifikus festését követően denzitométerrel mértük.

A TNV fertőzött uborkanövényekben vizsgáltuk egyrészt az első fertőzés hatására indukálódó SOD aktivitást, másrészt a TMV, ZYMV, valamint CMV indukcióját követő ún. kihívó vagy ismétlődő fertőzés hatására aktiválódó enzimeket. Megfigyelhettük, hogy az első fertőzés hatására specifikusan indukálódik a növényekben két új izoenzim (20. ábra), amelyet a kontroll növények konstitutívan nem fejeztek ki. A SOD2 és SOD3 izoenzim aktiválódása mellett a SOD1 és a SOD5 aktivitása is szignifikánsan megnőtt (20. ábra) az abszolút kontrollhoz képest. A felülfertőzéseket minden esetben TNV-vel végeztük. Az SzSzR indukálására nem képes CMV vírusok esetében a TNV fertőzés hatására kifejlődő léziók az első fertőzés lézióival egyeztek meg, a ZYMV esetén kisebbek a léziók, ezzel párhuzamba állítható a termelődő SOD aktivitása is. Az indukált, SzSzR-t kifejező növények felső fertőzetlen levelében az összes SOD aktivitása nem különbözött a kontrollban mért aktivitástól, kivéve a ZYMV esetén amikor ugyanis a fertőzésre indukálódó SOD2 és SOD3 aktivitása is kifejeződött (21. ábra).



20. ábra SOD-izoenzimek mintázata natív PAGE-n, szelektív festést követően. Az uborka növényeket a TNV-vel fertőztük, a PAGE-n látható mintázat a nekروزisok kifejlődésének 2., 3. és 4. napját szemlélteti. A SOD-izoenzimek sávjait növekvő elektroforetikus mobilitásuk sorrendjében számoztuk meg, k) kontroll, f) fertőzött



21. ábra SOD-izoenzimek aktivitása a vírusok által okozott tünetek kifejlődésének 3. napján. Az ábra összetettsége miatt nem szemléltettük a szórásokat, a valódi különbségeket (szignifikanciaszint $P = 0,05$) csillaggal jelöltük, az y-értéktengely a denzitóméter segítségével meghatározott görbék alatti terület relatív értékeit szemléltettük

Ez az eredmény arra utal, hogy a két izoenzim aktivitása a kórokozó szövetben való jelenlétével kapcsolatos, nem pedig a rezisztenciával (a ZYMV mozaik tüneteket okoz a növényben, az indukció 10. napján már szisztemizálódott és az egész növényre a kiterjedt, bár jellemző tünetek még nem jelentek meg).

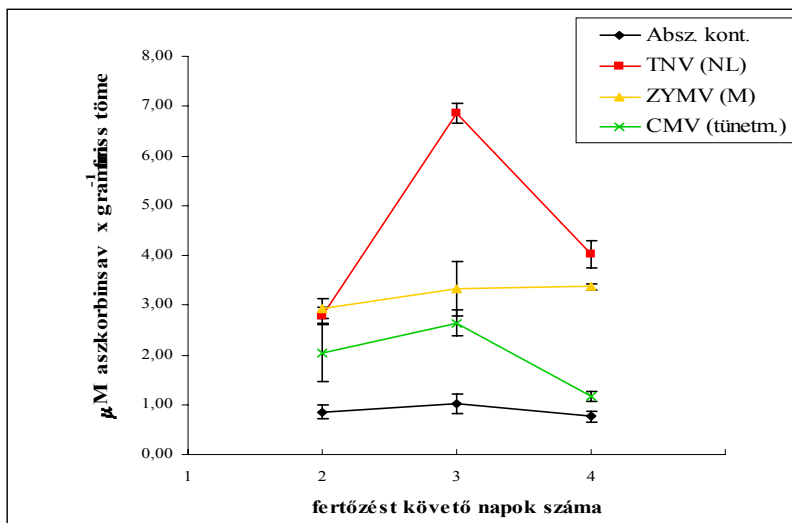
A *Chenopodium quinoa* növényekben a különböző vírusokkal történő fertőzést követően 3 napig mértük a SOD aktivitását. Az első napon nem találtunk valódi eltéréseket a kontroll és fertőzött, illetve indukált és felülfertőzött növények SOD aktivitásában. A nekrotikus tünetek megjelenésével, a 3. napon az összes SOD aktivitása kétszeresére nő a kontroll, valamint a klorotikus tüneteket okozó vírusokkal fertőzött növényekhez képest.

4.3.2. Az aszkorbát-peroxidáz aktivitásának vizsgálata uborkanövényeken

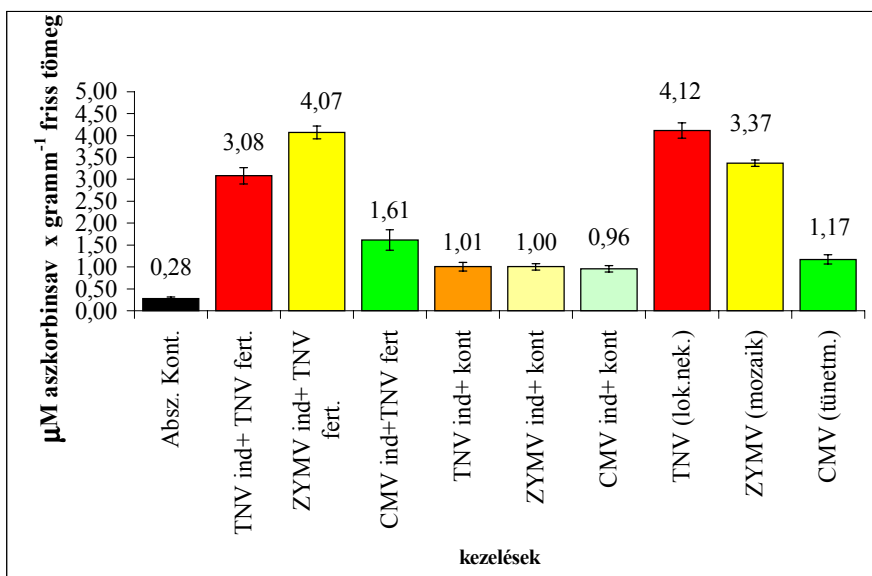
A vizsgálataink tárgyát képező többi antioxidáns mérése spektrofotometrián történt. Az enzimek közül először az aszkorbát-peroxidáz (APX) aktivitásának változásait vizsgáltuk. A fertőzésre, valamint indukcióra, illetve második, azaz kihívó (ismétlő) fertőzésre adott válaszát mértük az uborkanövények leveleiben. Az uborkát három kórokozóval fertőztük, TNV, ZYMV, CMV (tünetek lásd 3. táblázat), majd lokálisan mértük az antioxidáns enzimek aktiválódását. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az APX enzim indukálódásának lokális maximuma a harmadik napra esik. Ez a jelenség a nekrotikus léziók kifejlődésével, azaz a TNV esetén a tünetek megjelenésével kapcsolatos. Meglepetésünkre azonban a mozaik tünetek kifejlődéséért felelős ZYMV is indu-

kálta az APX aktivitásának növekedését, sőt a növényben korlátozás által a tünet kifejllesztésére nem képes CMV is (22. ábra). Fontos megjegyezni, hogy a szisztemikusan elterjedő ZYMV esetében ez az indukció tartósabb, míg a CMV-nél rövid idő alatt véget ér, hamarabb visszatér a kontroll szintjére. Ez az indukció valószínűleg nem specifikus, általános stressz reakcióról van szó, feltehetően az OAF első hullámáról. Azonban az indukció mértéke és tartama közötti különbségek meghatározóak lehetnek a rezisztencia és a kialakításában résztvevő faktorok indukálódása szempontjából. Az antioxidánsok emelkedésének hátterében természetesen a sejtben zajló oxidatív folyamatok találhatók. Ezen belül is meg kell különböztetnünk az egyes enzimek szerepét. Az APX a hidrogén-peroxid átalakítását közvetlenül első lépésben katalizáló enzimként aktiválódik.

A felső fertőzetlen levelekben az APX aktivitása 4-szer, több mint a kontroll levelekben. Ha ezeket összehasonlítjuk a ZYMV fertőzése után mért adatokkal, azok indukciója is hasonlóan alakul, csak hogy ott a kórokozó jelen van a szövetekben (23. ábra). A ZYMV fertőzést az oxidatív stressz enyhébb formája kíséri, és az antioxidánsok aktiválódásának hátterében valószínűleg az erek hidrogén-peroxid felhalmozódása állhat. Az oxidatív stressz mértéke tehát jellemzi a növény-vírus kapcsolat genetikailag meghatározott milyenségét.



22. ábra Az APX aktivitása uborkanövényekben, lokálisan a TNV, ZYMV és CMV fertőzést követő 2. 3. és 4. napon

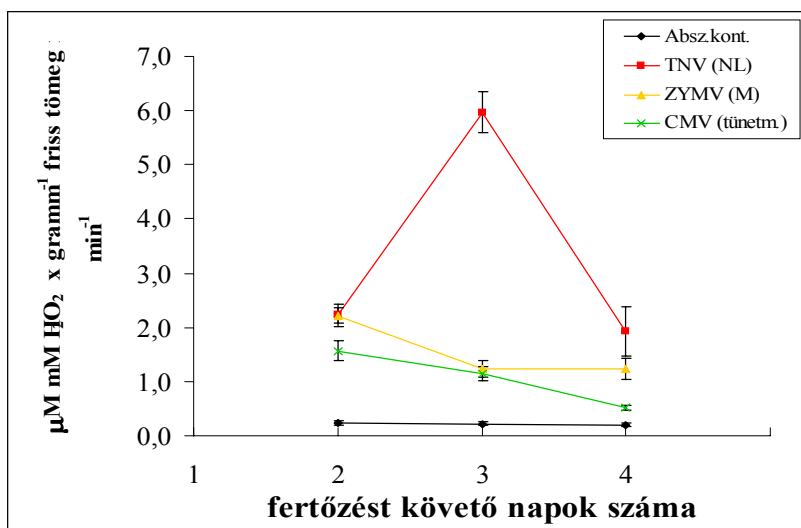


23. ábra Az APX enzim aktivitásainak változása az indukáló és ismétlődő fertőzések hatására uborkában

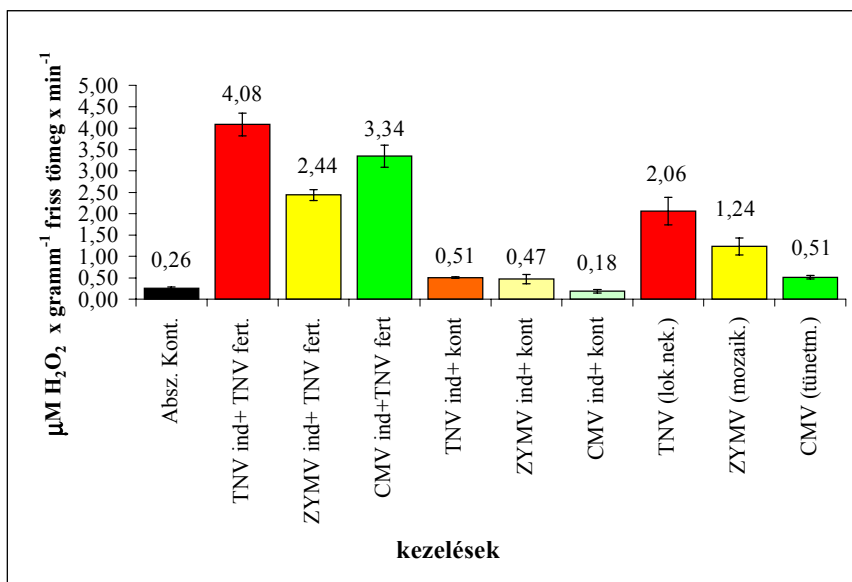
4.3.3. A peroxidáz enzim aktivitásának vizsgálata uborkanövényeken

A peroxidáz (POX) aktivitását szintén spektrofotométerrel vizsgáltuk. A TNV esetében aktivitása csakúgy mint az APX esetében jelentősen emelkedik. Aktivitásának maximuma hasonlóan az APX –hez a harmadik napra esik. Funkcióját tekintve a hidrogén-peroxid átalakítását közvetlenül első lépésben katalizáló enzimeként aktiválódik. Mivel ebben a funkciójában az APX-szel megegyezik, aktivitásának alakulása is hasonló. A TNV esetében valódi különbséget észleltünk, míg a ZYMV és a CMV hatására az enzim aktivitása átmenetileg ugyan megnő, és a kontrollhoz képest is eltérést mutat, azonban egymáshoz viszonyítva nem változik (24. ábra).

A TNV fertőzött növények felső fertőzetlen leveleiben a POX aktivitása 2-szer nagyobb, mint a kontroll levelekben. Ha összehasonlítjuk a ZYMV indukált növények adataival azok POX aktivitása is hasonlóan alakul, azonban a kórokozó jelen van a szövetekben, tehát a szisztemikus hatás mellett egy lokális hatással is számolnunk kell. A ZYMV indukálta stressz hatására nemcsak az APX, de a POX enzim aktivitása között is, a két vírus szempontjából valódi különbség van, ezeket a TNV jobban indukálja. A ZYMV fertőzést az oxidatív stressz enyhébb formája kíséri, és az antioxidánsok aktiválódásának hátterében valószínűleg az erek hidrogén-peroxid felhalmozódása állhat (25. ábra).



24. ábra A POX aktivitása uborkanövényekben, lokálisan a TNV, ZYMV és CMV fertőzést követő 2. 3. és 4. napon



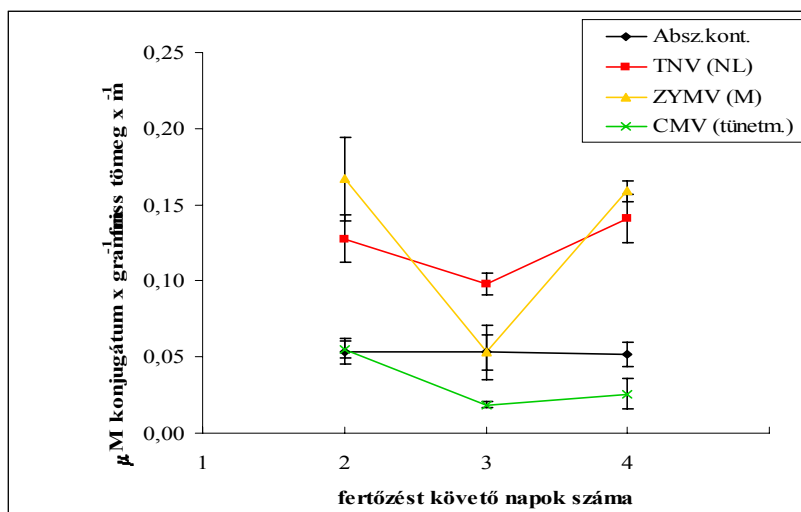
25. ábra A POX enzim aktivitásainak változása az indukáló és kihívó fertőzések hatására uborkában

4.3.4. A glutation S-transzferáz aktivitásának vizsgálata uborkanövényeken

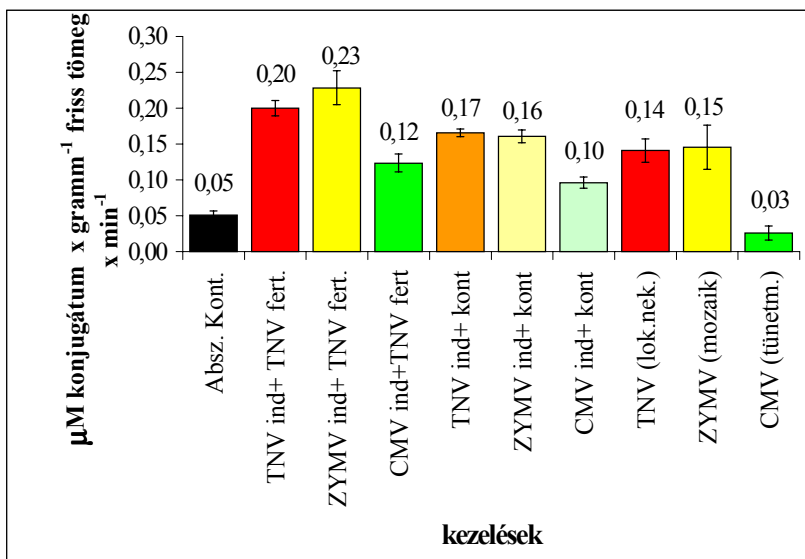
A glutation S-transzferáz (GST) aktivitásának maximuma valószínűleg korábban következett be, mint a POX és az APX esetében. Jelentős aktivitásnövekedés észlelhető már a második napon, ez megegyezik az enzim mRNS-ének második nagy mennyiségű átíródásával, amely a fertőzést követően az 55-70 órában észlelhető (Alvarez *et al.*, 1998). Ezt követően a GST aktivitása csökken, majd a TNV és a ZYMV esetében ismét emelkedik, míg a CMV-nél szintén a kontroll szintjére tér vissza, ahogyan az APX és a POX esetében is történt. A GST a xenobiotikumok méregtelenítésében vesz részt (26. ábra). A GST aktivitása az indukált növények felső fertőzetlen leveleiben 3,5-szer magasabb, mint a kontroll növényekében. A ZYMV indukálta stressz hatására a GST enzim aktivitása ugyanúgy megnő, és nem különbözik szignifikánsan a TNV által indukálttól (27. ábra). Azonban itt sem beszélhetünk a ZYMV által indukált rezisztencia szisztemikus mivoltáról mivel a kórokozó jelen van a szövetekben.

4.3.5. A glutation-reduktáz aktivitásának vizsgálata uborkanövényeken

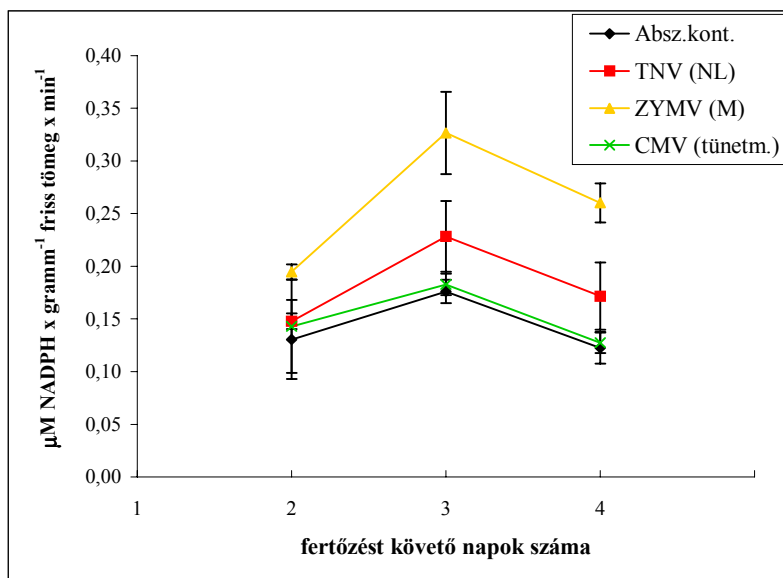
A GR enzim a Halliwell-Asada ciklus egyik kulcsenzime, amely a hidrogén-peroxid aszkorbát segítségével történő átalakításában vesz részt. Aktivitásának maximuma szintén a harmadik napra esik, ahogy az APX enzimé is, amely szintén a ciklus kulcsenzime. Valódi különbséget a kontrollhoz viszonyítva azonban csak a TNV fertőzés során mértünk (28. ábra). A GR enzim aktivitása 2,3-szor magasabb a kontroll növényekhez



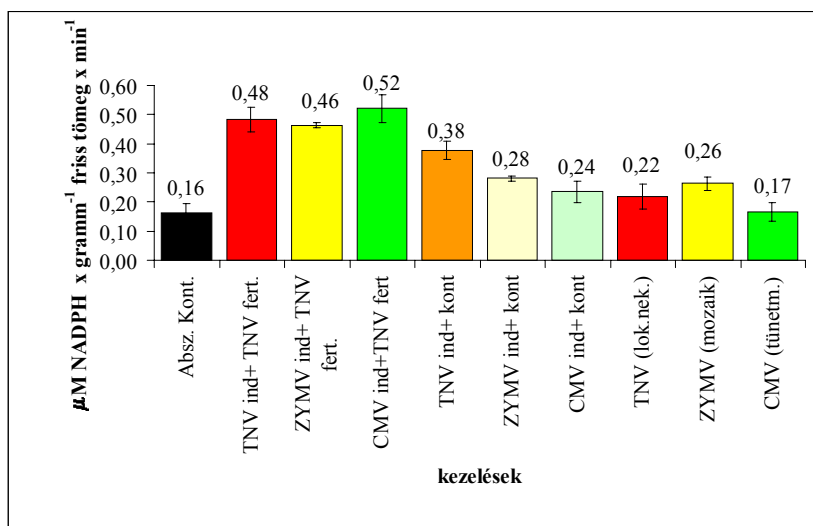
26. ábra A GST aktivitása uborkanövényekben, lokálisan a TNV, ZYMV és CMV fertőzést követő 2. 3. és 4. napon



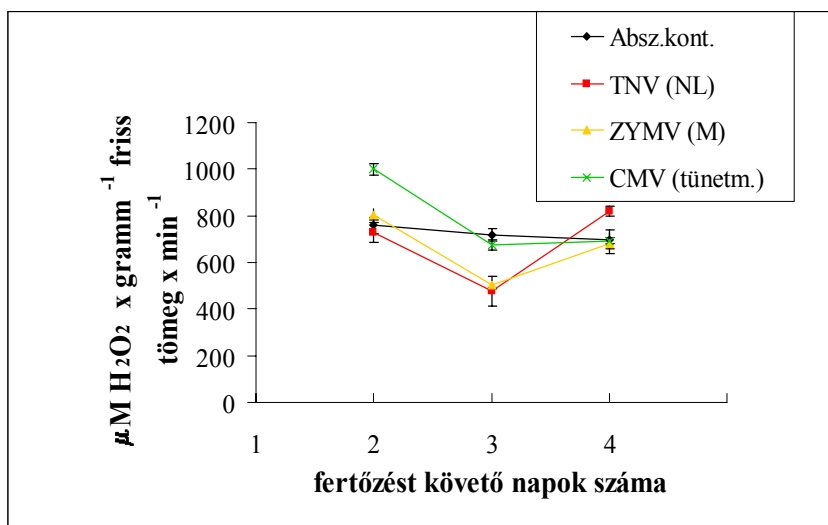
27. ábra A GST enzim aktivitásainak változása, az indukáló és kihívó fertőzések hatására uborkában



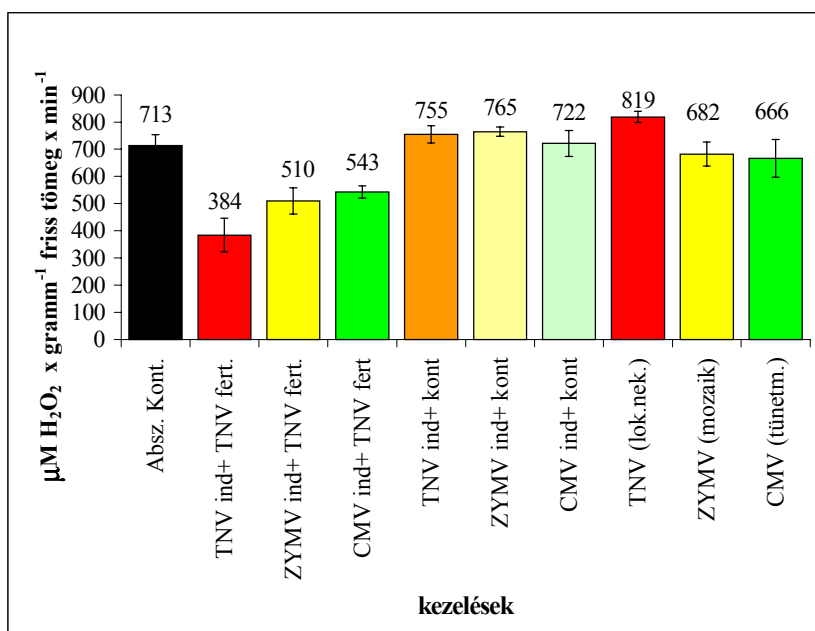
28. ábra A GR aktivitása uborkanövényekben, lokálisan a TNV, ZYMV és CMV fertőzést követő 2. 3. és 4. napon



29. ábra A GR enzim aktivitásainak változása, az indukáló és kihívó fertőzések hatására uborkában



30. Ábra A KAT aktivitása uborkanövényekben lokálisan a TNV, ZYMV és CMV fertőzést követő 2., 3. és 4. napon



31. ábra A KAT enzim aktivitásainak változása az indukáló és kihívó fertőzések hatására uborkában

viszonyítva a felső fertőzetlen levelekben. A másodszori fertőzés során az enzim aktivitása magasabb, mint az első fertőzéskor mért aktivitás, eltérés a különböző vírusfertőzések között azonban nincs (29. ábra).

4.3.6. A kataláz aktivitásának vizsgálata uborkanövényeken

A kataláz (KAT) aktivitása a második napon a kontrollhoz képest mind a TNV mind a ZYMV esetében átmenetileg megnő. A két vírus indukálta aktivitásváltozás között azonban nincs valódi különbség. A vírusfertőzés harmadik napján azonban az enzim aktivitásának minimumát valamint valódi különbségeket tapasztaltunk a TNV és a ZYMV esetén. Az enzim funkcióját tekintve, a kataláz szintén a hidrogén-peroxid eltávolításában vesz részt (30. Ábra).

Ahogy az előző enzimek esetében úgy itt is vizsgáltuk az enzim aktivitását a felső indukált, de fertőzetlen levelekben (31. ábra). Eltéréseket azonban az enzim aktivitásában nem sikerült kimutatni. A rezisztenciával rendelkező növényekben a kihívó fertőzés után azonban az enzimaktivitás csökkent. A legnagyobb mértékű, valódi különbség a TNV-vel indukált és másodszor is TNV-vel fertőzött növények leveleiben mérhető.

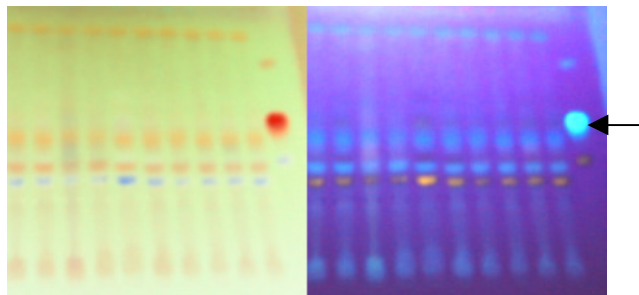
Eredményeinkből kitűnt, hogy az antioxidánsok lokális emelkedése mellett a legtöbb esetben szisztemikusan is észleltünk aktivitásváltozásokat. Ez további bizonyítéka Alvarez *et al*, (1998) munkájának, miszerint az avirulens kórokozóval történő fertőzés szisztemikus mikrooxidatív robbanást idéz elő, mind a fertőzött levélen, mind a növény fertőzetlen levelein. A feltehetően egysejt nekrozisok összefüggő hálóját figyelték meg, a levél érhalózata mentén, de az erektől távolabb eső szövetekben is

sikerült kimutatniuk hidrogén-peroxid felhalmozódást, amit kromatin kondenzáció és DNS feldarabolódás kísért a növényekben. Valódi különbségeket elsősorban a TNV fertőzés okozta indukcióban találtunk, ahol a fertőzött levél feletti, fertőzetlen, de rezisztens levélben nőtt az antioxidánsok aktivitása. A felső fertőzetlen levelekben az APX aktivitása 4-szer, a GST 3,5-szer a POX 2-szer, a GR 2,3-szor több mint a kontroll levelekben. Ha ezeket összehasonlítjuk a ZYMV fertőzése után mért adatokkal, azok indukciója is hasonlóan alakul, csak hogy ott a kórokozó jelen van a szövetekben. A ZYMV indukálta stressz hatására a GST és a GR enzimek aktivitása ugyanúgy megnő, és nem különbözik szignifikánsan a TNV által indukálttól. Az AP, a POX és a KAT enzimek között a két vírus szempontjából valódi különbség van, ezeket a TNV jobban indukálja. A ZYMV fertőzést az oxidatív stressz enyhébb formája kíséri, és az antioxidánsok aktiválódásának hátterében valószínűleg az erek hidrogén-peroxid felhalmozása állhat. A kihívó fertőzés hatását vizsgálva mértük az antioxidánsokat a felső, fertőzött levélben. Abból a feltételezésből kiindulva, hogy a növényben az állandósult oxidatív stressz egy könnyebben mobilizálható antioxidáns kapacitáshoz vezet, összehasonlítottuk a különböző vírusok esetében a TNV-vel történő felülfertőzést. A szövetben jelenlévő (az antioxidáns aktivitás növekedéséből következően), állandóan megemelkedett szintű OAF-ot a sejt tolerálja (ZYMV-esetén), ami által egy újabb fertőzéskor könnyebben mozgósítja antioxidánsait, és magasabb aktivitással jár a sejtekben. A TNV indukálta rezisztencia a hirtelen és nagyobb mennyiségben felszaporodó OAF hatására jön létre, itt a nekrotikus tünetek vagy a sejthalál (szisztemikus egysejt nekrozisok hálózata) az, ami az antioxidáns kapacitás mobilizálhatóságának növekedéséért felelős.

4.4. A *Chenopodium quinoa* növényeken végzett vizsgálatok

Chenopodium quinoa növényeken vizsgáltuk az antioxidáns enzimek aktivitását. Lokálisan az APX, DAR, KAT, GR, GST és POX enzimek aktivitását, valamint az aszkorbinsav mennyiségét. Arra az érdekes megállapításra jutottunk, hogy a POX aktivitása nem mérhető ezekben a növényekben. A növények antioxidáns enzimrendszere növényfajonként nyilván különbözhet egymástól. Ezt az elképzelésünket tovább erősítette az a tény, hogy a *Chenopodium quinoa* növények levélszöveti homogenátumai hosszabb állás után sem barnulnak el, ellentétben a dohány levélkivonatokkal. Arról, hogy ebben az esetben merőben más antioxidáns rendszerrel állunk szemben, mint az uborka, vagy a dohány esetében Takahama *et al.*, 1999 munkája alapján győződhetünk meg. Öregedő dohánylevelekben vizsgálták az aszkorbinsav, a klorogénsav, valamint a szuperoxid-dizmutáz és a peroxidáz összefüggését. Az öregedés során keletkező barna színű komponensek képződéséért a növekvő mennyiségű, illetve aktivitású POX és a klorogénsav a felelős. Mindezt az aszkorbinsav csökkenése, valamint a SOD aktivitásának növekedése kíséri. A reakcióhoz hidrogén peroxid szükséges, amit a SOD képez a szuperoxid átalakításával. Azon állításunkat, hogy a *Chenopodium quinoa* növényekben nincs klorogénsav, vékonyréteg kromatográfia segítségével igazoltuk. A kromatogramon (32. ábra) együtt futtattuk a növényi kivonatot ismert mennyiségű klorogénsav mintával. A kromatogramon négy fontosabb flavonoidot sikerült elválasztani, amelyek jellemzőek a növényekre, sőt már szabad szemmel látható különbségek is észlelhetők közöttük. Irodalmi adatot azonban nem találtunk a *Chenopodium* levelek

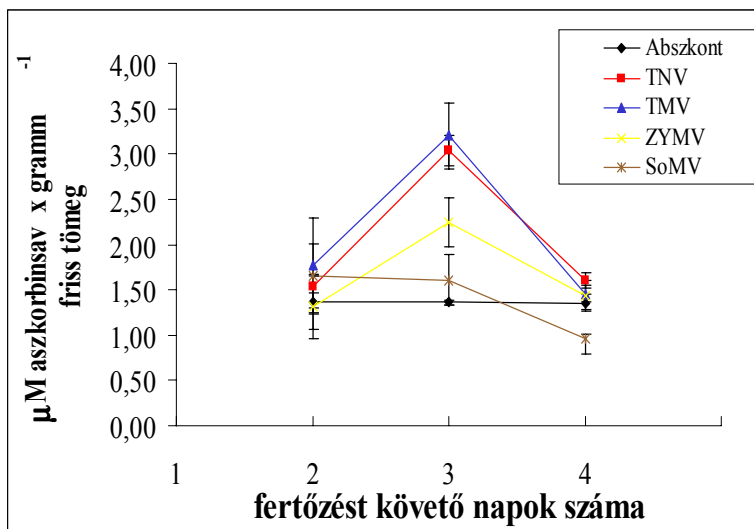
flavonoid tartalmára nézve, illetve ezen vegyületek meghatározása nem tartozott dolgozatunk célkitűzései közé.



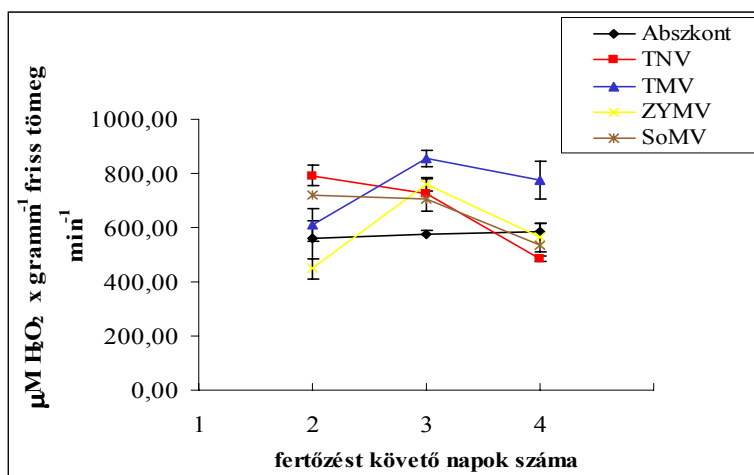
32. ábra *Chenopodium quinoa* növények flavonoid mintázata vékonyréteg kromatogramon, bal oldalt a kromatogram inverz képe látható, a nyíl a klorogénsavat jelöli

Az előzőekben felsorolt antioxidáns enzimek lokálisan kifejtett aktivitásának meghatározása után a következő észrevételeket tehetjük.

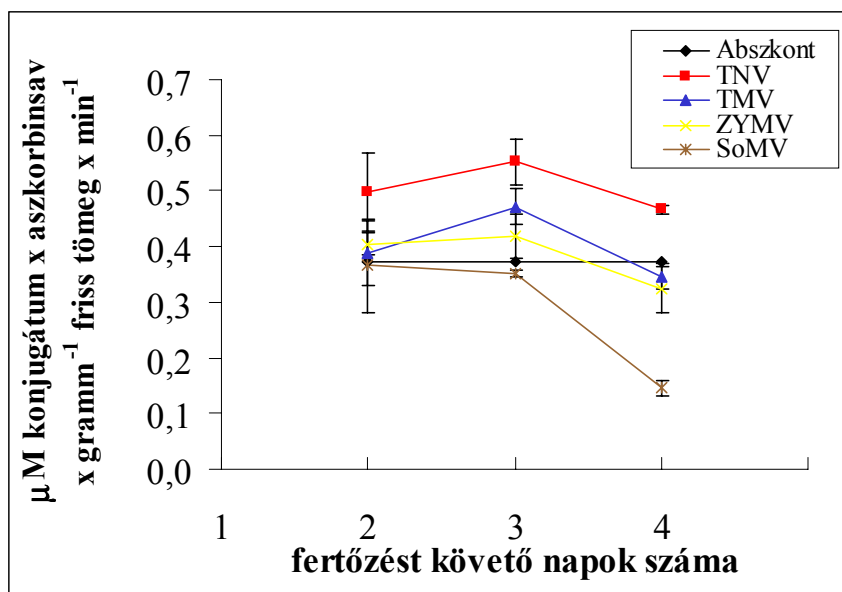
Az APX aktivitása elsősorban a nekrotikus léziókat képző tünetek hatására nőtt meg, maximuma szintén a harmadik napon észlelhető. Tendenciáját tekintve ugyanez mondható el a GST és a GR enzimekről, azaz nekrotízisok esetén megemelkedik az aktivitásuk. A *Chenopodium quinoa* ZYMV fertőzéskor klorotikus léziókat képez a vírus nem képes elterjedni a növényben. Az enzimek közül egyedül az APX enzimet indukálta, melynek aktivitása kb. kétszeresére nőtt a kontrollhoz képest, miközben az aszkorbinsav szintje a növényekben nem változott szignifikánsan. A SoMV szisztemizálódik a növényekben, sőt magról is képes fertőzni. A libatopfélék családjába tartozó növények többsége természetes gazdája a vírusnak. A vírus nem aktiválta az antioxidánsokat, sőt a negyedik napon fokozatosan csökkenni kezdtek az aktivitások. Ez a folyamat a tünetek megjelenésével mérséklődik, majd leáll.



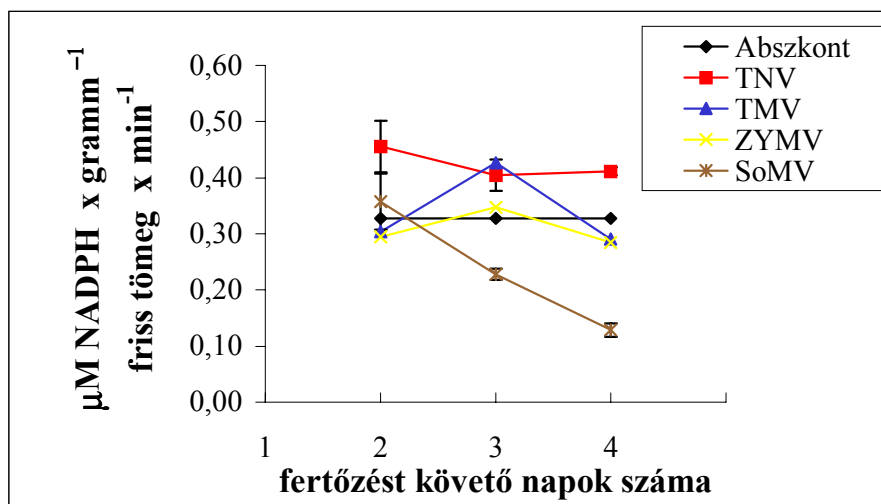
33. ábra Az APX enzim aktivitása a fertőzést követő 2.,3.,4. napon *Chenopodium quinoa* növényeken a fertőzött levélben



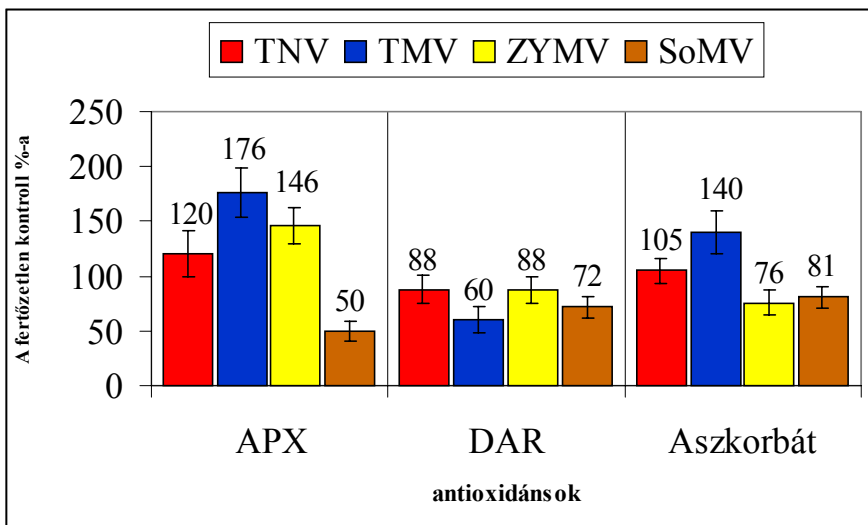
34. ábra A KAT enzim aktivitása a fertőzést követő 2.,3.,4. napon *Chenopodium quinoa* növényeken a fertőzött levélben.



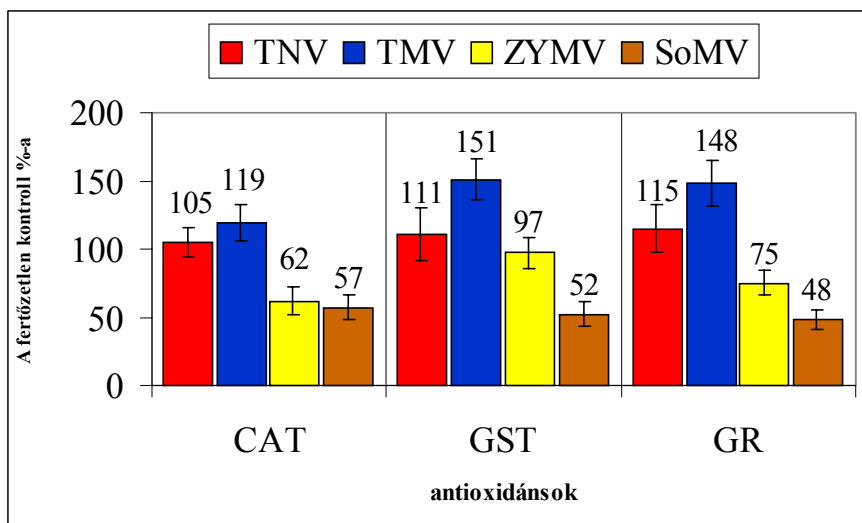
35. ábra A GST enzim aktivitása a fertőzést követő 2.,3.,4. napon *Chenopodium quinoa* növényeken a fertőzött levélben



36. ábra A GR enzim aktivitása a fertőzést követő 2.,3.,4. napon *Chenopodium quinoa* növényeken a fertőzött levélben



37. ábra Az APX, DAR enzimek aktivitásának, valamint az aszkorbinsav mennyiségének változása az indukáló fertőzést követően *Chenopodium quinoa* növények fertőzetlen levelében. A fertőzést követő 10. napon



38. ábra A KAT, GST és GR enzimek aktivitásának indukáló fertőzést követően *Chenopodium quinoa* növények fertőzetlen levelében. A fertőzést követő 10. napon

A következő kísérletekben a vírusok általi indukciót mértük a fertőzetlen levelekben (37. ábra, 38. ábra). Enzimaktivitás változásokat szisztemikusan csak a két nekrotikus tünetet okozó vírus indukálta a növény fertőzetlen részein. A ZYMV az APX-en kívül nem fokozta az antioxidánsok aktivitását.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A TMV U1-es törzsével fertőzött Xanthi-nc és a NahG dohányok nekrotikus lézióinak kialakulását kísértük figyelemmel. A fertőzést követően az inokulált levelekben megnő az MDA[•] mennyisége, ez a jelenség nemcsak lokálisan, de szisztemikusan is észlelhető. A fertőzés helyétől távolabbi levelekben tehát egy jóval kisebb, de szignifikáns ESR jel indukálódik, ami a gyök felhalmozódását jelzi. Lokálisan az emelkedés több százszoros, a NahG-ben pedig, ahol a nekrotikus léziók kiterjedése is nagyobb, az MDA[•] mennyisége is jelentősebben nő a Xanthi-nc-hez képest. A megvilágítás során mért ESR jelek sokkal nagyobbak, mint a sötétben észlelteket, az MDA[•] fény hatására bekövetkező növekedését az irodalomban is megtaláljuk. Meglepetésünkre, a fertőzött levelek sötétben és fényben mért ESR jeleinek különbsége nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest. A mért MDA[•] jelek többségükben (60-70%) függetlenek a fénytől. Vonatkozik ez mind a kontroll, mind a fertőzött levelekre és arra utal, hogy a fotoszintetikus apparátus károsodása arányos a sejt többi részeinek sérüléseivel. Az MDA[•] állandósult megnövekedése utal az MDA[•] és az aszkorbáttá történő redukció közötti egyensúlyvesztésre. Az MDA[•] képződés részben visszavezethető az elektronoknak az oxigénre majd az aszkorbinsavra kerülésével. A TMV által károsított sejtek kloroplasztiszai is hozzájárulhatnak a fényfüggő, megnövekedett MDA[•] jel kialakulásához. Az ESR jel nagyobb része azonban független a fénytől, amiből arra következtethetünk, hogy az OAF képződése nem köthető össze kizárólag csak a kloroplasztisszal. Az

OAF keletkezésének helyei ugyanúgy lehetnek a mitokondriumok, a citoplazma, vagy az apoplaszt illetve a vakuolum is.

A TMV fertőzött SzSzR-t kifejező levelekben alacsonyabb az MDA[•] akkumulációja. Ez a megfigyelés alátámasztja Alvarez *et al.* (1998) vizsgálatait, miszerint a lokális fertőzés szisztémikus mikrooxidatív robbanást (burst) indukál a növény távolabbi fertőzetlen részeiben. Az MDA[•] szisztémikus felszaporodása a fertőzetlen levelekben egyidőben történik az alsó leveleken kifejlődő nekrotikus tünetek megjelenésével. A szisztémikus mikrooxidatív robbanás (burst) egy átmeneti jelenség, amely megelőzi az SzSzR kifejlődését; általában 10 nappal az alsó levelek fertőzése után fejlődik ki. Az antioxidáns enzimek aktiválódása és az MDA[•] akkumulációja között összefüggést nem sikerült bizonyítani.

Az uborka és TNV kapcsolata esetében a nekrotikus léziók körül az egyes vékony hajszálerék szuperoxidra specifikus NBT festődését is megfigyeltük. Ez a festődés csak a formálódó nektrózisok körül észlelhető, a kontrollban és a már előregedő nektrózisok körül nem. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a hajszálerékbe is kilépő és ott érnektrózt okozó, az „A” szerotípusba tartozó TNV képes oxidatív stresszt indukálni az erekben. Valamint megerősítette azt a feltételezésünket, ami szerint a vírusok speciális előre meghatározott módú elterjedése a szövetben kapcsolatban áll az NBT által megfestett sejtekkel, azaz a vírus MP-fehérjájének mozgását jellemzi. A nektrózis körül formálódó gyűrűben a vírusok a sejtfalak ellentétes oldalán a plazmodezmák körül formálódó ún. X testekben szaporodnak nagy mennyiségben, elsősorban az MP-t kódoló szubgenomi RNS replikációja fokozott ebben a szövetrészben.

Ugyanakkor a nekrosis közepén már a virionok replikációja ún. viroplazmában zajlik és a CP-t kódoló szubgenomi RNS irányítása alatt áll.

A ZYMV által az uborkában megnövelt antioxidáns kapacitás magyarázható a felhalmozódó hidrogén-peroxiddal, az antioxidánsok növekedése ugyanakkor egy inkompatibilis gazda-parazita kapcsolatra utal, mivel ha összehasonlítjuk a SoMV okozta mozaik tünetek kialakulásával, az abszolút kompatibilis kapcsolatban nem észleltünk enzimaktivitás növekedést.

Chenopodium quinoa növényen vizsgáltuk a prooxidánsok-antioxidánsok összefüggését. A szuperoxid gyök csak a nekrozist szenvedő sejtekben mutatható ki, és csak a nekrozissal járó gazda – parazita kapcsolatokat jellemezte. A lokális klorózis és a mozaik tünetek esetén, azaz a ZYMV- és a SoMV - *Chenopodium quinoa* kapcsolatokban nem mutatható ki szuperoxid felhalmozódás. Evans-kék festődés is csak a nekrozissal járó tünetekre jellemző. A hidrogén-peroxid DAB-al történt kimutatásának eredménye (halványabb festés), valamint a későbbiekben megállapított peroxidáz aktivitás és a klorogénsav hiánya arra a következtetésre jutott bennünket, hogy a növények antioxidáns enzimrendszere és abban a főbb komponensek szerepe és hangsúlya különböző. Az antioxidánsok tekintetében a két nem-nekrotikus vírusfertőzés sem lokálisan, sem szisztémikusan nem idézett elő indukciót. Csupán a két nekrozist okozó vírus esetében mutatható ki szuperoxid és hidrogén-peroxid felhalmozódás, valamint a velük együtt járó sejthalál. Érdekes eredményre vezetett az SoMV és a *Chenopodium quinoa* kapcsolat antioxidánsainak vizsgálá-

lata. Az antioxidáns kapacitás már a fertőzés első szakaszában csökkenni kezdett. Még csak általános stressz reakciót sem indukál a vírus. A megváltozott anyagcsere-folyamatok valószínűleg nem a káros oxidatív reakciók halmozódásához vezetnek.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A növények, mint ahogy minden élőlény, életük során számos káros környezeti hatásra (szárazság, hőmérséklet-változás, légszennyeződés, kórokozókkal történő fertőződés, stb.) reagálnak. A stressz anyagcsere-folyamatok általában oxidatív reakciókkal jellemezhetők. Az oxidatív stressz: a prooxidánsok és az antioxidánsok között fellépő, a prooxidánsok javára történő egyensúlyeltolódás, amely akár károsodáshoz is vezethet.

Az oxidatív stresszt kiváltó, rendkívül reakcióképes szabad gyökök és prooxidáns tulajdonságú molekulák a sejt szinte bármilyen molekulájában kárt tehetnek, beleértve a ribonukleinsavakat, fehérjéket, lipideket. A növényi sejtek azonban több antioxidáns tulajdonságú molekulával rendelkeznek az OAF-ot termelő folyamatok szabályozására és az OAF méregtelenítésére (Van Kuijk *et al.*, 1987). Ide tartoznak a kismolekulájú nem enzimatisz antioxidánsok (aszorbát, glutation, E-vitamin, stb.), az egyes enzimek (szuperoxid-dizmutáz, aszorbát-peroxidáz, dehidroaszorbát-reduktáz, glutation S-transzferáz, glutation-reduktáz, kataláz, peroxidáz stb.), valamint több összetett enzimrendszer, amely képes hatékonyan védelmezni azokat a sejtalkotókat, amelyekben lokalizáltak.

A szabad gyökök és antioxidánsok kórélettani szakirodaloma mindeddig csak érintőlegesen foglalkozott a kompatibilis kapcsolatokban betöltött szerepükkel. Különösen hézagosak az ismereteink az oxigén aktív formáival egyensúlyt tartó antioxidánsok ilyen irányú vonatkozásait illetően. Munkánk célja ezen hiányosságok csökkentése volt.

Eredményeinket az alábbi pontokban foglalhatjuk össze:

1. A Xanthi-nc és NahG dohánynövények fertőzött leveleiben megnő a mono-dehidroaszorbát gyök ($\text{MDA}^\bullet$) mennyisége, az emelkedés a kontrollhoz képest több százszoros. Az $\text{MDA}^\bullet$ állandósult megnövekedése utal a gyök és az aszkorbáttá történő redukció közötti egyensúlyvesztésre.
2. E megnövekedett $\text{MDA}^\bullet$ mennyiség nemcsak lokálisan, de szisztémikusan is észlelhető; a fertőzés helyétől távolabbi fertőzetlen levelekben ugyan kisebb, de a kontrollhoz képest szignifikáns, nagyobb ESR jelet mértünk. Ez a megfigyelés alátámasztja Alvarez *et al.* (1998) vizsgálatait, miszerint a lokális fertőzés szisztémikus mikrooxidatív robbanást (burst) indukál a növény távolabbi fertőzetlen részeiben. Az MDA gyök szisztémikus felszaporodása a fertőzetlen levelekben azonos időben történik az alsó leveleken kifejlődő nekrotikus tünetek megjelenésével.
3. A fényben mért ESR jelek nagyobbak, mint a sötétben észlelteket, különbségük azonban nem változott a fertőzött növényekben a kontroll növényekhez viszonyítva. Az $\text{MDA}^\bullet$ képződés tehát részben visszavezethető a TMV által károsított sejtek kloroplasztisaiban, az elektronoknak az oxigénre majd az aszkorbinsavra kerülésével, azonban a mért $\text{MDA}^\bullet$ jelek nagyobb része független a fénytől, ami arra utal, hogy az OAF képződése nem köthető össze kizárólag csak a kloroplasztisszal. Az OAF keletkezésének helyei ugyanúgy lehetnek a mitokondriumok, a citoplazma, vagy az apoplaszt illetve a vakuolum is.

4. A TMV fertőzött szisztemikus szerzett rezisztenciával rendelkező levelekben alacsonyabb az MDA[•] akkumuláció. Ugyanakkor a NahG-ben, ahol a nekrotikus léziók kiterjedése nagyobb, az MDA[•] mennyisége is nő a Xanthi-nc-hez képest. A rezisztenciával rendelkező levelekben mért alacsonyabb MDA[•] jel összefüggésben van a kisebb szövetnekrózissal.
5. Az elsődlegesen fertőzött sejtől kiindulva a nekrosis kifejlődése során a szuperoxid először csak néhány, a fertőzött sejttel szomszédos sejtben, majd később a fokozatosan táguló nekrosis körüli gyűrűben mutatható ki. A festődés gyűrűje megegyezik a vírus sejtről-sejtre terjedésének egyedi mintázatával.
6. A TNV körüli gyűrűből kiinduló hajszálerék is festődnek, ez a festődés specifikusan csak a fejlődő léziók környékén figyelhető meg, az előregedett léziókra már nem jellemző. Ez arra utal, hogy a szuperoxid gyök képződése összefüggésben van a vírus terjedésével és ugyanakkor a nekrotikus tünetek kialakulásával is.
7. A szuperoxid gyök csak a nekrozist szenvedő sejtekben mutatható ki, és csak a nekrozissal járó gazda – parazita kapcsolatokat jellemzi, a lokális klorózis és mozaik tünetek esetén nem mutatható ki szuperoxid felhalmozódás.
8. A sejthalál (Evans-kék festődés) is csak a nekrozissal járó tüneteket jellemzi, a klorotikus tünetek esetében nem tapasztaltuk a sejtek elhalását.
9. A hidrogén-peroxid termelődése nemcsak a gyűrűn belül figyelhető meg a nekrotikus kapcsolatoknál, hanem az ereken is, a lokális klorózis és a mozaik tünetek esetében nem mutatható ki hidrogén-

peroxid felhalmozódás, kivétel ez alól a ZYMV és az uborka kapcsolata, ahol kisebb, de a kontrollhoz képest jelentős mértékű a hidrogén-peroxid felhalmozódása.

10. Az antioxidáns enzimek aktivitásának növekedése lokálisan és szisztémikusan egyaránt az inkompatibilis kapcsolatokra jellemző.
11. A lokális és szisztémikus klorózis esetén az antioxidáns kapacitás nem a tünetek függvénye, hanem a kapcsolaté, azaz az abszolút kompatibilis kapcsolatot (SoMV / *Ch. quinoa*) nem jellemzik oxidatív folyamatok.

7. SUMMARY

Green plants, within certain limitations, can adapt to a wide variety of unfavourable conditions (such as drought, temperature changes, air pollution, infectious attacks). Stress metabolism in general is characterised by oxidative processes. The term oxidative stress is widely used in free-radical literature but it is rarely defined, in essence we can define it as a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance in favour of the former, leading to potential damage. Prooxidants, i.e. reactive oxygen species (ROS) are partly free radicals, as superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) or hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) and have unpaired shell electrons, or they are relatively stable molecules, but reactive as hydrogen peroxide (H_2O_2) or singlet oxygen (1O_2). The ROS are toxic intermediates that result from successive one-electron steps in the reduction of molecular oxygen to water. Reactive oxygen species causing oxidative stress can damage all types of biomolecules, including ribonucleic acids, proteins and lipids. ROS generated in healthy plant cells may become toxic if they are allowed to accumulate. To avoid their effect, cells have several mechanisms for detoxification of these species (Van Kuijk *et al.*, 1987). These processes include small molecule weight non-enzymatic antioxidants (ascorbate, glutathione, vitamin E, etc.), single enzymes (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, dehydroascorbate-reductase, glutathione S-transferase, glutathione reductase, catalase, peroxidase etc.), and more complex systems which scavenge ROS and efficiently protect the cellular compartments where they are localised.

Until now research on free radicals mostly focused on hypersensitive reaction and incompatible host-parasite interactions and hardly dealt with their role in compatible reactions. Data is especially limited in the case of antioxidants which keep a delicate balance with ROS. Thus our main aim was to increase our knowledge in this field.

Our results:

- The level of mono-dehydroascorbic radical ($\text{MDA}^\bullet$) rose in the virus infected leaves of Xanthi-nc and NahG tobacco plants. There was a several hundredfold increase compared to the controls. Increased steady state levels of the $\text{MDA}^\bullet$ in TMV-infected leaves indicate an imbalance between the production of $\text{MDA}^\bullet$ and its reduction to ascorbate.
- Elevated levels of $\text{MDA}^\bullet$ could be measured not only locally but systemically as well. There was a smaller but still significantly higher EPR signal level in the non-inoculated leaves distant from the site of inoculation than in the controls. This observation further supports the conclusions of Alvarez *et al.* (1998), that a local infection induces a systemic microoxidative burst in the distant uninfected parts of the plant. With the systemic increase in the amount of $\text{MDA}^\bullet$ in the uninoculated leaves necrotic symptoms on the inoculated leaves, appeared.
- EPR signals measured in light were bigger than those in dark, but their difference compared to the control plants did not change. Therefore, $\text{MDA}^\bullet$ production partially originates from the chloroplasts damaged by the TMV throughout the movement of

electrons first to oxygen and later to ascorbic acid. However, a significant portion of the TMV-induced MDA[•] signal was light independent, indicating that the production of ROS was not confined to the chloroplasts.

- Accumulation of MDA[•] was lower in the leaves that exhibit systemic acquired resistance infected with TMV. In contrast, in the NahG tobacco plants, where the size of necrotic lesions was bigger compared to the Xanthi-nc plants, amount of MDA[•] increased. We suggest that the lower the levels of MDA[•] measured in leaves having systemic acquired resistance signals, the lower the rate of tissue necrotization.
- Starting from the primarily infected cells together with the development of necrosis, superoxide first appeared in the neighbouring cells which later expanded in the form of a ring around the site of necrosis. The expansion of the stained rings was equivalent to the virus pattern spreading from cell to cell.
- Capillary vessels of leaves only stained along the developing but not the older lesions. This supports the proposition that the generation of superoxide radicals is correlate with both the spread of the virus and the development of necrotic symptoms.
- The accumulation of superoxide radicals could only be detected in decaying cells which terminate in necrosis and were recognised only in incompatible host-parasite interactions not in case of local chlorosis or mosaic symptoms.

- Cell death (Ewans-blue staining) is only typical in necrotic host-parasite interactions, not in chlorotic symptoms.
- Generation of hydrogen peroxide could also be detected in the veins of leaves not just inside the rings. However, there was no hydrogen peroxide accumulation in the case of local chlorosis or mosaic symptoms except in the interaction of cucumber and ZYMV where there was a relatively smaller accumulation but still significantly higher than in the control.
- Local or systemic increase in the activity of antioxidant enzymes was only typical of incompatible interactions.
- In case of the local or systemic chlorosis antioxidant capacity did not correlate with the symptoms but the interaction. In other words, the absolute compatible interaction (SoMV / *Ch. quinoa*) could not be described as an oxidative proces.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetem szeretném kinyilvánítani e pár sorral és gondolattal, mindazoknak, akik e munkával töltött évek során hozzájárultak annak megvalósulásához, esetleges sikeréhez. Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek Király Zoltánnak a dolgozat megvalósításának lehetőségéért, a közös munka során nyújtott segítségéért. Továbbá köszönöm az intézet minden munkatársának segítőkészségét, biztatását. Köszönet: Fodor Józsefnek közvetlen munkatársamnak, Gullner Gábornak, a Kórélettani Osztály munkatársainak, Hideg Évának a SZBK munkatársának az ESR spektroszkópos vizsgálatokban nyújtott segítségéért, továbbá Tóbiás Istvánnak és Kazinczy Gabriellának, hogy vírusizolátumaikkal bármikor a rendelkezésemre álltak, Csorba Ildikónak a növényeim nevelésért, Bakonyi Józsefnek az izolátumokért, és spóra szuszpenziókért, Kiss Leventének a mikroszkópos vizsgálatokban nyújtott segítségéért, Mayer Évának a gombatenyészetek felszaporításáért.

Sáradi Krisztinának, szakdolgozatos hallgatónak az uborkán végzett kísérletekben való közreműködését.

Végül, de nem utolsó sorban Barna Balázsnak, és Gáborjányi Richárdnak, többéves segítségét illetve a házi opponensi teendők plussz terhét külön köszönöm.

Köszönet és hála illeti családomat, hogy ez alatt az idő alatt türelemmel, megértéssel és szeretettel vettek körül, köszönöm, férjemnek Kecskés Mihálynak, valamint családom többi tagjának szüleimnek, testvéremnek és barátaimnak.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Ádám, A., Farkas, T., Somlyai, G., Hevesi, M. and Király, Z. (1989): Consequence of O_2^- generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34, 13-26.
- Aebi, H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Allan, A. C. and Fluhr, R. (1997): Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9, 1559-1572.
- Allen, R. D., Webb, R. and Schake, S. A. (1997): Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Rad. Biol. Med.* 23, 473-479.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P.-J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. and Lamb, C. (1998): Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773-784.
- Aono, M., Kubo, A., Saji, H., Natori, T., Tanaka, K. and Kondo, N. (1991): Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 32, 691-698.
- Aono, M., Saji, H., Sakamoto, A., Tanaka, K., Kondo, N. and Tanaka, K. (1995): Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. *Plant Cell Physiol.* 36, 1687-1691.
- Apostol, I., Heinstein, P. F. and Low, P. S. (1989): Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 90, 109-116.
- Asada, K. (1984): Chloroplast: formation of active oxygen and its scavenging. *In*: Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Vol. 105., Acad. Press, New York, pp. 422-429.
- Asada, K. (1992): Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85, 235-241.
- Asada, K. (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601-639.

- Auch, C. K. and Murphy, T. M. (1995): Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol.* 107, 1241-1247.
- Baker, C. J., Orlandi, E. W. and Mock, N. M. (1993): Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol.* 102, 1341-1344.
- Baker, C. J. and Mock, N. M. (1994): An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39, 7-12.
- Balázs, E., Barna, B. and Király, Z. (1976): Effect of kinetin on lesion development and infection sites in Xanthi-nc tobacco infected by TMV: Single-cell local lesions. *Acta Phytopath. Hung.* 11, 1-9.
- Bannister, J. V., Bannister, W. H. and Rotilio, G. (1987): Aspects of the structure, function and application of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22, 111-180.
- Barna, B., Ádám, A. and Király, Z. (1993): Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* 80, 420-422.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971): Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276-287.
- Bendahmane A., Kanyuka K. and Baulcombe D. C. (1999): The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11, 781-791.
- Bent, A. F., Innes, R. W., Ecker, J. R. and Staskawicz, B. J. (1992): Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5, 372-378.
- Bergstrom, G. C., Johnson, M. C. and Kuć, J. (1982): Effects of local infections of cucumber by *Colletotrichum lagenarium*, *Pseudomonas lachrymans*, or tobacco necrosis virus on systemic resistance to cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 72, 922-926.

- Bestwick, C. S., Brown, I. R., Bennett, M. H. R. and Mansfield, J. W. (1997): Localisation of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Cell* 9, 209-221.
- Bi, Y.-M., Kenton, P., Darby, R. and Draper, J. (1995): Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J.* 8, 235-245.
- Bielski, B. H. J. (1982): Chemistry of ascorbic acid radicals. In Seib, P. A. and Tolbert, B. M. (Eds.), *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses*. Advances in Chemistry Series, American Chemical Society, Washington D. C. pp. 81-100.
- Bolter, C., Brammall, R. A., Cohen, R. and Lazarovits, G. (1993): Glutathione alterations in melon and tomato roots following treatment with chemicals which induce disease resistance to *Fusarium* wilt. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42, 321-336.
- Bowler, C., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1992): Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83-116.
- Bowling, S. A., Guo, A., Cao, H., Gordon, S., Klessig, D. F. and Dong, X. (1994): A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1845-1857.
- Bozarth, R. F. and Ross, A. F. (1964): Systemic resistance induced by localised virus infections: extent of changes in uninfected plant parts. *Virology* 24, 446-455.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principles of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Bradley, D. J., Kjellbom, P. and Lamb, C. J. (1992): Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein – a novel, rapid defense response. *Cell* 70, 21-30.
- Broadbent, P., Creissen, G. P., Kular, B., Wellburn, A. R. and Mullineaux, P. (1995): Oxidative stress responses in transgenic tobacco containing altered levels of glutathione reductase activity. *Plant J.* 8, 247-255.

- Cadenas, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 79-110.
- Chaerle, L., Caeneghem, W. V., Messens, E., Lambers, H., Van Montagu, M. and Van Der, Straeten, D. (1999): Presymptomatic visualization of plant-virus interaction by thermography. *Nature Biotech.* 17, 813-816.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Camp, W. (1996): Transgenic tobacco with a reduced catalase activity developed necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant J.* 10(3), 491-503.
- Chen, Z. X., Malamy, J., Henning, J., Conrath, U., Sanchezcasas, P., Silva, H., Ricigliano, J. and Klessig, D. F. (1995): Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defence responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4134-4137.
- Chester, K. S. (1933): The problem of acquired physiological immunity in plants. *Q. Rev. Biol.* 8, 275-324.
- Chivasa, S., Murphy, A. M., Naylor, M. and Carr, J. P. (1997): Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. *Plant Cell* 9, 547-557.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483.
- Cole, A. B., Király, L., Ross, K. and Schoelz, J. E. (2001): Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of *Nicotiana* species to cauliflower mosaic virus infection. *MPMI* 14, 31-41.
- Croft, K. P. C., Voisey, C. R. and Slusarenko A. (1990): Mechanism of hypersensitive cell collapse: Correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36, 49-62.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A. and Richberg, M. H. (1996): Death don't have no mercy: cell death programs in plant - microbe interactions. *Plant Cell* 8, 1793-1807.

- Dangl, J. and Holub, E. (1997): La dolce vita: a molecular feast in plant - pathogen interactions. *Cell* 91, 17-24.
- Darley-USmar, V., Wiseman, H. and Halliwell, B. (1995): Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS L.* 369, 131-135.
- Davis, B. J. (1964): Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* 121, 4044-4427.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. and Ryals, J. (1994): A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247-1250.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588.
- Dietrich, R. A., Delaney, T. P., Scott, I. U., Ward, E. R., Ryals, J. A. and Dangl, J. L. (1994): *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* 77, 565-577.
- Dixon, R. A., Harrison, M. J. and Lamb, C. J. (1994): Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 479-501.
- Doke, N. (1983): Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant. Pathol.* 23, 345-357.
- Doke, N. and Ohashi, Y. (1988): Involvement of an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32, 163-175.
- Durner, J. and Klessig, D. F. (1995): Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defence response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11312-11316.
- Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, D. F. (1998): Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10328-10333.

- Elstner, E. F. and Frommeyer, D. (1978): Production of hydrogen peroxide by photosystem II of spinach chloroplast lamellae. *FEBS L.* 86, 143-146.
- Elstner, E. F. and Osswald, W. (1994): Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *In*: Crawford, R. M. M., Hendry, G. A. F. and Goodman, B. A. (Eds.), *Oxygen and environmental stress in plants*. Proc. Royal Society Edinburgh 1994. 102B
- El-Zahaby, H. M. (1995): Role of reactive oxygen species and antioxidants in plant pathology. PhD Thesis, Plant Protection Institute of Hungarian Academy of Sciences, Budapest
- Ernst, L. (1986): Oxygen as an environmental poison. *Chemica Scripta* 26, 525-534.
- Farkas, G. L., Király, Z. and Solymosi, F. (1960): Role of oxidative metabolism in the localization of plant viruses. *Virology* 12, 408-421.
- Fauth, M., Merten, A., Hahn, M., G., Jeblick, W. and Kaus, H. (1996): Competence for elicitation of H₂O₂ in hypocotyls of cucumber is induced by breaching the cuticle and is enhanced by salicylic acid. *Plant Physiol.* 110, 347-354.
- Federico, R. and Angelini, R. (1986): Occurrence of diamine oxidase in the apoplast of pea epicotyls. *Planta* 167, 300-302.
- Fodor, J., Gullner, G., Ádám, A. L., Barna, B., Kömives, T. and Király, Z. (1997): Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco: Role in systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 114, 1443-1451.
- Foyer, C. H. and Halliwell, B. (1976): The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21-25.
- Foyer, C. H., Lelandais, M. and Kunert, K. J. (1994): Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92, 696-717.
- Fraser, R. S. S. (1979): Systemic consequences of the local lesion reaction to tobacco mosaic virus in a tobacco variety lacking the *N* gene for hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 14, 383-394.
- Fridovich, I. (1974): Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 44, 35-97.

- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. (1993): Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261, 754-756.
- Gestelen, P. V., Asard, H. and Caubergs, R. J. (1997): Solubilization and separation of a plant plasma membrane NAD(P)H-O₂[•] synthase from other NAD(P)H oxidoreductases. *Plant Physiol.* 115, 543-550.
- Glazener, J. A., Orlandi, E. W. and Baker, C. J. (1996): The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol.* 110, 759-763.
- Gönner, M. and Schlösser, E. (1992): Effect of radical scavengers on pathogenesis in the host-parasite-system *Avena sativa* - *Drechslera avenae*. *J. Plant Dis. Prot.* 99, 617-625.
- Greenberg, J. T. (1997): Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 525-545.
- Guedes, M. E., Richmond, S. and Kuć, J. (1980): Induced systemic resistance to anthracnose in cucumber as influenced by the location of the inducer inoculation with *Colletotrichum lagenarium* and onset of flowering and fruiting. *Physiol. Plant Pathol.* 17, 229-233.
- Gullner, G., Fodor, J. and Király, L. (1995): Induction of glutathione S-transferase activity in tobacco by tobacco necrosis virus infection and by salicylic acid. *Pest. Sci.* 45, 290-291.
- Gutteridge, J. M. C. and Halliwell, B. (1994): *Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Halliwell, B. and Foyer, C. H. (1978): Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* 139, 9-17.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999): *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition. Oxford University Press, New York.
- Hammerschmidt, R. and Kuć, J. (1982): Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiol. Plant Pathol.* 20, 61-71.

- Heber, U., Miyake, C., Mano, J., Ohno, C. and Asada, K. (1996): Monodehydroascorbate radical detected by electron paramagnetic resonance spectrometry is a sensitive probe of oxidative stress in intact leaves. *Plant Cell Physiol.* 37, 1066-1072.
- Hideg, É., Mano, J., Ohno, C. and Asada, K. (1997): Increased levels of monodehydroascorbate radical in UV-B-irradiated broad bean leaves. *Plant Cell Physiol.* 38, 684-690.
- Hille, R. and Massey, V. (1985): Molybdenum-containing hydroxylases: Xanthine oxidase, aldehyde oxidase, and sulfite oxidase. *In*: Spiro, G. (Ed.), *Molybdenum Enzymes*, T. John Wiley and Sons, New York, pp. 443-517.
- Hodgson, R. A. J., Beachy, R. N. and Pakrasi, H. B. (1989): Selective inhibition of photosystem II in spinach by tobacco mosaic virus: an effect of the viral coat protein. *FEBS Lett.* 245, 267-270.
- Horemans, N., Asard, H. and Caubergs, R. J. (1994): The role of ascorbate free radicals as an electron acceptor to cytochrome b-mediated trans-plasma membrane electron transport in higher plants. *Plant Physiol.* 104, 1455-1458.
- Horemans, N., Asard, H. and Foyer, C. H. (2000): Transport and action of ascorbate at plant plasma membrane. *Trends in Plant Science* 5, 263-267.
- Hossain, A. and Asada, K. (1984): Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol.* 25, 85-92.
- Hossain, A., Nakano, Y. and Asada, K. (1984): Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 25, 385-395.
- Ilyama, K., Lam, T. B.-T. and Stone, B. A. (1994): Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104, 315-320.
- Isaken, M (1991): Natural pigments. *In* Sherma, J and Fried, B (Eds.), *Handbook of Thin-layer Chromatography*, Chromatography Science Series, Vol 55. Marcel Dekler Inc. New York, USA, pp 625-663.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1997): Elicitor-stimulated ion fluxes and $O_2^{\bullet-}$ from the oxidative burst are essential

- components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4800-4805.
- Jacobson, M. D. (1996): Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* 21, 83-86.
- Jenns, A. and Kuć, J. (1979): Graft transmission of systemic resistance of cucumber to anthracnose induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 69, 753-756.
- Kaur-Sawhney, R., Flores, H. E. and Galston, A. W. (1981): Polyamine oxidase on oat leaves: a cell-wall localised enzyme. *Plant Physiol.* 68, 494-498.
- Kawano, T., Sahashi, N., Takahashi, K., Uozumi, N. and Muto, S. (1998): Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol.* 39, 721-730.
- Keppeler, L. D., Baker, C. J. and Atkinson, M. M. (1989): Active oxygen production during a bacteria induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells. *Phytopathology* 79, 974-978.
- Kim, C. H. and Palukaitis, P. (1997): The plant defense response to cucumber mosaic virus in cowpea is elicited by viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. *EMBO J* 13, 4060-4068.
- Király, Z., El-Zahaby, H. M. and Klement, Z. (1997): Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *J. Phytopathol.* 145, 59-68.
- Király, Z., El-Zahaby, H., Galal, A., Abdou, S., Ádám, A., Barna, B. and Klement, Z. (1993): Effect of oxygen free radicals on plant pathogenic bacteria and fungi and on some plant diseases. *In: Mózsik, Gy., Emerit, I., Fehér, J., Matkovics, B. and Vincze, Á. (Eds.), Oxygen Free Radicals and Scavengers in the Natural Sciences, Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 9-19.*
- Király, Z., Érsek, T., Barna, B., Ádám, A. and Gullner, G. (1991): Pathophysiological aspects of plant disease resistance. *Acta Phytopath. Entomol. Hung.* 26, 233-250.

- Király, Z., Hevesi, M. and Klement, Z. (1977): Inhibition of bacterial multiplication in incompatible host-parasite relationships in the absence of the hypersensitive necrosis. *Acta Phytopath. Hung.* 12, 247-256.
- Klapheck, S., Zimmer, I. and Cosse, H. (1990): Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 31, 1005-1013.
- Kogel, K.-H., Ortel, B., Jarosh, B., Schiffer, R. and Wasternack, C. (1995): Resistance in barley against the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) is not associated with enhanced levels of endogenous jasmonates. *Eur. J. Plant Pathol.* 101, 319-332.
- Krenitsky, T. A., Neil, S. M., Elion, G. B. and Hitchings, G. H. (1972): A comparison of the specificities of xanthin oxidase and aldehyde oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 150, 585-596.
- Kuč, J. (1982): Induced immunity to plant disease. *BioScience* 32, 854-860.
- Lamb, C. and Dixon, R. A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Lane, B. G., Dunwell, J. M., Ray, J. A., Schmitt, M. R. and Cuming, A. C. (1993): Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J. Biol. Chem.* 268, 12239-12242.
- Lawton, K., Uknes, S., Friedrich, L., Gaffney, T., Alexander, D., Goodman, R., Métraux, J.-P., Kessmann, H., Ahl-Goy, P., Gut-Rella, M., Ward, E. and Ryals, J. (1993): The molecular biology of systemic acquired resistance. *In*: Fritig, B. and Legrand, M. (Eds.), *Mechanism of Defence Responses in Plants*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 422-432.
- Lawton, K. A., Potter, S. L., Uknes, S. and Ryals, J. (1994): Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* 6, 581-588.
- Lee, H. I., Leon, J. and Raskin, I. (1995): Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4076-4079.
- Leon, J., Lawton, M. A. and Raskin, I. (1995): Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108, 1673-1678.

- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C. (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.
- Linthorst, H. J. M. (1991): Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10, 123-150.
- Macpherson, A. N., Telfer, A., Barber, J. and Truscott, T.G. (1993): Direct detection of singlet oxygen from isolated photosystem II reaction centres. *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 301-309.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F. and Raskin, I. (1990): Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250, 1002-1004.
- Malamy, J., Hennig, J. and Klessig, D. F. (1992): Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *Plant Cell* 4, 359-366.
- Marre, M. T., Amicucci, E., Zingarelli, L., Albergoni, F. and Marré, E. (1998): The respiratory burst and electrolyte leakage induced by sulfhydryl blockers in *Egeria densa* leaves are associated with H₂O₂ production and dependent on Ca²⁺ influx. *Plant Physiol.* 118, 1379-1387.
- Mauch, F. and Dudler, R. (1993): Differential induction of distinct glutathione S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102, 1193-1201.
- Mauch-Mani, B. and Slusarenko, A. J. (1994): Systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana* induced by a predisposing infection with a pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7, 378-383.
- Mauch-Mani, B. and Slusarenko, A. J. (1996): Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8, 203-212.
- Maxwell, D. P., Wang, Y. and McIntosh, L. (1999): The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8271-8276.
- Mehdy, M. C. (1994): Active oxygen species in plant defence against pathogens. *Plant Physiol.* 105, 467-472.

- Métraux, J.-P., Burkhart, W., Moyer, M., Dincher, S., Middlesteadt, W., Williams, S., Payne, G., Carnes, M. and Ryals, J. (1989): Isolation of a complementary DNA encoding a chitinase with structural homology to a bifunctional lysosyme/chitinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 896-900.
- Métraux, J.-P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Blum, W. and Inverardi, B. (1990): Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250, 1004-1006.
- Meuwly, P., Mölders, W., Buchala, A. and Métraux, J.-P. (1995): Local and systemic biosynthesis of salicylic acid in infected cucumber plants. *Plant Physiol.* 109, 1107-1114.
- Millar, A. H. and Day, D. A. (1997): Alternative solutions to radical problems. *Trends in Plant Science* 2, 289-290.
- Mittler, R., Shulaev, V., Sesar, M. and Lam, E. (1996): Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. *Plant Cell* 8, 1991-2001.
- Morre, J. D., Brightman, A. O., Davidson, M. and Crane, F. L. (1993): NADH oxidase activity of plasma membranes of soybean hypocotyls is activated by guanine nucleotides. *Plant Physiol.* 102, 595-602.
- Mortensen, A. and Skibsted, L. F. (1997): Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxil radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS L.* 417, 261-266.
- Mur, L. A. J., Bi, Y.-M., Darby, R. M., Firek, S. and Draper, J. (1997): Compromising early salicylic acid accumulation delays the hypersensitive response and increases viral dispersal during lesion establishment in TMV-infected tobacco. *Plant J.* 12, 1113-1126.
- Murakishi, H. H. and Carlson, P. S. (1976): Regeneration of virus-free plants from dark green islands of tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Phytopathology* 66, 931-932.
- Murphy, A. M., Chivasa, S., Singh, D. P. and Carr, J. P. (1999): Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends Plant Sci.* 4, 155-160.

- Nakano, Y. and Asada, K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Naylor, M., Murphy, A. M., Berry, J. O., and Carr, J. P. (1998): Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. *MPMI* 11, 860-868.
- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Ukness, S., Kessmann, H. and Ryals, J. (1995): Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.* 8, 227-233.
- Ninnemann, H. and Maier, J. (1996): Indications for the occurrence of nitric-oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem. Photobiol.* 64, 393-398.
- Ogawa, K., Kanematsu, S. and Asada, K. (1996): Intra- and extracellular localisation of „cytosolic” Cu,Zn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* 37, 790-799.
- Olson, P. D. and Varner, J. E. (1993): Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J.* 4, 887-892.
- Ori, N., Eshed, Y., Pinto, P., Paran, I., Zamir, D. and Fluhr, R. (1997): TAO1-A representative of the molybdenum cofactor containing hydroxylases from tomato. *J. Biol. Chem.* 272, 1019-1025.
- Parish, C. L., Zaitlin, M. and Siegel, A. (1965): A study of necrotic lesion formation by tobacco mosaic virus. *Virology* 26, 413-418.
- Peng, M. and Kuć, J. (1992): Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. *Phytopathology* 82, 696-699.
- Pennell, R. I. and Lamb, C. (1997): Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9, 1157-1168.
- Raskin, I., Skubatz, H., Tang, W. and Meeuse, B. J. D. (1990): Salicylic acid levels in thermogenic and nonthermogenic plants. *Ann. Bot.* 66, 369-373.
- Rasmussen, J. B., Hammerschmidt, R. and Zook, M. N. (1991): Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* 97, 1342-1347.

- Rathmell, W. G. and Sequeira, L. (1974): Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. *Plant Physiol.* 53, 317-318.
- Robinson, J. M. (1988): Does O₂ photoreduction occur within chloroplasts in vivo? *Physiol. Plant.* 72, 666-680.
- Ross, A. F. (1961a): Localised acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* 14, 329-339.
- Ross, A. F. (1961b): Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14, 340-358.
- Ross, A. F. (1966): Systemic effects of local lesion formation. *In*: Beemster, A. B. R. and Dijkstra, J. (Eds.), *Viruses of Plants*. North Holland, Amsterdam, pp. 127-150.
- Ryals, J., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. and Hunt, M. D. (1996): Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W. and Langebartels, C. (1998): Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends Plant Sci.* 3, 47-50.
- Schlee, D. (1992): *Ökologische Biochemie* (2 Auflage), Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Selye, J. (1975): *Bonckés alatt a kutatás. Kriterion könyvkiadó, Bukarest* 1975.
- Seo, S., Okamoto, M., Iwai, T., Iwano, M., Fukui, K., Isogai, A., Nakajima, N. and Ohashi, Y. (2000): Reduced levels of chloroplast FtsH protein in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive reaction. *Plant Cell* 12, 917-932.
- Seskar, M., Shulaev, V. and Raskin, I. (1998): Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. *Plant Physiol.* 116, 387-393.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Krishnamachari, R., Dixon, R. A. and Lamb, C. (1997): Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defence mechanisms. *Plant Cell* 9, 261-270.
- Shulaev, V., Silverman, P. and Raskin, I. (1997): Methyl-salicylate – an airborne signal in pathogen resistance. *Nature* 385, 718-721.
- Siefermann-Harms, D. (1987): The light harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* 69, 561-568.

- Sies, H. (1991): Oxidative Stress II. Oxidants and Antioxidants. Academic Press, London.
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Métraux, J.-P. and Raskin, I. (1995): Salicylic acid in rice: biosynthesis, conjugation and possible role. *Plant Physiol.* 108, 633-639.
- Smith-Becker, J., Marois, E., Huguet, E. J., Midland, S. L., Sims, J. J. and Keen, N. T. (1998): Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiol.* 116, 231-238.
- Stegmann, H. B., Schuler, P., Westphal, S. and Wagner, E. (1993): Oxidation stress of crops monitored by EPR. *Z. Naturforsch.* 48c, 766-772.
- Stein, A., Spiegel, S. and Loebenstein, G. (1985): Studies on induced resistance to tobacco mosaic virus in Samsun NN tobacco and changes in ribosomal fractions. *Phytopathol. Z.* 114, 295-300.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. and Métraux, J.-P. (1997): Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 235-270.
- Strobel, N. E. and Kuć, J. (1995): Chemical and biological inducers of systemic resistance to pathogens protect cucumber and tobacco plants from damage caused by paraquat and cupric chloride. *Phytopathology* 85, 1306-1310.
- Sutherland, M. W. (1991): The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 79-93.
- Szécsi, J., Ding, X., S., Lim, C.O., Bendahmane, M., Cho, M.J., Nelson, R.S. and Beachy, R.N. (1999): Development of tobacco mosaic virus infection sites in *Nicotiana benthamiana*. *MPMI* 12, 143-152.
- Sziráki, I., Balázs, E. and Király, Z. (1980): Role of different stresses in inducing systemic acquired resistance to TMV and increasing cytokinin level in tobacco. *Physiol. Plant Pathol.* 16, 277-284.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (Eds.) (1998): *Plant Physiology*, Sinauer Associates, Inc., Publisher, Sunderland, USA.

- Takahama, U., Hirotsu, M. and Oniki, T. (1999): Age-dependent changes in levels of ascorbic acid and chlorogenic acid, and activities of peroxidase and superoxide dismutase in the apoplast of tobacco leaves: Mechanism of the oxidation of chlorogenic acid in the apoplast. *Plant Cell Physiol.* 40, 716-724.
- Takusari, H. and Takahashi, T. (1979): Studies on viral pathogenesis in host plants. IX. Effect of citrinin on the formation of necrotic lesion and virus localization in the leaves of Samsun NN tobacco plants after tobacco mosaic virus infection. *Phytopathol. Z.* 96, 324-329.
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J. P. and Pugin, A. (1995): Involvement of free calcium in action of cryptogin, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol.* 109, 1025-1031.
- Tenhaken, R. and Rübel, C. R. (1997): Salicylic acid is needed in hypersensitive cell death in soybean but does not act as a catalase inhibitor. *Plant Physiol.* 115, 291-298.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D. B. (1997): Subcellular localization of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11, 1187-1194.
- Tolbert, N. E. (1981): Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 133-157.
- Tolbert, N. E., Oeser, A., Kisaki, T., Hageman, R. H. and Yamazaki, R. K. (1968): Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. *J. Biol. Chem.* 243, 5179-5184.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. and Ryals, J. (1992): Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4, 645-656.
- Uknes, S., Winter, A., Delaney, T., Vernooij, B., Morse, A., Friedrich, L., Nye, L., Potter, G., Ward, E. and Ryals, J. (1993): Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 692-698.
- Van Camp, W., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1999): H_2O_2 and NO redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Sci.* 3, 330-334.

- Van, Kuijk, F. J. G. M., Sevanian, A., Handelman, G. J. and Dratz, E. A. (1987): A new role for phospholipase A₂: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends Biochem. Sci.* 12, 31-34.
- Van Loon, L. C. and Van Kammen, A. (1970): Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN. *Virology* 40, 199-211.
- Van Loon, L. C., Pesold-Hurt, B. and Schatz, G. (1986): A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3820-3824.
- Van Loon, L. C. (1997): Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 753-765.
- Vera-Estrella, R., Blumwald, E. and Higgins, V. J. (1992): Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells. *Plant Physiol.* 99, 1208-1215.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jahwar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H. and Ryals, J. (1994): Salicylic acid is not the translocated signal responsible for systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6, 959-965.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P. and Ryals, J. (1991): Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- Westphal, S., Wagner, E., Knollmüller, M., Loreth, W., Schuler, P. and Stegmann, H. B. (1992): Impact of animotriazole and paraquat on the oxidative defence system of spruce monitored by monodehydroascorbic acid. *Z. Naturforsch.* 47c, 567-572.
- Weymann, K., Hunt, M., Uknes, S., Neuenschwander, U., Lawton, K., Steiner, H.-Y. and Ryals, J. A. (1995): Suppression and restoration of lesion formation in *Arabidopsis lsd* mutants. *Plant Cell* 7, 2013-2022.
- Wheeler, G. L., Jones, M. A. and Smirnoff, N. (1998): The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393, 365-369.

- White, R. F. (1979): Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99, 410-412.
- White, R. F., Antoniow, J. F., Carr, J. P. and Woods, R. D. (1983): The effects of aspirin and polyacrylic acid on the multiplication and spread of TMV in different cultivars of tobacco with and without the N-gene. *Phytopathol. Z.* 107, 224-232.
- Wise, R. R. and Naylor, A. W. (1987): Chilling enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.* 83, 278-282.
- Xiong, Z. (1999): Molecular plant virology. <http://ag.arizona.edu/~zxiong/plp611/>
- Yamaguchi, K., Mori, H. and Nishimura, M. (1995): A novel enzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol.* 36, 1157-1162.
- Yim, M.B., Chock, P.B. and Stadtman, E.R. (1990): Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5006-5010.
- Yu, D., Liu, Y., Fan, B., Klessig, D. F. and Chen, Z. (1997): Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato? *Plant Physiol.* 115, 343-349.
- Zhang, Z., Collinge, D. B. and Thordal-Christensen, H. (1995): Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J.* 8, 139-145.