

A jelentett pályázat címe:

Növényi programozott sejthalál gátlás hatása a biotróf és nekrotróf kórokozókkal szembeni rezisztenciára

A kutatási téma - elméleti háttér és megvalósítandó célok

A programozott sejthalál (PCD) a növényi növekedés és fejlődés szabályozásában valamint a stresszek elleni védekezésben (pl. kórokozó fertőzések) egyaránt fontos szerepet játszik. Az állati eredetű BAX fehérjék a PCD fő kiváltói és a PCD-hez köthető tipikus biokémiai változásokat okoznak (DNS fragmentálódás, proteázok aktiválódása, citokróm c kiáramlás a mitokondriumokból, stb.). Érdekes, hogy az állati BAX fehérjék a PCD-t növényekben is képesek kiváltani (pl. Lacomme és Santa Cruz, 1999; Kawai-Yamada et al., 2001), bár jelenlegi ismereteink szerint a növények BAX fehérjéket nem termelnek. Ennek ellenére a növényekben is megtalálható BAX antagonistá BAX inhibitor-1 (BI-1) fehérjék képesek az állati eredetű BAX által indukált PCD gátlására több növényben is (pl. *Arabidopsis thaliana* és árpa) (Kawai-Yamada et al., 2001; Eichmann et al., 2006; Babaeizad et al., 2009). Ugyanakkor a BI-1 túltermelése ellenállóvá teszi a növényeket a PCD-vel járó abiotikus stresszekkel szemben (Isbat et al., 2009; Watanabe és Lam, 2009).

Korábbi kutatások szerint árpában a BAX inhibitor-1 (BI-1) PCD gátló fehérje túltermelése a nekrotróf (elhalt növényi szöveteket preferáló) *Fusarium graminearum* fertőzések fokozott mértékű rezisztenciát, míg a biotróf (kizárólag élő szövetekben szaporodó) árpa lisztharmit (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) fertőzések fokozott fogékonyságot okoz (Hückelhoven et al., 2003; Eichmann et al., 2006; Babaeizad et al., 2009).

A pályázat fő célja volt annak tisztázása, hogy a BAX inhibitor-1 (BI-1) fehérjét túltermelő transzgenikus árpa- és dohány növények valóban rezisztensebbek-e a nekrotróf- és fogékonyabbak-e a biotróf kórokozókkal szemben? Kíváncsiak voltunk többek között arra is, hogy a BI-1 fehérjét túltermelő növények hogyan reagálnak baktérium- és vírusfertőzésekre, erről ugyanis jelenleg alig vannak ismereteink. A pályázati munka további célja volt annak tisztázása, hogy a fertőzés során kialakuló PCD gátlása a növényi antioxidáns kapacitás növelésével hogyan befolyásolja a tényleges betegségrezisztenciát, azaz a kórokozó felhalmozódását?

Eredmények

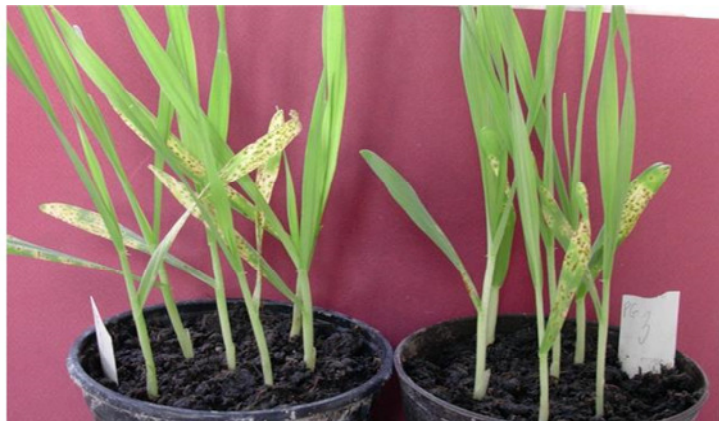
Programozott sejthalál (PCD) gátlás hatása biotróf és nekrotróf gombakórokozókkal szembeni rezisztenciára BI-1 transzgént kifejező árpában

A programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 árpafehérjét túltermelő transzgenikus árpa (*Hordeum vulgare*) két vonalát (cv. Golden Promise E4L3 és E15L7) valamint két vektor kontroll vonalát (cv. Golden Promise 29L13 és 29L28) (Desmukh et al., 2006) J. Imani és R. Hückelhoven (Justus Liebig University, Giessen és Technical University, München, Németország) bocsátották rendelkezésünkre. A növényekben a transzgén jelenlétét, ill. kifejeződését szemikvantitatív RT-PCR-rel mértük. A várakozásoknak megfelelően a transzgén expresszsióját a növényekben egy 584 bázispár méretű termék megléte jelezte.

PCD gátlás hatása biotróf gombakórokozókkal (rozsdagombák) szembeni rezisztenciára BI-1 transzgént kifejező árpában

Az első pályázati évben (2011) már elindított kísérletek célja annak vizsgálata volt, hogy a programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 fehérjét kifejező transzgenikus árpanövények hogyan reagálnak egyes biotróf gombakórokozók (rozsdagombák) fertőzésére? A kísérletek szerint a két vizsgált transzgenikus (*BI-1*) árpa vonal eltérően reagált a búza szárrozsdá (*Puccinia graminis* f.sp. *graminis*) fertőzésére. Kb. egy hetes csíranövényeket fertőzve azt tapasztaltuk, hogy a fertőzés után 7-8 nappal a rozsdatelepek megjelenését kísérő klorózis mértéke (levélfelület %) a vad típusúhoz képest jelentősebben - közel a felére - csak az E15L7 vonalban csökken (vad típus: $77\pm 11\%$, E15L7: $45\pm 14\%$, E4L3: $66\pm 13\%$). A transzgenikus (BI-1) árpaakat levélrozsdával (*Puccinia hordei*) is megfertőztük, és hasonló eredményeket kaptunk. A klorózis mértéke (levélfelület %) a vad típusúhoz képest ebben az esetben is jelentősebben csak az E15L7 vonalban csökkent (vad típus: $70\pm 5\%$, E15L7: $39\pm 5\%$, E4L3: $61\pm 5\%$), a fertőzés után 20-25 nappal. Ezek szerint a transzgenikus (BI-1) árpa egy része szárrozsdá és levélrozsdá fertőzésre szabad szemmel is látható tüneti rezisztenciát mutat (**1. ábra**). Feltételezhető, hogy a tüneti rezisztencia (csökkent mértékű PCD) együtt jár a biotróf rozsdagombák fokozott mértékű felhalmozódásával (a gazdanövény fokozott fogékonyságával), erre utalhat, hogy a rozsdatelepek száma az E15L7 vonalban alig volt kevesebb, mint a többi növényben. A kérdés tisztázása pl. a gomba DNS mennyiségi mérésével (PCR) lehetséges.

Puccinia graminis
f.sp. *graminis*



Levél klorózis vad típus: $77\pm 11\%$

E15L7: $45\pm 14\%$

Puccinia hordei



Levél klorózis vad típus: $70\pm 5\%$

E15L7: $39\pm 5\%$

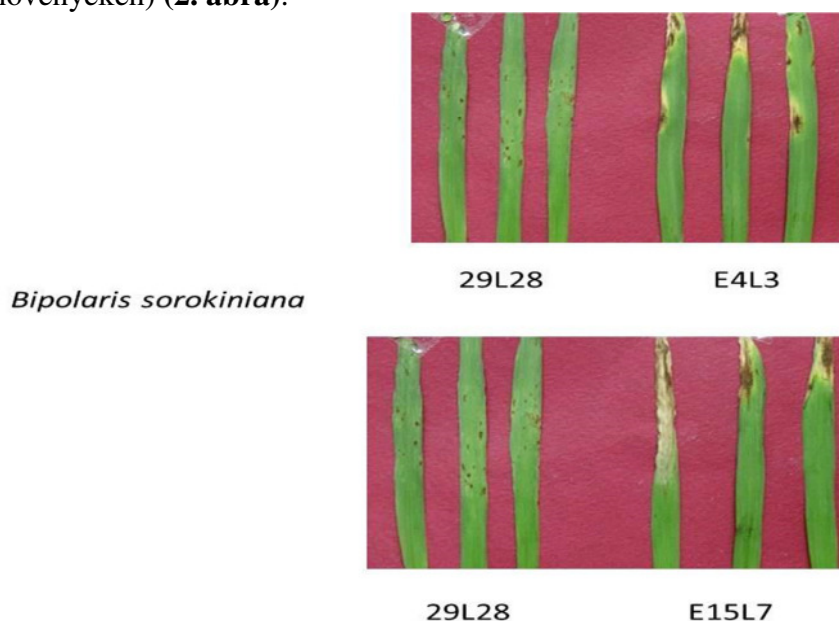
1. ábra. Programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 árpafehérjét túlermelő transzgenikus árpa (cv. Golden Promise E15L7) reakciója rozsdagombák fertőzésére, a vad típusú növényekhez képest. Felső rész: tünetek a búza szárrozsdá (*Puccinia graminis* f.sp. *graminis*) fertőzés után 10 nappal. Alsó rész: tünetek az árpa levélrozsdá (*Puccinia hordei*) fertőzés után 25 nappal.

PCD gátlás hatása nekrotróf (hemibiotróf) gombakórokozóval szembeni rezisztenciára BI-1 transzgént kifejező árpában

Ezekhez a vizsgálatokhoz azért választottuk az árpán főleg levél nektrózist okozó *Bipolaris sorokiniana*-t (teleomorf: *Cochliobolus sativus*), mert e kórokozó fertőzési stratégiájának megítélése a mai napig nem egyértelmű. A növénykórokozó gombák fertőzési stratégiáinak pontosabb jellemzéséhez ugyanis a „nekrotróf – biotróf” megkülönböztetés mellett bevezették a hemibiotróf fertőzési stratégia fogalmát is (Perfect és Green, 2001; Barna et al., 2012). A hemibiotróf gombakórokozók a fertőzés korai szakaszában az élő gazdaszövetekben szaporodnak (biotróf fázis), míg a patogenezis késői fázisában már a – részben toxinjaik által elölt – nekrotizálódott növényi részeket preferálják. Kumar és munkatársai 2002-es összefoglaló munkájukban a *B. sorokiniana*-t elsőként említik hemibiotrófként, ahogy később több más közlemény is (pl. Schäfer et al., 2004; Ibeagha et al., 2005). Ennek ellenére a szakirodalomban a *B. sorokiniana*-t sok szerző továbbra is nekrotróf kórokozóként tartja nyilván (Lambers és Colmer, 2005; Vidhyasekaran, 2010) feltételezhetően azért, mert a gomba kezdeti biotróf fertőzési fázisa viszonylag rövid, legfeljebb 2 nap.

Az első pályázati évben (2011) elindított kísérletek célja tehát annak vizsgálata volt, hogy a programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 fehérjét kifejező transzgenikus árpa (cv. Golden Promise) hogyan reagálnak a nekrotróf (hemibiotróf) *B. sorokiniana* fertőzésére?

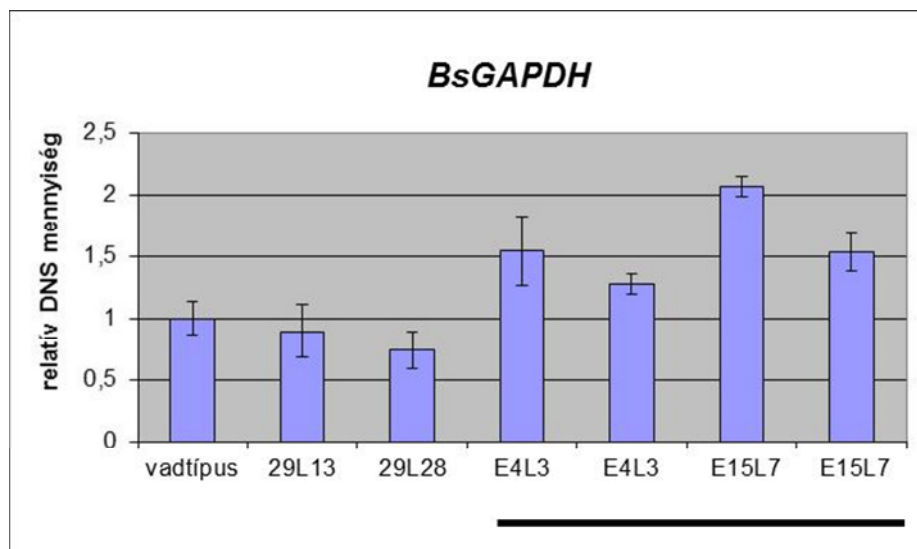
Kezdeti (2011-2012) eredményeink szerint a *B. sorokiniana* által előidézett nekrotikus foltosodás (levélfelület %) a két transzgenikus (*BI-1*) árpa közül az E15L7 vonalban szignifikánsan csökkent. Később sajnos kiderült, hogy az általunk akkor használt izolátum szennyezett volt, ezért a további vizsgálatokhoz 2013 elejétől az ATK NÖVI-ben fenntartott H-188 jelű *B. sorokiniana* izolátumot használtuk. A H-188-as izolátummal fertőzve az egy hetes árpa csíranövényeket a levél nektrózisok kb. 5-7 nap múlva jelentek meg és további 1-3 nap múlva fejlődtek ki teljesen. A vad típushoz és vektor kontroll növényekhez (29L13 és 29L28) képest mindkét transzgenikus (*BI-1*) árpa vonalban (E4L3 és E15L7) jelentősen erősebbek (legalább háromszor akkora nekrotizálódott levélfelület) voltak a tünetek, de ez elsősorban az E15L7 vonalban volt szembetűnő (közel ötször annyi nektrózis, mint a kontroll növényeken) (2. ábra).



2. ábra. Programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 árpafehérjét túltermelő transzgenikus árpák (cv. Golden Promise E4L3 és E15L7) reakciója *Bipolaris sorokiniana* fertőzésére, a vektor kontroll növényekhez (29L28) képest. Tünetek a *B. sorokiniana* fertőzés után 10 nappal.

A *B. sorokiniana* gomba jelenlétét a fertőzött árpalevelekben szemikvantitatív- és valós idejű, kvantitatív PCR-rel igazoltuk, egy gomba specifikus génre (*BsGAPDH*) tervezett primerpár segítségével. A PCR vizsgálatok szerint a fokozott nekrotikus tüneteket mutató E4L3 és E15L7 növényekben a gomba felhalmozódás is jóval nagyobb mértékű (1,5-2-szer akkora) volt, mint a kontrollokban (**3. ábra**).

Első pillantásra meglepőnek tűnik, hogy a programozott sejthalálban (PCD) gátolt árpákban egy nekrotikus tüneteket mutató – nekrotrófnak (hemibiotrófnak) tekintett – gomba kórokozó a szokásosnál virulensebb. Feltételezhető, hogy a kezdeti biotróf fázis kritikus jelentőségű a gomba patogenezisében, ezért ilyenkor a *B. sorokiniana* gyorsabban szaporodik/terjed a PCD-ben gátolt (BI-1 túltermelő) gazdanövényekben. A kórokozó gyors felhalmozódása viszont a toxinok és reaktív oxigénfajták intenzívebb termelődését, végül fokozott levél nekrozist eredményez. Ezek szerint a *B. sorokiniana* – legalábbis árpa gazdanövényen – inkább hemibiotróf kórokozóznak tekinthető.



3. ábra. Programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 árpafehérjét túltermelő transzgenikus árpák (cv. Golden Promise E4L3 és E15L7) reakciója *Bipolaris sorokiniana* fertőzésére, a vadtípusú és vektor kontroll (29L13 és 29L28) növényekhez képest. A *B. sorokiniana* felhalmozódását a fertőzött levelekben valós idejű, kvantitatív PCR-rel mértük, a fertőzés után 10 nappal. A relatív gomba DNS mennyiség a *BsGAPDH* gén detektálásával lett meghatározva (normalizálás a *HvUbi* árpa génre).

PCD gátlás hatása hemibiotróf gombakórokozóval szembeni rezisztenciára árpában – a rövid hőkezelés szerepe

Ha a *B. sorokiniana* patogenezisében a kezdeti biotróf fázis valóban kritikus jelentőségű, akkor a fertőzés e korai szakaszában a fogékonyság növelése (növényi PCD gátlása) nemcsak a *BI-1* gén mesterséges túlkifejeztetésével lehetséges. Ismert, hogy a fertőzés előtt két órával adott rövid hőkezeléssel (49 C°, 20 sec) jelentősen fokozható az árpa fogékonysága a biotróf árpalisztharmattal (*Blumeria graminis* f.sp. *graminis*) szemben (Barna et al., 2012, 2014). Feltételezhető, hogy ilyenkor a növényi PCD – legalább átmenetileg – gátolva van, és ebben szerepet játszhat a vadtípusú árpában működő *BI-1* gén indukciója is, hiszen ez a gén az árpalisztharmat fertőzés egyik fogékonysági faktora (Hückelhoven et al., 2003; Eichmann et al., 2006; Babaeizad et al., 2009).

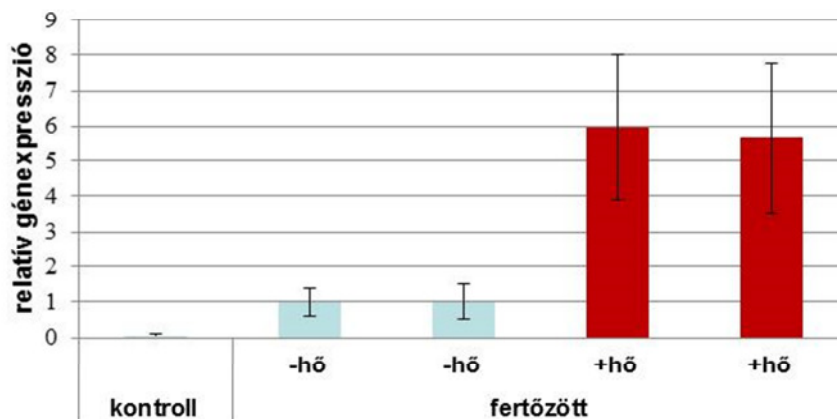
Ha a rövid hőkezelésnek kitett árpát a – hemibiotróf – *B. sorokiniana*-val fertőztük, szintén jelentősen megnőtt a fogékonyság: a fertőzés után 7 nappal a leveleken jelentősen fokozódott a szöveti nekrozis és nőtt a kórokozó mennyisége is (valós idejű, kvantitatív PCR-rel mérve), a kezeletlen kontroll fertőzött növényekhez képest (**4. és 5. ábra**).

Bipolaris sorokiniana



4. ábra. A gombás fertőzés okozta tünetek intenzitásának különbsége kezeletlen és hőkezelt, *Bipolaris sorokiniana*-val fertőzött vad típusú árpanövényekben (cv. Ingrid), 7 nappal a fertőzés után. A növények hőkezelése 2 órával a fertőzés előtt történt (49 C°, 20 sec).

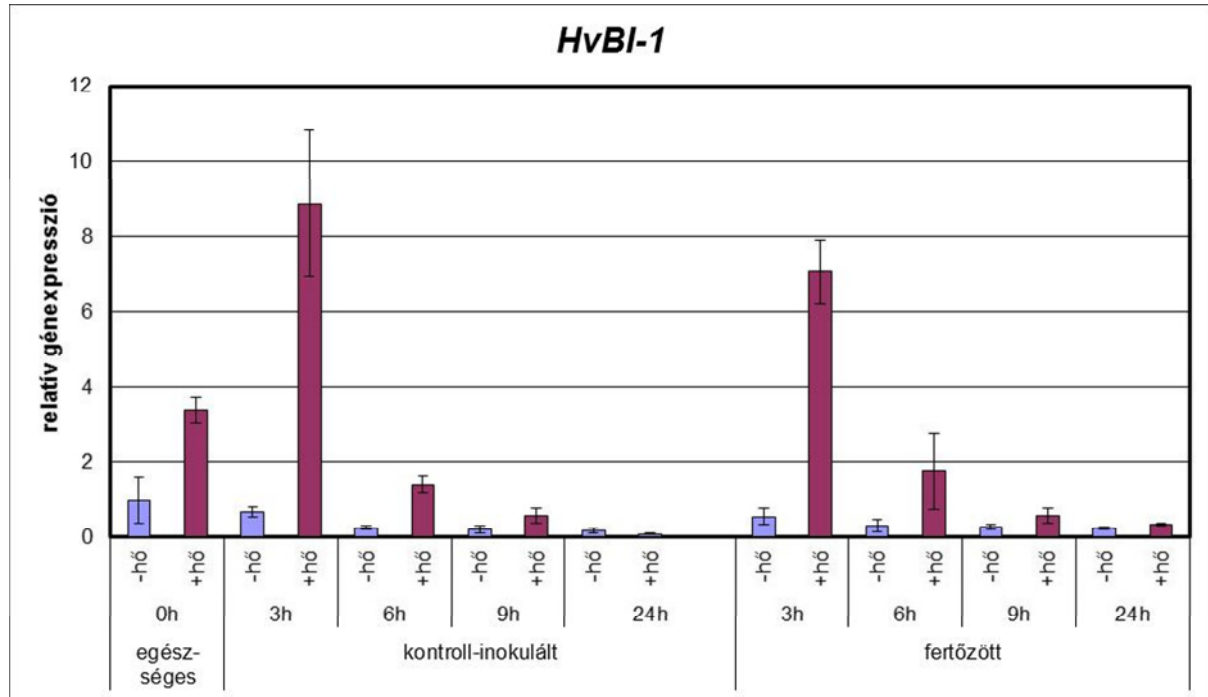
BsGAPDH



5. ábra. A gomba kórokozó felhalmozódásának különbsége kezeletlen és hőkezelt, *Bipolaris sorokiniana*-val fertőzött vad típusú árpanövényekben (cv. Ingrid), 7 nappal a fertőzés után. A növények hőkezelése 2 órával a fertőzés előtt történt (49 C°, 20 sec). Kontroll = egészséges, kezeletlen növények. A *B. sorokiniana* felhalmozódását a fertőzött levelekben valós idejű, kvantitatív PCR-rel mértük. A relatív gomba DNS mennyiség a *BsGAPDH* gén detektálásával lett meghatározva (normalizálás a *HvUbi* árpa génre).

A fent említett kísérletek is arra utalnak, hogy a *B. sorokiniana* – legalábbis árpa gazdanövényen – inkább hemibiotróf kórokozónak tekinthető. Ezek szerint a patogenezis korai, biotróf szakaszában (a fertőzés kezdete után maximum 2 nap) a fogékonyság nemcsak a *BI-1* gén mesterséges túlkifejeztetésével, hanem rövid hőkezeléssel is jelentősen fokozható, feltehetően a PCD visszاسzorítása által. Annak tisztázására, hogy a PCD gátlás valóban szerepet játszhat-e a hőkezeléssel megnövelt fogékonyság kialakításában, *B. sorokiniana*-val fertőzött (hőkezelt és kezeletlen) árpában vizsgáltuk a vad típusban működő (endogén) *HvBI-1* gén aktivitását. Eredményeink szerint a *HvBI-1* gén expressziója a hőkezelés után pár órával –

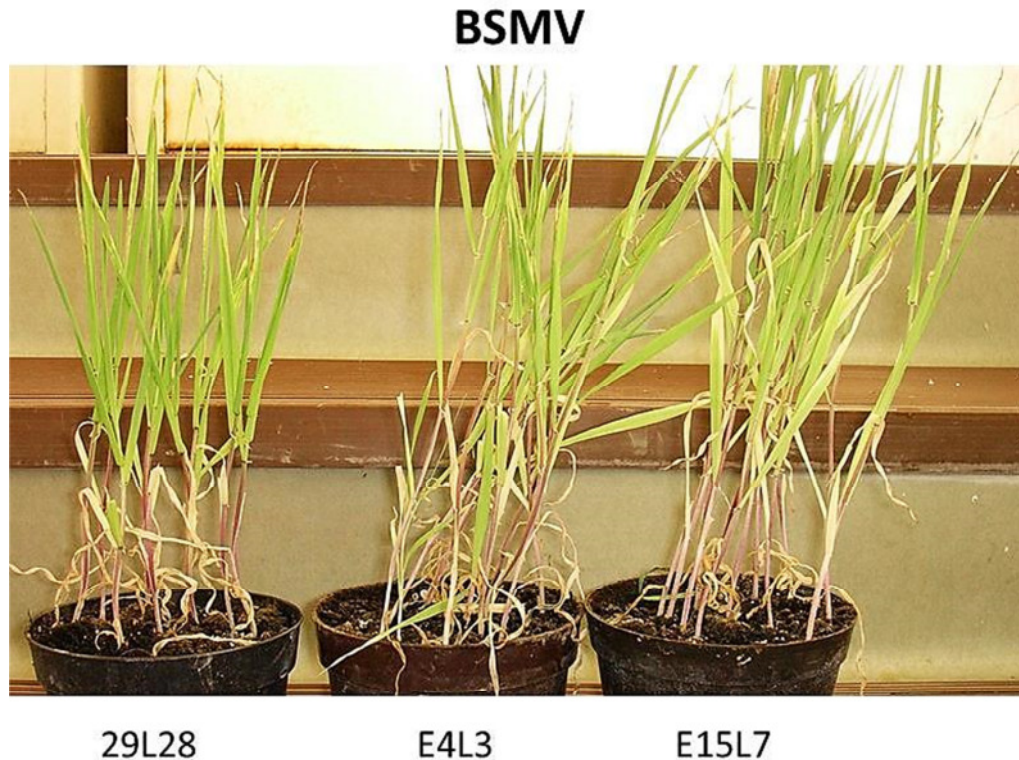
egészséges és fertőzött növényekben egyaránt – átmenetileg a többszörösére nőtt, ami a növényi PCD gátlására utal (**6. ábra**). Hasonló expresszió változásokat tapasztaltunk még két másik, sejthalál gátlásban szerepet játszó árpa gén (szuperoxid-dizmutáz *HvSOD*, citoplazmatikus dehidroaszorbát-reduktáz *HvDHARcyt*) esetében is. Eredményeink szerint tehát árpában a *B. sorokiniana*-val szemben hőkezeléssel megnövelt fogékonyság kialakítása a növényi PCD – legalább átmeneti – visszaszorításával jár együtt (lásd Küntler et al., 2014).



6. ábra. Kezeletlen és hőkezelt vad típusú árpa (cv. Ingrid) BAX inhibitor-1 génjének (*HvBI-1*) relatív expressziója (árpa *HvUbi* génjére normalizálva) egészséges, kontroll-inokulált, valamint *Bipolaris sorokiniana*-val fertőzött mintákban, a fertőzés utáni korai időpontokban. A növények hőkezelése 2 órával a fertőzés előtt történt (49 C°, 20 sec). A relatív géne xpressziót valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mértük.

Programozott sejthalál (PCD) gátlás hatása szisztemizálódó vírusfertőzésekre, *BI-1* transzgént kifejező árpában

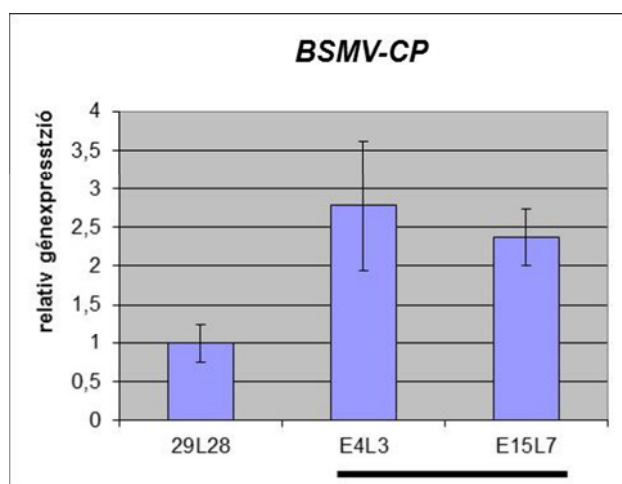
A programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 fehérjét kifejező transzgenikus árpa vírusfertőzésekre adott reakcióját még nem vizsgálták. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az árpát fertőző, szisztemikus klorózist/mozaikot okozó, gazdaságilag jelentős vírusok vajon virulensebbek vagy kevésbé virulensebbek lesznek-e a PCD-gátlást mutató transzgenikus árpavonalakban? Ehhez két olyan vírust választottunk, amelyek mechanikai úton is átvihetők: 1/ rozsok mozaik vírus (*Brome mosaic virus*, BMV), 2/ árpa csíkos mozaik vírus (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV). A vírus izolátumokat Dr. Nyerges Klára (MgSzH NTAI Velencei Virologiai Laboratórium) bocsájtotta rendelkezésünkre. A BMV és BSMV fertőzés után 7-10 nappal valamennyi vizsgált árpa vonalban enyhe klorotikus/mozaikos tünetek alakultak ki. A fertőzés után 21 nappal mindkét vírus láthatóan szisztemizálódott (erősebb mozaik, a BSMV-fertőzött növényekben enyhe csíkozás, „stripe” is). A vírusfertőzés utáni 30. napon a két transzgenikus (*BI-1*) árpában (E4L3 és E15L7) már egyértelműen erősebb tünetek jelentkeztek, mint a kontrollokban (vad típusú cv. Golden promise és egy vektor kontroll vonal /29L28/) (**7. ábra**).



7. ábra. Programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 árpafehérjét túlermelő transzgenikus árpák (cv. Golden Promise E4L3 és E15L7) reakciója árpa csíkos mozaik vírus (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV) fertőzésére, a vektor kontroll növényekhez (29L28) képest. Tünetek a BSMV fertőzés után 30 nappal.

A fertőzött árpákban a vírus felhalmozódást valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel detektáltuk, a BMV és BSMV köpenyfehérje génekre tervezett indítószekvenciák (primerek) felhasználásával. A BMV esetén a PCR többszöri próbálkozás után is sikertelen volt (nem kaptunk jelet), ezért valószínűsíthető, hogy a génbanki adatbázisokban található szekvenciák erősen eltérnek az általunk használt BMV izolátum szekvenciájától. A kérdés tisztázásához a jövőben további indítószekvenciák kipróbálása lesz szükséges.

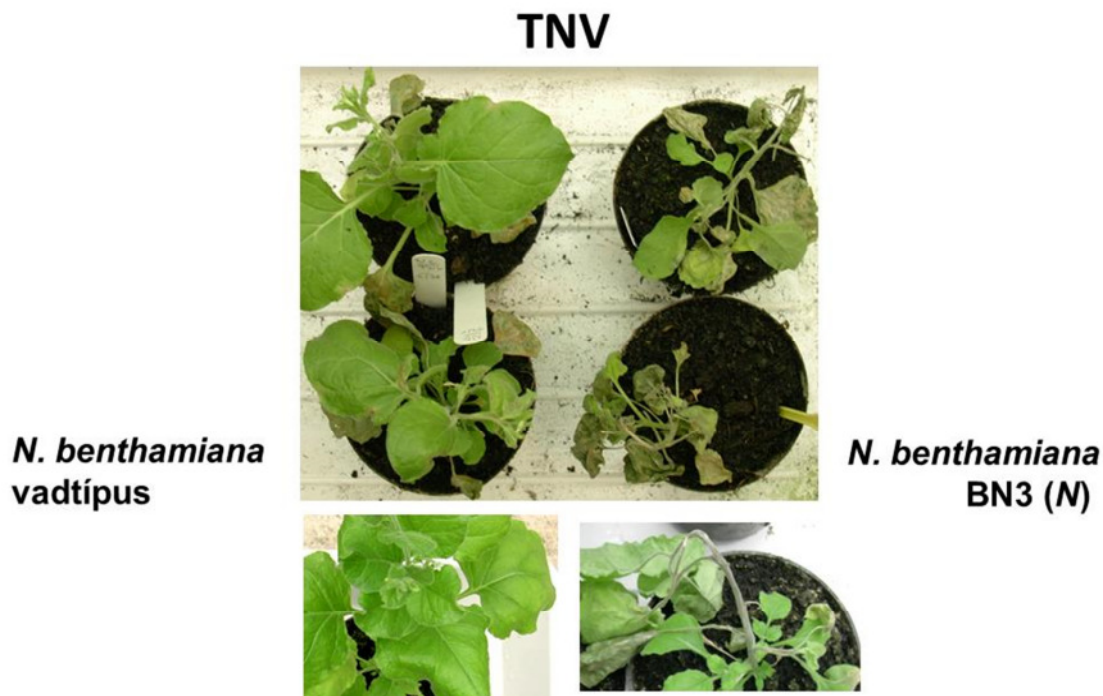
A PCR-es vizsgálatok eredményei szerint viszont a BSMV titer mindkét transzgenikus (*BI-1*) árpa vonalban (E4L3 és E15L7) legalább kétszer akkora volt, mint a kontroll növényekben (**8. ábra**). BSMV fertőzésnél tehát a PCD gátlás jelentősen emeli a vírustitert, ami azt jelezheti, hogy a sikeres vírus patogenezishez a fertőzött növényi gazdasejtek fokozott juvenilitása/antioxidáns kapacitása kritikus lehet.



8. ábra. Programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 árpafehérjét túltermelő transzgenikus árpák (cv. Golden Promise E4L3 és E15L7) reakciója árpa csíkos mozaik vírus (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV) fertőzésére, a vektor kontroll növényekhez (29L28) képest. A BSMV felhalmozódását a fertőzött levelekben valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mértük, a fertőzés után 30 nappal, a vírus köpenyfehérje gén (*BSMV-CP*) relatív expressziójának detektálásával (normalizálás a *HvUbi* árpa géne).

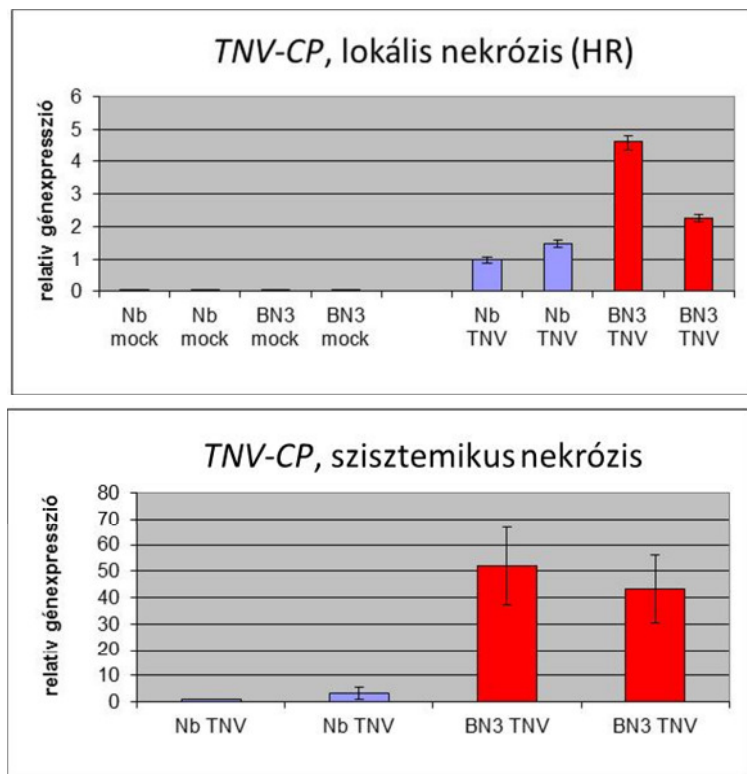
Programozott sejthalál (lokális és szisztémikus nekrosis) mértékének hatása a vírus rezisztenciára *Nicotiana benthamiana*-ban

Egy korábbi OTKA pályázatunkban (K61498) már ismertettük azokat az előkísérleteket, melyek során a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) ellen ható *N* rezisztenciagén más vírusokkal szemben kifejtett hatását vizsgáltuk *Nicotiana benthamiana*-ban. Ilyen vírus pl. a dohány nekrosis vírus (*Tobacco necrosis virus*, TNV), amely jelenlegi ismereteink alapján csak a *N. benthamiana*-t képes szisztémikusan megfertőzni (Molnár et al., 1997). A mostani pályázat keretében folytatott munka eredményei szerint az *N* génre transzgenikus *N. benthamiana* növények (BN3) a vad típusnál jóval fogékonyabbak a TNV által okozott lokális és szisztémikus nekrosisra (PCD-re). A fertőzésekhez a TNV E szerotípusát használtuk. A vad típusú és a transzgenikus (BN3) *N. benthamiana* növények inokulált levelein a TNV-fertőzés után egyaránt 2-3 nappal alakult ki a lokális nekrosis (hiperszenzitív reakció, HR). A BN3 növényekben ugyanakkor a léziószám, ill. a léziók összefolyásának mértéke jóval nagyobb volt, mint a vad típusban. A szisztémikus nekrotikus tünetek az *N* génre transzgenikus (BN3) növényeken pár nappal korábban (a TNV fertőzés után 10-12 nappal) jelentek meg, ill. jóval kifejezettebbek voltak, mint a vad típusú növényeken (**9. ábra**). A TNV fertőzés utáni 14-15. naptól a vad típusú *N. benthamiana* növényeknek csak 40 %-a, míg a transzgenikus (BN3) növények több, mint 85 %-a mutatott szisztémikus nekrotizist.



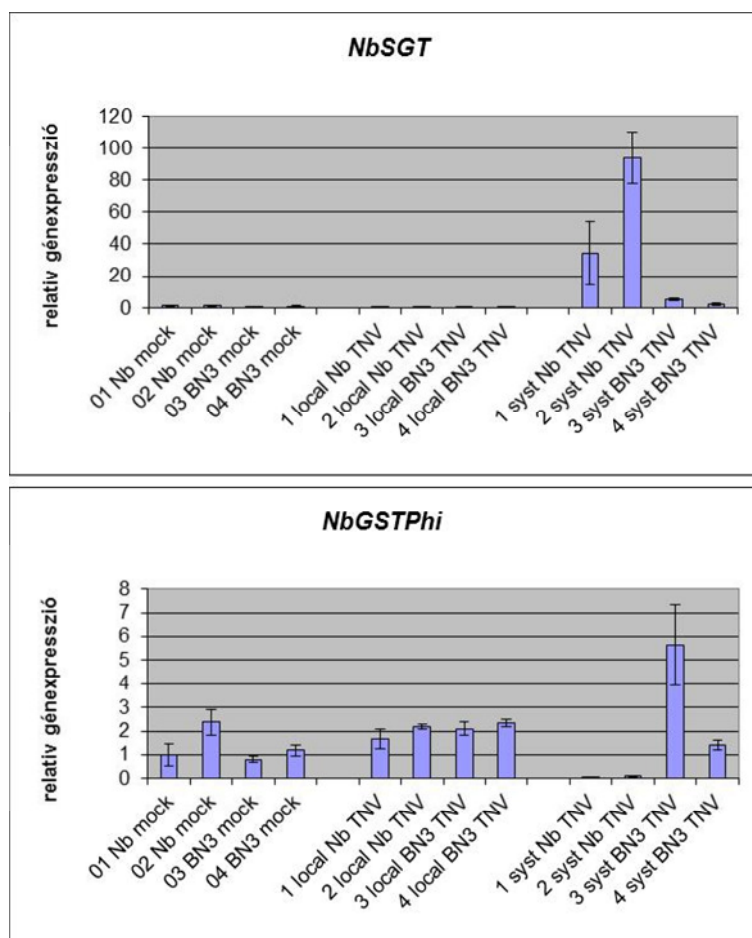
9. ábra. Vad típusú és az *N* vírus rezisztencia génre transzgenikus (BN3) *Nicotiana benthamiana* reakciója dohány nekrosis vírus (*Tobacco necrosis virus*, TNV) fertőzésére. Szisztémikus nekrotikus tünetek a TNV fertőzés után 21 nappal.

A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy a fokozott szisztemikus nekrozis (PCD) hogyan befolyásolja a TNV mennyiségét a gazdanövényben? A BN3 növények inokulált- és szisztemikusan fertőzött leveleiben a TNV koncentráció többszöröse volt annak, mint amit a vad típusú *N. benthamiana*-ban detektáltunk (szemikvantitatív- és valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mérve) (**10. ábra**).



10. ábra. Vad típusú (Nb) és az *N* vírus rezisztencia génre transzgenikus (BN3) *Nicotiana benthamiana* reakciója dohány nekrozis vírus (*Tobacco necrosis virus*, TNV) fertőzésére, a lokális (HR), ill. szisztemikus nekrozist mutató levelekben, a TNV fertőzés után 7, ill. 21 nappal. mock = kontroll inokulált. A TNV felhalmozódását valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mértük, a vírus köpenyfehérje gén (*TNV-CP*) relatív expressziójának detektálásával (normalizálás az *NbAct* génre).

Tisztázandó kérdés, hogy a BN3 növények TNV-vel, ill. a vírus által indukált PCD-vel szembeni fokozott fogékonysága hogyan függ össze a növényi védekező rendszer működésének megváltozásával? Eredményeink szerint ez a fokozott fogékonyság együtt járt egy védekezéssel kapcsolatos szalicilsav glükózil-transzferáz (*NbSGT*) gén expressziójának erős visszaesésével, ami a szalicilsavval kapcsolatos védekezési reakciók gyengülését jelezheti. Ugyanakkor egyes patogenezissel kapcsolatos gének (*NbPRI*, *NbPR5* és két glutation-S-transzferáz gén *NbGSTPhi* és *NbGSTTau11*) fokozott mértékben indukálódtak a BN3 növények TNV-vel szisztemikusan fertőzött leveleiben, ami feltehetően a fokozott sejt- és szövetelhalás valamint TNV replikáció markere lehet (**11. ábra**).



11. ábra. Egy szalicilsav glükozil-transzferáz (*NbSGT*) és egy glutation-S-transzferáz (*NbGSTPhi*) gén relatív expressziója vad típusú (Nb) és az *N* vírus rezisztencia génre transzgenikus (BN3) *Nicotiana benthamiana*-ban, dohány nekروزis vírus (*Tobacco necrosis virus*, TNV) fertőzésekor, a lokális (HR), ill. szisztemikus nekروزist mutató levelekben, a TNV fertőzés után 7, ill. 21 nappal. mock = kontroll inokulált. A relatív géneexpressziót valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mértük. (normalizálás az *NbAct* génre).

Összességében, a TNV fertőzés által a BN3 növényekben kiváltott fokozott mértékű programozott sejthalál (PCD) nem tudta gátolni a vírusreplikációt, ellenkezőleg, a TNV titer jelentősen nőtt. Ezek szerint vírusfertőzéseknél – bizonyos esetekben – a programozott sejthalál és a rezisztencia egymástól független folyamatok eredménye, amire a saját és mások korábbi eredményei is utalnak (Bendahmane et al., 1999; Cole et al., 2001; Király et al., 2008).

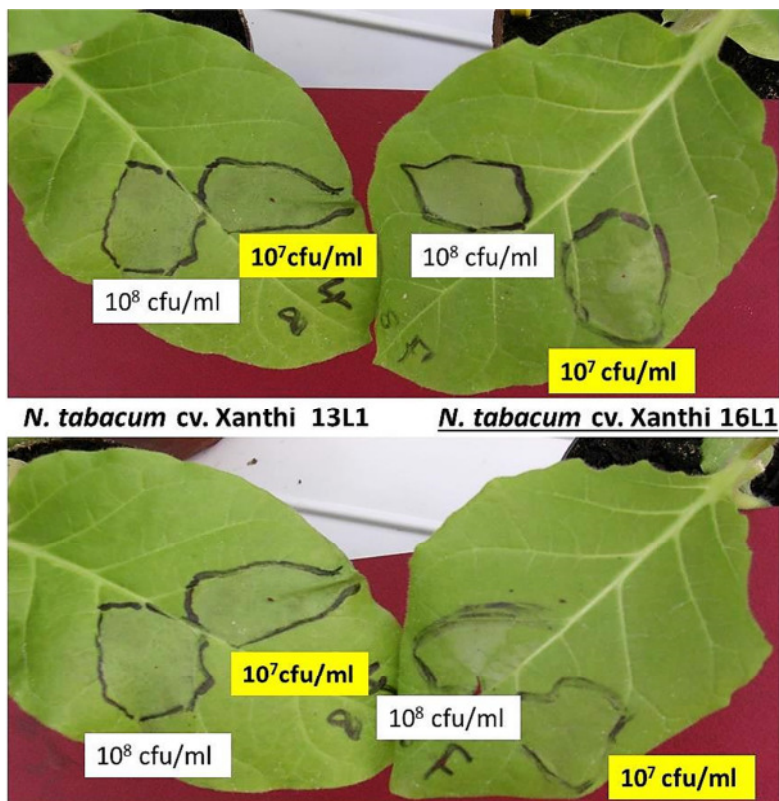
Programozott sejthalál (PCD, lokális nekروزis) gátlás vizsgálata baktériummal és vírussal fertőzött, *BI-1* transzgént kifejező dohányban

A programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 árpafehérjét kifejező transzgenikus dohány (*Nicotiana tabacum*) két vonalát (cv. Xanthi 16L1 és 16L3) valamint egy vektor kontroll vonalat (cv. Xanthi 13L1) J. Imani és R. Hüchelhoven (Justus Liebig University, Giessen és Technical University, München, Németország) bocsátották rendelkezésünkre. A transzgén jelenlétét, ill. kifejeződését a növényekben szemikvantitatív RT-PCR-rel mértük, a várakozásoknak megfelelően a transzgén expresszióját egy 584 bázispár méretű termék megléte jelezte.

A kísérletek célja annak tisztázása volt, hogy a PCD gátló BI-1 fehérjét kifejező transzgenikus dohányok hogyan reagálnak lokális nekrosis (HR) kialakulásával járó vírus-, ill. baktérium fertőzésére, erre ugyanis még nincsenek közölt szakirodalmi adatok.

PCD (lokális nekrosis, HR) gátlás vizsgálata baktériummal fertőzött, BI-1 transzgént kifejező dohányban

A transzgenikus (BI-1) dohány növények leveleit két, HR-tüneteket okozó baktériummal (*Pseudomonas pisi* és *Pseudomonas tomato* DC3000) is megfertőztük, a levélszegmensek infiltrálásával. A kísérletek többszöri megismétlése nyomán úgy tűnik, hogy *P. pisi* fertőzésnél (10^7 cfu/ml inokulum denzitás) mindkét - PCD-gátló BI-1 fehérjét kifejező - transzgenikus dohányvonalban a vizsgált növények kb. 25-50 %-ában az infiltrált területen belüli nekrotizálódott levélfelület (HR) kb. feleakkora, mint a vad típusnál (nagyobb inokulum denzitásnál / 10^8 cfu/ml/ viszont már nincs/alig van tünetcsökkenés) (**12. ábra**). Ez a tünetcsökkenés elsősorban a 16L3 vonalban szembetűnő. A csökkent mértékű HR-t mutató transzgenikus (BI-1) dohányokban ugyanakkor a baktériumszám nem változik jelentősen a kontrollokhöz képest (kb. 1×10^4 - 2×10^4 cfu/cm² infiltrált levél). Lényegében ugyanezeket az eredményeket kaptuk, ha a BI-1 dohányokat egy másik HR-tüneteket okozó baktériummal (*Pseudomonas tomato* DC3000, 10^7 cfu/ml) fertőztük: a BI-1 transzgén hatására csökken a nekrotizálódott levélfelület, a baktériumszám viszont gyakorlatilag változatlan a kontrollokhöz képest. Ezek szerint baktériumfertőzéskor is (a vírusfertőzéshez hasonlóan) a programozott sejthalál és a rezisztencia bizonyos esetekben egymástól független folyamatok eredménye (lásd pl. Gassman, 2005; Barna et al., 2008; Coll et al., 2010).

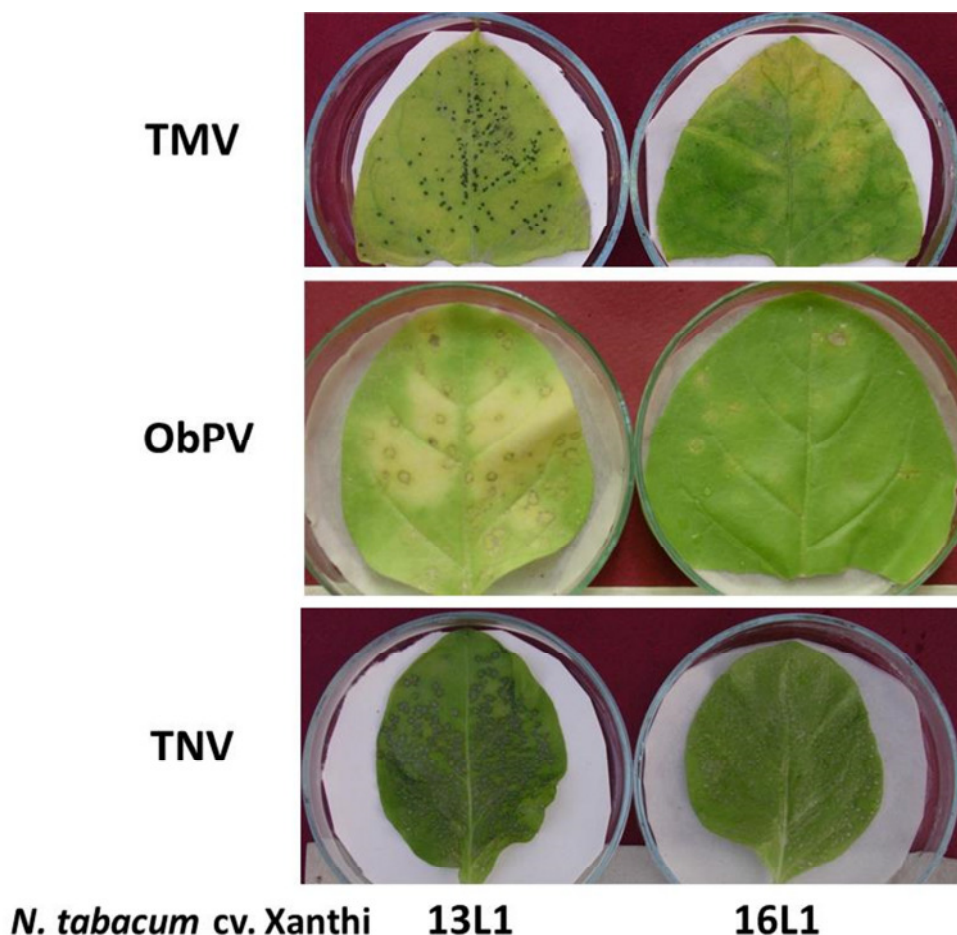


12. ábra. Programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 árpafehérjét túltermelő transzgenikus dohány (cv. Xanthi 16L1) reakciója lokális nekrozist (HR) okozó *Pseudomonas pisi* baktérium fertőzésére, a vektor kontroll növényekhez (13L1) képest. Tünetek a baktériumfertőzés után 1 nappal. A feketével jelölt levélszegmenseket infiltráltuk a baktériummal (inokulum denzitás: 10^7 cfu/ml, ill. 10^8 cfu/ml).

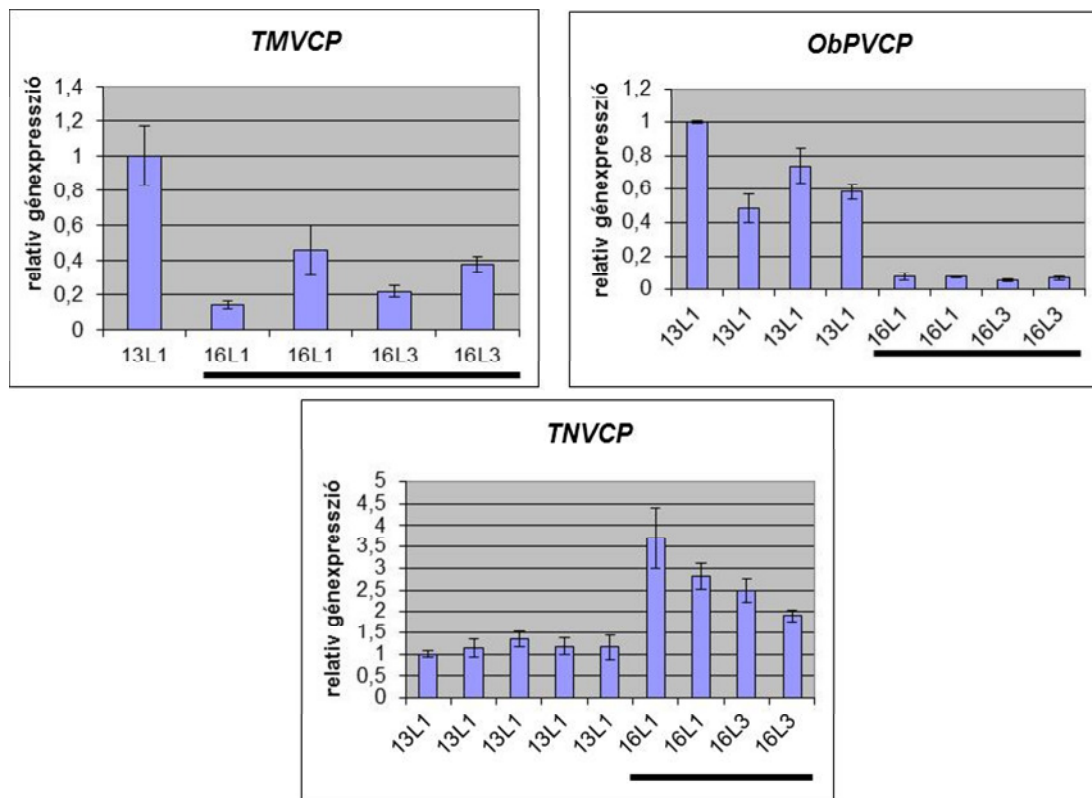
Programozott sejthalál gátlás hatása lokális nektrózissal együtt járó vírusfertőzésekre, BI-1 transzgént kifejező dohányban

A kísérletek célja annak tisztázása, hogy a programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 fehérjét kifejező transzgenikus dohányok (cv. Xanthi) hogyan reagálnak lokális nektrózis (HR) kialakulásával járó vírusfertőzésekre? Három növényi vírust használtunk a vizsgálatokhoz: két tobamovírust (TMV és a vele rokon *Óbuda paprika vírus*, ObPV) valamint a dohány nektrózis vírust (*Tobacco necrosis virus*, TNV).

A transzgenikus (BI-1) növények levágott leveleit TMV-vel fertőzve a HR tünetei a fertőzés után 2 nappal jelentek meg, a kontroll növényekhez hasonlóan. Mindkét - PCD-gátló BI-1 fehérjét kifejező - transzgenikus dohányvonalban a TMV fertőzéskor kialakult léziók mérete nemigen változott, a léziószám, ill. a nekrotizálódott levélfelület azonban jelentősen csökkent a kontrollokhoz képest (**13. ábra**). A TMV títert az inokulált levelekben valós idejű RT-PCR-rel meghatározva azt kaptuk, hogy a transzgenikus (BI-1) dohányokban a lokális nektrózisok mérséklődése együtt jár a vírusszint jelentős visszaszorulásával (a kontroll növényekben mért TMV szint kb. 30 %-a) (**14. ábra**).



13. ábra. Programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 árpafehérjét túltermelő transzgenikus dohány (cv. Xanthi 16L1) reakciója lokális nektrózist (HR) okozó vírusok (TMV, ObPV, TNV) fertőzésére, a vektor kontroll növényekhez (13L1) képest. Tünetek a vírusfertőzések után 7 nappal.



14. ábra. Programozott sejthalált (PCD) gátló BI-1 árpafehérjét túlermelő transzgenikus dohány (cv. Xanthi 16L1 és 16L3) reakciója lokális nekrozist (HR) okozó vírusok (TMV, ObPV, TNV) fertőzésére, a vektor kontroll növényekhez (13L1) képest, a vírusfertőzések után 7 nappal. A vírus felhalmozódást valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mértük, a vírus köpenyfehérje gének (*TMV-CP*, *ObPV-CP*, *TNV-CP*) relatív expressziójának detektálásával (normalizálás az *NtAct* génre).

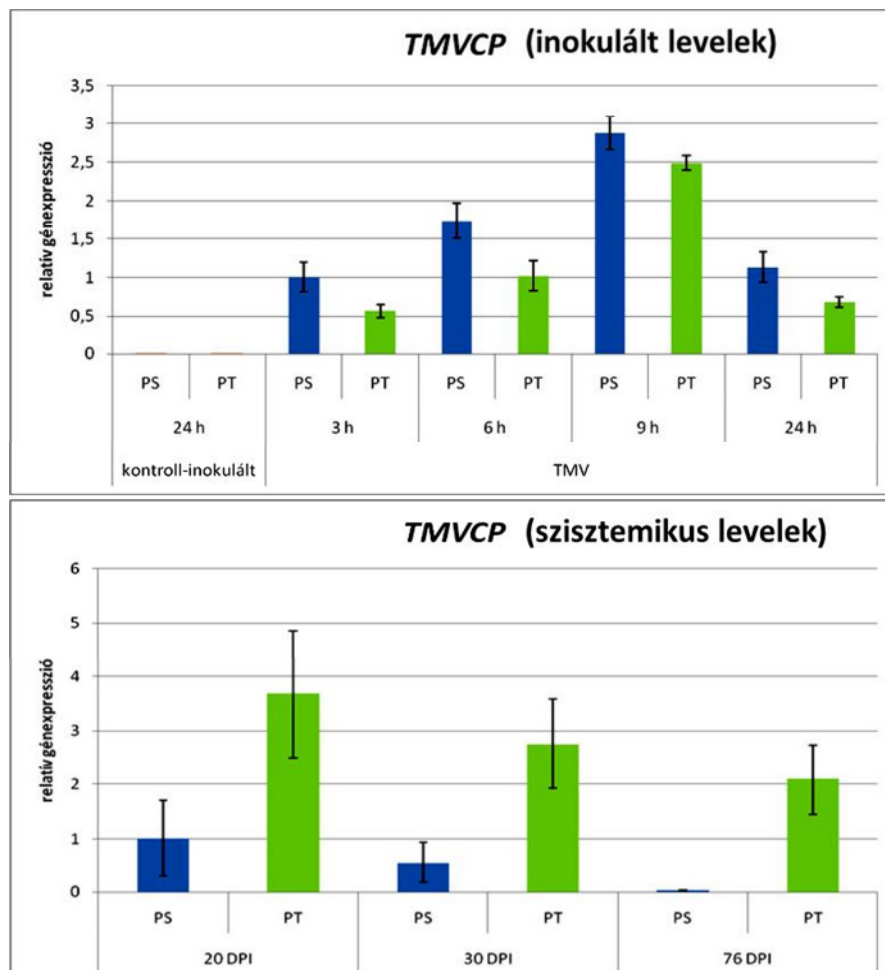
Kíváncsiak voltunk arra, hogy a BI-1 gén által kialakított PCD gátlás hogyan befolyásolja a HR-t, ill. vírusszintet egy TMV-vel rokon másik tobamovírus, az *Óbuda paprika vírus* (ObPV) fertőzése esetén? A fentebb említett dohány vonalakat (16L1, 16L3, 13L1) ObPV-vel fertőzve hasonló változásokat kaptunk, mint TMV fertőzéskor: a nekrotizálódott levélfelület (léziószám) és az ObPV mennyisége a transzgenikus (BI-1) dohányokban jelentősen csökkent a kontroll növényekhez képest (**13. és 14. ábra**). Ezek szerint tobamovírus fertőzésnél a PCD gátlás visszaszorítja a vírustitert. Elképzelhető, hogy ez a jelenség arra vezethető vissza, hogy ilyenkor a PCD-t végső soron okozó reaktív oxigénformák (ROS, pl. szuperoxid, hidrogén-peroxid) termelődése is lecsökken. Egyes vírusfertőzéseknel (pl. potexvírusokkal fertőzött babban) a patogenezis korai szakaszában a sikeres vírusreplikációhoz szükség van a ROS jelenlétére (Clarke et al., 2002). Ezt igazolja a kis antioxidáns kapacitás és nagyobb vírusedényesség közötti kapcsolat egy oxidatív stresszre érzékenyebb (paraquat szenzitív) dohány TMV-inokulált leveleiben is (részletesebben lásd lejjebb, valamint Király et al., 2014).

A BI-1-transzgenikus dohányokat a TMV-vel és ObPV-vel nem rokon dohány nekrozis vírussal (*Tobacco necrosis virus*, TNV) fertőzve viszont elsősorban a léziók mérete csökkent (a léziószám kevésbé), míg a TNV titer kb. kétszeresére nőtt (**13. és 14. ábra**). Ezek szerint TNV fertőzésnél a PCD gátlás emeli a vírustitert, ami arra utal, hogy a TNV replikációjánál elsősorban az alacsonyabb ROS szint, ill. magasabb antioxidáns kapacitás a meghatározó.

Programozott sejthalál gátlás hatása szisztémikus vírusfertőzésre - nagy antioxidáns kapacitású, szuperoxid toleráns dohány vizsgálata

Korábbi kutatások szerint egy szuperoxid (paraquat) toleranciára biotechnológiai úton (*in vitro*) szelektált, nagy antioxidáns kapacitású dohány biotípus fokozottan ellenáll abiotikus és biotikus stressz által okozott programozott sejthalálnak, ill. szöveti nekrozisnak (Barna et al., 1993). Kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a nekrotikus tüneteknek/programozott sejthalálnak ellenálló dohány hogyan reagál egy szisztémikus mozaikos tüneteket okozó vírusfertőzésre? A vizsgálatokhoz paraquat toleráns dohány (*Nicotiana tabacum*, cv. Samsun) biotípust, ill. kontrollként vad típusú, paraquat szenzitív növényeket használtunk.

A TMV felhalmozódást először az inokulált (tünetmentes) levelekben mértük, a TMV köpenyfehérje génjére tervezett indítószekvenciák felhasználásával, szemikvantitatív és valós idejű RT-PCR-rel. A vírus-inokuláció utáni első 24 órában a TMV szint a paraquat szenzitív (PS) dohány inokulált leveleiben kissé (kb. másfélszer) nagyobb volt, mint a paraquat toleráns (PT) növényekben. A szisztémikus mozaikos tüneteket mutató levelekben a TMV felhalmozódást az inokuláció utáni késői időpontokban (20, 30 és 76 nap) mérve viszont azt tapasztaltuk, hogy a TMV szint a PT dohányban többszöröse a PS növényekben mért értéknek (**15. ábra**). A szisztémikus mozaikos tünetek ugyanakkor a PT növényekben jóval enyhébbek voltak, mint a PS dohányban (**16. ábra**). A növényi vírusrezisztenciában és a tünetek kialakulásában is szerepet játszó reaktív oxigénfajták (szuperoxid, hidrogén-peroxid) közül a szisztémikusan fertőzött levelekben a szuperoxid szintje inkább a TMV felhalmozódással, míg a hidrogén-peroxid mennyisége a mozaikos tünetek erősségével korrelált (NBT, ill. DAB szövetfestéssel mérve).

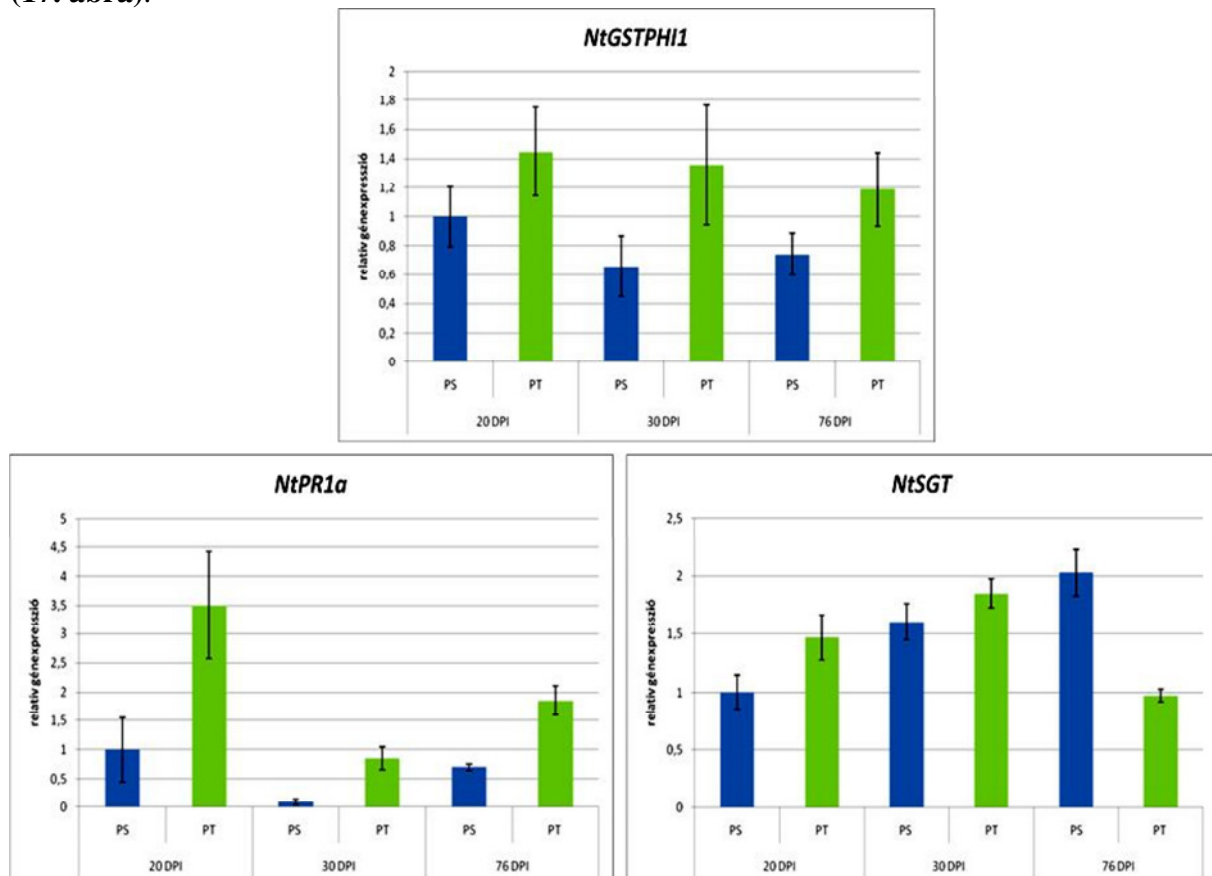


15. ábra. Paraquat (szuperoxid) toleráns (PT) dohány (cv. Samsun) reakciója dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzésére, az inokulált, ill. szisztemikus mozaikot mutató levelekben, a TMV fertőzés utáni korai (első 24 óra), ill. késői (20, 30 és 76 nap) időpontokban, a paraquat szenzitív (PS) vad típusúhoz képest. A TMV felhalmozódását valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mértük, a vírus köpenyfehérje gén (*TMV-CP*) relatív expressziójának detektálásával (normalizálás az *NtAct* génre).



16. ábra. Paraquat (szuperoxid) toleráns (PT) dohány (cv. Samsun) reakciója dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzésére. A szisztemikus mozaikos tünetek intenzitása a TMV fertőzés után 20 nappal, a paraquat szenzitív (PS) vad típusúhoz képest.

A TMV-fertőzött dohányokban három, ún. védekezési gén expresszióját vizsgáltuk valós idejű RT-PCR-rel: egy antioxidánsként is működő stresszgén (Phi glutation-S-transzferáz, *NtGSTPhi*), egy ún. patogenezissel kapcsolatos védekezési markergén (*NtPRI-a*) és egy szalicilsav-metabolizmus gén (szalicilsav glükózil-transzferáz, *NtSGT*). Az expresszió mindegyik védekezési gén esetben jól követte a TMV felhalmozódását, ami a PT növénynek a szisztemikus vírusfertőzés limitálására irányuló, de túl későn jelentkező reakcióját jelezheti (**17. ábra**).



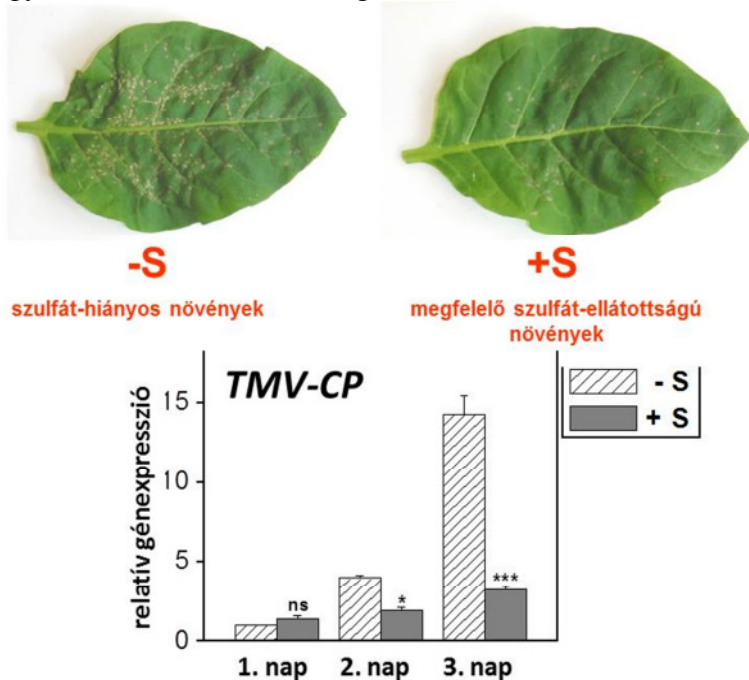
17. ábra. Egy glutation-S-transzferáz (*NtGSTPhi*) gén, egy patogenezissel kapcsolatos gén (*NtPRI-a*) és egy szalicilsav glükózil-transzferáz (*NtSGT*) gén relatív expressziója paraquat (szuperoxid) toleráns (PT) és paraquat szenzitív (PS) dohányban (cv. Samsun), dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzésekor, a szisztemikus mozaikot mutató levelekben, a TMV fertőzés utáni késői (20, 30 és 76 nap) időpontokban. A relatív génextpressziót valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mértük (normalizálás az *NtAct* génre).

Összefoglalva, eredményeink szerint a PT dohányban a nagy antioxidáns kapacitás miatti programozott sejthalál gátlás fokozhatja egy növényi vírus szisztemikus terjedését, ill. felhalmozódását, de mérsékeli a szisztemikus mozaikos tüneteket (lásd Király et al., 2014).

Az optimális szulfát-ellátottság gátolja a programozott sejthalált (lokális nekrozis) és fokozza a vírus rezisztenciát TMV-fertőzött dohányban

Korábbi eredményeink szerint dohány mozaik vírussal (TMV) fertőzött fogékony dohányban az optimális szulfát ellátottság hatására nő az antioxidáns kapacitás (glutacion és cisztein tartalom), ugyanakkor mérséklődnek a szisztemikus mozaikos tünetek és fokozódik a vírus rezisztencia (Höller et al., 2010). A jelen pályázat keretében viszont arra kerestük a választ, hogy az optimális szulfát ellátottság képes-e gátolni a vírusfertőzések által okozott, rezisztenciához köthető programozott sejthalált (lokális nekrotikus - HR - tüneteket) is?

A pályázati időszak első részében kimutattuk, hogy TMV fertőzött, genetikailag rezisztens dohányban (cv. Samsun NN) az optimális szulfát ellátottság hatására szintén nő az antioxidáns kapacitás (glutacion és cisztein tartalom) és jelentősen mérséklődik a HR-típusú, lokális nekrozis (kb. 50 %-al kevesebb nekrotizálódott levélfelület), ugyanakkor tovább fokozható a vírusrezisztencia (valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mérve a TMV titer kb. felére csökken a szulfáthiányos növényekhez képest) (**18. ábra**). Eredményeink szerint (szemikvantitatív- és valós idejű, kvantitatív RT-PCR mérések) számos, patogenezissel (PR), ill. védekezéssel kapcsolatos dohány gén expressziója jelentősen fokozódott a TMV-fertőzött, optimális szulfát ellátottságú növényekben, a szulfáthiányos növényekhez képest; ezt tapasztaltuk három PR-1 gén, egy Tau1 típusú glutation-S-transzferáz (*NtGSTTau1*) valamint egy szalicilsav-kötő kataláz gén (*NtCATSAB*) esetében (lásd Király et al., 2012).



18. ábra. Az optimális szulfát ellátottság (+S) hatása a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) fertőzésre, a szulfáthiányos (-S) növényekhez képest (dohány, cv. Samsun NN). A szulfát ellátottság hatása a TMV által kiváltott lokális nekrozisra (HR a vírusfertőzés 3. napján) (felső ábrarész) és a TMV felhalmozódásra (alsó ábrarész). A TMV felhalmozódását valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mértük, a vírus köpenyfehérje gén (*TMV-CP*) relatív expressziójának detektálásával (normalizálás az *NtAct* génre).

A hidrogén-peroxid előkezelés gátolja a programozott sejthalált (lokális nekrozist) de nem befolyásolja a vírus rezisztenciát TMV-fertőzött dohányban

Korábbi kísérleteink szerint dohánynövények előkezelése alacsony koncentrációjú (5-10 mM) hidrogén-peroxiddal az antioxidáns kapacitás fokozódásával és a lokális (HR) és normoszenzitív nekrotikus tünetek mérséklődésével jár együtt baktériumos (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*), ill. gombás (*Botrytis cinerea*) fertőzéskor, de a kórokozók mennyisége a gazdában lényegében nem változik („immunizálás”). Hasonló eredményeket kaptunk HR-típusú nekrozist okozó vírus (TMV) fertőzésekor is: hidrogén-peroxid előkezelés után a nekrotikus léziók száma és mérete jelentősen csökkent, de a TMV titer (ELISA módszerrel mérve) változatlan maradt. Ezek szerint dohányban a hidrogén-peroxid előkezelés gátolja a TMV által kiváltott programozott sejthalált (lokális nekrozist) de nem befolyásolja a vírusrezisztenciát, ami arra utal, hogy vírusfertőzéskor a programozott sejthalál (PCD) és a rezisztencia bizonyos esetekben egymástól független folyamatok eredménye (lásd pl. Bendahmane et al., 1999; Cole et al., 2001; Király et al., 2008). Kimutattuk, hogy ebben a típusú tüneti rezisztenciában nincs lényeges szerepe a növényi betegségrezisztencia egyik központi faktorának, a szalicilsavnak. TMV fertőzött dohányban a hidrogén-peroxid előkezelés hatására 1/ nem változott a kötött és szabad szalicilsav mennyisége (HPLC-vel mérve), 2/ átmenetileg visszaszorult egy rezisztenciával (növényi védekezéssel) kapcsolatos szalicilsav-metabolizmus gén (szalicilsav-glükoziltranszferáz, *SGT*) expressziója (valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel mérve). A fent említett eredményeket 2012-ben publikáltuk (Hafez et al., 2012).

A kutatási téma további lehetséges irányai, a kutatási eredmények hasznosításának lehetőségei

A pályázat eredményei rámutatnak arra, hogy a növényi programozott sejthalál (PCD) gátlása a BAX inhibitor 1 (BI-1) fehérje túltermelésével nem minden esetben eredményez fokozott rezisztenciát a nekrotrof- és fogékonyságot a biotrof kórokozókkal szemben. Továbbá, ha a vírusfertőzések során kialakuló PCD-t a növényi antioxidáns kapacitás fokozásával gátoljuk, a lokális nekrotikus, ill. szisztemikus mozaikos tünetek visszaszorulása mellett a vírus felhalmozódás nőhet, csökkenhet, vagy nem változik (a víruskórokozó, ill. a növényben indukált biokémiai változások függvényében).

A BI-1 túltermelés (PCD gátlás) hatása a növények ún. nem-gazda rezisztenciájára még további tisztázásra szorul. Ezzel kapcsolatban csak biotrof gombakórokozóknál mutatták ki, hogy a BI-1 túltermelés árpában a nem-gazda rezisztencia sérülésével járhat (Eichmann et al., 2004; Hof et al., 2014). A BI-1 túltermelés miatti növényi PCD gátlás nem-gazda rezisztenciára gyakorolt hatása más kórokozók (baktériumok, vírusok) esetén további kutatások tárgyát képezheti a jövőben.

A programozott sejthalál fokozása növényekben tehát egy „kétélű fegyver”: az ilyen növények felhasználhatók ugyan a rezisztencia-nemesítésben, de a gyakorlati alkalmazás előtt rendkívül fontos az olyan káros „mellékhatások” vizsgálata, mint pl. a biotrof kórokozókkal szembeni fokozott fogékonyság. Mindazonáltal a PCD-gátolt – pl. BI-1 túltermelő – növények a fokozott juvenilitás/antioxidáns kapacitás miatt agronómiai szempontból előnyösek lehetnek olyan esetekben, ahol a friss zöldtömeg maximalizálása a fő cél (pl. takarmánynövényeknél és egyes zöldségféléknél).

Idézett irodalom

Babaeizad, V., Imani, J., Kogel, K.-H., Eichmann, R., Hükelhoven, R. 2009. Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. *Theor. Appl. Gen.* 118, 455-463.

Barna, B., Fodor, J., Harrach, B., Pogány, M., Király, Z. 2012. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 59, 37-43.

Barna, B., Harrach, B., Viczián, O., Fodor, J. 2014. Heat induced susceptibility of barley lines with various types of resistance genes to powdery mildew. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 49, 177-188.

Barna, B., Smigocki, A.C., Baker, J.C. 2008. Transgenic production of cytokinin suppresses bacterially induced hypersensitive response symptoms and increases antioxidative enzyme levels in *Nicotiana* spp. *Phytopathology* 98, 1242-1247.

Bendahmane, A., Kanyuka, K., Baulcombe, D.C. 1999. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11, 781-791.

Clarke, S. F., Guy, L. P., Burritt, J. D., Jameson, E. P. 2001. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiol. Planta.* 114, 157-164.

Cole, A.B., Király, L., Ross, K., 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.

Coll. N.S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., van Breusegem, F., Dangl, J.L., Epple, P. 2010. *Arabidopsis* Type I metacaspases control cell death. *Science* 330, 1393-1397.

Desmukh, S., Hükelhoven, R., Schäfer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., Waller, F., Kogel, K.-H. 2006. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18450-18457.

Eichmann, R., Dechert, C., Kogel, K.-H., Hükelhoven, R. 2006. Transient over-expression of barley BAX Inhibitor-1 weakens oxidative defence and MLA 12-mediated resistance to *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *Mol. Plant Pathol.* 7, 543-552.

Eichmann, R., Schultheiss, H., Kogel, K.-H., Hükelhoven, R. 2004. The barley apoptosis suppressor homologue Bax Inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 484-490.

Gassmann, W. 2005. Natural variation in the *Arabidopsis* response to the avirulence gene *hopPsyA* uncouples the hypersensitive response from disease resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 1054-1060.

Hafez, Y.M., Bacsó, R., Király, Z., Künstler, A., Király, L. 2012. Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of H₂O₂ suppresses necrotic disease symptoms. *Phytopathology* 102, 848-856.

Hof, A., Zechmann, B., Schwammbach, D., Hükelhoven, R., Doehlemann, G. 2014. Alternative cell death mechanisms determine epidermal resistance in incompatible barley-*Ustilago* interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27, 403-414.

Höller, K., Király, L., Künstler, A., Müller, M., Gullner, G., Fattinger, M., Zechmann, B. 2010. Enhanced glutathione metabolism is correlated with sulfur induced resistance in *Tobacco mosaic virus*-infected genetically susceptible *Nicotiana tabacum* plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 1448-1459.

Hückelhoven, R., Dechert, C., Kogel, K.-H. 2003. Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of *mlo*-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 555-5560.

Ibeagha, A.E., Hückelhoven, R., Schäfer, P., Singh, D.P., Kogel, K.-H. 2005. Model wheat genotypes as tools to uncover effective defense mechanisms against the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana*. Phytopathology 95, 528-532.

Isbat, M., Zeba, N., Kim, S.R., Hong, C.B. 2009. A BAX inhibitor 1 gene in *Capsicum annuum* is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco. J. Plant Physiol. 166, 1685-1693.

Kawai-Yamada M., Jin, L., Yoshinaga, K., Hirata, A., Uchimiya, H. 2001. Mammalian Bax-induced cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 (AtBi-1). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 12295-12300.

Király, L., Hafez, Y.M., Fodor, J., Király, Z. 2008. Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotisation in tobacco at high temperature is associated with down-regulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase. J. Gen. Virol. 89, 799-808.

Király, L., Künstler, A., Höller, K., Fattinger, M., Juhász, Cs., M., Müller, M., Gullner, G., Zechmann, B. 2012. Sulfate supply influences compartment specific glutathione metabolism and confers enhanced resistance to *Tobacco mosaic virus* during a hypersensitive response. Plant Physiol. Biochem. 59, 44-54.

Király L., Nádai, T., Künstler, A. 2014. Elevated antioxidant capacity and programmed cell death inhibition in a superoxide tolerant tobacco is associated with enhanced susceptibility to systemic virus infection. XVI. International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Rhodes, Greece. Abstract, CS-20.3.

Kumar, J., Schäfer, P., Hückelhoven, R., Langen, G., Baltruschat, H., Stein, E., Nagarajan, S., Kogel, K.-H. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: Cytological and molecular approaches towards better control. Mol. Plant Pathol. 3, 185-195.

Künstler, A., Füzék, K., Márfi-Bacsó, R., Király L. 2014. Enhanced, heat-induced susceptibility of barley to *Bipolaris sorokiniana* is marked by increased levels of superoxide and hydrogen peroxide and elevated *PR-1b* expression. XVI. International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Rhodes, Greece. Abstract, P009.

Lacomme, C., Santa Cruz, S. 1999. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 7956-7961.

Lambers, H., Colmer, T.D. 2005. Root Physiology: from Gene to Function. Springer.

Molnár, A., Havelda, Z., Dalmay, T., Szutorisz, H., Burgyán, J. 1997. Complete nucleotide sequence of tobacco necrosis virus strain D^H and genes required for RNA replication and virus movement. J. Gen. Virol. 78, 1235-1239.

Perfect, E.S., Green, J.R. 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens, Mol. Plant Pathol. 2, 101-108.

Schäfer, P., Hückelhoven, R., Kogel, K.-H. 2004. The white barley mutant *Albostrians* shows a supersusceptible but symptomless interaction phenotype with the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana*. Mol. Plant-Microbe Interact. 17, 366-373.

Vidhyasekaran, P. 2010. Fungal Pathogenesis in Plants and Crops: Molecular Biology and Host Defense Mechanisms, CRC Press, FL, USA.

Watanabe, N., Lam, E. 2009. Bax inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. Int. J. Mol. Sci. 10, 3149-3167.