



Citokiningénnel transzformált dohányvonal ellenállósága  
dohány nekrózis vírussal szemben

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Készítette: Pogány Miklós

Témavezető: Dr. Barna Balázs, az MTA doktora

Veszprémi Egyetem Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok  
Doktori Iskola

Iskolavezető: Dr. Horváth József, az MTA rendes tagja

**CITOKININGÉNNEL TRANSZFORMÁLT DOHÁNYVONAL  
ELLENÁLLÓSÁGA DOHÁNY NEKRÓZIS VÍRUSSEL  
SZEMBEN**

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Készült a Veszprémi Egyetem Növénytermesztési  
és Kertészeti Tudományok Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Barna Balázs

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton ..... % -ot ért el,

Keszthely, 2001. november 23.

Dr. Horváth József  
a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: ..... igen / nem

.....  
(aláírás)

Bíráló neve: ..... igen / nem

.....  
(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján ..... % -ot ért el

Keszthely,

.....  
A Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése .....

.....  
Az EDT elnöke

## TARTALOMJEGYZÉK

### KIVONAT, SUMMARY, ZUSAMMENFASSUNG

|        |                                                                                                       |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | BEVEZETÉS                                                                                             | 5  |
| 2.     | IRODALMI ÁTTEKINTÉS                                                                                   | 7  |
| 2.1.   | A növény élettani állapota: a juvenilitás és az öregedés fogalma                                      | 7  |
| 2.2.   | Az élettani állapot és a betegségellenállóság összefüggése                                            | 10 |
| 2.2.1. | A biotrófia és a nekrotrófia fogalma                                                                  | 10 |
| 2.2.2. | Az élettani állapot hatása a növényvírusok által okozott nekrotikus tünetekre                         | 11 |
| 2.3.   | A nekrotikus betegségtünetek és a reaktív oxigénfajták kapcsolata                                     | 13 |
| 2.3.1. | A reaktív oxigénfajták felszaporodása: a nekrotikus tünetekkel együtt járó jelenség                   | 13 |
| 2.3.2. | Antioxidánsok: a reaktív oxigénfajták méregtelenítése                                                 | 16 |
| 2.3.3. | Miként járulhatnak hozzá a kórfolyamat során képződő reaktív oxigénfajták a sejthalál kialakulásához? | 19 |
| 2.4.   | A szeneszscencia, a reaktív oxigénfajták és a lipidperoxidáció összefüggése                           | 25 |
| 2.5.   | A citokininek kémiai szerkezete, elnevezésük és növényélettani szerepük                               | 29 |
| 2.6.   | Külső citokinin kezelések hatása a növények vírusfogékonyságára                                       | 31 |
| 2.7.   | Példák citokinin-túlermelő, izopentenil-transzferáz génnel transzformált növényvonalak előállítására  | 35 |

|        |                                                                                                            |    |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.8.   | A nekrotikus vírustünetek és az etilénképződés kapcsolata                                                  | 38 |
| 2.9.   | Kórfolyamatfüggő fehérjék: kitinázok és $\beta$ -1,3-glükanázok                                            | 39 |
| 2.10.  | A fertőzésekhez használt kórokozó: dohány nekrosis vírus                                                   | 40 |
| 3.     | CÉLKITŰZÉSEK                                                                                               | 42 |
| 4.     | ANYAG ÉS MÓDSZER                                                                                           | 44 |
| 4.1.   | A kísérleti növények                                                                                       | 44 |
| 4.2.   | A növények fertőzése                                                                                       | 44 |
| 4.3.   | Izopentenil-adenozin és zeatin-ribozid típusú citokininek mennyiségi meghatározása szerológiai úton        | 45 |
| 4.3.1. | Citokininek kivonása növényi mintából                                                                      | 45 |
| 4.3.2. | A citokininek kvantitatív meghatározásához használt ELISA módszer                                          | 45 |
| 4.4.   | TNV köpenyfehérje-tartalom mérés DAS-ELISA módszerrel                                                      | 47 |
| 4.5.   | Klorofilltartalom becslése Minolta SPAD-502 készülékkel                                                    | 48 |
| 4.6.   | Etán és etilén mérése gázkromatográffal                                                                    | 49 |
| 4.7.   | Kitináz és $\beta$ -1,3 glükanáz aktivitás fotometriás meghatározása                                       | 50 |
| 4.7.1. | Növényi minták extrakciója és fehérjetartalom meghatározása kitináz és $\beta$ -1,3 glükanáz mérés céljára | 50 |
| 4.7.2. | Kitinázaktivitás mérés mikrotiterlemezen                                                                   | 50 |
| 4.7.3. | $\beta$ -1,3 glükanáz aktivitás mérés mikrotiterlemezen                                                    | 51 |
| 4.8.   | Levágott dohánylevélen végzett kísérletek                                                                  | 52 |
| 4.8.1. | A levágott levelek előkészítése                                                                            | 52 |
| 4.8.2. | Levéلكorongok membránpermeabilitásának vizsgálata konduktométerrel                                         | 53 |

|        |                                                                                                       |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.8.3. | Levágott levelek antioxidáns enzimaktivitásainak fotometriás mérése                                   | 53 |
| 4.8.4. | Aszkorbinsavtartalom fotometriás meghatározása levágott levelekben                                    | 55 |
| 4.8.5. | Glutationtartalom fotometriás mérése                                                                  | 56 |
| 4.9.   | A kísérleti adatok statisztikai értékelése                                                            | 57 |
| 5.     | EREDMÉNYEK                                                                                            | 58 |
| 5.1.   | Az izopentenil-transzferáz génnel transzformált dohány-növények fejlődési és morfológiai sajátosságai | 58 |
| 5.2.   | Citokininek ELISA vizsgálata                                                                          | 59 |
| 5.3.   | A dohány nekrosis vírus tünetei és a köpenyfehérje-tartalom alakulása                                 | 60 |
| 5.4.   | Klorofilltartalom változás dohány nekrosis vírussal fertőzött levelekben                              | 62 |
| 5.5.   | Etilén és etán kibocsátás                                                                             | 63 |
| 5.6.   | $\beta$ -1,3-glükanáz és kitináz aktivitások                                                          | 65 |
| 5.7.   | Fertőzetlen, levágott dohányleveleken végzett kísérletek                                              | 66 |
| 5.7.1. | Levágott SR1 és CTKm levelek klorofilltartalom-változása és etilén termelésük                         | 66 |
| 5.7.2. | Vezetőképesség-mérés és antioxidánsok vizsgálata                                                      | 70 |
| 6.     | KÖVETKEZTETÉSEK                                                                                       | 74 |
| 7.     | ÖSSZEFOGLALÁS                                                                                         | 87 |
|        | NEW RESULTS                                                                                           | 91 |
|        | IRODALMI HIVATKOZÁSOK                                                                                 | 93 |
|        | Köszönetnyilvánítás                                                                                   |    |

**Citokiningénnel transzformált dohányvonal ellenállósága  
dohány nekrosis vírussal szemben  
(Kivonat)**

A növényi szerv öregedése az élettani állapot változását vonja maga után. Ez a folyamat a növény által termelt növekedésszabályozó anyagok (auxin és származékai, gibberellinek, citokininek, etilén, abszcisszinsav, jázmonsav, stb.) kölcsönhatásának az eredménye. Az élettani állapot jelentősen befolyásolja a növényvírusok iránti fogékonyságot is, amit korábban főképp növekedésszabályozó anyagokkal külsőleg kezelt növényeken vizsgáltak.

A doktori munka citokinintútermelő dohányvonal (CTKm) dohány nekrosis vírussal (TNV) szemben mutatott ellenállóságával foglalkozik. A CTKm dohányba a citokininek bioszintézisében kulcsszerepet játszó *ipt* (izopentenil-transzferáz) -gént ültették be. A transzformált növények magasabb citokinintartalmát újonnan kifejlesztett immunanalitikai módszerrel igazoltuk: kompetitív-indirekt, rögzített-antigénalapú ELISA technikával.

Munkánk során megállapítottuk, hogy a TNV-vel inokulált CTKm dohány levelein kevesebb nekrotikus lézió fejlődött ki, mint a kontroll növényeken. A CTKm növények TNV-vel fertőzött leveleiben a köpenyfehérje-tartalom is alacsonyabb volt a kontrollhoz képest, ami arra utalt, hogy a citokininek visszaszorították a kórokozó replikációját is. A CTKm növények a TNV-fertőzést követően kevesebb etilént és lényegesen kevesebb etánt termeltek, amiből arra következtettünk, hogy az *ipt*-gén által okozott juvenilitás növelte a növények stressztoleranciáját és gátolta a

vírusfertőzés nyomán fellépő lipidperoxidációt. Megállapítottuk, hogy a TNV fertőzését követően két – PR-proteinként számon tartott – enzim, a kitináz és a  $\beta$ -1,3-glükanáz aktivitásának növekedése valószínűleg nem játszott szerepet a CTKm dohány TNV-vel szembeni ellenállóságában. A kitináz aktivitása mind a CTKm, mind a kontroll növényekben egyforma mértékben emelkedett, a glükanáz aktivitása pedig a kontroll növényekben nőtt erősebben, tehát inkább a tünetek intenzitásával mutatott összefüggést, nem a rezisztenciával. Kimutattuk, hogy a CTKm dohány egészséges, levágott leveleiben négy vizsgált antioxidáns enzim közül három (a glutathion S-transzferáz, az aszkorbinsav-peroxidáz és a kataláz) aktivitása jelentősen meghaladta a kontroll növényekről származó levelek aktivitását, ugyanezt tapasztaltuk az aszkorbinsav tartalommal kapcsolatban is. Megállapítható tehát, hogy az *ipt*-gén beépítése magasabb antioxidáns kapacitást biztosított a transzformált növények számára, ami részben választ adott a TNV által okozott nekrotikus léziókkal szemben mutatott ellenállóságra. Tekintettel arra, hogy a reaktív oxigén fajták lipidperoxidációt okozva a membránokat károsítják és ez által fontos szerepet játszanak a nekrosis kialakulásban, a reaktív oxigéneket méregtelenítő antioxidánsok védelmet nyújthatnak a membránlipidek számára. Az antioxidánsok szerepét támasztotta alá a CTKm levélkorongok sejteinek kisebb ionkiáramlása is, ami arra utalt, hogy a juvenilis szövetekben a membránok kevésbé sérültek, elektrolit-visszatartó képességük jobb volt.

A doktori munkában elsőként vizsgáltunk vírusfogékonyság szempontjából citokinint túltermelő növényt. Kísérleteink részben megerősítették a



citokininekkel külsőleg kezelt növényeken szerzett tapasztalatokat, részben kiegészítették azokat.

**Tobacco necrosis virus resistance of cytokinin gene transformed  
tobacco line  
(Summary)**

Tobacco necrosis virus (TNV) resistance of a cytokinin overproducing tobacco line (CTKm) transformed with the *ipt* (isopentenyl transferase) gene was studied. Higher level of cytokinins in CTKm tobacco was confirmed by competitive-indirect ELISA. The number of the TNV induced necrotic lesions as well as the virus coat protein content were significantly lower in case of the CTKm tobacco compared to the control. TNV infected CTKm leaf disks produced less ethylene and ethane which indicated higher stress tolerance and lower level of lipid peroxidation. The activity of three antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase, glutathione S-transferase, catalase) and the amount of the non-enzymatic antioxidant ascorbic acid were markedly higher in healthy CTKm tobacco leaves. Increased antioxidant capacity may inhibit the process of lipid peroxidation, and hence explains partially the resistance of the CTKm tobacco against the necrosis development induced by TNV.

**Tabaknekrosevirus-Resistenz einer transgenen Tabaklinie  
mit erhöhtem Zytokiningehalt  
(Zusammenfassung)**

Die Tabaknekrosevirus-Resistenz einer zytokininüberproduzierenden Tabaklinie (CTKm), die mit dem ipt (Isopentenyl-Transferase) Gen transformiert ist, wurde untersucht. Der erhöhte Zytokiningehalt der Transformanden wurde mit einem kompetitiv-indirektem ELISA bestimmt. Bei den CTKm Pflanzen waren sowohl die Anzahl von virusinduzierten Nekrosen als auch der virale Hüllproteingehalt niedriger. Die TNV-infizierten Blattscheiben der CTKm Linie produzierten weniger Ethylen und Ethan, was die höhere Stresstoleranz und den geringeren Grad der Lipidperoxidation des CTKm Tabaks anzeigte. Die Aktivität von 3 antioxidativen Enzymen (Ascorbat-Peroxidase, Glutathion-S-Transferase, Katalase) und die Ascorbinsäurekonzentration in gesunden CTKm Tabakblättern war signifikant höher als in den Blättern der gesunden Kontrollpflanzen. Die erhöhte antioxidative Kapazität kann den Prozess der Lipidperoxidation hemmen und erklärt somit zum Teil die Resistenz der CTKm Tabakpflanzen gegenüber der Entwicklung von virusinduzierten Nekrosen.

## 1. BEVEZETÉS

A növény növekedését és fejlődését irányító növekedésszabályozó anyagoknak (hormonoknak) jelentős a szerepe a növény-kórokozó kölcsönhatásokban is. Számos megfigyelés támasztja alá ezt a megállapítást, példaként a következőket említjük:

Rozsdafertőzött bab és lóbab levelekben megnő a citokininek mennyisége (Király és munkatársai, 1967). Dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic tobamovirus*; *TMV*) fertőzésére hiperszenzitív módon reagáló dohány etilénképzése a vírus okozta léziók megjelenésével párhuzamosan fokozódik (Balázs és munkatársai, 1969). Fiziológias koncentrációban adagolt jázmonsavval teljesen vissza lehet szorítani a fehérhere mozaik vírus (*White clover mosaic potexvirus*; *WCIMV*) replikációját babnövényekben (Clarke *et al.*, 1998). Tehát a növényi hormonok anyagcseréje a beteg növényben jelentősen megváltozik, illetve hormonkezelésekkel befolyásolni lehet a betegségek alakulását.

Az elmúlt fél évszázadban a növényvirológia területén nagyon sok tudományos közlemény született a növények élettani állapota és a vírusok iránti fogékonyság összefüggéséről (Mahadevan, 1984; Goodman, 1991). Ezek között számos olyan munkát találunk, ami a citokininek vírusherőzésekre gyakorolt hatásával foglalkozik, témája alapján ide sorolható ez a dolgozat is. Vizsgálataink azonban a korábbiakhoz képest több módszertani újdonságot tartalmaznak. A hagyományos módszertani megközelítés szerint a növényeket külsőleg kezelték különböző citokininek oldatával. Ilyenkor nem lehetett pontosan tudni, hogy a levél felületére juttatott

citokininből mennyit vett fel a növény. Bizonytalanságot okozott az is, hogy a citokininkezelés és a kontroll növények vírustartalmát bioteszttel hasonlították össze, ami nem adott megbízható eredményt a citokininek vírusreplikációt befolyásoló hatására vonatkozóan.

Munkánk legfőbb különbségeit abban látjuk, hogy:

1. Külső citokininkezelés helyett egy citokiningénnel transzformált dohányvonallal (CTKm) dolgoztunk. 2. A CTKm és a kontroll dohányvonalak citokinintartalma közötti eltérést kompetitív-indirekt, rögzített-antigénalapú ELISA módszer segítségével határoztuk meg, tehát pontosan ismertük, hogy a transzgenikus vonal mennyivel tartalmaz több citokinint, mint a kontroll. 3. A vírusrészecskét is szerológiai úton vizsgáltuk, ami objektívebb eredményt nyújtott, mint ha a klasszikus gyakorlatnak megfelelően biotesztet használtunk volna erre a célra.

A korábbiakhoz képest előrelépésnek tartjuk, hogy a vírusok iránti eltérő fogékonyság fiziológiai hátterére vonatkozóan is új eredménnyel tudunk szolgálni. Olyan, ezt megelőzően ebben az összefüggésben nem vizsgált növényélettani jelenségeket követtünk nyomon, mint például a lipidperoxidáció szintjét jelző etán képződése, különböző antioxidáns enzimek aktivitásának és nem enzimtermészetű antioxidánsok mennyiségének az alakulása, vagy két, PR-proteinként ismert enzim aktivitásának változása.

A doktori értekezés témaválasztásának jelentőségét és időszerűségét mi sem bizonyítja jobban, mint az a tény, hogy jóllehet az elmúlt években számos citokinin-útermelő transzformált növényi vonalat sikerült előállítani, ezek virológiai, sőt általában növénykórtani vizsgálatáról – két

általunk ismert kivételtől eltekintve (Storti *et al.*, 1994, Bettini *et al.*, 1998) – nem készült jelentős közlemény.

A doktori munkával kapcsolatban megfogalmazott részletes célkitűzéseinket a 3. "Célkitűzések" című fejezetben, pontokba szedve foglaltuk össze.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A növény élettani állapota: a juvenilitás és az öregedés fogalma

Az egyéves növények életciklusa a mag csírázásától számítva egy tenyészidőszak alatt megy végbe, egyedfejlődésük erre az időtartamra korlátozott. Ez az időben behatárolt egyedfejlődési folyamat egymást követő szakaszokból áll (csírázás, vegetatív növekedés és fejlődés, virágzás, termésképzés és -érés), amely együtt jár a növényi szövetek élettani állapotának dinamikus változásával. Az élettani állapot lehet juvenilis (fiatal), vagy szenescens (idős), aminek alakulását a növény által termelt különböző növekedésszabályozó anyagok nagymértékben befolyásolják. Juvenilitást okozó növekedésszabályozó anyagok az indol-3-ecetsav (auxin) és származékai, a gibberellinek, a citokininek, a brasszinoszteroidok és a poliaminok. Szenescenciát idéznek elő az etilén, az abszcisszinsav és a jázmonsav (Kende és Zeevart, 1997; Creelman és Mullet, 1997). A juvenilis élettani állapotot a sejtek intenzív nukleinsav-, fehérje- és lipidszintézise, a gyors sejtosztódás, és a tápelemek (szén, nitrogén, foszfor, kálium, egyéb ásványi anyagok) felhalmozása

jellemzi, míg a szenescenciát ezekkel ellentétes irányú folyamatok kísérik. A növényi szenescenciát vizsgálva el kell választani egymástól a levelek öregedését és a teljes növényegyed öregedését. Ezt jól szemlélteti egy lombhullató fa leveleinek és az egész növénynek a kapcsolata. Az öregedés ilyen két különböző megnyilvánulási formája figyelhető meg az egyéves lágyszárú növények esetében is. Itt a levelek öregedése fokozatos (az alsó levelek öregszenek vagy már el is haltak, a felsők ezzel szemben még juvenilisek), azonban a növényegyed életciklusának végét jelentő generális öregedés csak később, a terméséréssel megközelítőleg egy időben következik be.

A levél fejlődése időben előre haladva három szakaszra osztható fel. Kezdetben a levél gyors növekedési fázison megy keresztül, tápelemeket halmoz föl, intenzív fehérjeszintézist folytat egészen addig, amíg el nem éri teljes kifejléttségét és fotoszintetikus aktivitásának a csúcsát. Ezután viszonylag hosszú kiegyensúlyozott állapot következik, amelyben a fehérjék szintézise és lebomlása egyensúlyban van. A levél az intenzív fotoszintézis által hatékonyan járul hozzá a növényi szervezet további növekedéséhez és fejlődését biztosító asszimilációhoz. Az előállított szervesanyag tekintélyes része a növekedő, juvenilis állapotú szervekbe szállítódik. A levél életgörbéjének harmadik, befejező szakasza a külső vagy belső tényezők által elindított öregedés (Buchanan-Wollaston, 1997), amelyben a levél szervesanyag-mérlege (a fotoszintetizált és az ellélegzett szervesanyag mennyiségének különbsége) fokozatosan negatívvá válik. A sejtalkotók szintjén a szenescencia először a kloroplasztiszokban nyilvánul meg, membránrendszerük károsodik, a klorofill-protein komplexek felbomlanak, a klorofill- és a fehérjetartalom

külön-külön csökken, a levél elkezd sárgulni. Az endoplazmatikus retikulum és a riboszómák mennyisége – a fehérjeszintézis mértékével összhangban – szintén fokozatosan csökken. A sejtet felépítő makromolekulák (lipidek, fehérjék és nukleinsavak) lebontásában szerepet játszó néhány enzim aktivitása ugyanakkor növekszik. Ezek katalitikus aktivitása nyomán képződő kismolekulák (elsősorban szacharóz, glutamin és aszparagin) a juvenilis, fejlődésben lévő növényi részekbe szállítódnak (Buchanan-Wollaston, 1997). A növény tehát az előregedett levélből a számára értékes tápanyagokat mobilizálja és újrahasznosítja. A levélőregedésnek ezt a lényeges szerepét ismerve könnyebb megérteni, hogy az egész folyamat miért olyan programszerű és lépésről-lépésre pontosan szabályozott. Az öregedés katabolikus lépéseinek energiaigényét biztosító mitokondriumok és a sejtmag károsodása csupán a szenescencia végső stádiumában, a levél pusztulását közvetlenül megelőző szakaszban játszódik le, amit mérsékelt légzésnövekedés kísér. A levél légzésének ezt követő leállása a levél pusztulását jelzi (Pethő, 1993; Quirino *et al.*, 2000). Lényeges megjegyeznünk azt, hogy a növényi szervek szenescenciájával kapcsolatban több más fejlődési lépéshez és a növényi hiperszenzitív reakcióhoz hasonlóan igazolták, hogy a jelenség során programozott sejthalál megy végbe (Pennel és Lamb, 1997; Gan és Amasino, 1997; Yen és Yang, 1998).

## 2.2. Az élettani állapot és a betegségellenállóság összefüggése

### 2.2.1. A biotrófia és a nekrotrófia fogalma

A növény illetve növényi szerv (levél) élettani állapota jelentősen befolyásolja a betegségekkel szemben mutatott ellenállóságát. Tipikus biotróf gombakórokozók, mint a lisztharmat- és rozsdagombák a fiatal növényi szöveteket részesítik előnyben (Barna, 1995). Életmódjukra jellemző, hogy a megfertőzött növényi rész sejtjeit nem teszik tönkre, de a növény által előállított tápanyag jelentős részét saját életfolyamataik fenntartása céljára elvonják. Kimutatták, hogy citokinint termelve képesek gátolni a növényt abban, hogy a megbetegített levélből a tápanyagokat más (egészséges) részekbe szállítsa (Pozsár és Király, 1966).

A nekrotróf életmódot folytató növénykórokozó gombák viszont toxintermeléssel (pl. *Alternaria*, *Cochliobolus* vagy *Fusarium* fajok), vagy sejtfalbontó enzimek, így poligalakturonázok, hemicellulázok és cellulázok kibocsátásával (pl. a *Botrytis*, a *Colletotrichum*, a *Penicillium*, vagy a *Sclerotinia* nemzetség bizonyos tagjai) a megfertőzött növényi szövet sejtjeit elpusztítják, és az elhalt sejtekből fedezik tápanyagszükségletüket (Manners, 1993). A nekrotróf gombák fertőzése iránt ezért főként a már öregedésben lévő növényi részek mutatnak fogékonytságot (Barna, 1995). Dohány-növények alsó, szeneszicens levelei fogékonyabbnak bizonyultak *Alternaria alternata* és *Botrytis cinerea* fertőzése, valamint a fuzarinsav (*Fusarium* fajok által termelt nem-gazdaspecifikus toxin) okozta szöveti károsodás iránt, mint a felső, juvenilis élettani állapotú levelek. További kísérletekkel azt is sikerült igazolni, hogy a felső



levelekből kivágott levélszeletek lényegesen ellenállóbbak pektináz és celluláz sejtfalbontó enzimeknek, mint az öregedő, alsó levelekből származó levélszeletek (Barna és Györgyi, 1992).

#### 2.2.2. Az élettani állapot hatása a növényvírusok által okozott nekrotikus tünetekre

A növényvírusok – az előbbi gombák világából vett példákkal szemléltetett gondolatmenetet folytatva – nyilvánvalóan biotróf (obligát) parazita kórokozók, hiszen önálló anyagcserével nem rendelkeznek, replikálódni is kizárólag a gazdaszervezet élő sejtjében, annak nukleinsav- és fehérjeszintézisét felhasználva képesek, tehát az aktív metabolizmust folytató növényi sejt létszükséglet számukra.

Bizonyos vírus-gazda kapcsolatok esetében azonban a vírusrészecskék behatolását a növény részéről felismerési reakció, majd sejt kollapszus követi, ami lokális nekrotikus léziók megjelenéséhez vezet. A jelenséget az inkompatibilis gomba - növény kölcsönhatásokkal mutatott nagyfokú hasonlósága miatt Stakman (1915) után gyakran hiperszenzitív reakciónak is nevezik. Hangsúlyozni kell azonban, hogy hiperszenzitív reakcióról csak olyan növény-kórokozó kölcsönhatások esetében beszélhetünk, ahol ugyanannak a növény- és kórokozó fajnak létezik kompatibilis (normoszenzitív) kapcsolata is, és ez utóbbi a két faj kölcsönhatásának jellemző megnyilvánulási formája. Ezt a terminológiai megkülönböztetést szem előtt tartva a hiperszenzitív reakció fogalmát olyankor használjuk, amikor az tényleg megfelel ennek a követelménynek. Egyéb esetekben az általánosabb nekrózis (nekrotikus lézió,

nekrotikus tünet) kifejezést használjuk. Növényvírus által kiváltott hiperszenzitív reakcióra kézenfekvő példa a növényvirológiában gyakori modellként szereplő – *Nicotiana glutinosa* -ból származó "N" - rezisztencia gént hordozó – Xanthi-nc és Samsun NN dohányfajták és a TMV kapcsolata. Ebben a növény-kórokozó kapcsolatban a TMV fertőzésének jellemző megnyilvánulási formája a legtöbb *Nicotiana tabacum* fajtán a szisztemikus mozaiktünet, az "N" -génnel rendelkező fajták azonban lokális léziókat képeznek a fertőzés helyén, és a betegség ezután nem képes szisztemizálódni. Az értekezés vizsgálataiban használt dohány nekrosis vírus (*Tobacco necrosis necrovirus; TNV*) - dohány kölcsönhatás esetében viszont nem beszélhetünk hiperszenzitív reakcióról, az is kérdéses, hogy egyáltalán kompatibilis vagy inkompatibilis kapcsolatról van-e szó. Tekintettel arra, hogy a TNV jellemző tünete a gazdanövények döntő többségén a lokális nekrotikus lézió (és szisztemikus megbetegedést csak elvétve okoz), elvileg nevezhetjük ezt a kölcsönhatást kompatibilisnek, a növényben lejátszódó élettani folyamatok azonban mégis nagyon közel állnak a hiperszenzitív reakció jelenségéhez. Ezért az irodalmi áttekintés további fejezeteiben gyakran szerepelnek majd példaként a témával összefüggésben álló klasszikus hiperszenzitív reakciót mutató növény-vírus kapcsolatok. Meg kell jegyezni, hogy a TNV természetes úton a különböző gazdanövények föld alatti részeit (gyökérszetét, hagymáit) fertőzi, a levél mechanikai inokulációja tehát eleve csak a virológusok által teremtett mesterséges fertőzési helyzet.

Az eredeti gondolatmenethez visszatérve a növényvírusok kétségtelenül biotróf kórokozók. A nekrotikus tünetekkel járó vírusfertőzések szimp-tómaíit azonban a növény élettani állapota paradoxnak tűnő módon

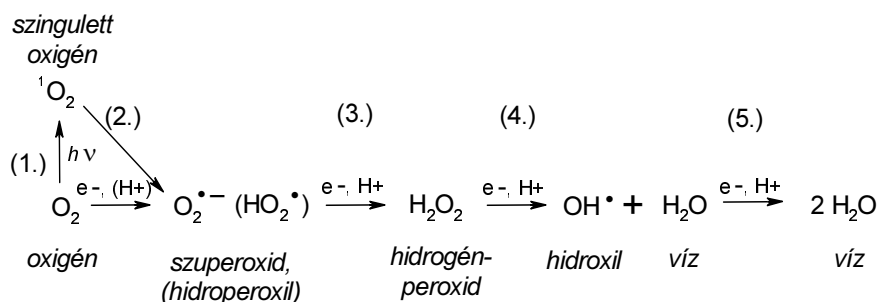
befolyásolhatja. Ennek igazolására példaként felhozható az a tény, hogy a Xanthi-nc dohány alsó, idősödő levelei – amikben a fehérjeszintézis mértéke ( $^{35}\text{S}$ -cisztein és  $^{14}\text{C}$ -glicin beépülésének vizsgálata alapján) már jelentősen visszaszorul – lényegesen több nekrotikus léziót képeznek a TMV-vel való fertőzés nyomán, mint a felső, juvenilis levelek (Király, 1968; Takahashi, 1972). Más példaként említhető az, hogy dohánynövények leveleiben a csúcsrügy előzetes eltávolításával csökkenteni lehet egy ezt követő TMV fertőzés által okozott nekrotikus léziók számát a kontroll növényekhez képest (Király és munkatársai, 1968; Ádám és munkatársai, 1990). A csúcsrügy eltávolítása (dekapitálás) ugyanis az alsó állású, öregedő levelek citokinintartalmát újból megnöveli (Palmer *et al.*, 1981), serkenti a fehérje- és nukleinsav szintézisüket, tehát a már szeneszcens levelek ismételt visszafiatalodásához vezet (Mothes, 1960). Ezek alapján megállapítható az, hogy a növény élettani állapota jelentős befolyásoló tényező a nekrozissal járó vírustünetek kialakulásában.

### 2.3. A nekrotikus betegsértünetek és a reaktív oxigén fajták kapcsolata

#### 2.3.1. A reaktív oxigén fajták felszaporodása: a nekrotikus tünetekkel együtt járó jelenség

A nekrozissal végződő – gyakran inkompatibilis (hiperszenzitív) – növény-gomba, illetve növény-baktérium és növény-vírus kölcsönhatásokat különböző reaktív oxigén fajták (ROF) korai, sejthalált megelőző felszaporodása kíséri a megfertőzött növényi szövet sejtközötti járataiban és a

sejtekben (Mehdi, 1994; Baker és Orlandi, 1995; Hammond-Kosack és Jones, 1996; Hückelhoven *et al.*, 1999). A ROF kifejezés gyűjtőnév, amely oxigén szabadgyököket és egyéb, nem gyöktermészetű, fokozott reakcióképességet mutató oxigénszármazékokat foglal magában. Ilyenek többek között a triplett állapotú, kétatomos dioxidmolekulából ( $O_2$ ) energia bevitel hatására képződő, gerjesztett szingulett oxigén ( $^1O_2$ ), valamint az oxigénből egyelektronos redukciós lépésekkel keletkező szuperoxid gyök ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) és hidroxilgyök ( $OH^{\bullet}$ ) intermedierek (2.1. ábra).



2.1. ábra. Az oxigén aktiválása, reaktív oxigén fajták képződése (Eltner, 1982)

A kloroplasztisz és a mitokondrium elektrontranszport folyamatai során, tehát a növényi sejt normális működése közben is jelentős mennyiségű ROF termelődik.

A ROF nekrotikus tünetekkel kapcsolatos fokozott képződését a jelenség heveny lefolyása miatt oxidatív robbanásnak („oxidative burst”-nek) nevezik. Doke és Ohashi (1988) TMV-vel fertőzött Samsun NN dohánynövények levélkorongjaiban a nekrotikus léziók megjelenése előtt

**Megjegyzés:** Mehdy, M.C. (1994): Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105, 467-472.

**Megjegyzés:** Baker, C.J. and Orlandi E.W. (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 299-321

**Megjegyzés:** Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1996): Resistance gene dependent plant defence responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.

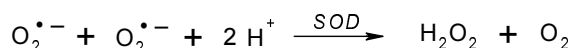
**Megjegyzés:** Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. and Kogel, K.-H. (1999): Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* 119, 1251-1260.

a szuperoxid szabadgyökök intenzív termelődését mérték, kimutatták továbbá a szuperoxid gyűrű alakú, sugárirányban terjedő felhalmozódását a léziók körüli, még ép szövetekben. Az oxidatív robbanás során felszaporodó ROF keletkezésének egyik feltételezett forrása a sejtmembránban található NAD(P)H oxidáz enzim, ami szuperoxid szabadgyököket ( $O_2^{\bullet-}$ ) termel az intercelluláris térben (Jabs, 1999). A szuperoxid gyökök spontán, vagy egy antioxidáns enzim, a szuperoxid-dizmutáz által katalizált dizmutációval hidrogén-peroxiddá ( $H_2O_2$ ) alakul (2.2. ábra), ami a plazmalemmán keresztül diffúzióval a sejtbe visszajutva sejthalált indukálhat (Levine *et al.*, 1994; Draper, 1997).

**Megjegyzés:** Jabs, T. (1999): Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.* 57, 231-245.

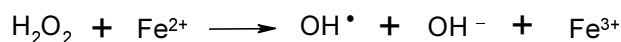
**Megjegyzés:** Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1994):  $H_2O_2$  from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. *Cell* 79, 583-593.

**Megjegyzés:** Draper, J. (1997): Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defense. *Trends Plant Sci.* 2, 162-165.



2.2. ábra. Hidrogén-peroxid képződése szuperoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ) dizmutációja útján;  
SOD = szuperoxid-dizmutáz

A ROF képződésének másik alternatívájaként sejtfalhoz kötött, pH-függő peroxidázok szerepét feltételezik (Bolwell *et al.*, 1995), amelyek aktivitása hidrogén-peroxid felhalmozódást okoz a sejtközötti térben. A reaktív oxigén fajtákon belül külön figyelmet érdemel a hidroxilgyök ( $OH^{\bullet}$ ), amely hidrogén-peroxidból keletkezik Fenton-reakcióval, redukált állapotú átmenetifémek ( $Fe^{2+}$ ) jelenlétében (2.3. ábra).



2.3. ábra. Fenton-reakció: hidroxilgyök ( $OH^{\bullet}$ ) képződése hidrogén-peroxidból

A hidroxilgyökök az élő sejtben képződő legaktívabb ROF. Az  $OH^{\bullet}$ ,  $H^+$ / $H_2O$  elektródreakció standardpotenciálja 2,31 V. Ez nagyon magas érték,

ami a hidroxilgyököt rendkívül erős oxidálószerre teszi. A sejtalkotó szerves makromolekulák roncsolódását előidéző gyökös láncreakciók elindításában a hidroxilgyöknek kulcsszerepet tulajdonítanak (Wojtaszek, 1997), ilyen a későbbiekben részletezett lipidperoxidáció is (2.4. ábra).

Levine és munkatársai (1994), Jabs és munkatársai (1996) és Chamongpol és munkatársai (1998) kísérletei igazolták, hogy a ROF képződésének ugrásszerű növekedése önmagában is elegendő lehet sejthalál előidézéséhez. Mások adatai ugyanakkor világossá teszik, hogy a sejthalál kiváltásában a ROF-on kívül más tényezőknek (például a nitrogén-monoxidnak) is jelentősége van (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998), illetve a ROF szerepe a különböző növény-kórokozó kölcsönhatásokban eltérő lehet (Heath, 2000).

**Megjegyzés:** Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1994): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. *Cell* 79, 583-593.

**Megjegyzés:** Jabs, T., Dietrich, R.A. and Dangl, J.L. (1996): Extracellular superoxide initiates runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant. *Science* 273, 1853-1856.

**Megjegyzés:** Chamongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Camp, W. (1998): Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5818-5823.

### 2.3.2. Antioxidánsok: a reaktív oxigén fajták méregtelenítése

A reaktív oxigén fajták méregtelenítését az élő szervezetekben, így a növényekben is antioxidánsok végzik. Ezek egy része enzim (szuperoxid-dizmutáz, kataláz, aszkorbinsav-peroxidáz, dehidroaszkorbinsav-reduktáz, glutation-reduktáz, glutation S-transzferáz, glutation-peroxidáz és egyéb, kevésbé specifikus szubsztrát igényű peroxidázok), más részük olyan szerves kis molekula, ami elektrondonor természeténél fogva a reaktív oxigén fajtákat redukálni képes, ezek tehát nem enzimatisz antioxidáns vegyületek (aszkorbinsav, glutation,  $\alpha$ -tokoferol, karotinoidok, redukált fenolok, stb.).

Azt, hogy a reaktív oxigén fajtáknak (ROF) nagy jelentősége van a kórfolyamatban, a ROF közömbösítését végző antioxidánsok vizsgálatai is

alátámasztják. El-Zahaby és munkatársai (1995), majd később Vanacker és munkatársai (1998) árpa lisztharmattal (*B. graminis* f.sp. *hordei*) fertőzött árpában a hidrogén-peroxid lebontását (részben) végző Halliwell-Asada ciklus enzimeinek és nem enzimikus összetevőinek (aszkorbinsav és glutation) nagyfokú aktivitás- ill. koncentrációváltozásait tapasztalták. Jelentős eltérést észleltek a lisztharmat iránt fogékony és a gombabetegségnek ellenálló (hiperszenzitív reakciót mutató) árpafajták antioxidánsainak változása között is. Fodor és munkatársai (1997) TMV-vel inokulált Xanthi-nc dohánylevelekben szintén a Halliwell-Asada ciklushoz tartozó enzimek (aszkorbinsav-peroxidáz, glutation-reduktáz), továbbá a glutation-S-transzferáz és a szuperoxid-dizmutáz aktivitásnövekedését mérték a nekrotikus léziók megjelenését követően. Növekedést tapasztaltak az inokulált levelek glutation és dehidroaszkorbinsav tartalmában is, az aszkorbinsav mennyisége és a dehidroaszkorbinsav-reduktáz aktivitása ugyanakkor csökkent. Gullner és munkatársai (1999) L-2-oxotiazolidin-4-karboxilsav kezeléssel több, mint kétszeres glutation szintet idéztek elő Xanthi-nc dohánylevélkorongokban. Az így előkezelt levélkorongok ellenállónak bizonyultak a TMV nekrotikus lézióival szemben, sőt a vírustartalmuk is alacsonyabb volt a kontrollhoz képest. Az L-2-oxotiazolidin-4-karboxilsavból az 5-oxo-L-prolináz enzim aktivitása nyomán cisztein keletkezik, ami a glutation prekursora (Williamson és Meister, 1981). A ROF és a sejthalál ok-okozati összefüggését támasztják alá Mittler és munkatársai (1999) vizsgálatai is. Két olyan transzgenikus dohányvonalat tanulmányoztak, amelyekben egy-egy – a ROF közömbösítésében szerepet játszó – antioxidáns enzim (aszkorbinsav-peroxidáz és kataláz) működését gátolták antiszensz módon. A két

**Megjegyzés:** Vanacker, H., Carver, T.L.W. and Foyer, C.H. (1998): Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol.* 117, 1103-1114.

**Megjegyzés:** Fodor, J., Gullner, G., Adám, A.L., Barna, B., Kőmives, T. and Király, Z. (1997): Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiol.* 114, 1443-1451.

**Megjegyzés:** Gullner, G., Tóbiás, I., Fodor, J. and Kőmives, T. (1999): Elevation of glutathione level and activation of glutathione-related enzymes affect virus infection in tobacco. *Free Rad. Res.* 31, 155-161.

**Megjegyzés:** Mittler, R., Herr, E.H., Orvar, B.L., Van Camp, W., Inzé, D. and Ellis, E. (1999): Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14165-14170.

dohányvonalat hiperszenzitív reakciót okozó, inkompatibilis baktérium-törzs (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) különböző koncentrációjú szuszpenziójával infiltrálták. Kísérleteik eredményei arról tanúskodtak, hogy mindkét transzgenikus vonal fogékonyabb volt a baktérium által kiváltott nekrozis iránt, mint a kontroll fajta: az a viszonylag alacsony inokulum koncentráció, ami a kontrollon még nem okozott nekrozist, a csökkent antioxidáns képességgel rendelkező vonalakban már elegendőnek bizonyult annak kiváltásához. Azt a feltételezést, hogy a jelenség hátterében a ROF közömbösítését végző antioxidáns rendszer elégtelen működése állt, az a tény is alátámasztotta, hogy antioxidáns vegyületek (aszcorbinsav és glutation), kataláz, valamint difenilén-jodónium (a plazmalemmához kötött NAD(P)H oxidáz gátló) kezelésekkel a transzgenikus vonalakban is fel lehetett emelni a nekrozis kialakulásához szükséges baktérium koncentráció küszöbértékét a kontroll növényeken tapasztalt szintre.

A ROF kórfolyamatban betöltött toxikus szerepére utal az a növényeken végzett kísérletek tekintetében úttörőnek számító munka is, amit Deák és munkatársai (1999) közöltek. Kísérleti hipotézisük lényege az, hogy az élő sejt számára rendkívül toxikus hidroxilgyök ( $\text{OH}^\bullet$ ) termelődését úgy gátolták, hogy a reakcióban elektrondonorként szereplő Fe (II) ionok (2.3. ábra) mennyiségét egy vasmegkötő tulajdonsággal bíró ferritin nevű fehérje intenzív túltermelésével visszaszorították. A lucernából izolált ferritin gént kifejező transzformált dohánynövények valóban fokozott toleranciát mutattak a szuperoxidot termelő herbicidhatóanyaggal, a paraquattal szemben, továbbá az *A. alternata* és a *B. cinerea* nekrotikus tüneteivel és a TNV által okozott léziókkal szemben is.

**Megjegyzés:** Deák, M., Horváth, V.G., Davletova, S., Török, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Király, Z. and Dudits, D. (1999): Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotech.* 17, 192-196.

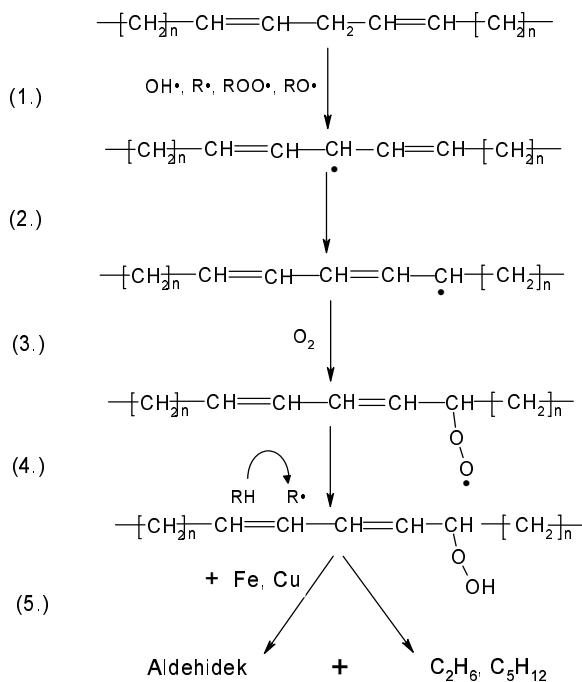


### 2.3.3. Miként járulhatnak hozzá a kórfolyamat során képződő reaktív oxigénfajták a sejthalál kialakulásához?

A ROF és a kórokozók által előidézett nekrotikus tünetek összefüggését vizsgáló munkák a ROF-nak alapvetően kettős szerepet tulajdonítanak a sejthalál kiváltásában. Egyrészt közvetlen szerepet, mint nagy reakcióképességű molekulák a sejtmembránok károsításán keresztül, másrészt közvetett, jelátvivő szerepet, további a sejthalálhoz vezető folyamatok aktiválása révén (Jabs *et al.*, 1996).

#### 2.3.3.1. A reaktív oxigénfajták növényi sejtmembránokra gyakorolt hatása

A ROF iránt mutatott érzékenységekben a membránokat felépítő foszfor- és galaktolipidek több telítetlen kötést tartalmazó zsírsavösszetevői (így többek között a linolsav és a linolénsav) kimagaslanak. A ROF és a többszörösen telítetlen zsírsavak kölcsönhatása lipidperoxidációt eredményez. Ennek első lépése a cisz, cisz-1,4-pentadién rendszer  $\alpha$ -metilén szénatomján bekövetkező hidrogénelvonás (2.4. ábra/1.), amit előidézhet például hidroxilgyök, vagy szerves szabadgyök ( $R^\bullet$ ), peroxilgyök ( $ROO^\bullet$ ) és alkoxilgyök ( $RO^\bullet$ ). Következő lépésben a zsírsavmolekulában egy kettős kötés átrendeződés játszódik le, ami konjugált diénszerkezetet eredményez (2.4. ábra/2.). A konjugált kettős kötést hordozó zsírsavszabadgyök ( $R^\bullet$ ) aerob körülmények között molekuláris oxigénnel peroxilszabadgyököt ( $ROO^\bullet$ ) képez (2.4. ábra/3.), amely mint hatékony oxidálószer, a környező lipidmolekulák egyikéről hidrogént képes elvonni. Ezáltal önmaga lipid-hidroperoxiddá ( $LOOH$ ) alakul (2.4. ábra/4.),



2.4. ábra. Foszfo- és galaktolipidek izolált kettőskötést tartalmazó zsírsavdallancának szabadgyökök hatására bekövetkező lipidperoxidációja

miközben a hidrogénelvonás nyomán keletkezett szerves szabadgyökök oxigénfelvétel által szintén peroxilgyököket képez és így lipidperoxidációs láncreakció veszi kezdetét (Halliwell és Gutteridge, 1999). A lipid-hidroperoxidok fémionok (vas, réz) katalizálta bomlása során epoxidok, telített és telítetlen aldehidek, ketonok és gázhalmazállapotú szénhidrogének (pentán, etán) keletkeznek (2.4. ábra/5.). Jellegzetes lipid-hidroperoxid bomlástermékek például a telítetlen aldehidekhez tartozó 4 -hidroxi -2 -transz -nonénal (HNE) és a 4 -hidroxi -2 -transz -hexénal (HHE). Ezek jelentősége valószínűleg meghaladja a korábban fő bomlás-

terméknek tartott malondialdehidét (MDA), ami úgy tűnik valójában csak igen kis mennyiségben képződik linolénsav és arachidonsav peroxidációját követően (Halliwell és Gutteridge, 1999).

A ROF által okozott lipidperoxidáció megváltoztatja a membránok szerkezetét. A biológiai membránok folyadékkristály állapotának (fluidititásának) fenntartásában a telítetlen és többszörösen telítetlen zsírsavdallancoknak döntő szerepe van (Shinitzky, 1984), amelyek alacsony olvadáspontjuk miatt a membránok fázisátalakulási hőmérsékletét csökkentik. A lipidperoxidáció következtében ezek mennyisége a membránokban a telített zsírsavakhoz képest kisebb lesz (Halliwell és Gutteridge, 1999), ami gélfázisú lipidterületek megjelenéséhez és a membránon keresztül végbemenő transzportfolyamatok zavarához vezet. A lipidperoxidációs láncreakció során képződő zsírsavszabadgyökök között további keresztkötések alakulhatnak ki (Frank *et al.*, 1989), de bekövetkezhet az is, hogy a nagy reakcióképességű zsírsavszabadgyökök más membránalkotókkal, például membránfehérjék tiol (-SH) csoportjaival lépnek reakcióba (Halliwell és Gutteridge, 1999). A membránszerkezetben végbement változások fokozzák az elektrolitkiáramlást a sejtszervecskékben és a citoplazmában, tehát a membrán – mint biológiai határfelület – szelektív áteresztőképessége romlik. Érdemes megjegyezni azt is, hogy a lipid-hidroperoxidok korábban említett aldehid bomlástermékei (HNE, HHE) mérgezőek (Esterbauer *et al.*, 1991), különösen a mitokondriumokra (Kristal *et al.*, 1996).

Weststeijn (1978) Xanthi-nc dohány TMV-vel inokulált leveleiben már 7 órával a nekrotikus léziók megjelenése előtt a membránpermeabilitás

megváltozását, és az elektrolitok kiáramlásának fokozódását észlelte. Kato és Misawa (1976) tehénborsó (*Vigna sinensis*) növényeket uborka mozaik vírussal (*Cucumber mosaic cucumovirus*; *CMV*) fertőztek és az inokuláció után, de még a lokális léziók megjelenése előtt a szabadgyökök mennyiségének növekedését mérték elektronspin rezonancia spektroszkópiával. A szabadgyöktartalom változásával párhuzamosan megnőtt a lipidperoxidáció szintjét jelző "tiobarbitúrsavval reagáló anyagok" (thiobarbituric acid reactive substances) mennyisége, a többszörösen telítetlen linolsav és linolénsav mennyiségének jelentős része pedig elbomlott. A fertőzött tehénborsólevelek sejtjeinek elektrolitkiáramlása ebben az esetben is fokozódott, megelőzve a nekrotikus tünetek megjelenését. Ruzicska és munkatársai (1983) a TMV-vel inokulált, *N*-rezisztenciagént hordozó dohánynövényeket 33 °C-on inkubálták, ezen a hőmérsékleten a rezisztenciagén inaktív, a vírushatás szisztemizálódik. Bizonyos idő elteltével az inokulált növényeket 25 °C-ra helyezték, ekkor a hiperszenzitivitásért felelős "*N*"-gén működésbe lép és a vírus által megfertőzött szövetek rövid időn belül nekrotizálódnak. A nekrotikus tünetek megjelenését ebben az esetben is megelőzte a membrán-áteresztőképesség megváltozását jelző ionkiáramlás megnövekedett mértéke és a mikroszóma frakció (kloroplasztisz és mitokondrium) lipidösszetételének eltolódása a telített zsírsavak irányába. Meg kell említeni, hogy a vírus nekrotikus lézióinak kialakulását megelőző lipidperoxidációt mind a két utóbbi munkában a lipoxigenáz enzim aktivitásának növekedésével hozták összefüggésbe, a lipoxigenáz katalizálta lipidperoxidációra azonban az jellemző, hogy csak a szabad zsírsavakat érinti, a szabadgyökök viszont képesek megtámadni a foszfo-

és galaktolipidekhez kötött zsírsavdalláncokat is (Leshem, 1987). Pennazio és Sapetti (1982) az előbbi eredményekkel összhangban fokozott szabadgyöktermelést és a sejtek elektrolitkiáramlását tapasztalta paradicsom bokros törpülés vírussal (*Tomato bushy stunt tombusvirus; TBSV*) fertőzött *Gomphrena globosa* leveleiben. Dohány gyűrűsfoltosság vírussal (*Tobacco ringspot nepovirus; TRSV*) fertőzött tehénborsó levelekben a szuperoxid szabadgyök intenzív képződését, magas szuperoxid-dizmutáz aktivitást, erős lipidperoxidációt (tiobarbitúrsav-teszt alapján) és fokozott  $K^+$  ion kibocsátást észleltek a nekrotikus léziók megjelenése előtt (Beleid El-Moshaty *et al.*, 1993). Ádám és munkatársai (1989) inkompatibilis növény - baktérium kölcsönhatás (dohány - *P. syringae* pv. *syringae*) vizsgálata során szintén a szuperoxid szabadgyök – p-nitrotetrazóliumkék redukció alapján kimutatott – termelődését, fokozott lipidperoxidációt és ionkiáramlást figyeltek meg azt megelőzően, hogy a baktériumszuspenzióval infiltrált levélterületen a szövetelhalás bekövetkezett volna. A membránalkotó foszfo- és galaktolipid zsírsavkomponensek kettőskötés indexe (telítetlensége) ezalatt csökkent. Antioxidáns vegyületekkel (aszorbinsav, glutation,  $\alpha$ -tokoferol-acetát, szarvasmarha-szérumalbumin) késleltetni lehetett a nekrózis kifejlődését, illetve az elektrolitok kiáramlását. Deighton és munkatársai (1999) *Botrytis cinerea*-val fertőzött paprika (*Capsicum annuum*) termékekben olyan szabadgyök jelenlétét mutatták ki, amelynek elektronspin rezonancia spektroszkóppal kapott jele a nekrotikus zóna középpontjában volt a legnagyobb, de kismértékben a fertőzött területet körülvevő egészséges szövetrétegben is érzékelhető volt. Ezzel párhuzamosan a 4-hidroxinonénal (HNE) és a 4-hidroxihexénal (HHE) mennyiségének növekedé-

sét mérték mind az elhalt, mind a nekrozist körülvevő egészséges paprikaszövetben. A toxikus aldehid lipidbomlástermékek mennyisége különösen az egészséges és a beteg részek határán volt ugrásszerűen magas.

A ROF nekrozist megelőző fokozott termelődése tehát lipidperoxidációt okozva egyrészt a membránok szerkezetét roncsolja és szelektív áteresztőképességüket megváltoztatja, másrészt a növényi sejt számára mérgező aldehidek képződéséhez vezet. A ROF -nak ezáltal közvetlen szerepet tulajdoníthatunk a nekrotikus betegségtünetek kialakulásában.

#### 2.3.3.2. A reaktív oxigén fajták feltételezett jelátvivő szerepe a sejthalál előidézésében

A ROF a sejtekre gyakorolt közvetlen károsító hatásuk mellett közvetett, jelátvivő szerepet is játszhatnak a sejthalál kiváltásában. Erre utal az a megfigyelés, hogy hidrogén-peroxid kezelés a kalcium sejtekbe történő gyors beáramlását idézi elő *Nicotiana plumbaginifolia* csíranövényekben (Price *et al.*, 1994). Levine és munkatársai (1996) hidrogén-peroxid kezelés hatására szintén kalcium beáramlást, majd apoptózist figyeltek meg szója sejtszuszpenzióban. Lamb és Dixon (1996) a fenti eredmények alapján feltételezik, hogy a hidrogén-peroxid egy olyan szignál, amelynek hatására kalcium áramlik a sejtekbe, és ez sejthalált okoz. Meg kell ugyanakkor jegyezni, hogy a kalcium sejtekbe történő áramlása és hidrogén-, illetve káliumionok párhuzamos kiáramlása a sejtől szükséges magának az oxidatív robbanásnak a kialakulásához is (Atkinson *et al.*, 1990). Lamb és Dixon (1996) ezért a kalciumnak kettős szerepet tulajdo-

nít a sejthalálhoz vezető jelátviteli láncban: egyrészt indukálja a ROF felszaporodását, másrészt feltételezik azt, hogy az oxidatív robbanás hatására szintén kalcium beáramlás megy végbe, ami apoptózist eredményez.

#### 2.4. A szeneszencia, a reaktív oxigén fajták és a lipidperoxidáció összefüggése

Öregedő szegfű szíromlevelekben a szuperoxid szabadgyök ( $O_2^{\bullet-}$ ) megnövekedett mennyiségét mutatták ki, ezzel egy időben a szuperoxid közömbösítésében szerepet játszó antioxidáns enzimek (a szuperoxid-dizmutáz és a kataláz) aktivitásának csökkenését mérték (Mayak *et al.*, 1983; Droillard *et al.*, 1987). Jiménez és munkatársai (1998) borsóleveleket levágva és sötétben inkubálva szeneszenciát idéztek elő. Az így előkezelt levelek mitokondrium és peroxiszóma frakcióit különválasztva vizsgálták a két sejtalkotóban végbemenő pro- és antioxidáns változásokat, illetve a lipidperoxidáció mértékét. A peroxiszóma frakcióban a hidrogén-peroxid szintje és a lipidperoxidációt jelző tiobarbitúrsav-reaktív anyagok mennyisége nagymértékben megnőtt az indukált öregeedés következtében. Az aszkorbinsav-peroxidáz és a monodehidroaszkorbinsav-reduktáz aktivitása, továbbá a redukált és az oxidált glutation aránya (GSH/GSSG) jelentősen csökkent, az egyéb antioxidánsok aránya pedig számottevően nem változott. A mitokondrium frakció szuperoxid-dizmutáz, aszkorbinsav-peroxidáz, monodehidroaszkorbinsav-reduktáz, dehidro-aszkorbinsav-reduktáz és glutation-reduktáz aktivitása szintén erősen csökkent a szeneszencia

hatására, ugyanezt állapították meg az aszkorbinsav-, a dehidroaszkorbinsav- és kisebb mértékben a glutationtartalomról is. A mitokondrium frakció hidrogén-peroxid szintje – szerényebb mértékben ugyan, mint a peroxiszóma frakció esetében – szintén növekedett. Ye és munkatársai (2000) *Arabidopsis thaliana* növények leveleiben a generatív fázisba való átmenet során az aszkorbinsav-peroxidáz aktivitás ugrásszerű csökkenését és a zsírsav-hidroperoxidok mennyiségének ezzel párhuzamos emelkedését észlelték. Mások öregedő dohánylevelekben jelentős aszkorbinsavtartalom csökkenést mutattak ki (Takahama *et al.*, 1999). Panavas és Rubinstein (1998) egy *Hemerocallis* (sásliliom) hibrid szíromleveleinek öregedését vizsgálta. A folyamatot tanulmányozva megállapították, hogy a szíromlevelek öregedésének látható tüneteit megelőzi a növényi szövet hidrogén-peroxid tartalmának és lipoxigenáz aktivitásának növekedése, a lipid-hidroperoxidok mennyiségének emelkedése, és a ROF közömbösítését végző kataláz és aszkorbinsav-peroxidáz aktivitásának csökkenése. Ezzel párhuzamosan fokozott elektrolitkiáramlásról számoltak be, ami a membránok áteresztőképességének növekedésére utalt. Lacan és Baccou (1998) két – eltarthatóságukban nagy különbséget mutató – görögdinnye (*Cucumis melo* L.) fajta (Clipper és Jerac) vizsgálatán keresztül jutottak arra a következtetésre, hogy a lassabban öregedő Clipper fajta jobb tárolhatósága a magasabb kataláz és szuperoxid-dizmutáz aktivitással és a kisebb mértékű lipidperoxidációval magyarázható. Kumar és Knowles (1993) magtermesztésre szánt burgonya gumók (*Solanum tuberosum*) öregedése közben, Zhuang és munkatársai (1995) pedig brokkoli virágzati kezdemények (bimbók) betakarítást követő szenescenciája során tapasztaltak



fokozott lipidperoxidációt. Ezeknek az adatoknak a fényében leszögezhetjük, hogy a növényi szövet öregedése általában együtt jár a ROF megnövekedett termelődésével és a semlegesítő antioxidánsok kapacitásának csökkenésével, ami lipidperoxidációhoz és membránkárosodáshoz vezet (Leshem, 1988).

Az értekezés témáját figyelembe véve érdemes kitérni a szeneszcenciát gátló citokininkezelések oxidatív stresszt befolyásoló hatására.

Barna és munkatársai (1997) benzil-adenin és kinetin kezelésekkel eredményesen szorították vissza a fuzarinsavval (5-n-butilpikolinsav) előidézett ionkiáramlást, a higany-klorid által okozott léziókat és a paraquat (herbicidhatóanyag) nekrotikus tüneteit Xanthi-nc dohányleveleken. Mindhárom toxikus anyag a ROF fokozott termelődését idézi elő a növényekben. Hasonló hatást értek el agrobaktériumos tumorból regenerált paradicsomnövényekkel, amik az *Agrobacteriumból* származó T-DNS (és a benne kódolt izopentenil-transzferáz gén) növényi genomba való beépülése folytán juvenilisebbek, több citokinint termelnek (Székács és munkatársai, 2000). A regenerált paradicsomnövények ellenállóbbak voltak a paraquat és a fuzarinsav által okozott elektrolitkiáramlással (membránkárosodással), valamint a *Phytophthora infestans* és a *Botrytis cinerea* nekrotikus tüneteivel szemben. Leveleik – a juvenilis szövetekre jellemzően – több foszfo- és galaktolipidet, és kevesebb szterolt tartalmaztak, emellett két vizsgált antioxidáns enzim (a szuperoxid-dizmutáz és a kataláz) aktivitása is meghaladta a kontroll növényekben mért értéket (Barna és munkatársai, 1995; Barna és Pogány, 2001). Beckman és Ingram (1994) kinetin kezeléssel hatékonyan gátolták burgonyagumószeletek *Phytophthora infestans* egy avirulens rasszával szemben adott

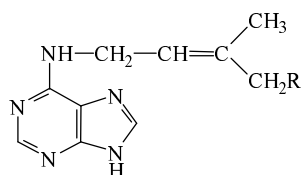
hiperszenzitív reakcióját. A felsorolt eredményekkel összhangban állnak, sőt kiegészítik azok az állati eredetű modelleken végzett *in vitro* kísérletek adatai, amik arra mutatnak rá, hogy a citokininek – amellet hogy a növény juvenilis élettani állapotának fenntartásáért felelősek – önmagukban is gyökfogó (scavenger) vegyületek, amelyek részben képesek a nukleinsavakat és a fehérjéket megvédeni a szabadgyökök károsító hatásától. Kinetin (szintetikus citokinin, növényekben nem fordul elő) kezeléssel ugyanis sikerült visszaszorítani szarvasmarha *thymus* DNS és szérum albumin minták oxidatív stressz hatására bekövetkező roncsolódását (Olsen *et al.*, 1999; Verbeke *et al.*, 2000). Ezek megerősítik Pauls és Thompson (1982) korábbi feltevését, amiben a citokininek ózonkezeléssel szembeni védő hatását azok antioxidáns képességével hozták összefüggésbe babnövényekkel végzett vizsgálataikban. Témánk szempontjából nagyon érdekesnek találjuk azt az összefüggést, amire Barna és munkatársai (1993) hívták fel a figyelmet, hogy a paraquat herbicid-hatóanyaggal szemben toleráns dohányvonal magasabb klorofill- és proteintartalommal rendelkezik, illetve több citokinint termel (Székács és munkatársai, 2000), tehát juvenilisabb, mint a kontroll fajta. Közismert tény az, hogy a paraquat szuperoxid szabadgyököt termelve fejt ki a növényben toxikus hatását. A növény juvenilis élettani állapota ebben az esetben védelmet nyújt a paraquat által okozott oxidatív stresszel szemben. A reaktív oxigén fajtákkal szembeni hatékonyabb védelem szerepére utal még a paraquattoleráns növények magasabb szuperoxid-dizmutáz aktivitása, a membránlipidek összetételében tapasztalt alacsonyabb szterol/foszfolipid arány és a tiobarbitúrsav-teszt segítségével mért enyhébb lipidperoxidáció. A paraquattoleráns növények ezen kívül

kereszttoleranciát mutatnak egyéb – fokozott szabadgyökképződéssel járó – abiotikus és biotikus stresszel szemben is (fagyasztás, hősokk-, higany-klorid- és fuzarinsav-kezelés, *B. cinerea* és dohány nekrozis vírus fertőzés).

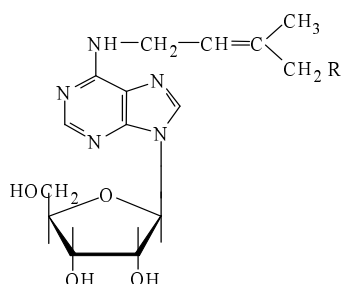
## 2.5. A citokininek kémiai szerkezete, elnevezésük és növényélettani szerepük

A citokininek növényi hormonok, amelyek alapvető fontosságúak a növény fiatal élettani állapotának fenntartásában. Kémiai szerkezetüket tekintve  $N^6$  – szubsztituált adenin származékok. A növényi szervezetben előforduló leggyakoribb citokininek esetében a szubsztituens izoprenoid-lánc, izopentenil származék. Ha az oldallánc egyszerű izopentenil csoport, akkor ez a citokinin izopentenil-adenin. Ha az izopentenil csoport első szénatomján található hidrogénatomok egyikét hidroxil csoport helyettesíti, akkor ezt a vegyületet zeatinnak nevezik (2.5./A ábra). Mind a zeatin, mind az izopentenil-adenin jelenléte általános a növényvilágban. A két vegyület a nemzetközi szakirodalomban Letham (1974) alapján a citokininek gyakorlatban elterjedt nevezéktanának alapját képezi. A növényi szervezetben található citokininek gyakran tartalmazzak ribóz vagy glükóz gyűrűt a purinváz 7. vagy 9. nitrogénatomjához kapcsolva (a glükózidoknak elsősorban a hormon inaktiválásában van szerepe), ezeket citokinin-nukleozidoknak nevezik. Ilyenek például a 9-zeatin-ribozid vagy a 9-izopentenil-adenin-ribozid (izopentenil-adenozin) (2.5./B ábra).

A



B



2.5. ábra. A szabad citokininbázisok (A) és a citokinin-nukleozidok (B) általános szerkezeti képlete. R: -H = izopentenil-adenin ill. 9-izopentenil-adenin-ribozid, R: -OH = zeatin ill. 9-zeatin-ribozid

A citokininek szintézise elsősorban a gyökér osztódó szöveteiben megy végbe, de egyéb merisztémákban is képződnek. A bioszintézis lépéseit végző enzimek azonosítására tett törekvések ez idáig nem jártak sikerrel. Növénykórokozó baktériumok által termelt izopentenil-transzferáz (ipt) enzim aktivitását (2.7. fejezet) már sikerült ugyan dohány szövettenyésztéből és csírázó kukoricaszemekből kimutatni (Chen és Melitz, 1979; Reinecke *et al.*, 1991), tehát ez az enzim az egészséges növényekben is valószínűleg jelen van, tisztítása azonban idáig egy esetben sem volt eredményes (Chen és Ertl, 1994). A gyökerekben termelt citokinin a xilémen keresztül a hajtás fiatal, fejlődő szerveibe szállítódik.

A citokininek az auxinnal kölcsönhatásban a sejtosztódás szabályozásáért elsősorban felelős növényi hormonok, a sejtciklus szabályozásában kulcsfontosságúak (Jacquard *et al.*, 1994). A citokininek jelenléte nélkülözhetetlen a kalluszból történő hajtás- és rügydifferenciálódáshoz,

ugyanakkor jellemző rájuk, hogy a hajtás és a gyökér megnyúlásos növekedését gátolják, az apikális dominanciát pedig feloldják. A citokininnek szerepet játszanak továbbá a csíranövények fejlődésében a magban raktározott tartalékfehérjék mobilizációján keresztül. A citokininnek szénescenciát gátló hatása is jól ismert (Mok, 1994).

Az aktív citokinin molekulákat a növény két általunk ismert úton hatástalanítja. Az egyik a purin váz 7-es vagy 9-es pozíciójában lévő nitrogén atom glükózhoz kapcsolása, a másik az izopentenil oldallánc enzimes hasítása, melyet a citokinin-oxidáz végez (Kende és Zeevaart, 1997).

## 2.6. Külső citokininkezelések hatása a növények vírusfogékonyságára

Az a kérdés, hogy a citokinin növényi hormonok miként befolyásolják a növények vírusfogékonyságát, hosszú ideje foglalkoztatja a növényvirológia és a kórélettan művelőit. Ezt jelzi az is, hogy milyen magas számban készültek olyan tudományos közlemények, melyek citokininekkel végzett kezelések különböző vírus-gazdanövény kapcsolatokra gyakorolt hatását írják le (Mahadevan, 1984; Goodman, 1991). A fent megfogalmazott kérdést ezeknek a kutatási eredményeknek az ismeretében sem lehet teljes bizonyossággal megválaszolni, azonban a kísérleti körülmények különbözőségeit figyelembe véve az ellentmondások részben feloldhatók.

A vírusfertőzés kimenetelét erősen befolyásolja mindenek előtt a citokininkezelés időzítése: az inokulációt megelőző citokininkezelés rendszerint gátolja a fertőzést, az inokulációt követő kezelés viszont inkább serkenti azt. Az alkalmazott citokinin-oldat koncentrációja és a

kezelés módja (ép vagy levágott levelek ecsetelése, levélkorongok úsztatása, stb.) szintén hatással van a fertőzés eredményére (Goodman, 1991). A Xanthi-nc dohány (Király és munkatársai, 1968), a Pinto bab (Király és munkatársai, 1968; Nakagaki, 1971) vagy a *Datura stramonium* (Reunov *et al.*, 1976) TMV-fertőzést megelőző kinetin kezelése a lokális léziók visszaszorulását idézi elő. Mukherjee és munkatársai (1967) szintén a TMV léziószámának csökkenését tapasztalták kinetinnel előkezelt *N. glutinosa* levélen, a léziók mérete ugyanakkor növekedett. Ha az inokuláció előtt kezelték kinetinnel a *D. stramoniumot* (Reunov *et al.*, 1976) vagy a dohányt (Király és Pozsár, 1964), a vírusrészecskék felhalmozódása is csökkent. Ugyanezt észlelték paradicsomon, ha a paradicsom bronzfoltosság vírussal (*Tomato spotted wilt tospovirus; TSWV*) való fertőzés előtt N<sup>6</sup>-benzil-adeninnel kezelték a leveleket (Aldwinckle és Selman, 1967).

A vírussal történő inokulációt követő citokininkezelések a kísérleti körülményektől függően ellentétes eredményeket szültek. Daft (1963) szerint az inokuláció utáni kinetinkezelés serkentette a paradicsom mozaik vírus (*Tomato mosaic tobamovirus; ToMV*) képződését dohánylevelekben. Figyelemre méltó, hogy a TMV mennyisége is megnövekedett azoknak a szisztemikus gazdanövényeknek a leveleiben (*N. rustica*, *N. tabacum* cv. *Wisconsin 38*), amelyeket a fertőzés után csupán 10-20 perccel (!) helyeztek különböző citokininek oldatába (Milo és Srivastava, 1969a). Az inokuláció és a citokininkezelés között eltelt idő jelentőségét támasztja alá annak a kísérletnek a meglepő eredménye is, amiben a TMV-vel fertőzött dohányleveleket az inokuláció után különböző időpontokban kezelték N<sup>6</sup>-benzil-adeninnel (Aldwinckle, 1975).

Ha a citokininkezelés egy perccel az inokuláció után kezdődött, kevesebb vírust lehetett kimutatni a kezelt féllevelekben, mint a kezeletlenekben. Ha azonban a kezelés 5 perccel a fertőzés után kezdődött, a vírus felhalmozódása már nagyobb volt a kezelt levél-félben, mint a kontrollban. A legerősebb vírusserkentést akkor kapták, ha a citokininkezelést az inokuláció után 60 perccel kezdték el. Ugyanakkor Király és Pozsár (1964), valamint Reunov és munkatársai (1977) azt találták, hogy magasabb kinetinkoncentráció (110  $\mu\text{M}$ ) alkalmazása utólag is visszaszorította szisztémikus dohánygazdában a TMV akkumulációját. Ezekkel az eredményekkel összhangban TMV-vel fertőzött *N. glutinosa* levélkorongokat az inokulációt követően nagyobb koncentrációjú kinetin-oldattal (230  $\mu\text{M}$ ) kezelve mind a vírusfelhalmozódást, mind a léziószámot csökkenteni lehetett (Király és Szirmai, 1964). A citokininkoncentráció vírushatást befolyásoló szerepét Bailiss és munkatársai (1977) vizsgálatai is alátámasztják. Kísérleteikben TMV-vel fertőzött paradicsomlevélkorongokat különböző töménységű (93  $\mu\text{M}$  - 9,3 nM) kinetin oldatokon úsztattak. Az alacsonyabb koncentrációkban a vírusfelhalmozódás növekedését tapasztalták, a magasabb koncentrációk esetében annak gátlását figyelték meg.

Az egymásnak ellentmondani látszó kísérleti eredmények szövevényét Mahadevan (1984) könyvének ezzel a kérdéssel foglalkozó fejezetében található összefoglaló táblázata (219-224. oldal) valamivel átláthatóbbá teszi. Ennek tartalmát röviden értékelve megállapítható, hogy az összegyűjtött 37 (különböző vírus-gazdanövény kapcsolatot és eltérő kísérleti viszonyokat felölelő) vizsgálati eredmény többségében (26 esetben) a citokininkezelés vírushatást gátló hatásáról számolnak be. Ezeket az

eseteket jobban szemügyre véve feltűnik az, hogy a fertőzés gátlását többnyire a nekrotikus tünetek (léziószám) visszaszorulásával jellemezték és csupán néhány (3) esetben észleltek nyilvánvaló csökkenést a fertőzött növényi szövet vírustartalmában is (Király és Szirmai, 1964; Milo és Srivastava, 1969b). Azokban az esetekben, amelyekben a citokininkezelés serkentőleg hatott a vírusfertőzésre, ez jobbra a vírus szaporodásában nyilvánult meg, és mindössze két esetben utaltak arra, hogy a vírusfertőzés következtében kialakuló nekrotikus léziók száma is megnövekedett (Cheo, 1971; Fletcher *et al.*, 1968). Mindkét esetben a szokásosnál alacsonyabb citokinin koncentrációval dolgoztak (23  $\mu\text{M}$  és 230 nM). Érdemes megjegyezni, hogy a fertőzött növényi szövetek víruskoncentrációjának meghatározása az említett kísérletekben a korábbi gyakorlatnak megfelelően bioteszttel történt, tehát a fertőzött növényi minta levélkivonatát lokális léziót adó gazdanövény levelére kenték és az így kapott léziószámból következtettek az eredeti minta vírustartalmára. A léziószámot azonban feltehetően egyéb tényezők is befolyásolják, nem csupán az eredeti növényi minta vírusedményisége, ezért a módszer által nyert adat megbízhatóságát komolyan megkérdőjelezzük (Fraser és Whenham, 1982; Matthews, 1991).

A citokininkezelésnek vírusfertőzés okozta nekrotikus léziókra gyakorolt hatását Balázs és munkatársai (1976a) vizsgálatai helyezték bizonyos mértékig új megvilágításba. Kinetinnel kezelt Xanthi-nc dohány-félleveleket Evans-kékkel megfestettek, majd mikroszkóp alatt vizsgáltak és azt tapasztalták, hogy – noha a látható léziók száma tényleg alacsonyabb volt a kinetinkezelt dohány-szövet esetében, egyúttal azonban lényegesen több egysejt-elhalás is jelentkezett, mint a kontroll (vízzel



kezelt) levél-fél esetében. Ezek nyilvánvalóan olyan fertőzési helyek voltak, amikből nem fejlődött ki nekrotikus lézió, tehát a kinetin valójában nem a vírusfertőzés megeredését, hanem csupán a lézió kifejlődését gátolta. Ráadásul a kinetinnel kezelt levélfélből kivágott léziókban a fertőző vírus RNS mennyisége nagyobb volt, ami úgy tűnt, hogy fertőzőképesség szempontjából kompenzálta a léziók számának visszaszorulását. Később ugyanezt a jelenséget a szisztémikus szerzett rezisztenciával kapcsolatban is megfigyelték, ahol előzőleg szintén megemelkedett citokininmennyiséget mértek (Balázs és munkatársai, 1977). Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a növényi szövet sejtjei élettani szempontból feltehetőleg nem egységesek, bizonyos sejtekben a kinetin a gazdasejt RNS- és fehérjeszintézisét serkenti a vírussal szemben, más sejtekben viszont inkább a vírusreplikációt stimulálja.

Clarke és munkatársai (1998) a citokinin vírusreplikációt befolyásoló hatását egy, a korábbiaktól több ponton eltérő kísérleti rendszerben vizsgálták. A dihidrozeatin citokinint egy cérnán felszívva közvetlenül juttatták babnövények szállítószövetébe, majd WCIMV-vel fertőzték a növényeket. A vírusköpenyfehérje-tartalmat DAS-ELISA módszerrel határozták meg. Eredményeik tanúsága szerint a citokinin mind a lokális, mind a szisztémikus tüneteket mutató levelekben gátolta a vírusreplikáció mértékét, a vírusköpenyfehérje-tartalom az adagolt koncentrációval fordított arányban változott. Ugyanakkor meglepő módon nem volt hatással a tünetek kifejlődésére.

## 2.7. Példák citokinint túltermelő, izopentenil-transzferáz génnel transzformált növényvonalak előállítására

A citokininek növényi bioszintézisében szerepet játszó enzimek felfedezése még várat magára (Prinsen, 1997; Kende és Zeevaart, 1997), de számos golyvás tünetet kiváltó növénykórokozó baktériumban sikerült már olyan gének jelenlétét igazolni, amelyek a megbetegített növényben kóros citokinin-túlermelést idéznek elő: *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi *et al.*, 1984; Barry *et al.*, 1984), *Pseudomonas syringae* *pv. savastanoi* (Morris, 1986), *Rhodococcus fascians* (Crespi *et al.*, 1992), *Erwinia herbicola* *pv. gypsophilae* (Lichter *et al.*, 1995). A fenti mikrobákból izolált citokiningének mindegyike izopentenil-transzferáz aktivitású enzimet kódol, aminosav sorrendjük azonban jelentős különbségeket mutat. Az izopentenil-transzferáz aktivitása nyomán az 5'-AMP és az izopentenil-pirofoszfát prekursorokból izopentenil-AMP keletkezik, ebből képződik a foszfátcsoport és a ribóz lehasadását követően az izopentenil-adenin (iP) citokinin, amely az egyéb citokininek (zeatin, dihidrozeatin) szintézisének kiinduló vegyülete (McGaw, 1987). Kulcs lépésnek azonban minden vitát kizáróan az izopentenil csoport AMP-hez való kötődését tekintik, tehát az izopentenil-transzferáz a fokozott citokinintermelésben döntő szerepet játszik. Az *A. tumefaciens* Ti (tumor indukáló) -plazmidján elhelyezkedő *ipt* (izopentenil-transzferáz) -gént felfedezése óta különböző promóterekkel szabályozva számos növénybe beépítették. Az első transzformáns vonalakat az jellemezte, hogy nem fejlesztettek gyökérzetet, ezért nem lehetett ép növényeket regenerálni belőlük (Klee *et al.*, 1987; Smigocki és Owens, 1988). Medford és munkatársai (1989) voltak az elsők, akiknek sikerült életképes *ipt*-gént tartalmazó transzgenikus növényt előállítani. Az *ipt*-gént kukorica *hsp70*

hősokk indukálta promóterhez kapcsolták, majd a kiméra gént dohány és *Arabidopsis* növényekbe ültették. A gén kifejeződését hősokkal kiváltva erős *ipt*-mRNS szintézist észleltek mindkét faj transzformált vonalai esetében, továbbá dohányból citokinin kivonást és mennyiségi meghatározást végezve igazolták több citokinin fajta (zeatin, zetain-ribozid, stb.) szöveti szintjének hősokkot követő nagyfokú emelkedését. Smart és munkatársai (1991) szőja *HS6871* hősokk promóterrel szabályozott *ipt*-gén segítségével a fentebb ismertetett eredményeket szintén dohánynövényekkel dolgozva megerősítették, valamint rávilágítottak arra a külsőleg adott citokininekkel végzett kísérletekből már régóta ismert tényre, hogy a citokiningénnel transzformált növények levelei juvenilibbek, lassabban öregszenek. Smigocki és munkatársai (1993) az *ipt*-gént egy burgonyából származó proteinázgátló enzimet kódoló gén (*PI-IIK*) sebzéssel indukálható promóteréhez kapcsolták, majd a génkonstrukciót agrobaktériumos transzformációval *Nicotiana plumbaginifolia* levélkorongokba juttatták. A transzformált levélkorongokból regenerált növények származékaiban a gén mRNS-sé történő átíródása és a szöveti citokininszint sebzés és rovarragás hatására látványosan megnőtt. Gan és Amasino (1995) az *ipt*-gént egy olyan *Arabidopsis thaliana*-ból származó gén (*SAG12*) promóterével kapcsolták össze, amelynek transzkripciója fiatal élettani állapotú, aktívan fotoszintetizáló levélben elenyésző mértékű, a levél öregedésével párhuzamosan azonban transzkripciója fokozódik. Az elmúlt években számos *SAG*-gént fedeztek fel (Buchanan-Wollaston, 1997; Nam, 1997), a rövidítés az angol „*senescence associated gene*” kifejezésből ered, amit öregedéshez kapcsolt vagy öregedéssel együtt járó géneknek fordíthat-

nánk. A *SAG*-gének növényélettani jelentőségét alapvetően abban látják, hogy az általuk kódolt enzimek a levélben lévő makromolekulákat az öregedés során kisméretű alkotóelemekké bontják, biztosítva a növény fejlődő szerveibe való szállíthatóságukat és újbóli felhasználhatóságukat. A  $P_{SAG12}$ -*ipt* kiméra gén dohánynövénybe ültetve olyan citokinin-szintézist automatikusan szabályozó rendszert eredményezett, ami – a szeneszcencia hatására indukálódó promóter miatt – csak az öregedő dohánylevélben lép működésbe. A transzformált növényekben a  $P_{SAG12}$ -*ipt* gén jelenléte csakugyan késleltette az öregedés folyamatát. Azok az alsó levelek, amelyeknek a kontroll dohányokkal való összehasonlítás alapján már a szeneszcencia jeleit kellett volna mutatniuk, még hosszan zölden maradtak és fotoszintézisük (a felhasznált szén-dioxid mennyiségét figyelembe véve) többszörösen meghaladta a kontroll növények azonos levélemeleten mért értékét.

## 2.8. A nekrotikus vírustünetek és az etilénképződés kapcsolata

Az etilén ( $C_2H_4$ ) gázhalmazállapotú növényi növekedésszabályozó anyag, szeneszcenciahormon. Szintézise a metionin-ciklusból vezethető le (Yang és Hoffman, 1984), közvetlen prekursora az 1-amino-ciklopropán-1-karbonsav (ACC). Élettani hatásai közé tartozik a megnyúlásos növekedés gátlása, a légzés fokozása, a virágképzés indukciója, a termésérés serkentése és a levelek leválásának elősegítése. A növényt ért biotikus és abiotikus stresszek következtében képződése ugrásszerűen megnő (Abeles, 1992). TMV fertőzésére hiperszenzitív választ adó dohányok fokozott etiléntermelését mutatták ki (Balázs és munkatársai, 1969). A nekrosisok száma,

nagysága és az etilénprodukciónak között egyenes összefüggés figyelhető meg (Nakagaki *et al.*, 1970). Tekintettel arra, hogy az etiléntermelés emelkedése csak néhány órával előzi meg a nekrozisok megjelenését, ráadásul az eredetileg fertőzött sejtek elhalása már kissé előbb bekövetkezik, minthogy a látható léziók kialakulnának, valószínűnek látszik, hogy az etilén nem kiváltó, hanem a lézióképződésnek. Ezt támasztja alá az is, hogy lokális klorózist okozó vírusfertőzés szintén fokozott etiléntermeléssel jár együtt (Gáborjáni és munkatársai, 1971).

## 2.9. Kórfolyamatfüggő fehérjék: kitinázok és $\beta$ -1,3-glükanázok

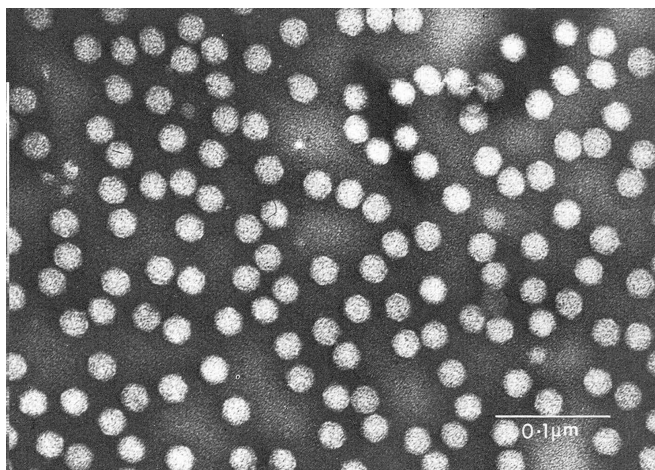
A kórfolyamatfüggő fehérjék (pathogenesis-related proteins = PR-proteinek) olyan kis molekulatömegű, proteázokkal szemben ellenálló fehérjék, amik fiatal, egészséges növényekben nem szintetizálódnak, azonban a növényt ért különböző biotikus és abiotikus stresszek hatására, illetve a növényi szövet szénésztercenciájának előrehaladtával képződésük megindul. Felfedezésük *N*-rezisztenciagént hordozó dohány-növények TMV-vel való fertőzését követően történt, a vírusfertőzött levelek fehérjekivonatának elektroforézise során ugyanis olyan új fehérjesávok megjelenésére lettek figyelmesek, amelyek az egészséges növényekről származó levelekben nem fordultak elő (van Loon és van Kammen, 1970). A "kórfolyamatfüggő" elnevezés is onnan származik, hogy eleinte kizárólag beteg növényekből sikerült kimutatni a jelenlétüket és csupán később ismerték fel, hogy képződésük a növényben nem csak kórokozók fertőzéséhez köthető. A PR-proteinek kutatásában áttörést jelentett az a felfedezés, hogy bizonyos, egymással szerológiai rokonságban álló kép-

viselőiről kiderült,  $\beta$ -1,3-glükanáz enzimaktivitással rendelkeznek (Kauffmann *et al.*, 1987). A bázikus  $\beta$ -1,3-glükanáz enzimek csoportját már ezt megelőzően is úgy tartották számon, mint a növény fitopatogén gombákkal szembeni védelmében szerepet játszó hidrolitikus enzimeket (Boller, 1988), amelyek a gombasejtfal bontása során olyan elicitorokat szabadítanak fel, amik a növény részéről rezisztens választ váltanak ki (Keen és Yoshikawa, 1983). A PR-proteinek későbbi osztályozásakor a  $\beta$ -1,3-glükanázokat önálló csoportként a PR-2-be sorolták (van Loon *et al.*, 1994). A PR-proteinek számos további tagjáról az derült ki, hogy kitináz aktivitású hidrolitikus enzimek és a  $\beta$ -1,3-glükanázokhoz hasonlóan a növénykórokozó gombák elleni védelemben van jelentőségük. A kitinázok többsége a PR-3 csoportba került (van Loon *et al.*, 1994). A PR-proteinek a növényvírusokkal szemben valószínűleg nem fejtenek ki közvetlen hatást (Linthorst *et al.*, 1989).

#### 2.10. A fertőzésekhez használt kórokozó: a dohány nekروزis vírus

A TNV a *Tombusviridae* család *Necrovirus* nemzetségének tagja (Pringle, 1998). A virion izometrikus (2.6 ábra), megközelítőleg 28 nm átmérőjű, molekulatömege  $7,6 \times 10^6$ . A genom osztatlan, lineáris, pozitív egyszálú RNS, 3600-4000 nukleotid alkotja. Az 5' végen ppApGpUp... szekvencia található, a 3' végen nincs polyadenin farok. A víruspartikulumok RNS tartalma 18-21 %. A köpenyfehérjét alkotó polipeptid alegységek molekulatömege  $30 \times 10^3$ . A TNV természetes körülmények között öntözött területeken és üvegházban nevelt növények gyökerét fertőzi. Talajban való terjedése a Phycomycetes osztály

Chytridiomycetidae alosztályába tartozó sejtes plazmódiumú *Olpidium brassicae* talajlakó gomba sporangiospóráival történik.



2.6. ábra. Dohány nekrosis vírus partikulumok elektronmikroszkópos felvétele  
(Kassanis, 1977)

A vírus leírása Smith és Bald (1935) nevéhez fűződik, hazánkban Szirmai János (1952) izolálta első ízben. Mechanikailag számos növényfaj levelére átvihető, azokon lokális léziókat okoz, szisztémikus fertőzése nagyon ritka. A TNV természetes fertőzése nyomán fellépő jellegzetes tünet a tulipánon előidézett levélnekrózis (tulipán Augusztá-betegsége), amit Magyarországon is leírtak (Szirmai, 1955). Virologiai szempontból különösen érdekes, hogy a TNV, mint helper vírus fertőzésével együtt járhat egy szatellit vírus (*Tobacco necrosis satellivirus*) jelenléte, ami intenzív kutatás tárgya (Francki *et al.*, 1985).

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A doktori munka lényegét röviden úgy lehetne összefoglalni, hogy egy új, korábban nem használt kísérleti modell alkalmazása a növényi öregeedés vírusfogékonyságra gyakorolt hatásának pontosabb megértése érdekében.

A kérdés vizsgálatát egy genetikailag módosított, izopentenil-transzferáz (*ipt*) génnel transzformált, fokozott citokininszintézist mutató dohányvonal segítségével végeztük. A TNV-re, mint a dohányon lokális léziókat adó kórokozóra azért esett a választásunk, mert a növényi vírusfogékonyság sokrétű kérdésének elsősorban azt az oldalát igyekeztünk vizsgálni, hogy a növény élettani állapotának változása (a növény öregeedése) miként befolyásolja a vírus által okozott nekrotikus lézió, mint tünettípus kialakulását. A probléma korábbi módszertani megközelítése ugyanazon növény alsó (szeneszencs) és felső (juvenilis) leveleinek párhuzamos fertőzésével (Király, 1968), továbbá külső citokinin kezeléssel (2.6. fejezet) és csúcsrügy eltávolítással visszafiataltított növényeken történt (Ádám és munkatársai, 1990). Az általunk végzett kísérletek újszerűségét az adta, hogy egy transzgenikus, citokinin-túltermelő, juvenilis dohányvonal (CTKm) TNV-vel inokulált leveleit hasonlítottuk össze a kontroll dohányfajta (SR<sub>1</sub>) fertőzött leveleivel. A kétféle dohány TNV iránti fogékonyságának vizsgálatán túl célunk volt a ROF felszaporodásával kapcsolatos folyamatok (lipidperoxidáció, antioxidánsok) tanulmányozása, összefüggésben a citokiningén beépítése által indukált juvenilitással. Ezzel párhuzamosan más, vírushatásához köthető növényélettani jelenségeket (fokozott etilénképződés, PR-proteinek megjelenése) is



megfigyeltünk, összehasonlítva a juvenilis CTKm és a kontroll SR<sub>1</sub> dohányban megnyilvánuló különbségeket.

Célkitűzéseink a következők voltak:

- a CTKm dohányvonal fokozott citokinintartalmának igazolása immunanalitikai módszerrel;
- CTKm és az SR<sub>1</sub> dohányvonalak TNV-vel szembeni ellenállóságának vizsgálata, mind a vírus által okozott nekrotikus tünetek összehasonlítása, mind a vírusreplikáció mértékét jelző köpenyfehérje-tartalom meghatározása révén;
- TNV fertőzése következtében képződő stresszetilén mérése a két dohányvonal leveleiben;
- TNV által kiváltott lipidperoxidáció nyomán keletkező etán mennyiségének vizsgálata a CTKm és az SR<sub>1</sub> dohányokban;
- kórfolyamatfüggő (PR)- fehérjék (kitináz,  $\beta$ -1,3-glükanáz) enzimaktivitás növekedésének mérése CTKm és SR<sub>1</sub> dohánylevelekben a TNV-fertőzést követően;
- tekintettel arra, hogy a levelek növényekről történő levágása és sötétben való inkubációja serkenti az öregedést, ilyen kezelésnek vetettünk alá CTKm és SR<sub>1</sub> leveleket, majd miután a levágott levelek öregedésükben már szembeötlő eltérést mutattak, meghatároztuk bennük különböző reaktív oxigénfajtákat méregtelenítő antioxidánsok

mennyiségét, illetve aktivitását, valamint a membránok szerkezetének stabilitására utaló elektrolitkiáramlás mértékét.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. A kísérleti növények

A kísérleteket az *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90RK) törzsével transzformált, CaMVp35S-*ipt* gént tartalmazó dohányvonalon (CTKm) és a hozzá tartozó kontroll fajtán (Petit Havana = SR<sub>1</sub>) végeztük. A növényeket üvegházi körülmények között neveltük.

### 4.2. A növények fertőzése

A dohánynövényeket TNV-vel inokuláltuk. A vírustörzs az MTA Növényvédelmi Kutatóintézete izolátumgyűjteményéből, Szirmai Jánostól származik, fenntartása babon történt. Szerológiaiilag a TNV-E törzsével mutat rokonságot.

A növényeket mechanikailag inokuláltuk spatula segítségével, a levelek felületére karborundumot szórtunk a fertőzési helyek számának növelése érdekében. Az inokulációhoz használt fertőzött növényi mintát 0,1 M Sörensen foszfát-pufferben (pH 7,0) homogenáltuk.

### 4.3. Izopentenil-adenozin és zeatin-ribozid típusú citokininek mennyiségi meghatározása szerológiai úton

#### 4.3.1. Citokininek kivonása növényi mintából

8-12 hetes dohánynövények kifejtett leveleit (20-25 g) 80 %-os jéghideg metanol oldatban (250 ml) homogenáltuk, ezt centrifugáltuk (3700 g, 30 perc, 4 °C), majd a felülúszót 37 °C-on, vízlégszivattyúhoz kapcsolt Rotadest bepárlókészülékkel, vákuumban, 40 ml végtérfogatra pároltuk be. Az így nyert növényi citokinin kivonatot használtuk mennyiségi meghatározásra.

#### 4.3.2. A citokininek kvantitatív meghatározásához használt ELISA módszer

Növényi minták citokinintartalmának mennyiségi vizsgálata szerológiai úton más analitikai módszerekhez képest gyorsabban és egyszerűbben elvégezhető (Pogány, 1999). A dohánylevél kivonatok citokinin meghatározása az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében kifejlesztett kompetitív-indirekt rögzített-antigénalapú ELISA módszerrel történt (Székács és munkatársai, 2000), amelynek lépései a következők: 1. *érzékenyítés*, 2. *blokkolás*, 3. *kompetíciós elegy felvitele*, 4. *második antitest hozzáadása*, 5. *a jelzőenzim szubsztrátjának felvitele*, 6. *leolvasás fotométerrel*.

1. Az ELISA-lemez *érzékenyítése* során felvitt haptén-fehérje konjugátum BSA (bovine serum albumin) fehérjéhez kötött citokinin célmolekula, tehát zeatin-ribozid (ZR) vagy izopentenil-adenin-ribozid (izopentenil-adenozin; IPA) volt. A konjugátumok 0,1 M karbonát-bikarbonát pufferben (pH 9,6), 1 illetve 5 µg/ml koncentrációban (ZR

esetében 1 µg/ml, IPA esetében 5 µg/ml), 100 µl/üreg mennyiségben kerültek a mikrotálcára. 37 °C-on végzett termosztálást követően 0,2 % Tween-t tartalmazó PBS (phosphate-buffer saline) -pufferrel (pH 7,4) (= PBST 0,2) mostuk a lemezt.

2. A *blokkolást* 3 %-os zselatinos PBS pufferrel 150 µl/üreg mennyiségben végeztük, termosztáltuk (37 °C-on), majd a lemezt PBST 0,2 pufferrel mostuk.

3. A *kompetíciós elegy* 50 µl OVA(ovalbumin)-ZR, vagy OVA-IPA konjugátummal szemben termelt antiszérum 1:100 arányú hígításából állt (0,05 % Tween-t és 1 % zselatint tartalmazó PBS-pufferben), továbbá 50 µl hígított növényi citokinin kivonatból. A növényi minta hígítását is az antiszérum hígításához használt pufferrel végeztük. Az ELISA-lemezt ezután az előző lépésekkel azonos módon termosztáltuk, majd újra PBST 0,2 pufferrel mostuk.

4. *Második antitestként* egy alkalikus-foszfátáz enzimmel jelölt, nyúl IgG-vel szemben termelt kecske-antiszérumot használtunk 150 mM NaCl-t és 0,1 % Tween-t tartalmazó 50 mM Tris-pufferben (pH 7,8), 1:5000 arányú hígításban, 100 µl/üreg mennyiségben. A lemezt ezt követően ismét termosztáltuk és PBST 0,2 pufferrel mostuk.

5. A jelzőenzim *szubsztrátját* (4-nitrofenil-foszfát) 0,5 mM diethanolamin pufferben (pH 9,8), 0,1 %-os koncentrációban, 200 µl/üreg mennyiségben vittük fel a lemezre.

6. Utolsó lépésként ELISA-lemezek *leolvasására* használt spektrofotométerrel ("ELISA readerrel") 405 nm-en mértük az üregekben kifejlődő színintenzitást, amelynek mértéke fordított arányban állt a növényi minta

citokininintartalmával, amelyet szigmoid kalibrációs görbe segítségével állapítottunk meg.

#### 4.4. TNV köpenyfehérje-tartalom mérés DAS-ELISA módszerrel

A TNV replikáció mértékét a fertőzött dohánylevelekben DAS-ELISA módszerrel határoztuk meg (Clark és Adams, 1977), ami a növényi szövet vírusköpenyfehérje-tartalmát jelzi. A vizsgálatot poliklón antiszérummal, a Loewe Biochemica GmbH Tobacco Necrosis Virus E ELISA Kit-jével végeztük. A vizsgálat lépései: 1. *érzékenyítés*, 2. *vírus-fertőzött növényi szövetből származó kivonat hozzáadása*, 3. *antitest-jelzőenzim konjugátum felvitele*, 4. *a jelzőenzim szubsztrátjának hozzáadása*, 5. *fotometrálas*.

1. Az *érzékenyítés* az antiszérum 1:200 arányú hígításával, 150 µl/üreg mennyiségben történt. Az antiszérumot nátrium-karbonát/nátrium-hidrogénkarbonát pufferben (pH 9,6) oldottuk.

Az inkubációt követően 0,05 % Tween-t tartalmazó PBS-pufferrel (pH 7,4) mostuk a lemezt.

2. A fertőzött leveleket az inokulációt követő nyolcadik napon távolítottuk el a növényről, folyékony nitrogénben megfagyasztottuk, liofilizáltuk és a vizsgálatot megelőzően mértem a liofilizált levélminták tömegét. A mintákhoz adott *kivonó puffer* (1 % tejport és 2 % polivinil-pirrolidont tartalmazó mosó puffer) mennyiségét a száraz tömegek alapján számítottuk ki: 50, 150 és 450 x-es hígításokat alkalmazva. A levélhomogenátumokat centrifugáltuk (15000 g, 15 perc, 4 °C), a felül-

úszókat az érzékenyített ELISA-lemez üregeibe pipettáztuk 150 µl/üreg mennyiségben, majd a lemezt egy éjszakán át 4 °C-on tároltuk.

3. A lemez PBST 0,05 pufferrel való mosása után az üregekbe mértük az *antitest-jelzőenzim konjugátumot* 1:200 hígításban, 1 % tejport tartalmazó mosópufferben (= konjugátum puffer), 150 µl/üreg mennyiségben. A lemezt ezután ismét inkubáltuk és mostuk.

4. Az *alkalikus-foszfátáz jelzőenzim szubsztrátját* (4-nitrofenil-foszfát) diethanol-amin és magnézium-klorid tartalmú pufferben (pH 9,8), 1 mg/ml koncentrációban vittük az üregekbe (150 µl/üreg mennyiségben). Az enzim aktivitása nyomán képződő színes termék (para-nitro-fenol) mennyiségét 405 nm hullámhosszon, ELISA-leolvasóval mértük. A vírushertőzött levélminták köpenyfehérje-tartalmát a kapott abszorbancia-értékek alapján hasonlítottuk össze.

#### 4.5. Klorofilltartalom becslése Minolta SPAD-502 készülékkel

A Minolta SPAD-502 készüléket levelek klorofilltartalmának gyors, roncsolásmentes meghatározására fejlesztették ki (Penuelas *et al.*, 1994; Hoel and Solhaug, 1998). Működése során két különböző hullámhosszúságú fényt bocsát ki, majd méri a levél által elnyelt mennyiségeket. Az alacsonyabb hullámhosszú (650 nm) fény abszorpciója a levélben lévő klorofill-a és klorofill-b együttes mennyiségére utal. Az így kapott elnyelési értéket a nagyobb hullámhosszú (940 nm) fény elnyelési értékével korrigálva becsüli a levél relatív klorofilltartalmát. Ez azt jelenti, hogy a készülék által szolgáltatott adat jól használható levelek klorofilltartalmának összehasonlítására, de nem nyújt abszolút értéket

(mg fotoszintetikus pigment/g növényi minta), mint amit a hagyományos szerves oldószerrel történő extrakció és fotometrálas ad. A készülékkel mért adatok 0 és 500 egység közötti skálán mozogtak, hibája (azonos levélminta ismételt visszamérése esetén) 10-15 egység között ingadozott.

#### 4.6. Etán és etilén mérése gázkromatográffal

A dohánylevelek által termelt etán és etilén mennyiségét gázkromatográffal határoztuk meg. A leveleket a növényről eltávolítottuk és hermetikusan zárható műanyag küvettákba helyeztük. A küvetták alján lévő kevés víz védte a leveleket a kiszáradástól. A küvetták tetején levő csőcsontot egy gumimembrán zárta le, ezen keresztül történt a mintavétel 1 ml térfogatú fecskendőre illesztett tűvel. Másik módszer szerint a vírusfertőzött és az egészséges levelekből 1,4 cm átmérőjű levélkorongokat vágunk ki, ezeket kis méretű (10 ml térfogatú) küvettákba tettük, 1 ml desztillált vízen úszatva. A mintavétel itt is gumimembránon keresztül történt. A gázelegy összetételét egy Varian Aerograph 3300 típusú, alumínium-oxid kolonnával (1/8 inch x 1 m) és lángionizációs detektorral felszerelt gázkromatográffal vizsgáltuk. A készülék hőmérsékleti paraméterei a következők voltak: injektor 80 °C, kolonna 80 °C, detektor 225 °C (Heiser *et al.*, 1998). A gázminták etán - és etiléntartalmát 1 ml etán ill. etilénstandard által adott csúcs területe alapján számítottuk ki.

#### 4.7. Kitináz és $\beta$ -1,3 glükánáz aktivitás fotometriás meghatározása

##### 4.7.1. Növényi minták extrakciója és fehérjetartalom meghatározása kitináz és $\beta$ -1,3 glükánáz mérés céljára

A TNV-vel fertőzött ill. fertőzetlen növények leveleiből körülbelül 0,1 g tömegű mintákat gyűjtöttünk. A mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -70 °C-on tároltuk. A kivonás 0,1 % polivinil-pirrolidont tartalmazó 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH 5,5) történt, egy tömeg-egység növényi mintához (0,1 g) négy térfogategység kivonópuffert (0,4 ml) adva. A minták fehérjetartalmának meghatározása Bradford (1976) szerint történt, Bio-Rad "Protein Assay" reagenssel.

#### 4.7.2. Kitinázaktivitás mérés mikrotiterlemezen

A kitinázaktivitás meghatározást Wirth és Wolf (1990) módszerével végeztük mikrotiterlemezen. A lemez üregeibe kétszerdesztilláltvízzel negyvenszeresre hígított 50 µl növényi enzimkivonatot pipettáztunk. A mintákhoz 150 µl 0,1 M-os nátrium-acetát puffert (pH 5,0), majd 50 µl kitinszubsztrátot (CM-Chitin-RBV; Loewe Biochemica GmbH) mértünk. A kitinpolimer-szubsztrátot alkotó monomerek mintegy 20 %-a "remazol brilliant ibolya" molekulával jelölt. A szubsztrát hozzáadása után a mikrotiterlemezt ragadós felületű műanyag fóliával zártuk le, erősen összeráztuk és 37 °C-on 20 percig inkubáltuk. Az enzimreakciót 50 µl 1 M-os sósavoldattal állítottuk le, majd a lemezt 10 percig jégen tároltuk. A kitináz enzimaktivitása nyomán a festékmolekulával jelölt kitinszubsztrátból mono- és oligomerek szabadultak fel, amelyek mennyisége az enzimaktivitás mértékével arányos volt. A reakció leállítását követően a lemezt mikrotiterlemez-centrifugával 4 °C-on, 3000 1/perc fordulaton, 10 percig centrifugáltuk. Centrifugálás után a lemez üregeiből



mintánként 175-175 µl felülúszót egy második, kis üregméretű mikrotiterlemezbe pipettáztunk át és ELISA-leolvasóval 550 nm hullámhosszon mértük az üregekben lévő kitinmonomer (oligomer)-remazol brilliant ibolya komplex fényelnyelését. Az értékeket referenciaként használt Sigma *Serratia marcescens* kitináenzim (2,5 mU = 41,7 pkat/üreg) aktivitásával összehasonlítva számítottuk ki az eredeti növényi minta enzimaktivitását.

#### 4.7.3. β-1,3 glükánáz aktivitás mérés mikrotiterlemezen

A növényi minták glükánázaktivitását Lever (1972) szerint határoztuk meg. Az enzim szubsztrátja a β-glükóz monomerekből álló laminarin poliszacharid volt, a színreakció az enzim aktivitása nyomán felszabaduló glükóz monoszacharid molekulák mennyiségével volt arányos. A mikrotiterlemez üregeibe 50 µl kétszerdesztilláltvízzel nyolcvanszorosra hígított növényi enzimkivonatot mértünk. Hozzáértünk 50 µl 0,2 M-os nátrium-acetát pufferben (pH 5,0) oldott – 4 mg/ml koncentrációjú – laminarin (Sigma) oldatot. A lemezt 60 percen át 37 °C-on inkubáltuk, ezután 200 µl 0,1 %-os p-hidroxibenzoészav-hidrazin oldatot pipettáztunk az üregekbe, amely a színreakciót kiváltotta. (A reagens készítése a következő volt: 0,1 g p-hidroxibenzoészav-hidrazint 10 ml 0,1 M-os sósavoldatban feloldottunk, majd hozzáértünk 40 ml 0,5 M-os nátrium-hidroxid oldatot és 50 ml kétszerdesztilláltvizet.) A mikrotiterlemezt ezután ragadós felületű műanyag fóliával lefedtük és 5 percre 100 °C-os

vízfürdőbe helyeztük. Ezt követően szobahőmérsékleten hagytuk kihűlni, majd ELISA-leolvasóval 410 nm hullámhosszon fotometráltuk.

Minden egyes növényi minta enzimkivonatából készítettünk párhuzamosan egy kontroll próbát is, amelyhez a laminarin szubsztrátot csak a 60 perces inkubáció és a színreakciót előidéző reagens bemérése után adtuk hozzá. Az így kapott abszorbanciaértéket a laminarinnal inkubált minták értékeiből kivontuk. A tényleges enzimaktivitásokat glükóz standardsor beállításával kaptuk meg (0, 25, 62,5, 125 nmol glükóz/üreg), amit a mikrotiterlemezen a mintákkal azonos módon határoztunk meg.

#### 4.8. Levágott dohánylevélen végzett kísérletek

##### 4.8.1. A levágott levelek előkészítése

A vizsgálatokhoz 8-12 hetes dohánynövények alsó, kifejlett leveleit használtuk. A leveleket a növényekről levágtuk és vagy egyesével 250 ml-es küvetákba helyeztük őket, vagy több levágott levelet állítottunk nagyméretű üveg deszikkátorba. A levelek kiszáradását a küvetta, illetve deszikkátor alján lévő desztillált víz akadályozta meg. A leveleket levágásuktól kezdve folyamatosan 22-24 °C-on, sötétben tároltuk.

##### 4.8.2. Levélkorongok membránpermeabilitásának vizsgálata kondukto-méterrel

A dohánylevél-sejtmembránok öregedés okozta áteresztőképesség-növekedését a sejtekből kiáramló elektrolitok mennyisége alapján határoztuk meg. A vizsgálatot a levelekből kivágott 5-5 db 10 mm átmérőjű

levélkoronggal, főzőpohárban, 10 ml kétszerdesztilláltvízen úsztatva végeztük. A levélkorongokat 5 órán keresztül inkubáltuk, az inkubálóoldat vezetőképességét ezt követően Radelkis OK-102 típusú készülékkel mértük. Az adatokat  $\mu\text{S/g friss levéltömeg}$  mértékegységben adtuk meg.

#### 4.8.3. Levágott levelek antioxidáns enzimaktivitásainak fotometriás mérése

##### 4.8.3.1. Enzimkivonat készítése dohánylevélből

Az enzimaktivitás-vizsgálatok előtt a levágott dohányleveleket 8 napig sötétben inkubáltuk.

A sejtmentes enzimkivonatot 0 - 4 °C közötti hőmérsékleten készítettük. CTKm és SR<sub>1</sub> dohánynövények leveleiből 0,5 g tömegű mintákat vettünk, előhűtött dörzsmozsárba helyeztük és mozsártörővel homogenáltuk mintánként 3 ml hideg, 0,05 M-os TRIS-HCl pufferben (pH = 7,8), amely 7,5 vegyes % vízdékony polivinil-pirrolidon K 25-öt és 1 mM EDTA-Na<sub>2</sub>-t tartalmazott. A homogenátumot centrifugáltuk (12000 g, 20 perc, 4 °C), és a felülúszóval dolgoztunk tovább az aktivitások meghatározása során. Az enzimkivonatot a mérés teljes időtartama alatt jeges vízfürdőben tároltuk.

##### 4.8.3.2. Glutation S-transzferáz

A glutation S-transzferáz aktivitását Mauch és Dudler (1993) szerint mértük. A reakcióelegy 2,75 ml végtérfogatban 2 ml 0,1 mM EDTA-Na<sub>2</sub>-t tartalmazó 0,1 M-os nátrium-foszfát puffert (pH = 6,5), 0,5 ml 20 mM-os, a fenti pufferben oldott redukált glutationt, 150  $\mu\text{l}$  18,3 mM-os, eta-

nolban oldott 1-klór-2,4-dinitro-benzolt és 100  $\mu\text{l}$  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, Shimadzu UV 160 A spektrofotométerrel mértük. A kontroll elegy növényi kivonatot nem tartalmazott. Az adatokat *nkat enzimaktivitás/g friss levéltömeg* mértékegységben adtuk meg mindegyik vizsgált antioxidáns enzim esetében. (kat = Katal; az enzimaktivitás SI mértékegysége. Jelentése: az enzim katalitikus aktivitása nyomán egy másodperc alatt képződő termék mólból kifejezve.)

#### 4.8.3.3. Aszorbinsav-peroxidáz

Az aszorbinsav-peroxidáz aktivitásának mérését Nakano és Asada (1981) módszere alapján végeztük. A reakcióelegy 2,25 ml végtérfogatban 2 ml 0,2 M-os TRIS-HCl puffert (pH = 7,8), 100  $\mu\text{l}$  5,625 mM-os aszorbinsav oldatot, 50  $\mu\text{l}$  nyers növényi enzimkivonatot és 100  $\mu\text{l}$  11,25 mM-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  oldatot tartalmazott. Az aszorbinsav fogyásából eredő abszorbanciaváltozást kvarc küvettában, 290 nm-en, 3 percig mértük. A kontroll meghatározására szolgáló elegy nem tartalmazott  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t. Az aszorbinsav moláris extinkciós koefficiense ( $\epsilon$ ) 290 nm-en  $\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

#### 4.8.3.4. Kataláz

A kataláz aktivitását Aebi (1984) szerint mértük. A reakcióelegy 2,15 ml végtérfogatban 2 ml 0,1 M-os (pH = 6,0) foszfát puffert, 100 µl 270 mM-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  oldatot és 50 µl növényi kivonatot tartalmazott. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon_{240} = 6450 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) fogyását 240 nm hullámhosszon, kvarc küvettában mértük. A kontroll elegyben nem volt növényi kivonat.

#### 4.8.3.5. Peroxidáz

A peroxidáz aktivitását guajakol szubsztráttal Rathmell és Sequeira (1974) módszere alapján határoztuk meg. A reakcióelegy 2,45 ml végtérfogatban 2,2 ml 0,1 M-os (pH = 6,0) foszfát puffert, 100 µl 50 mM-os guajakolt, 100 µl 32,5 mM-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  oldatot és 50 µl növényi kivonatot tartalmazott. A guajakolból képződő tetrakonjugátum ( $\epsilon_{436} = 106,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) képződését 436 nm hullámhosszúságon követtük nyomon. A kontroll elegy növényi kivonatot nem tartalmazott.

#### 4.8.4. Aszkorbinsavtartalom fotometriás meghatározása levágott levelekben

Az aszkorbinsav koncentrációját Wise és Naylor (1987) alapján fotometriásan mértük. A levélből 0,3 g-ot homogenáltunk az enzimkivonatok készítésénél leírt módon 3 ml 1 M-os  $\text{HClO}_4$  oldatban, majd a szuszpenziót centrifugáltuk (12000g, 20 perc, 4 °C). A felülúszóból 100 µl-t kivettünk és 2 ml borostyánkősav-pufferhez (pH = 12,7) 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

aszorbát-oxidáz enzimet adtunk az oldathoz, és az extinkció csökkenését 265 nm-en követtük, amíg a minimumot el nem érte. A két adat különbsége arányos az oldat aszcorbinsav tartalmával, amit a fotométerről leolvasott két abszorbancia érték különbségeként ( $\Delta E$ ) adtunk meg.

#### 4.8.5. Glutationtartalom fotometriás mérése

A nem fehérjetermészetű (szabad) tiolok koncentrációját De Kok és Graham (1989) szerint mértük. A dohánylevelekből mintánként 0,5 g mennyiséget 5 ml homogenáló pufferben eldörzsöltünk és centrifugáltunk (12000 g, 4°C, 20 perc). A méréshez a felülúszót használtuk. A homogenáló puffer 300 ml térfogatban 6,099 g 5-szulfoszalicilsavat, 0,45 g aszcorbinsavat és 0,1116 g EDTA- $\text{Na}_2$ -t tartalmazott. A mérést Shimadzu UV 160A spektrofotométerrel 412 nm hullámhosszúságon végeztük. A küvettába bemértünk 2 ml 0,1 M (pH = 7,8) Na-foszfát puffert, 0,2 ml 10 mM 5,5'-ditio-bisz-nitrobenzoetsavat (DTNB) és 0,5 ml felülúszót. A kontroll nem tartalmazta a DTNB-t. Kalibrációs görbét glutation oldatokkal készítettünk.

#### 4.9. A kísérleti adatok statisztikai értékelése

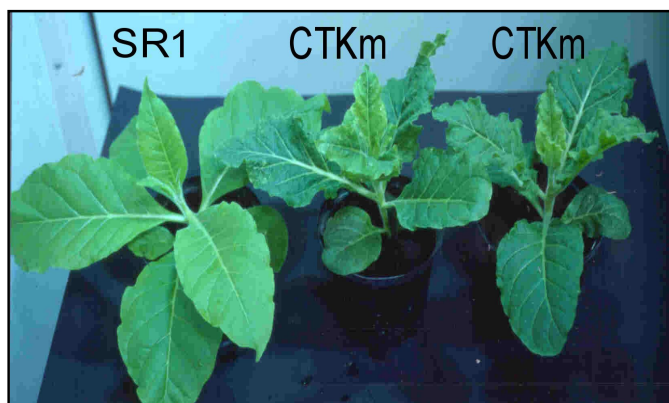
A közölt eredmények két független kísérlet, kísérletenként 4-6 párhuzamos mérésének átlagát mutatják be. A középértékek különbözőségét

Student-féle t-próbával vizsgáltuk, és legtöbbször  $P = 95\%$  valószínűséggel adtuk meg.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Az izopentenil-transzferáz génnel transzformált dohánynövények fejlődési és morfológiai sajátosságai

A vizsgálatokban szereplő izopentenil-transzferáz (*ipt*) génnel transzformált dohányvonal (CTKm) egyedeit a levelek harsány-zöld színe, a levéllemez fodrozottsága, az erek közötti régiókban megfigyelhető szövetszaporodás, hólyagos levélfelszín jellemzik (5.1. ábra).

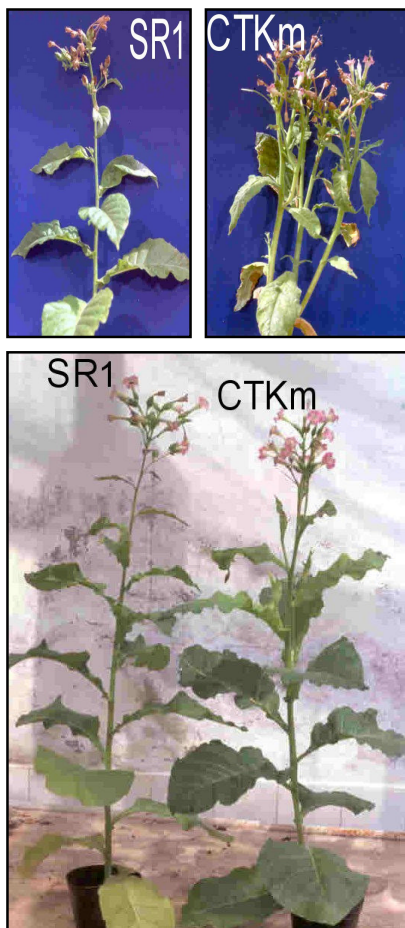


5.1. ábra. Kontroll (SR<sub>1</sub>) és izopentenil-transzferáz génnel transzformált, citokinint túltermelő (CTKm) dohánynövények 8 hetes korban

A levelek közötti szártagok rövidebbek, a leveles szár zöldtömege nagyobb, a gyökérzet azonban alulfejlett. A CTKm növények a kontrollhoz képest alacsonyabbak, lassabban fejlődnek, a generatív fázist



később érik el. Jellemző rájuk az apikális dominancia feloldása, a levélnyelek és a szár találkozásánál lévő hónaljrügyek kihajtanak.



5.2. ábra. Kontroll (SR1) és CTKm dohánynövények virágzás közben (22 hetes korban)

A kontroll növényeken megfigyelhető természetes levélöregedés, – tehát az alsó, idős levelek fokozatos sárgulása és elpusztulása – részben gátolt, az alsó levelek lényegesen hosszabb ideig juvenilis állapot-ban maradnak, nem öregszenek (5.2. ábra).

#### 5.2.Citokininek ELISA vizsgálata

A transzgenikus növényekbe (CTKm) beépített *ipt*-gén tényleges biológiai aktivitását, a gén termékének (izopentenil-transzferáz) működése nyomán megnövekedett citokinintartalom kompetitív ELISA vizsgálatával igazoltuk (5.1. táblázat). A CTKm vonalban a zeatin-ribozid (ZR) típusú citokininek

átlagos szintje megközelítőleg háromszorosa (64,95) volt a kontroll (SR<sub>1</sub>) értékének. Az egyébként kisebb koncentrációban előforduló izopentenil-adenozin (IPA) típusú citokininek mennyisége pedig az SR<sub>1</sub>-ben nem érte el a mérésstartomány alsó küszöbértékét, a CTKm vonalban viszont ebben az esetben is magasabb, jól kimutatható értéket kaptunk (7,27).

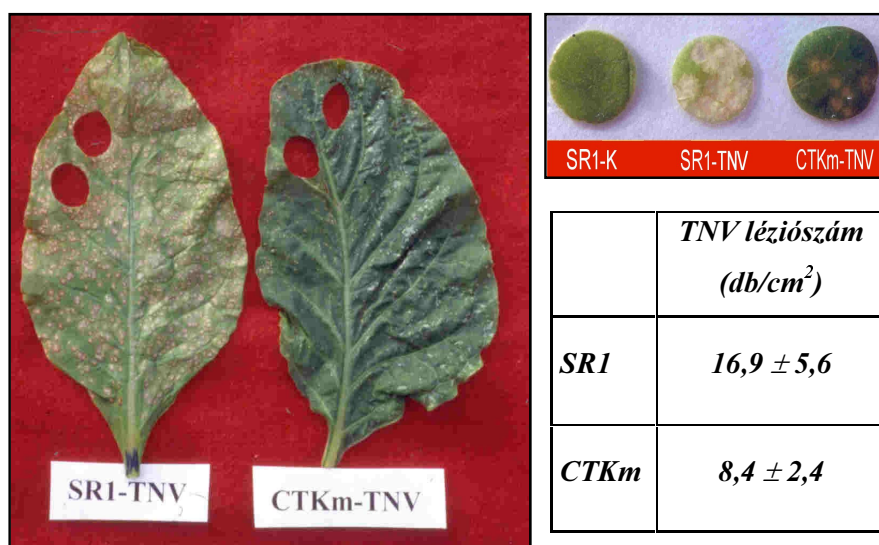
5.1. táblázat. Zeatin-ribozid (ZR) és izopentenil-adenozin (IPA) citokininek koncentrációja CTKm és SR<sub>1</sub> dohányvonalakban (két független kísérlet átlaga)

|                               | ZR<br>(ng g <sup>-1</sup> friss tömeg) | IPA<br>(ng g <sup>-1</sup> friss tömeg) |
|-------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| CTKm                          | 64,95<br>(52,91 – 77,9)                | 7,27<br>(6,28 – 9,36)                   |
| SR <sub>1</sub><br>(kontroll) | 21,91<br>(17,83 – 26,84)               | n.d.*                                   |

\* a mérés határ alsó küszöbértéke alatti érték

### 5.3. A dohány nekrotikus vírus tünetei és a köpenyfehérje-tartalom alakulása

A TNV-vel történő mechanikai inokuláció lokális nekrotikus léziókat idézett elő az inokulált dohányleveleken. A vírus tünetei a CTKm növények levelein enyhébbek voltak (5.3. ábra). A CTKm növényeken észlelt léziószám csupán mintegy 50 %-a volt az SR<sub>1</sub> fajta levelein tapasztalt értéknek (5.2. táblázat). Ez a megfigyelés arra mutat, hogy a CTKm dohányvonal a kontroll fajtához képest ellenállóbb a dohány nekrotikus vírus nekrotikus tüneteinek kialakulásával szemben.



5.3. ábra. Dohány nekrosis vírus (TNV) tünetei 5 nappal a fertőzés után SR<sub>1</sub> és CTKm dohányokból származó egész levélen (bal oldali kép) és levélkorongon (jobb oldali kép)

5.2. táblázat. Dohány nekrosis vírus (TNV) léziószáma SR<sub>1</sub> és CTKm dohánynövényekről származó levélkorongokon (két független kísérlet, kísérletenként 8-10 SR<sub>1</sub> és CTKm levélkorong átlaga)

A vírusfertőzés által okozott betegségi tünetek összehasonlítása mellett lényegesnek véltük a vírusreplikáció mértékének vizsgálatát is, a beteg levelekből gyűjtött minták köpenyfehérje tartalmának DAS-ELISA módszerrel történő meghatározása alapján (5.3. táblázat).

5.3. táblázat. Dohány nekrosis vírus köpenyfehérje relatív mennyisége SR<sub>1</sub> és CTKm dohánynövények liofilezett mintáiban. A minták gyűjtése 8 nappal a fertőzés után történt. Fertőzetlen levél kivonatában mért abszorbancia érték: 0,160.

SzD<sub>5%</sub>=0,354

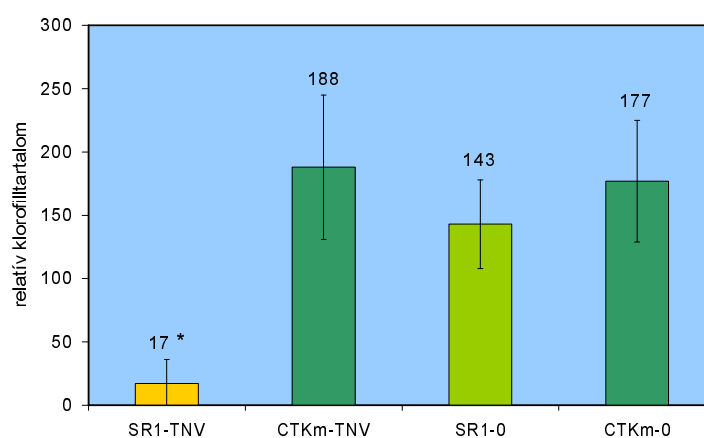
(két független kísérlet, kísérletenként 4 - 4 levélminta átlaga)

|                       | SR <sub>1</sub> | CTKm          |
|-----------------------|-----------------|---------------|
| Abszorbancia (405 nm) | 0,964 ± 0,378   | 0,538 ± 0,203 |

Az értékek jelentős szórása ellenére a kontroll (SR<sub>1</sub>) fertőzött leveleiben mért TNV köpenyfehérje-tartalom – a tünetekkel összhangban – magasabb volt, tehát az *ipt*-génnel transzformált CTKm vonalban a víruspartikulumok mennyisége is részben visszaszorult.

#### 5.4 Klorofilltartalom változás dohány nekrosis vírussal fertőzött levelekben

A TNV fertőzése nyomán az SR<sub>1</sub> dohányfajta inokulált levelei a nekrotikus léziók megjelenését követően elsárgultak, klorofilltartalmuk zöme rövid időn belül lebomlott (5.4. ábra).



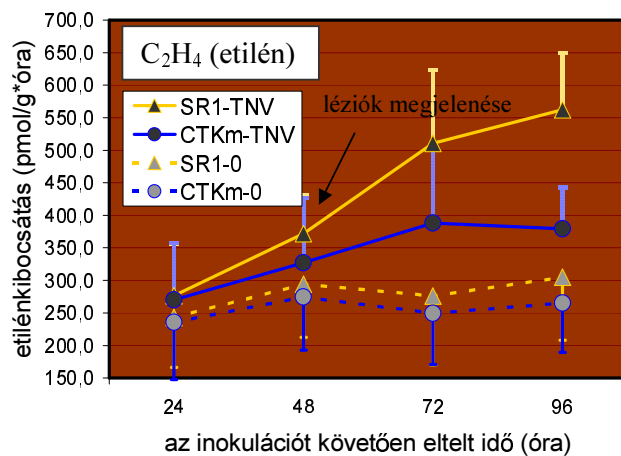
5.4. ábra. SR<sub>1</sub> és CTKm dohányvonalak TNV-vel fertőzött és egészséges (0) leveleinek relatív klorofilltartalma, Minolta SPAD-502 készülékkel mérve. A méréseket 10 hetes dohánynövények alsó levelein, 7 nappal a fertőzés után végeztük.

\*Az eltérés 95 %-os valószínűséggel szignifikáns  
(két független kísérlet 4 – 4 párhuzamos méréseinek átlaga)

Ezzel szemben az *ipt*-génnel transzformált CTKm dohányvonal fertőzött leveleiben ez a nekrotikus tünetek megjelenésével összefüggésben álló nagymérvű klorofilltartalom-csökkenés elmaradt, a levelek a léziók kifejlődését követően is megőrizték az egészséges növényekre jellemző zöld színüket.

### 5.5. Etilén és etán kibocsátás

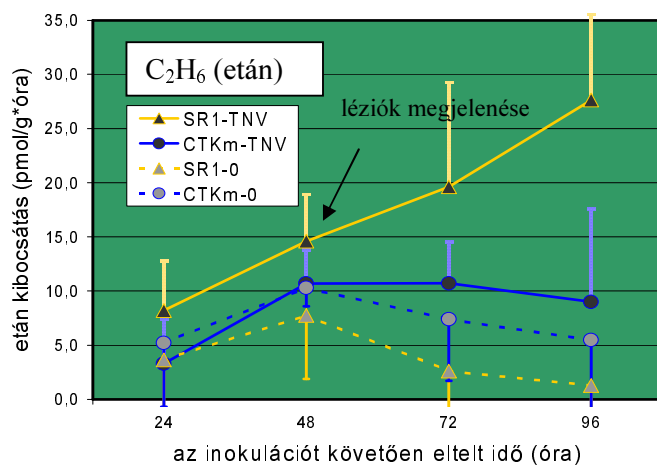
A CTKm és a kontroll (SR<sub>1</sub>) dohányvonalak TNV fertőzése nyomán fellépő fokozott etilén- és etánkibocsátását fertőzött levelekből kivágott levélkorongok által termelt gázelegy gázkromatográfiás vizsgálatával hasonlítottuk össze. Az etilén növényi szénészencia- és stresszhormon termelődésének mennyisége két nappal az inokuláció után észrevehetően megnövekedett (5.5 ábra).



5.5. ábra. Dohány nekrotízis vírussal (TNV) fertőzött és egészséges CTKm és SR<sub>1</sub> dohánylevélkorongok etiléntermelése 24-96 órával az inokuláció után (két független kísérlet 4 - 4 párhuzamos mérésének az átlaga)

A citokinint túltermelő, juvenilis CTKm fajta levélkorongjainak etiléntermelése a vírusfertőzés következtében – összhangban az alacsonyabb léziószámmal – kisebb mértékben emelkedett, mint az SR<sub>1</sub> fajta levélkorongjainak etilénkibocsátása. A különbség már az inokulációt követő 3. napon megfigyelhető, de csak a 4. napon lett statisztikailag is igazolható (5.5. ábra).

Az etán a lipidperoxidáció során képződik, jelenléte a növényeket ért biotikus és abiotikus stresszek sejtmembránokra gyakorolt roncsoló hatását jelzi. Termelődése a TNV-fertőzést követően az etilénhez hasonlóan alakult, azzal a különbséggel, hogy a TNV-vel fertőzött SR<sub>1</sub> fajta levélkorongjai esetében az etán képződésének növekedése még szembeötlőbb volt a TNV-vel fertőzött CTKm vonalhoz képest (5.6. ábra).

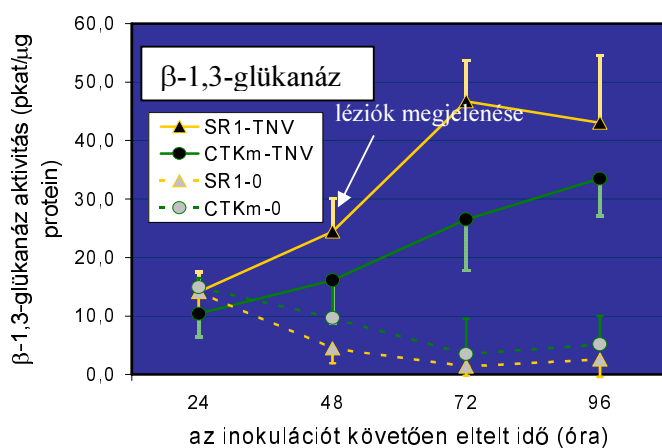


5.6. ábra. CTKm és SR<sub>1</sub> dohányvonalak TNV-vel inokulált és fertőzetlen leveleinek etántermelése 24-96 órával az inokuláció után  
(két független kísérlet 4 - 4 párhuzamos mérésének az átlaga)

A TNV fertőzése tehát fokozott etilén- és etánpépződést idézett elő a megbetegített dohánylevelekben, a citokinin génnel transzformált CTKm dohányvonalban mérhető kibocsátásnövekedés azonban mind az etilén, mind az etán esetében lényegesen kisebb mértékű volt.

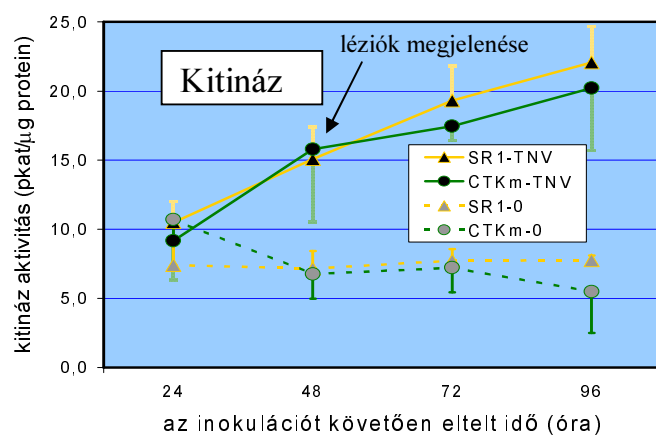
#### 5.6. $\beta$ -1,3-glükánáz és kitináz aktivitások

A  $\beta$ -1,3-glükánáz és a kitináz enzimek a növényekben azonosított kórfolyamatfüggő fehérjék két képviselője. Szintézisük a növényben különböző kórokozók fertőzését követően, de abiogén stresszhatások következtében is megindul. Az aktivitásokat spektrofotométerrel mértük. A TNV fertőzés hatására az inokulált dohánylevelek nagymértékű  $\beta$ -1,3-glükánáz- és kitinázaktivitás-növekedést mutattak. A  $\beta$ -1,3-glükánáz enzim aktivitásának növekedése az SR<sub>1</sub> vonal növényeinek leveleiben volt magasabb (5.7. ábra).



5.7. ábra. Dohány nekrotízis vírus (TNV) fertőzés hatása SR<sub>1</sub> és CTKm dohányvonalak  $\beta$ -1,3-glükánáz aktivitására 24 - 96 órával az inokuláció után (két független kísérlet 4 - 4 párhuzamos mérésének az átlaga)

A CTKm és az SR1 vonalak kitináz aktivitásának emelkedése pedig nem tért el egymástól (5.8. ábra).



5.8. ábra. Dohány nekrosis vírus (TNV) fertőzés hatása SR<sub>1</sub> és CTKm dohánylevelek kitináz aktivitására 24 - 96 órával az inokuláció után (két független kísérlet 4 - 4 párhuzamos méréseinek az átlaga)

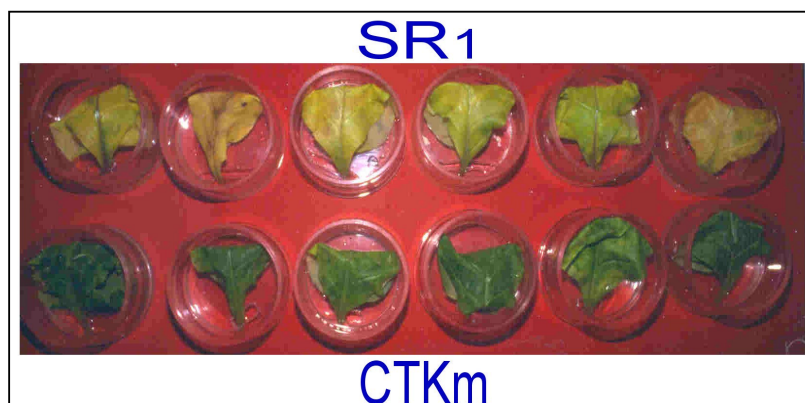
## 5.7. Fertőztelen, levágott dohányleveleken végzett kísérletek

### 5.7.1. Levágott SR<sub>1</sub> és CTKm levelek klorofilltartalom változása és etiléntermelésük

Az alábbiakban taglalt kísérleteknek az a megfigyelésünk volt az előzménye, hogy az SR<sub>1</sub> (kontroll) és a CTKm (*ipt*-génnel transzformált) dohánynövényekről levágott és sötétben tárolt levelek öregedésének folyamata nagy eltérést mutatott. Természetesen a CTKm vonalban jelenlévő *ipt*-génből fakadóan számítottunk arra, hogy a transzformált vonal levágott levelei az ép CTKm növényekhez hasonlóan lassabban

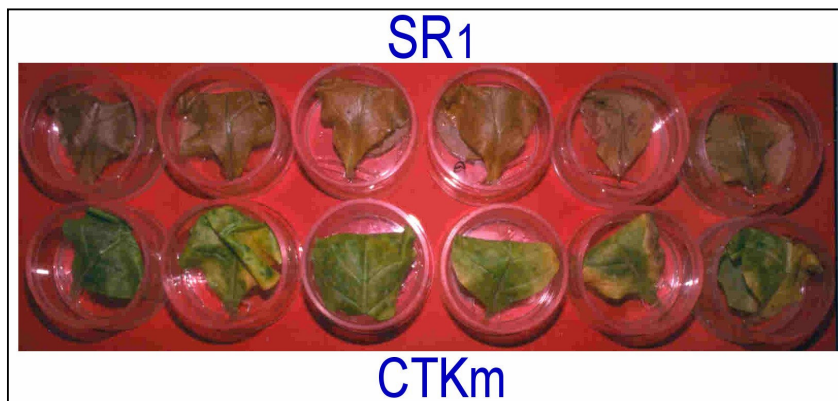


öregszenek majd, ilyen mértékű különbséget azonban nem vártunk (5.9. ábra).



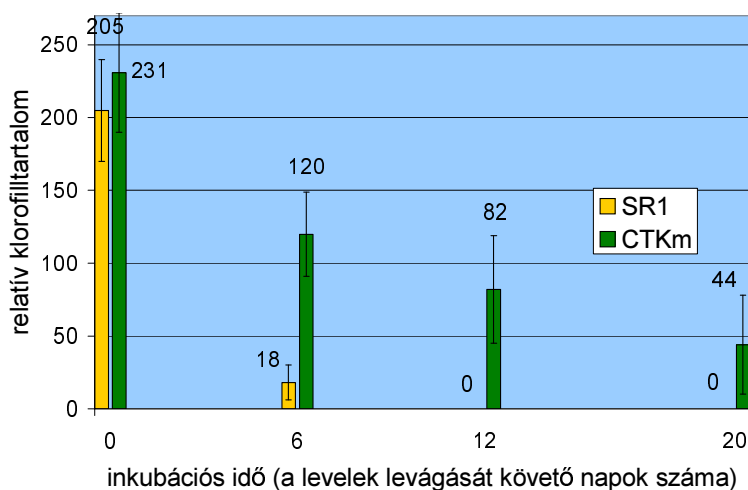
5.9. ábra. Levágott és sötétben tárolt SR<sub>1</sub> (felső sor) és CTKm (alsó sor) dohánylevelek etilénmérésre használt küvettákban. A felvétel a levelek levágása után 10 nappal készült. A kísérlet ideje alatt a levágott leveleken nekrotrof kórokozók megtelepedését nem tapasztaltuk.

A vizsgálatokhoz használt kifejlett (nem szeneszzens) dohányleveleket a levágást követően légmentesen zárható küvettákba helyeztük és sötétben tároltuk. A leveleket a kiszáradástól a küvetták alján lévő víz óvta. Az SR<sub>1</sub> (kontroll) levelek már 4 nappal a levágást követően nyilvánvalóan sárgábbak voltak, mint a CTKm növényekről származó levelek, 20 nappal a levágás után pedig az SR<sub>1</sub> vonalról származó levelek egyöntetűen elpusztultak (5.10. ábra). A CTKm vonalról gyűjtött leveleken viszont az öregedés jelei csupán erősen megkésve (12-16 nappal a levágás után) kezdtek megjelenni, a levéllemez szélétől a közepe felé húzódó sárgulás formájában (5.10. ábra).



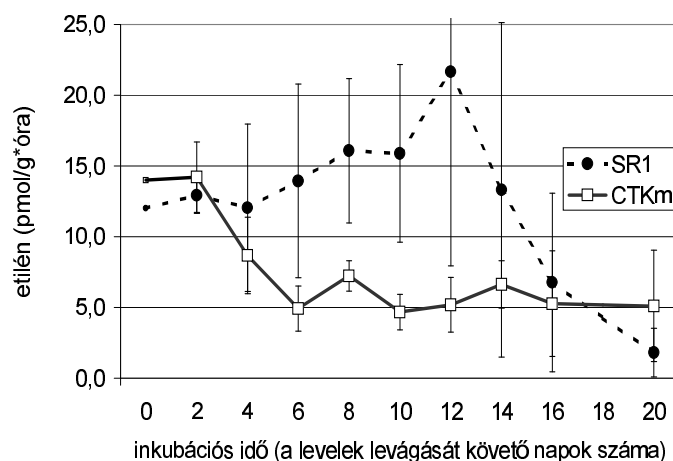
5.10. ábra. Levágott és sötétben tárolt SR<sub>1</sub> (felső sor) és CTKm (alsó sor) dohánylevelek, a levelek levágása után 20 nappal. Az SR<sub>1</sub> levelek erre az időre elpusztultak, a CTKm levelek lassan öregszenek. A kísérlet ideje alatt a levágott leveleken nekrotróf kórokozók megtelepedését nem tapasztaltuk.

A levelek Minolta SPAD-502 készüléssel mért klorofilltartalom-változása is tükrözte a citokiningénnel transzformált CTKm vonal leveleinek késleltetett öregedését (5.11. ábra). Az SR<sub>1</sub> fajta leveleiben már 6 nappal a levágás után is csak egészen alacsony klorofilltartalom értéket (18) mértünk, a CTKm vonalban azonban még a kísérlet kezdetétől számított 12., sőt 20. napon is számottevő klorofilltartalmat (82 és 44) találtunk (5.11. ábra). Az *ipt*-gén szenescenciát gátló hatását a levágott SR<sub>1</sub> és CTKm levelek eltérő öregedése tehát jól szemléltette.



5.11. ábra. SR<sub>1</sub> és CTKm dohányvonalakról származó levágott levelek relatív klorofilltartalom-változása a levágástól számított 0-20 nap időszakban, Minolta SPAD-502 készülékkel mérve (két független kísérlet 6 - 6 párhuzamos méréseinek az átlaga)

Az etilén szeneszcenciahormon kibocsátása szintén párhuzamot mutatott a kétféle dohány leveleinek öregedésében megfigyelt nyilvánvaló különbséggel. A levelek levágását követő 6. naptól a 12. napig az SR<sub>1</sub> fajta leveleinek etiléntermelése messze túlszárnyalta a CTKm vonalról származó levelek etilénkibocsátását (5.12. ábra). Az SR<sub>1</sub> levelek pusztulásával azonban (16-20. nap) az etilén képződése is leállt, a CTKm vonal levelei esetében viszont a késleltetett szeneszcenciával összefüggésben az etilénképződés egyenletes, egyformán alacsony szintet mutatott.



5.12. ábra. Fertőzetlen SR<sub>1</sub> és CTKm dohányylevelek etilénkibocsátása. A leveleket a növényekről levágtuk és sötétben, légmentesen záró küvettákban 20 napig inkubáltuk.

A gázmintavétel másnaponként történt, a mintákat gázkromatográffal elemeztük (két független kísérlet 6 - 6 párhuzamos mérésének az átlaga)

### 5.7.2. Vezetőképesség-mérés és antioxidánsok vizsgálata

A kontroll (SR<sub>1</sub>) és az *ipt*-génnel transzformált (CTKm) dohány levágott leveleinek öregedésében következetesen megnyilvánuló nagyfokú eltérés indított bennünket arra, hogy ennek az egyszerű kísérleti rendszernek a segítségével megpróbáljunk részben választ adni a CTKm növényeken megfigyelt (5.3. alfejezetben ismertetett), nekrotikus vírustünetekkel szemben kialakuló rezisztencia jelenségre. Tekintettel arra, hogy a ROF-ot közömbösítő antioxidánsoknak a nekrotikus léziók kifejlődésének gátlásában komoly jelentőséget tulajdonítunk, következő vizsgálataink ezekre irányultak. Az 5.4. táblázat szerint a glutation S-transzferáz és az aszkorbinsav-peroxidáz aktivitása a normális szenescenciát mutató

levágott SR<sub>1</sub> levelekben 8 nappal a levágás után lényegesen alacsonyabb volt, mint az öregedésében gátolt CTKm vonalról származó levágott levelekben. A kataláz aktivitása kisebb mértékben ugyan, de szintén alacsonyabb volt az SR<sub>1</sub> levelekben, mint CTKm vonal leveleiben, a peroxidáz aktivitása viszont szignifikánsan nem tért el egymástól a két dohányvonal leveleiben.

5.4. táblázat. Antioxidáns enzimaktivitások SR<sub>1</sub> és CTKm dohányok levágott és sötétben tárolt leveleiben. A mérés 8 nappal a levelek levágása után következett.

<sup>a,b</sup> A különbség 95 %-os és <sup>a,c</sup> 99 %-os valószínűséggel szignifikáns.  
<sup>a,a</sup> Nincs szignifikáns különbség.

(két független kísérlet 6 - 6 párhuzamos mérésének az átlaga)

|                                                 | Antioxidáns enzimaktivitás  |                               |
|-------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
|                                                 | SR <sub>1</sub>             | CTKm                          |
| Glutation S-transzferáz<br>(nkat/g friss tömeg) | 8,85 ± 3,70 <sup>a</sup>    | 16,89 ± 4,96 <sup>b</sup>     |
| Aszkorbinsav-peroxidáz<br>(nkat/g friss tömeg)  | 13,43 ± 2,67 <sup>a</sup>   | 40,71 ± 15,60 <sup>c</sup>    |
| Kataláz<br>(nkat/g friss tömeg)                 | 868,20 ± 82,15 <sup>a</sup> | 1149,74 ± 222,71 <sup>b</sup> |
| Peroxidáz<br>(nkat/g friss tömeg)               | 277,39 ± 31,51 <sup>a</sup> | 310,95 ± 35,99 <sup>a</sup>   |

A nem enzimatis antioxiánsok közül két alapvető fontosságú vegyület illetve vegyületcsoport (aszkorbinsav és nemfehérje tiolok) mennyiségét vizsgáltuk (5.5. táblázat). Az aszkorbinsav mennyisége jelentős eltérést mutatott a kétféle dohány leveleiben, a CTKm vonal leveleiben mért

érték magasabb volt a kontroll (SR<sub>1</sub>) aszkorbinsavtartalmához képest. A nemfehérje tiolok (elsősorban glutation) koncentrációja azonban az SR<sub>1</sub> és a CTKm vonalakat összehasonlítva nem mutatott statisztikailag igazolható különbséget (5.5. táblázat).

5.5. táblázat. SR<sub>1</sub> és CTKm dohánylevelek nem enzimikus antioxidáns tartalma és a levelekből kivágott levélkorongok elektrolitkiáramlása. A leveleket levágtuk és a vizsgálat megkezdése előtt 8 napig sötétben tároltuk. Az ionkiáramlást ismétlésenként 5-5 db levélkoronggal, 10 ml kétszerdesztillált vízben, 5 órán át inkubálva végeztük. Az inkubáló közeg vezetőképességét konduktométerrel mértük.<sup>a,b</sup> A különbség 99 %-os és<sup>a,c</sup> 99,9 %-os valószínűséggel szignifikáns.<sup>a,a</sup> Nincs szignifikáns különbség.

(két független kísérlet 6 - 6 párhuzamos mérésének az átlaga)

|                                              | SR <sub>1</sub>              | CTKm                         |
|----------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Aszkorbinsav<br>(ΔE, 265 nm)                 | 0,0234 ± 0,0023 <sup>a</sup> | 0,0423 ± 0,0034 <sup>c</sup> |
| Nemfehérje tiolok<br>(μM tiol/g friss tömeg) | 0,250 ± 0,016 <sup>a</sup>   | 0,260 ± 0,016 <sup>a</sup>   |
| Vezetőképesség<br>(μS/g friss tömeg)         | 49,9 ± 4,63 <sup>a</sup>     | 37,3 ± 3,68 <sup>b</sup>     |

A levágott levelek sötétben való tárolása tehát az SR<sub>1</sub> dohányfajta leveleinek gyors öregedését idézte elő, amit az *ipt*-génnel transzformált, citokinint túltermelő CTKm vonallal történő összehasonlítás tett nyilvánvalóvá. A kétféle dohány leveleinek antioxidáns vizsgálatai rávilágítottak arra, hogy a szeneszcenciával összhangban több antioxidáns enzim aktivitása és az aszkorbinsavtartalom is nagymértékben csökkent. Tekintettel arra, hogy az antioxidáns kapacitás csökkenése a ROF elleni védelem hatékonyságának gyengülését jelenti és a reaktív oxigének károsító hatá-

sukat részben a sejtmembránok szerkezetének roncsolásával fejtik ki, meghatároztuk a sötétkezelésnek kitett SR<sub>1</sub> és CTKm dohánylevelek levélkorongjainak ionkibocsátását, ami tükrözte a membránok állapotát (5.5. táblázat). Az adatok jelzik, hogy az SR<sub>1</sub> fajta levélkorongjainak ionkibocsátása – az inkubálóoldat vezetőképességének mérése alapján – meghaladta a CTKm vonalról származó levélkorongok ionkiáramlását. Tehát az öregedés folyamata az SR<sub>1</sub> fajta leveleiben membránpermeabilitás-növekedést okozott, ami véleményünk szerint az antioxidáns rendszer hatékonyságának csökkenése miatt fellépő fokozott oxidatív stressz következménye.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink tárgya egy CaMVp35S-*ipt* génnel transzformált dohányvonallal (CTKm) volt. Az *ipt*-gén az *Agrobacterium tumefaciens* Ti (tumor indukáló)-plazmidjának T-DNS szakaszán található és izopentenil-transzferáz aktivitású enzimet kódol. Az izopentenil-transzferáz citokininszintézist katalizáló enzim, ami jelentős szerepet játszik az *Agrobacterium* által megbetegített növényeken megjelenő golyvás tünetek kialakulásában. Az általunk használt CTKm dohány transzformációját az *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90RK) törzsével végezték az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében.

A CTKm dohányba beépített *ipt*-gén expresszióját egy konstitutív kifejeződést biztosító promóter (CaMV 35S) szabályozza. A CTKm dohánynövények jellegzetes fejlődési és morfológiai rendellenességeket mutattak: alulfejlett gyökérzet, csökkent szármagasság, internódiumok rövidülése, apikális dominancia zavara, terebélyes, harsány-zöld levelek, a leveleken hólyagosodás, az idősödő alsó levelek szenescenciájának gátlása. Ezek összhangban állnak más *ipt*-génnel transzformált dohányvonalakon megfigyelt eltérésekkel (Medford *et al.*, 1989), és a citokininnek ismert növényélettani szerepének világos megnyilvánulási formái.

A transzformáció sikerét a beépített gén által termelt enzim aktivitása nyomán megnövekedett citokininszint kvantitatív immunanalitikai vizsgálatával igazoltuk. Az MTA Növényvédelmi Kutatóintézete által kifejlesztett kompetitív-indirekt rögzített-antigénalapú citokinin ELISA-rendszer alkalmasnak bizonyult az izopentenil-adenozin (IPA) és a



zeatin-ribozid (ZR) típusú citokininek szelektív, csekély mintaelőkészítést igénylő, gyors, egyszerű meghatározására (Székács és munkatársai, 2000). Az ELISA-vizsgálat eredménye megerősítette feltevésünket: a CTKm dohányok levelének citokinintartalma jelentősen nagyobb volt, mint a nem transzformált, kontroll vonal (SR<sub>1</sub>) egyedeinek citokininkoncentrációja. A ZR citokininek mennyisége a transzgenikus dohányvonal leveleiben háromszorosára növekedett a kontrollhoz képest, az IPA szintje pedig a kontroll fajtában nem érte el a méréshatár alsó küszöbértékét, a CTKm vonalban viszont ebben az esetben is magasabb, küszöbértéket meghaladó szintet találtunk. A CTKm dohányban mért megnövekedett citokinintartalom tehát alátámasztotta a transzformáció eredményességét, a beépített *ipt*-gén várakozásoknak megfelelő működését.

A CTKm dohánynövényeket TNV-vel megfertőzve arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a fokozott citokininszintézist okozó *ipt*-gén működése nyomán bekövetkező juvenilis élettani állapot milyen hatással van a vírus által előidézett nekrotikus tünetek kialakulására. Azt tapasztaltuk, hogy a CTKm vonal levelein a TNV nekrotikus léziói kisebb számban fejlődtek ki, a léziószám csak mintegy 50 %-a volt a kontroll fajta inokulált levelein tapasztalt értéknek. Külsőleg adott citokininek hasonló – nekrotikus léziók kifejlődését gátló – hatásáról számoltak be TMV-vel fertőzött *N. glutinosa* levélkorongokon (Király és Szirmai, 1964), Xanthi-nc dohányon (Király és munkatársai, 1968; Balázs és munkatársai, 1976a), *D. stramoniumon* (Reunov *et al.*, 1976), babon (Pozsár és munkatársai, 1967; Milo és Srivastava, 1969a; Nakagaki, 1971) és dohány gyűrűsfoltosság vírussal fertőzött lóbabon (Kuriger és Agrios, 1977). Kísérleteink

tehát azt bizonyítják, hogy egy citokiningén beépítésével, endogén úton indukált juvenilis élettani állapot szintén képes visszaszorítani a vírus által okozott nekrotikus léziók kialakulását, megerősítve a külső citokininkezelésekkel kapott korábbi eredményeket.

A tünetek megfigyelése mellett lényegesnek véltük a kórokozó mennyiségének összehasonlítását is a TNV-vel fertőzött transzgenikus és kontroll dohányyszövetekben, mert a citokininek vírusreplikációra gyakorolt hatásáról készült korábbi közlemények egymásnak ellentmondó eredményeket tartalmaztak. A TMV-vel fertőzött *N. glutinosa* levélkórangokban Király és Szirmai (1964) citokininkezeléssel gátolni tudta a vírusreplikációt. A dohány gyűrűsfoltosság vírussal fertőzött lóbabon és a fehérhere mozaik vírussal fertőzött babon a citokininek hasonló, vírusreplikációt gátló hatásáról is már korábban beszámoltak (Kuriger és Agrios, 1977; Clarke *et al.*, 1998). Dhingra és munkatársai (1991) a burgonya Y vírussal (*Potato Y potyvirus*) fertőzött burgonya kalluszosokban különböző citokininekkel való kezeléssel szintén vissza tudták szorítani a vírusreplikáció mértékét. Ezzel szemben mások a citokininek vírusreplikációt stimuláló hatását figyelték meg (Daft, 1963; Schuster, 1967; Milo és Srivastava, 1969a). Ezekben a vizsgálatokban a vírustartalom meghatározása a korábbi gyakorlatot követve bioteszt kísérletekkel történt: a kérdéses vírufertőzött levél szövetnedvével lokális léziókat adó gazdanövények leveleit inokulálták és a tesztnövényen megjelenő léziók száma alapján következtettek az eredeti minta vírustartalmára. Erről a módszerről ma már tudjuk, hogy a víruskoncentráció meghatározásához nem ad megbízható támpontot. Ezt szemlélteti Balázs és Király (1981) munkája is, amiben TMV-vel fertőzött szisztemikus dohánygaz-

dában (Samsun fajtában) két különböző módszerrel vizsgálták a levelekben a TMV mennyiségét, és a bioteszttel kapott eredmények következetesen eltértek a szerológiai módszerrel (kvantitatív rocket immunoelektroforézis) nyert adatoktól. Munkánk során a vírustartalom meghatározását mi is szerológiai úton (DAS-ELISA) végeztük, amelyben a vírusfertőzött mintákban közvetlenül a vírus-köpenyfehérje mennyiségét mértük. Ez által úgy véljük, megbízhatóbb képet kaptunk a vírusreplikáció mértékére vonatkozóan.

Eredményeink rámutattak arra, hogy a CTKm vonalban a nekrotikus tünetek visszaszorulásával párhuzamosan a TNV köpenyfehérje-tartalom is alacsonyabb volt a kontroll levelek megfelelő értékéhez képest, a TNV-vel fertőzött kontroll levelekben mért abszorbancia közel kétszerese volt a CTKm dohánylevelekben mért értéknek. Vizsgálataink eredménye tehát inkább azt a megfigyelést támogatja, hogy a növényi citokininszint a nekrotikus tünetek gátlásán túl hatással van a vírusreplikációra is, és ez az összefüggés fordított, vagyis a citokininek megnövekedett mennyisége részlegesen gátolja a vírusreplikációt.

A jelenség lehetséges mechanizmusával kapcsolatban Clarke és munkatársai (2000) munkája ad bizonyos támpontot. Megállapították ugyanis, hogy fehérhere mozaik vírussal fertőzött babnövényekben citokininkezelés hatására nem csupán a köpenyfehérje tartalom szorul vissza, hanem már a vírusreplikáció egy korábbi lépése, a szubgenomi kettősszalú replikatív formák (dsRNS) képződése is gátlást szenved.

Elképzeltető, hogy a citokininek a vírusfertőzés kórfolyamatában több ponton is változásokat idéznek elő, tehát a nekrotikus tünetek visszaszorítása és a vírusreplikáció gátlása két különböző hatás következménye.

Újabban egyébként két növény-vírus kölcsönhatás esetében is sikerült bizonyítani azt, hogy a hiperszenzitív nekrosis és a vírusrezisztencia egymástól független, két különálló mechanizmus szerint jön létre (Bendahmane *et al.*, 1999; Cole *et al.*, 2001).

Tekintettel arra, hogy az etilén szeneszcenciahormon jellege mellett a növényeket ért stressz egyik jellegzetes indikátora is, a TNV-vel fertőzött CTKm és SR<sub>1</sub> levélkorongok etiléntermelésének vizsgálatával képet kaptunk arra vonatkozóan, hogy a nekrotikus tünetekkel járó vírusfertőzés milyen mértékű stresszt idézett elő a két különböző dohány esetében. Megállapíthatjuk, hogy a CTKm dohány TNV-vel fertőzött leveleiből kivágott levélkorongok kontrollhoz képest lényegesen alacsonyabb etilénkibocsátása a citokiningénnel transzformált növények fokozott stressztoleranciájának tényét húzza alá. Megfigyelésünk összhangban áll Balázs és munkatársai (1971) vizsgálatának eredményeivel, akik babnővények külső citokininkezelésével csökkenteni tudták az etilénképződést. A növények környezetükből származó abiotikus és biotikus károsító hatásokra adott korai válaszreakciója az oxidatív robbanás, ami a sejtalkotó lipidek peroxidációját és ezáltal a membránok működésének megváltozását idézi elő. A ROF által okozott lipidperoxidáció jól jellemezhető a károsodást szenvedett növényi szövet etántermelésével, amit a sejtmembránokat ért sérülés fokmérőjeként értékelhetünk (Halliwell és Gutteridge, 1999). A TNV-vel fertőzött SR<sub>1</sub> levélkorongokban a vírus fertőzésével összefüggésben intenzíven nő az etánpépződés, a CTKm levélkorongokban viszont csupán kismértékű növekedés következik be. Levonhatjuk tehát azt a következtetést, hogy az *ipt*-génnel való transzformáció, illetve az ennek következtében kialakuló magasabb citokininszint a növény

számára védelmet nyújt a ROF felszaporodásával kapcsolatos lipidperoxidációval és membránkárosodással szemben. Ez az eredmény azért különösen figyelemreméltó, mert a munka kezdetén megfogalmazott hipotézisünket igazolja, amely szerint a juvenilis növényi élettani állapottal járó fokozott stressztolerancia egyik fő oka a ROF-fal szembeni hatékonyabb ellenállóképesség.

Két kórfolyamatfüggő (enzim)fehérje csoport vírusfertőzéshez köthető aktivitásnövekedésének vizsgálata az előzetes várakozásunkat erősítette meg. Jóllehet mindkét enzim aktivitása a tünetek megjelenésével párhuzamosan jelentősen megnőtt, a kitinázaktivitás változása a TNV-vel fertőzött CTKm és SR<sub>1</sub> levelekben azonos volt, a  $\beta$ -1,3-glükánáz aktivitásának fokozódása pedig a súlyosabb tüneteket mutató kontroll dohányvonal leveleiben volt nagyobb. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a kísérleti modellünkben vizsgált két PR-protein inkább a tünetek erősségével mutat korrelációt és nem az ellenállósággal, tehát az általunk leírt rezisztenciajelenségben nincs szerepe.

A levágott leveleken végzett kísérleteink alapjául az a megfigyelésünk szolgált, hogy a CTKm és az SR<sub>1</sub> dohánynövényekről levágott és sötétben tárolt levelek szenescenciája markánsan eltért egymástól. Az SR<sub>1</sub> levelek a levágást követő 10. napra teljesen elsárgultak, klorofilltartalmuk lebomlott, a 20. napra pedig elpusztultak. A CTKm levelek ezzel szemben csupán a 12-16. napon kezdtek el nyilvánvalóan sárgulni a levéllemez szélétől a közepe felé haladva, de még a 20. napon is számottevő mennyiségű klorofillt tartalmaztak. Ezt a nagymérvű eltérést a szenescenciában hűen tükrözte a levelek etiléntermelésének különbsége is. A levelek levágását és sötétben való tárolását olyan kísér-

letnek tekinthetjük, ami jól szimulálja a természetes levélöregedés folyamatát. Ezt támasztja alá Weaver és munkatársai (1998) közleménye is, amiben különböző szeneszcenciát előidéző kezelések öregedéssel kapcsolatos génindukcióra gyakorolt hatását összehasonlítva azt figyelték meg, hogy a természetes levélöregedésre jellemző *SAG*-gének (*SAG* = *senescence associated gene*) mRNS-sé történő átíródásának mintázatát leginkább a levelek levágása, majd ezt követő sötétben való inkubációja közelítette meg. Ez azt jelentette, hogy a levágás és sötétben történő tárolás egy kivételével az összes olyan vizsgált *SAG*-gén indukcióját kiváltotta, amelyek a természetes levélöregedés folyamán is indukálódnak. A többi szeneszcenciát okozó kezeléssel (például etilén vagy abszcisszinsav kezelések) kiváltott *SAG*-gén indukció kisebb átfedést mutatott a természetes levélöregedés *SAG*-mRNS mintázatával. A levéllevágása és sötétben való tárolása tehát felgyorsított természetes levélöregedésnek tekinthető. Azt a tényt, hogy a CTKm dohányról származó levelek olyan nagy ellenállóságot mutattak ezzel az öregedést okozó kezeléssel szemben, a következőképpen magyarázzuk: a citokininek szintézisének normális helye elsősorban a gyökér osztódószöveiben van. Ha a levelet levágjuk, a levelet elválasztjuk a citokininképződés forrásától (a gyökértől). Ezért okoz a levél levágása gyors szeneszcenciát. A transzgenikus CTKm növényekben viszont a fokozott citokininszintézist előidéző izopentenil-transzferáz gén a karfiol mozaik vírus 35S promóterének köszönhetően a transzformált növény minden szervében (levél, szár, gyökér, szíromlevelek) expresszáldik (Odell *et al.*, 1985). Tehát a levágott CTKm levelek – a normálistól eltérően – részben citokinin önellátóak, nem szorulnak rá a gyökér

citokininutánpótlására, és ezért képesek hosszabb ideig életben maradni a növényről való levágás után. Ugyanez a jelenség lehet a magyarázata annak is, hogy az intakt CTKm dohánynövények alsó levelei sokkal tovább zöldek maradnak, nem öregszenek, szemben a kontroll dohányok alsó leveleivel. Az alsó állású idős levelek természetes szenescenciája során a növény az idősödő levelekben felhalmozott értékes tápelemeket a fiatal, élénk anyagcserét folytató levelekbe szállítja. Ebben a folyamatban az öregedő levelek citokinin szintjének csökkenése kulcsszerepet játszik. Balázs és munkatársai (1976b) igazolták ugyanis, hogy a növény különböző levélemeleteinek citokinin tartalma eltér egymástól. Az alsó, idősebb levelekben a citokinin szintje alacsony, a felső levélemeletek felé haladva viszont mennyiségük növekszik, létezik tehát egy citokinin gradiens a növényen belül. A beépített citokinin működése azonban megváltoztatja a növény citokinin háztartását, az alsó levelek citokinin szintje az izopentenil-transzferáz gén aktivitása miatt magas marad, ezért a levelek természetes öregedése lassabban következik be. A CTKm növények leveleinek önálló citokinin szintetizáló-képességével kapcsolatban érdemes kitérni egy szintén a kísérleteinkből kirajzolódó kórélettani vonatkozású összefüggésre is. Az 5.4. ábrát szemügyre véve látható, hogy a TNV-vel való fertőzés után egy héttel, amikor már a vírus által okozott léziók nagy méretűek, a léziók közötti ép levélrészek klorofill tartalma az SR<sub>1</sub> dohányvonal inokulált leveleiben erősen lecsökken. A CTKm vonal levelei viszont a fertőzetlen levelekhez hasonló zöldek maradnak, a léziók közötti szövetek klorofill tartalma nem változik. A megfigyeléssel kapcsolatos hipotézisünk az, hogy a megbetegített levelek szenescenciája a növény aktív védekezési válasza a vírusfertő-

zésre, és ebben a levél citokinintartalmának csökkenése szintén meghatározó szerepet játszik. Ezért nem következik be a jelenség azoknak a CTKm növényeknek a leveleiben, ahol a citokininek mennyisége a beépített *ipt*-gén folyamatos működése miatt állandóan magas. Butt és munkatársai (1998) *Arabidopsis thaliana* sziklevelek *Peronospora parasitica* kompatibilis rasszával való fertőzését követően figyeltek meg a fertőzött leveleken korai, a betegség által kiváltott szeneszenciát. Munkájukban ők is felvetik azt az elképzelést, hogy ez a szeneszenciajelenség a növény aktív védekezési válasza a betegség egy bizonyos előrehaladott stádiumában. Ezáltal – a hipotézis szerint – a növény a megbetegített levélben található tápelemek egy részét mobilizálja, és hasznosíthatóvá teszi a fiatal növényrészekben folyó szintetikus folyamatok számára, másrészt védekezik is a kórokozó ellen, mert megfosztja azt a szaporodásához és fejlődéséhez szükséges további tápanyagforrásoktól. Nem kizárt, hogy ennek a védekezési folyamatnak kórokozó oldalról történő ellensúlyozása a számos biotróf növénykórokozó gomba esetében megfigyelt citokinintermelő képesség (Király és munkatársai, 1967; Sziráki és munkatársai, 1975; Dekhuijzen, 1976; Vizárová, 1979), ami az alsó levelek fertőzöttsége esetén az alsó levelekből a felső levelek felé irányuló tápanyagtranszport irányának megfordulását eredményezi (Pozsár és Király, 1966). A növény betegségekkel szembeni válaszreakcióinak és a szeneszencia során lejátszódó folyamatoknak az átfedésére utal az a tény is, hogy olajrepce (*Brassica napus*) (Hanfrey *et al.*, 1996), paradicsom (John *et al.*, 1997) és *Arabidopsis* (Quirino *et al.*, 1999) növények leveleinek öregedése során különböző PR-proteineket kódoló gének expresszálódnak konstitutív



módon (kórokozók jelenlététől függetlenül). Ezek feltételezett szerepe az öregedő, gyengült ellenállóképességű levél védelme a nekrotróf kórokozók fertőzéseivel szemben (Quirino *et al.*, 2000).

A fejezet korábbi oldalain már beszámoltunk róla, hogy az *ipt*-génnel transzformált CTKm dohányvonalban a TNV fertőzése nyomán fellépő lipidperoxidáció mértéke lényegesen kisebb. Utaltunk arra, hogy a lipidperoxidáció jelensége a vírusfertőzést követő oxidatív robbanás eredménye, aminek a növényi sejtre gyakorolt károsító hatása a folyamat során felszaporodó reaktív oxigén fajták és az ezeket semlegesítő antioxidánsok egyensúlyától függ.

A dohánylevelek levágásával és sötétben történő tárolásával – mint említettük – a levelek gyors szenescenciáját lehetett előidézni. Az így előkezelt levelek alkalmasaknak tűntek a későbbiekben annak a kérdésnek a vizsgálatára, hogy vajon a reaktív oxigén fajtákat méregtelenítő antioxidáns enzimek és nem enzimikus antioxidánsok tekintetében mutatható-e ki eltérés a CTKm és az SR<sub>1</sub> dohányvonalak között. Igaz hogy ezeket a kísérleteket fertőzetlen levelekben végeztük, azonban a növényi sejt egészséges működése közben is jelentős mennyiségű ROF képződik, hatékony antioxidáns védelemre tehát a fertőzéstől függetlenül is szüksége van a növénynek. Az 5.4. táblázat CTKm és SR<sub>1</sub> dohánynövényekről származó levelekben mért négy antioxidáns enzim aktivitását tartalmazza 8 nappal a levelek levágása és folyamatos sötétben tartása után (a CTKm és SR<sub>1</sub> levelek közötti szenescenciabeli eltérés ekkor már nyilvánvaló). A vizsgált enzimek közül három (kataláz, peroxidázok és az aszkorbinsav-peroxidáz) közvetlenül a hidrogén-peroxid lebontásában vesz részt, jóllehet funkciójuk és a növényi sejten belüli elhelyezkedésük jelentősen

eltér egymástól. A negyedik antioxidáns enzim (glutation S-transzferáz) a már bekövetkezett oxidatív stressz káros következményeit enyhíti, a lipidperoxidáció köztes termékeinek (foszfolipid-hidroperoxidok, 4-hidroxi-nonénal) glutationnal való konjugációját katalizálva (Halliwell és Gutteridge, 1999). Az aszkorbinsav-peroxidáz és a glutation S-transzferáz aktivitása lényegesen nagyobb volt a CTKm dohányokról levágott levelekben. A CTKm dohánylevelek katalázaktivitása szerényebb mértékben ugyan, de szintén meghaladta az SR<sub>1</sub> vonal leveleiben mért értéket. A guajakol szubsztráttal vizsgált peroxidázok aktivitása statisztikailag nem tért el szignifikánsan a két dohányvonal leveleiben. Növényi szövetek öregedésével összefüggésben az aszkorbinsav-peroxidáz és a kataláz aktivitásának csökkenését számos esetben leírták (Jiménez *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 2000; Takahama *et al.*, 1999; Panavas és Rubinstein, 1998; Lacan és Baccou, 1998). Jiménez és munkatársai (1998), valamint Panavas és Rubinstein (1998) ezzel párhuzamosan a hidrogén-peroxid mennyiségének növekedéséről számoltak be. A növényi szenescencia és a glutation S-transzferáz aktivitásának összefüggését Barna és munkatársai (1995) vizsgálták. Paraquat (szuper-oxid)- toleráns és ezzel párhuzamosan juvenilis élettani állapotot mutató dohánynövények paraquat kezelését követően a glutation S-transzferáz aktivitása a paraquat kezelt kontroll növényekkel összehasonlítva erősebben növekedett. A peroxidázok reaktív oxigén fajták anyagcseréjében játszott szerepe viszont kettős, anti- és prooxidáns tulajdonságuk egyaránt ismert (Halliwell és Gutteridge, 1999; Yamazaki és Yokata, 1973), nem tekinthetők tehát egyértelműen antioxidáns enzimeknek. Takahama és munkatársai (1999) juvenilis és szenescens dohánylevelek

szimplasztjának peroxidáz aktivitásait összehasonlítva nem találtak szignifikáns eltérést a fiatal és idős levelekben mérhető enzimaktivitások között, az apoplaszt peroxidázaktivitása pedig nőtt a levél öregedése során. Az 5.5. táblázat két, nem enzimtermészetű antioxidáns kismolekula, illetve molekulacsoport mennyiségét jelzi a CTKm és az SR<sub>1</sub> dohányvonalak levágott leveleiben. A táblázat adataiból kiderül, hogy az aszkorbinsavtartalom a juvenilis CTKm dohánynövényekről származó levelekben magasabb, mint a normális öregedésű kontroll (SR<sub>1</sub>) dohánylevelekben. A nemfehérje tiolok mennyisége ugyanakkor nem tér el egymástól a két dohányvonal leveleiben. Jiménezt és munkatársai (1998) az általunk is használt szeneszenciát kiváltó kezelés hatására, borsólevelek levágása és sötétben történő tárolása során észleltek jelentős aszkorbinsavtartalom és kisebb mértékű glutationtartalom csökkenést a levelek mitokondrium frakciójában. Takahama és munkatársai (1999) öregedő dohánylevelek aszkorbinsavszintjének csökkenését figyelték meg. Barna és munkatársai (1995) a már említett paraquat toleráns, juvenilis dohánynövények leveleiben mértek a kontrollhoz képest magasabb aszkorbinsavtartalmat. Eredményeinkből levonható az a következtetés, hogy az *ipt*-gén beépítése által előidézett juvenilis élettani állapot a növény antioxidánskapacitását fokozta, különös tekintettel a Halliwell-Asada ciklusban részt vevő aszkorbinsavra és a hidrogénperoxid redukcióját aszkorbinsav szubsztrát segítségével katalizáló aszkorbinsav-peroxidázra. Ez összhangban áll más irodalmi adatokkal, amelyek szintén a növény öregedése során bekövetkező antioxidánskapacitás csökkenésének tényét hangsúlyozzák (Leshem, 1988). Amint ezt saját és mások által közölt eredményekkel igazoltuk, az

aszkorbinsavtartalom a levél öregedésével párhuzamosan erősen csökken. Ezzel kapcsolatban rendkívül izgalmasnak találjuk Fodor és munkatársai megfigyelését, ami szerint idős Xanthi-nc dohánylevelekben az aszkorbinsavból reaktív oxigénfajták semlegesítése során képződő monodehidro-aszkorbinsav gyök mennyisége a juvenilis levelekkel összehasonlítva mintegy százszorosára nő, ami azt jelenti, hogy koncentrációja a levél szenescenciája során a redukált aszkorbinsav mennyiségének alakulásához képest ellenkező irányba tolódik el (Fodor J. személyes közlése). A redukált aszkorbinsav/monodehidro-aszkorbinsav gyök arány eltolódása a monodehidro-aszkorbinsav gyök irányába, szintén világosan mutatja, hogy a növényi szövet öregedése fokozott oxidatív stresszt von maga után.

A kontroll (SR<sub>1</sub>) dohányvonal levágott leveleinek öregedése és az ezzel együtt járó kevésbé hatékony antioxidáns védelem membránlipidekre gyakorolt hatását az SR<sub>1</sub> és a CTKm vonalak leveleiből kivágott levélkorongok elektrolitkiáramlásának nyomonkövetésével vizsgáltuk. Ez a kísérleti adat arra világít rá, hogy az antioxidáns védelem hiányossága a ROF által okozott lipidperoxidáción keresztül okoz-e membránáteresztőképesség-növekedést az öregedő dohánylevelekben. Az 5.5. táblázat ad választ erre a kérdésre: a levágott és sötétben tárolt SR<sub>1</sub> dohánylevelekből kivágott levélkorongok ionkibocsátása 25%-kal meghaladta a citokinint túltermelő, juvenilis CTKm vonal leveleiből származó levélkorongok elektrolitkibocsátását. Megállapíthatjuk tehát azt, hogy az SR<sub>1</sub> dohány levágott leveleiben a membránok elektrolit-visszatartó képessége romlik, összefüggésben a reaktív oxigénformákkal

szembeni antioxidáns-védelem hatékonyságának csökkenésével és a levél szeneszenciájával.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A citokininek növényvírusokra gyakorolt hatását olyan korszerű növény-biotechnológiai, szerológiai és biokémiai módszerek segítségével kívántuk vizsgálni, ami a témával ezt megelőzően foglalkozó kutatóknak még nem állt rendelkezésére. Célul tűztük ki, hogy a kérdéssel kapcsolatban felmerült korábbi ellentmondásokat tisztázzuk.

Először azt vizsgáltuk, hogy a vizsgálatokban szereplő *ipt*-génnel transzformált dohányvonalban (CTKm) a beépített gén kifejeződik-e, és hogy ezek a növények csakugyan több citokinint termelnek-e, mint a kontroll fajta (SR<sub>1</sub>) egyedei. A kétféle dohány citokinintartalmának immunanalitikai módszerrel történő összehasonlítása igazolta, hogy a CTKm vonalban a citokininek mennyisége lényegesen magasabb. A további munka során ezután arra az alapvető kérdésre kerestünk választ, hogy a növényi élet-tani állapotot jelentősen befolyásoló citokininszint hogyan változtatja meg a növényvírusok iránti fogékonyságot, elsősorban a vírus okozta lokális léziók kialakulását, másodsorban a vírus-köpenyfehérje mennyiségét a fertőzött levélszövetben. A dohányainkon nekrotikus tüneteket okozó dohány nekrosis vírus (TNV) léziói a CTKm vonal levelein kisebb számban jelentek meg, mint az SR<sub>1</sub> fajtán, és a vírus-köpenyfehérje koncentrációja is alacsonyabb volt a CTKm vonal inokulált leveleiben, mint a kontrollban. Leszögezhetjük tehát azt, hogy a citokiningén beépítése,

illetve az általa előidézett juvenilis élettani állapot a növény számára ellenállóságot biztosított a TNV-vel szemben. A TNV-fertőzött dohánylevelek gázkibocsátásának gázkromatográfiás elemzésével megállapítottuk, hogy a vírus által okozott nekrotikus léziók megjelenését követően mindkét vonal leveleiben indukálódik az etilén és az etán képződése, de a CTKm növényekről származó levelekben a két gáz termelődésének fokozódása lényegesen kisebb mértékű. Ez azt jelzi, hogy a CTKm dohányban a TNV-fertőzés enyhébb stresszel (kisebb etilénkibocsátással) és alacsonyabb fokú lipidperoxidációval (kevesebb etántermeléssel) jár együtt. A második megfigyelés arra is utal, hogy a CTKm dohány leveleiben a membránlipidek nem károsodnak olyan erősen a betegség következtében. A TNV-fertőzés nyomán tapasztalt kitináz és  $\beta$ -1,3-glükánáz aktivitások növekedésével kapcsolatban az a véleményünk, hogy nincs szerepük a CTKm dohány TNV-ellenállóságában, mert a kitinázaktivitás növekedése a kétféle dohányban azonos volt, a glükánáz aktivitása pedig az SR<sub>1</sub> (fogékony) vonal esetében nőtt jobban. Nincs tehát közvetlen összefüggés a két enzim aktivitása és az észlelt rezisztenciajelenség között. A CTKm és az SR<sub>1</sub> növényekről leveleket levágva és folyamatosan sötétben tárolva öregedést indukáltunk és a levelek klorofilltartalmának csökkenése alapján azt tapasztaltuk, hogy a citokiningénnel transzformált dohányvonal levelein a szenescencia sokkal lassabban megy végbe. Egyúttal megállapítottuk, hogy az így kezelt CTKm levelek etilénkibocsátása lényegesen alacsonyabb, mint a normális öregedésű SR<sub>1</sub> vonal leveleinek etiléntermelése. Tekintettel arra, hogy a TNV által okozott nekrosis egy programozott sejthalál típus, amiben a reaktív oxigén fajták szerepét feltételezzük, lényegesnek véltük a két

dohányvonal antioxidánskapacitásának összehasonlítását. A reaktív oxigénfajtákat semlegesítő antioxidánsok aktivitása illetve mennyisége olyan paraméter, ami a különböző, növényt ért stresszek során nagy mennyiségben képződő reaktív oxigén fajták sejtkárosító hatását ellensúlyozni képes, ezért a CTKm vonal nekrotikus vírustünetekkel szemben mutatott rezisztenciájában szerepe lehet. Kísérleteink eredményei igazolták várakozásunkat, a vizsgált négy antioxidáns enzim közül három (kataláz, aszkorbinsav-peroxidáz, glutation S-transzferáz) aktivitása szignifikánsan magasabb volt a juvenilis CTKm dohányvonalban, és ugyanezt tapasztaltuk a nem enzimatisz antioxidáns aszkorbinsav esetében is. Megállapíthatjuk tehát, hogy a citokinint túltermelő transzgenikus CTKm dohányvonal nagyobb antioxidánskapacitással rendelkezik, mint a normális öregedésű SR<sub>1</sub> fajta, ami részben magyarázatul szolgál a CTKm dohány nekrotikus vírustünetekkel szemben mutatott ellenállóságára.

### **Új tudományos eredményeink:**

1. Először vizsgáltunk *ipt*-génnel transzformált, citokinint túltermelő transzgenikus növényt vírusfogékonyság szempontjából, és igazoltuk, hogy a beépített citokiningén következtében a növények ellenállóbbá váltak a nekrotikus vírustünetekkel szemben.
2. Elsőként állapítottuk meg, hogy a citokiningénnel transzformált növényben a vírusreplikáció mértéke is részben visszaszorul.
3. Első ízben mértük citokiningénnel transzformált növény etilénkibocsátását. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a fokozott citokininszintézis gátolja a szeneszcencia által indukált etilénképző-

dést és visszaszorítja a nekrotikus vírusléziók megjelenésével összefüggésben álló stressztilén termelést.

4. Első ízben mértük citokiningénnel transzformált növény etánkibocsátását vírusfertőzés után és bizonyítottuk, hogy a vírusfertőzés által okozott lipidperoxidáció egyik végtermékének tekintett etán képződése a transzgenikus növényben visszaszorul.
5. Megállapítottuk, hogy a vírusfertőzés által indukált – PR-proteinként ismert – kitináz és  $\beta$ -1,3-glükanáz aktivitásának növekedése nem mutat összefüggést az általunk észlelt vírusellenállósággal.
6. Igazoltuk, hogy a citokiningénnel transzformált növény – a juvenilis élettani állapottal összefüggésben – magasabb antioxidáns kapacitással bír: a glutation S-transzferáz, az aszkorbinsav-peroxidáz és a kataláz aktivitása, valamint az aszkorbinsav mennyisége meghaladta a kontroll növényben mért értéket, a peroxidáz aktivitása és a nemfehérje tiolok mennyisége szignifikánsan nem tért el a kontrolltól. A reaktív oxigén fajtákkal szembeni hatékonyabb védelem részben magyarázatot ad a nekrotikus vírustünetekkel szembeni ellenállóságra, amit a membránlipidek állapotára utaló kisebb mértékű elektrolitkáramlás is alátámasztott.

Az értekezés eredményeivel kapcsolatban merülnek fel olyan kérdések, amiket az eddigi vizsgálatok alapján nem tudunk megválaszolni. Az egyik ilyen kérdés, hogy a megnövelt citokininszint miért gátolta a TNV replikációját. Egy másik nyitott kérdés a TNV-fertőzött, lokális léziókat mutató levelek esetében megfigyelt gyors öregedésének szabályozása. Ennek megválaszolásához további kísérletek szükségesek.



## New Results

1. The virus resistance of a genetically modified cytokinin overproducing plant containing the *ipt* gene was investigated for the first time, showing reduced susceptibility to the virus induced necrotic symptoms.
2. The virus coat protein content in the *ipt* gene transformed line was lower as well, parallel with the symptoms.
3. The ethylene production of a cytokinin overproducing plant was measured for the first time. The results highlight that the enhanced cytokinin level inhibits senescence ethylene formation and suppresses stress ethylene emission related to the development of the necrotic lesions.
4. Ethane production (representing the level of lipid peroxidation) of the *ipt* gene containing plant was examined for the first time in these experiments. Virus infection induced significantly lower ethane formation (and lipid peroxidation) in case of the cytokinin overproducing plant compared to the control plant.
5. PR-protein chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities did not correlate with this type of virus resistance.
6. The *ipt* gene containing plant in connection with its juvenility possesses higher antioxidant capacity: the activity of ascorbate peroxidase, glutathione S-transferase and catalase as well as the ascorbic acid content were markedly higher in the healthy transformed plant than in the corresponding uninfected control plant. The efficient reactive oxygen species detoxifying capability explains par-

tially the resistance phenomena against the virus induced necrosis. The role of antioxidants in the restriction of the necrosis development is supported by the lower electrolyte leakage parameter as well, which indicates the higher membrane integrity of the cytokinin over-producing plant.

## IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Abeles, F.B. (1992): Ethylene in Plant Biology. Academic Press, San Diego.
- Ádám, A., Barna, B., Farkas, T. and Király, Z. (1990): Effect of TMV-induced systemic acquired resistance and removal of the terminal bud on membrane lipids of tobacco leaves. *Plant Sci.* 66, 173-179.
- 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: deterioration of membrane lipids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34, 13-26.
- Aebi, H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Akiyoshi, D., Klee, H., Amasino, R., Nester, E.W. and Gordon, M.P. (1984): T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5994-5998.
- Aldwinckle, H.S. (1975): Stimulation and inhibition of plant virus infectivity in vivo by 6-benzylamino-purine. *Virology*, 66, 341-343.
- Aldwinckle, H.S. and Selman, I.W. (1967): Some effects of supplying benzyladenine to leaves and plants inoculated with viruses. *Ann. Appl. Biol.* 60, 49-58.
- Atkinson, M.M., Keppler, L.D., Orlandi, E.W., Baker, C.J. and Mischke C.F. (1990): Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the  $K^+/H^+$  exchange and hypersensitive responses in tobacco. *Plant Physiol.* 92, 215-221.

- Bailiss, K.W., Cocker, F.M. and Cassells, A.C. (1977): The effect of Benlate and cytokinins on the content of tobacco mosaic virus in tomato leaf discs and cucumber mosaic virus in cucumber cotyledon discs and seedlings. *Ann. Appl. Biol.* 87, 383-392.
- Baker, C.J. and Orlandi E.W. (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 299-321
- Balázs, E., Barna, B. and Király, Z. (1976a): Effect of kinetin on lesion development and infection sites in Xanthi-nc tobacco infected by TMV: single-cell local lesions. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 11, 1-9.
- Balázs, E., Barna, B. and Király, Z. (1976b): A comparison of the number of infection sites with the number of local lesions in TMV-infected Xanthi-nc tobacco treated with kinetin. *Abstr. 8<sup>th</sup> Congr. Czechoslovak Plant Virologists, Bratislava.*
- Balázs, E., Gáborjányi, R. és Király, Z. (1971): Etilén által indukált szeneszcencia ellensúlyozása citokininekkel. XII. Biokémiai Vándorgyűlés, Pécs.
- Balázs, E., Gáborjányi, R., Tóth, A. and Király, Z. (1969): Ethylene production in Xanthi tobacco after systemic and local virus infections. *Acta Phytopath. Hung.* 4, 355-358.
- Balázs, E. and Király, Z. (1981): Virus content and symptom expression in Samsun tobacco treated with kinetin and a benzimidazole derivative. *Phytopath. Z.* 100, 356-360.
- Balázs, E., Sziráki, I. and Király, Z. (1977): The role of cytokinins in the systemic acquired resistance of tobacco hypersensitive to tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* 11, 29-73.

- Barna, B. (1995): Betegség- és abiotikus stressztoleráns növények előállítására a juvenilitás és az antioxidáns kapacitás fokozásával. *Növénytermelés* 44, 561-567.
- Barna, B., Ádám, A.L., Gullner, G. and Király, Z. (1995): Role of antioxidant systems and juvenility in tolerance of plants to diseases and abiotic stresses. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 30, 39-45.
- Barna, B., Ádám, A.L. and Király, Z. (1993): Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* 80, 420-422.
- Barna, B., Ádám, A.L. and Király, Z. (1997): Increased levels of cytokinin induce tolerance to necrotic diseases and various oxidative stress-causing agents in plants. *Phyton* 37, 25-30.
- Barna, B. and Györgyi, B. (1992): Resistance of young versus old tobacco leaves to necrotrophs, fusaric acid, cell wall-degrading enzymes and autolysis of membrane lipids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40, 247-257.
- Barna, B. and Pogány, M. (2001): Antioxidant enzymes and membrane lipid composition of disease resistant tomato plants regenerated from crown galls. *Acta Physiol. Plant.* 23, 273-277.
- Barry, G.F., Rogers, S.G., Fraley, R.T. and Brand, L. (1984): Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4776-4780.
- Beckman, K.B. and Ingram, D.S. (1994): The inhibition of the hypersensitive response of potato tuber tissues by cytokinins:

similarities between senescence and plant defence responses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45, 229-246.

Beleid El-Moshaty, F.I., Pike, S.M., Novacky, A.J. and Seghal, O.P. (1993): Lipid peroxidation and active oxygen production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43, 109-119.

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.

Bettini, P., Cosi, E., Pellegrini, M.G., Turbanti, L., Vendramin, M. and Buiatti, M. (1998): Modification of competence for *in vitro* response to *Fusarium oxysporum* in tomato cells. III. PR-protein gene expression and ethylene evolution in tomato cell lines transgenic for phytohormone-related bacterial genes. *Theor. Appl. Genet.* 97, 575-583.

Boller, T. (1988): Ethylene and the regulation of antifungal hydrolases in plants. *In*: Miflin, B.J. (Ed.), *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. vol. 5. Oxford University Press, Oxford, pp. 145-174.

Bolwell, G.P., Butt, V.S., Davies, D.R. and Zimmerlin, A. (1995): The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic. Res.* 23, 517-532.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- Buchanan-Wollaston, V. (1997): The molecular biology of leaf senescence (review). *J. Exp. Bot.* 48, 181-199.
- Butt, A., Mousley, C., Morris, K., Beynon, J., Canan, C., Holub, E., Greenberg, J.T. and Buchanan-Wollaston, V. (1998): Differential expression of senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J.* 16, 209-221.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Camp, W. (1998): Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5818-5823.
- Chen, C.-M. and Ertl, J.R. (1994): Cytokinin biosynthetic enzymes in plants and slime mold. *In*: Mok, D.W.S. and Mok, M.C. (Eds.), *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 81-85.
- Chen, C.-M. and Melitz, D.K. (1979): Cytokinin biosynthesis in a cell-free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue cultures. *FEBS Lett.* 107, 15-20.
- Cheo, P.C. (1971): Effect of plant hormones on virus-replicating capacity of cotton infected with tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 61, 869-872.
- 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.

- Clarke, S.F., Burritt, D.J., Jameson, P.E. and Guy, P.L. (1998): Influence of plant hormones on virus replication and pathogenesis related proteins in *Phaseolus vulgaris* L. infected with white clover mosaic *potexvirus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53, 195-207.
- Clarke, S.F., Burritt, D.J., Jameson, P.E. and Guy, P.L. (2000): Effects of plant hormones on white clover mosaic *potexvirus* double-stranded RNA. *Plant Pathol.* 49, 428-434.
- 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. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 31-41.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E. (1997): Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression (review). *Plant Cell* 9, 1211-1223.
- Crespi, M., Messens, E., Caplan, A.B., van Montagu, M. van and Desomer, J. (1992): Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid incoding a cytokinin gene. *EMBO J.* 11, 795-804.
- Daft, M.J. (1963): Some effects of pancreatic ribonuclease and kinetin on tomato aucuba mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 52, 393-403.
- De Kok, L.J. and Graham, M. (1989): Levels of pigments, soluble proteins, amino acids and sulfhydryl compounds in foliar tissue of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced and natural senescence. *Plant Physiol. Biochem.* 27, 203-209.
- Deák, M., Horváth, V.G., Davletova, S., Török, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Király, Z. and Dudits, D. (1999): Plants ectopically



- expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotech.* 17, 192-196.
- Deighton, N., Muckenschnabel, I., Goodman, B.A. and Williamson, B. (1999): Lipid peroxidation and the oxidative burst associated with infection of *Capsicum annuum* by *Botrytis cinerea*. *Plant J.* 20, 485-492.
- Dekhuijzen, H.M. (1976): Endogenous cytokinins in healthy and diseased plants. *In: Heitefuss, R. and Williams, P.H. (Eds.), Physiological Plant Pathology.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 527-559.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588.
- Dhingra, M.K., Khurana, S.M.P., Lakhanpal, T.N. and Chandra, R. (1991): Effect of cytokinins and light on the growth and virus content of potato leaf callus. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 14, 117-120.
- Doke, N. and Ohashi, Y. (1988): Involvement of an  $O_2^{\bullet-}$  generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32, 163-175.
- Draper, J. (1997): Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defense. *Trends Plant Sci.* 2, 162-165.
- Droillard, M.J., Paulin, A. and Massot, J.C. (1987): Free radical production, catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Physiol. Plant.* 71, 197-202.

- 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. (1982): Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 73-96.
- El-Zahaby, H.M., Gullner, G. and Király, Z. (1995): Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in different host-pathogen interactions. *Phytopathol.* 85, 1225-1230.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. and Zollner, H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 11, 81-128.
- Fletcher, R.A., Quick, W.A. and Phillips, D.R. (1968): Effect of kinetin on senescence and tobacco mosaic virus infection in leaves of *Nicotiana glutinosa*. In: Wrightman, F. and Setterfield, M. (Eds.), *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*. Runge Press, Ottawa, pp. 1447-1455.
- Fodor, J., Gullner, G., Ádám, A.L., Barna, B., Kőmives, T. and Király, Z. (1997): Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiol.* 114, 1443-1451.
- Francki, R.I.B., Milne, R.G. and Hatta, T. (1985): *Atlas of Plant Viruses* Vol. I., CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Frank, H., Thiel, D. and MacLeod, J. (1989): Mass spectrometric detection of cross-linked fatty acids formed during radical induced lesion of lipid membranes. *Biochem. J.* 260, 873-878.

- Fraser, R.S.S. and Whenham, R.J. (1982): Plant growth regulators and virus infection: a critical review. *Plant Growth Regul.* 1, 37-59.
- Gáborjányi, R., Balázs, E. and Király, Z. (1971): Ethylene production, tissue senescence and local virus infections. *Acta Phytopath. Hung.* 6, 51-56.
- Gan, S. and Amasino, R.M. (1995): Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270, 1986-1988.
- Gan, S. and Amasino, R.M. (1997): Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol.* 113, 313-319.
- Goodman, R.N. (1991): Növekedésszabályozók anyagcseréje. *In: Goodman, R.N., Király, Z. és Wood, K.R. (Szerk.), A Beteg Növény Biokémiája és Élettana.* Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 457-534.
- Gullner, G., Tóbiás, I., Fodor, J. and Kőmíves, T. (1999): Elevation of glutathione level and activation of glutathione-related enzymes affect virus infection in tobacco. *Free Rad. Res.* 31, 155-161.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999): *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, New York.
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1996): Resistance gene dependent plant defence responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Hanfrey, C., Fife, M. and Buchanan-Wollaston, V. (1996): Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 30, 597-609.
- Heath, M.C. (2000): Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44, 321-334.

- Heiser, I., Osswald, W.F. and Elstner, E.F. (1998): Photodynamic ethane and ethylene formation from  $\alpha$ -linolenic acid catalyzed by cytokinins and copper ions. *J. Plant Physiol.* 152, 230-234.
- Hoel, B.O. and Solhaug, A. (1998): Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Ann. Bot.* 82, 389-392.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. and Kogel, K.-H. (1999): Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* 119, 1251-1260.
- Jabs, T. (1999): Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.* 57, 231-245.
- Jabs, T., Dietrich, R.A. and Dangl, J.L. (1996): Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273, 1853-1856.
- Jacqumard, A., Houssa, C. and Bernier, G. (1994): Regulation of the cell cycle by cytokinins. *In*: Mok, D.W.S. and Mok, M.C. (Eds.), *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 197-215.
- Jiménez, A., Hernández, J.A., Pastori, G., del Río, L.A. and Sevilla, F. (1998): Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol.* 118, 1327-1335.

- John, I., Hackett, R., Cooper, W., Drake, R., Farrell, A. and Grierson, D. (1997): Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Mol. Biol.* 33, 641-651.
- Kassanis, B. (1977): Tobacco necrosis virus group. *In*: Maramorosch, K. (Ed.), *The Atlas of Insect and Plant Viruses*. Academic Press, pp. 281-285.
- Kato, S. and Misawa, T. (1976): Lipid peroxidation during the appearance of hypersensitive reaction in cowpea leaves infected with cucumber mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* 42, 472-480.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B. (1987): Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR-proteins of tobacco have 1,3- $\beta$ -glucanase activity. *EMBO J.* 6, 3209-3212.
- Keen, N.T. and Yoshikawa, M. (1983):  $\beta$ -1,3 endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiol.* 71, 460-465.
- Kende, H. and Zeevaart, J.A.D. (1997): The five "classical" plant hormones (review). *Plant Cell* 9, 1197-1210.
- Király, Z. (1968): *A Növényi Betegségellenállóság Élettana*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Király, Z., El-Hammady, M. and Pozsár, B.I. (1967): Increased cytokinin activity of rust-infected bean and broad-bean leaves. *Phytopathology* 57, 93-94.

- Király, Z., El Hammady, M. and Pozsár, B.I. (1968): Susceptibility to tobacco mosaic virus in relation to RNA and protein synthesis in tobacco and bean plants. *Phytopath. Z.* 63, 47-63.
- Király, Z. and Pozsár, B.I. (1964): On the inhibition of TMV production by kinetin and adenine in intact tobacco leaves. *In: Király, Z. and Ubrizsy, G. (Eds.), Host-Parasite Relations in Plant Pathology. Res. Inst. Plant Prot., Budapest, pp. 61-64.*
- Király, Z. and Szirmai, J. (1964): The influence of kinetin on tobacco mosaic virus production in *Nicotiana glutinosa* leaf discs. *Virology* 23, 286-288.
- Klee, H., Horsch, R. and Rogers, S. (1987): *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 467-486.
- Kristal, B.S., Park, B.K. and Yu, B.P. (1996): 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 271, 6033-6038.
- Kumar, G.N.M. and Knowles, N.R. (1993): Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiol.* 102, 115-124.
- Kuriger, W.E. and Agrios, G.N. (1977): Cytokinin and kinetin-virus interaction in tobacco ringspot virus infected cowpea plants. *Phytopathology* 67, 604-609.
- Lacan, D. and Baccou, J.C. (1998): High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted muskmelon fruits. *Planta* 204, 377-382.

- Lamb, C. and Dixon, R.A. (1996): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Leshem, Y.Y. (1987): Membrane phospholipid catabolism and  $\text{Ca}^{2+}$  activity in control of senescence. *Physiol. Plant.* 69, 551-559.
- Leshem, Y.Y. (1988): Plant senescence processes and free radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 5, 39-49.
- Letham, D.S. (1974): Regulators of cell division in plant tissues. XXI. Distribution coefficients for cytokinins. *Planta* 118, 361-364.
- Lever, M. (1972): A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal. Biochem.* 47, 273-279.
- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R. and Lamb, C. (1996): Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 6, 427-437.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1994):  $\text{H}_2\text{O}_2$  from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. *Cell* 79, 583-593.
- Lichter, A., Manulis, S., Sagee, O., Gafni, Y., Gray, J., Meilan, R., Morris, R.O. and Barash, I. (1995): Production of cytokinins by *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* and isolation of a locus conferring cytokinin biosynthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 114-121.
- Linthorst, H.J.M., Meuwisse, R.L.J., Kauffmann, S. and Bol, J. (1989): Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GPR and PR-S in tobacco has no effect on virus expression. *Plant Cell* 1, 285-291.

- Mahadevan, A. (1984): Cytokinins in microorganisms and infected plants. *In*: Mahadevan, A. (Ed.), Growth Regulators, Microorganisms and Diseased Plants. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, pp. 193-231.
- Manners, J.G. (1993): Principles of Plant Pathology (2<sup>nd</sup> edition). Cambridge University Press.
- Matthews, R.E.F. (1991): Plant Virology (3<sup>rd</sup> edition). Academic Press, New York.
- 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.
- Mayak, S., Legge, R.L. and Thompson, J.E. (1983): Superoxide radical production by microsomal membranes from senescing carnation flowers: an effect on membrane fluidity. *Phytochemistry* 22, 1375-1380.
- McGaw, B.A. (1987): Cytokinin biosynthesis and metabolism. *In*: Davies, P.J. (Ed.), Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. Kluwer Academic Publishers, pp. 76-93.
- Medford, J.I., Horgan, R., El-Sawi, Z. and Klee, H.J. (1989): Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *Plant Cell* 1, 403-413.
- Mehdy, M.C. (1994): Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105, 467-472.



- Milo, Jr. G.E. and Srivastava, B.I.S. (1969a): Effect of cytokinins on tobacco mosaic virus production in local-lesion and systemic hosts. *Virology* 38, 26-31.
- Milo, Jr. G.E. and Srivastava, B.I.S. (1969b): Effect of cytokinins on tobacco mosaic virus production in tobacco pith tissue cultures. *Virology* 39, 621-623.
- Mittler, R., Herr, E.H., Orvar, B.L., Van Camp, W., Inzé, D. and Ellis, E. (1999): Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14165-14170.
- Mok, M.C. (1994): Cytokinins and plant development – An overview. *In*: Mok, D.W.S. and Mok, M.C. (Eds.), *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 155-166.
- Morris, R.O. (1986): Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37, 509-538.
- Mothes, K. (1960): Über das Altern der Blätter und die Möglichkeit ihrer Wiederverjungung. *Naturwissenschaften* 47, 334-335.
- Mukherjee, A.K., Soans, L.C. and Chessin, M. (1967): Effects of kinetin and actinomycin D on the susceptibility of *Nicotiana glutinosa* L. to infection by tobacco mosaic virus. *Nature* 216, 1344-1345.
- Nakagaki, Y. (1971): Effect of kinetin on local lesion formation on detached bean leaves inoculated with tobacco mosaic virus or its nucleic acid. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* 37, 307-309.

- Nakagaki, Y., Hirai, T. and Stahmann, M. A. (1970): Ethylene production by detached leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* 40, 1-9.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Nam, H.G. (1997): The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 200-207.
- Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.-M. (1985): Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313, 810-812.
- Olsen, A, Siboska, G.E., Clark, B.F.C. and Rattan, S.I.S. (1999): N-6-furfuryladenine, kinetin, protects against fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 499-502.
- Palmer, M.V., Horgan, R. and Wareing, P.F. (1981): Cytokinin metabolism in *Phaseolus vulgaris* L. I: Variation in cytokinin levels in leaves of decapitated plants in relation to lateral bud outgrowth. *J. Exp. Bot.* 32, 1231-1241.
- Panavas, T. and Rubinstein, B. (1998): Oxidative events during programmed cell death of daylily (*Heemerocallis* hybrid) petals. *Plant Sci.* 133, 125-138.
- Pauls, K.P. and Thompson, J.E. (1982): Effects of cytokinins and antioxidants on the susceptibility of membranes to ozone damage. *Plant Cell. Physiol.* 23, 821-832.

- Pennazio, S. and Sapetti, C. (1982): Electrolyte leakage in relation to viral and abiotic stresses inducing necrosis in cowpea leaves. *Biol. Plant.* 24, 218-225.
- Pennel, R.I. and Lamb, C. (1997): Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9, 1157-1168.
- Penuelas, J., Filella, I. and Baret F. (1994): Semi-empirical indices to assess carotenoids/chlorophyll ratio from leaf spectral reflectance. *Photosynthetica* 31, 221-230.
- Pethő, M. (1993): Az öregedés fiziológiája *In*: Pethő, M. (Ed.), *Mezőgazdasági Növények Élettana*. Akadémiai Kiadó, pp. 455-476.
- Pogány, M. (1999): Növényi vírusbetegségek és növekedést szabályozó anyagok. *In*: Horváth, J. és Gáborjányi, R. (Szerk.), *Növényvírusok és Virologiai Vizsgálati Módszerek*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp. 284-316.
- Pozsár, B.I. and Király, Z. (1966): Phloem-transport in rust-infected plants and the cytokinin-directed long-distance movement of nutrients. *Phytopath. Z.* 56, 397-309.
- Pozsár, B.I., El Hammady, M. and Király, Z. (1967): Cytokinin effect on benzyladenine: increase of nucleic acid and protein synthesis in bean leaves. *Nature* 214, 272-274.
- Price, A.H., Taylor, S., Ripley, S.J., Griffiths, A., Trewavas, A.J. and Knight, M.R. (1994): Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6, 1301-1310.
- Pringle, C.R. (1998): The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including

new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV Report in 1995. Arch.Virol. 142/1, 203-208.

- Prinsen, E. (1997): Cytokinin biosynthesis: a black box? Plant Growth Regul. 23, 3-15. *In*: J. van Staden (Ed.), Special Issue: Opinions on Current Research in Cytokinin Physiology.
- Quirino, B.F., Noh, Y.-S., Himelblau, E. and Amasino, R.M. (2000): Molecular aspects of leaf senescence (review). Trends Plant Sci. 5, 278-282.
- Quirino, B.F., Normanly, J. and Amasino, R.M. (1999): Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. Plant Mol. Biol. 40, 267-278.
- Rathmell, W. G. and Sequeira, L. (1974): Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. Plant Physiol. 53, 317-318.
- Reinecke, D.M., Brenner, M.L. and Rubenstein, I. (1991): Cytokinin biosynthesis in developing corn kernels. Plant Physiol. 96 (Suppl.), 77.
- Reunov, A.V., Reunova, G.D. and Shmaidenko, G.D. (1976): Kinetin effect on tobacco mosaic virus (TMV) replication in *Datura stramonium* leaves. Virus Diseases of Plants in the Far East 25, 174.
- Reunov, A.V., Reunova, G.D. Vasilyeva, L.A. and Reifman, V.G. (1977): Effect of kinetin on tobacco mosaic virus and potato virus X replication in leaves of systemic hosts. Phytopath. Z. 90, 342-349.

- Ruzicska, P., Gombos, Z. and Farkas, G.L. (1983): Modification of the fatty acid composition of phospholipids during the hypersensitive reaction in tobacco. *Virology* 128, 60-64.
- Schuster, G. (1967): Umwelt und Versuchsanordnung als modifizierende Faktoren der Kinetinwirkung auf die Virusvermehrung. *Flora* 158, 325-342.
- Shinitzky, M. (1984): Membrane fluidity and cellular functions. *In*: Shinitzky, M. (Ed.), *Physiology of Membrane Fluidity*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-51.
- Smart, C.M., Scofield, S.R., Bevan, M.W. and Dyer, T.A. (1991): Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. *Plant Cell* 3, 647-656.
- Smigocki, A., Neal, J.W. Jr., McCanna, I. and Douglass, L. (1993): Cytokinin-mediated insect resistance in *Nicotiana* plants transformed with the *ipt* gene. *Plant Mol. Biol.* 23, 325-335.
- Smigocki, A.C. and Owens, L.D. (1988): Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5131-5135.
- Smith, K.M. and Bald, J.G. (1935): A description of a necrotic virus disease affecting tobacco and other plants. *Parasitology* 27, 231-245.
- Stakman, E.C. (1915): Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. Agric. Res.* 4, 193-299.

- Storti, E., Bogani, P., Bettini, P., Bittini, P., Guardiola, M.L., Pellegrini, M.G. and Buiatti, M. (1994): Modification of competence for *in vitro* response to *Fusarium oxysporum* in tomato cells. II. Effect of the integration of *Agrobacterium tumefaciens* genes for auxin and cytokinin synthesis. Theor. Appl. Genet. 88, 89-96.
- Székács, A., Hegedűs, Gy., Tóbiás, I., Pogány, M. and Barna, B. (2000): Immunoassays for plant cytokinins as tools for the assessment of environmental stress and disease resistance. Anal. Chim. Acta 421, 135-146.
- Sziráki, I., Balázs, E. and Király, Z. (1975): Increased levels of cytokinin and indoleacetic acid in peach leaves infected with *Taphrina deformans*. Physiol. Plant Pathol. 5, 45-50.
- Szirmai, J. (1952): Palánták gyökérvírusának változata. MTA Agrártudományi Osztályának Közleményei I/2.
- Szirmai, J. (1955): Tulipánjaink új vírusbetegsége. Kertészet és Szőlészet 4, 17.
- Takahama, U., Hirotsu, M. and Takayuki, O. (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.
- Takahashi, T. (1972): Studies on viral pathogenesis in plant hosts. III. Leaf age dependent susceptibility to tobacco mosaic virus infection in 'Samsun NN' and 'Samsun' tobacco plants. Phytopath. Z. 75, 140-155.

- van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T. and Conejero, V. (1994): Recommendation for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12, 245-264.
- 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'. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40, 199-211.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W. and Foyer, C.H. (1998): Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol.* 117, 1103-1114.
- Verbeke, P., Siboska, G.E., Clark, B.F.C. and Rattan, S.I.S. (2000): Kinetin inhibits protein oxidation and glycooxidation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 1265-1270.
- Vizárová, G. (1979): Changes in the level of endogenous cytokinins of barley during the development of powdery mildew. *Phytopath. Z.* 95, 314-329.
- Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B. and Amasino, R.M. (1998): A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* 37, 455-469.
- Weststeijn, E.A. (1978): Permeability changes in the hypersensitive reaction of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. after infection with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* 13, 253-258.
- Williamson, J.M. and Meister, A. (1981): Stimulation of hepatic glutathione formation by administration of L-2-oxothiazolidine-4-

- carboxylate, a 5-oxo-L-prolinase substrate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 936-939.
- Wirth, S.J. and Wolf, G.A. (1990): Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. J. Microbiol. Meth. 12, 197-206.
- 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.
- Wojtaszek, P. (1997): Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem. J. 322, 681-692.
- Yamazaki, I. and Yokata, K. (1973): Oxidation states of peroxidase. Mol. Cell Biochem. 2, 39.
- Yang, S.F. and Hoffman, N.E. (1984): Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35, 155-189.
- Ye, Z., Rodriguez, R., Tran, A., Hoang, H., de los Santos, D., Brown, S. and Vellanoeweth, R.L. (2000): The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci. 158, 115-127.
- Yen, C-H. and Yang, C-H. (1998): Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. Plant Cell Physiol. 39, 922-927.
- Zhuang, H., Hildebrand, D.F. and Barth, M.M. (1995): Senescence of broccoli buds is related to changes in lipid peroxidation. J. Agric. Food Chem. 43, 2585-2591.



## Köszönetnyilvánítás

Ez úton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik doktori értekezésem elkészítésében segítségemre voltak. Hálás vagyok, hogy pályámat az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében kezdhettem, élvezve mindazokat az előnyöket, amiket egy nagy múlttal rendelkező tudományos iskola nyújtani képes. Köszönöm az Intézet minden munkatársának jó szándékát és segítségét. Elsősorban köszönöm Dr. Barna Balázs témavezetőm áldozatkészségét, amit az együtt eltöltött évek során tanúsított irántam, megosztva velem mindazokat az ismeretbeli és anyagi forrásokat, amik a növénykóréletteni kutatások terén rendelkezésére álltak. Köszönettel tartozom Dr. Sági Lászlónak, aki a vizsgálatokban szereplő *ipt*-génnel transzformált dohányvonalat a Szegedi Biológiai Központ támogatásával elkészítette, továbbá Dr. Székács Andrásnak a citokininek mérésére használt kompetitív-indirekt ELISA módszer kidolgozásáért és Dr. Tóbiás Istvánnak, aki az említett módszerhez az antiszérumokat előállította. Köszönöm továbbá a Müncheni Műszaki Egyetem (Technische Universität München) Növénykórtani Tanszékének, illetve a tanszéket irányító Eric F. Elstner professzor úrnak a nagyvonalúságát, hogy számomra 9 hónapon keresztül a Tanszéken kutatási lehetőséget biztosított. Köszönöm a Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)\*, a Magyar Tudományos Akadémia (MTA)\*, a Deutscher Akademischer Austauschdienst

(DAAD)\*\* és az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA)\*\*\* anyagi támogatását, amivel fedezték németországi tanulmányútjaim költségét és a Magyarországon végzett kísérleteim költségeinek egy részét. Köszönöm a Veszprémi Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Karának, hogy a Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok Doktori Iskolában a Ph.D. fokozat megszerzését lehetővé tette. Külön köszönöm Dr. Horváth József akadémikusnak, a "Növénykórokozó mikroorganizmusok biológiája, ökológiája és a rezisztencia" c. alprogram vezetőjének, hogy a növényvirológia szeretetét belém oltotta és önzetlenül segítségemre volt ezen az úton.

Megköszönöm végül mindazt a sok szeretet és törődést, amit szüleitől kaptam, ez a munka az ő fáradozásuk gyümölcse is.

\* DFG-MTA kutatócsere-program (436 UNG 113/134/0 ill. 1998/107)

\*\* DAAD ösztöndíj (A/00/23288)

\*\*\* Ifjúsági OTKA pályázat (F030269)