

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai Doktori Iskola

A növény-specifikus *PRLIP* (patogenezishez köthető lipáz) gén-család evolúciós és funkcionális jellemzése

PhD értekezés

Szalontai Bálint

Témavezető:

Dr. Jakab Gábor, PhD

Témavezető aláírása

Iskolavezető aláírása

PÉCS, 2012.

Tartalomjegyzék

A disszertációban használt rövidítések jegyzéke.....	2
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. Az indukált rezisztencia jelensége növényekben	6
2.2. A PR proteinek, mint az indukált rezisztencia fontos effektorai.....	9
2.3. Az indukálható növényi védelemi folyamatok.....	11
2.3.1. A szisztémás szerzett rezisztencia (SAR).....	11
2.3.2. A rizobaktérium mediálta indukált szisztémás rezisztencia (ISR)	12
2.3.3. Az abszcizinsav (ABA) szerepe a növényi rezisztenciában.....	14
2.4. A párbeszéd és a szignál transzdukció a növényi rezisztenciában	15
2.5. A béta-aminovajsav indukálta rezisztencia és a priming jelensége.....	17
2.6. Transzgenerációs priming	19
2.7. A lipázok szerepe az indukált rezisztenciában	20
3. Célkitűzések	23
4. Anyag és módszer.....	24
4.1. A Microarray adatbázis keresés.....	24
4.2. A szekvencia vizsgálatok.....	24
4.3. A növénynevelés	25
4.4. A kémiai kezelések.....	25
4.5. A génexpressziós vizsgálatok.....	26
4.6. A klónozás és a szekvenálás	29
5. Eredmények	31
5.1. A PRLIP fehérjék egy különálló csoportot alkotnak az Arabidopsis 3-as típusú lipáz enzimjei között	31
5.2. A <i>PRLIP3</i> , <i>PRLIP9</i> és <i>PRLIP8</i> gének eltérő expressziós válaszai stressz indukció hatására	34
5.3. Az <i>Arabidopsis thaliana</i> és az <i>A. lyrata</i> <i>PRLIP</i> régiójának az összehasonlítása	44
5.4. <i>PRLIP</i> homológok távoli rokon növényfajokban.....	46
5.5. A szőlő <i>PRLIP</i> gének expressziós vizsgálata.....	49
6. Az eredmények megvitatása.....	55
6.1. A <i>PRLIP</i> géncsalád Arabidopsisban	55
6.2. Genom specifikus <i>PRLIP</i> gének indukciója stressz hatására	56
6.3. Az általános <i>PRLIP</i> gének ősi csoportja.....	58
6.4. A <i>PR</i> gének eltérő indukciója.....	59
6.5. A <i>PR</i> gének genomi elhelyezkedése.....	60
6.6. Taxon specifikus paralóg <i>PR</i> gének a növényvilágban	62
7. Összefoglaló	63
8. Summary.....	65
9. Köszönetnyilvánítás	67
10. Hivatkozások	68
11. Saját publikációk jegyzéke	84
12. MELLÉKLETEK	87

A disszertációban használt rövidítések jegyzéke

ABA	(Abscisic Acid): abszcizinsav
AtLTL1	(<i>A. thaliana</i> Li-Tolerant Lipase 1): <i>A. thaliana</i> lítium toleráns lipáz 1
AtMES	(<i>A. thaliana</i> Methyl Salicylate Esterase): <i>A. thaliana</i> metil szalicilát észteráz
Avr	(Avirulence): avirulencia
BABA	(Beta-Amino-Butyric Acid): béta-aminovajsav
BTH	(Benzothiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester): benzotiadiazol-7-karbotionsav S-metilészter
CaGLIP1	(Capsicum GDSL-type Lipase 1): paprika GDSL típusú lipáz 1
CaPR4	(Capsicum Pathogenesis-Related protein 4): paprika patogenezishez köthető protein 4
CEV1	(Constitutive Expression of VSP1): VSP1 fehérjét folyamatosan expresszáló (fenotípus)
CTAB	(Hexadecyl-Trimethyl-Ammonium Bromide): hexadecil-trimetilammónium-bromid
DAMP	(Damage Associated Molecular Pattern): károsodáshoz köthető molekuláris mintázat
DIR1	(Defective in Induced Resistance): indukált rezisztenciában hibás 1 (fenotípus)
EDS1	(Enhanced Disease Susceptibility 1): betegségre fokozottan fogékony 1 (fenotípus)
ERF1	(Ethylene Response Factor 1): etilén-válasz faktor 1
ET	(Ethylene): etilén
ETI	(Effector Triggered Immunity): effektor molekulák által előidézett immunválasz
ETS	(Effector-Triggered Susceptibility): effektor molekulák által kiváltott érzékenység
GDSL/SGNH	(GDSL/SGNH lipases): GDSL/SGNH aminosav motívumot tartalmazó lipáz enzimek
GER1	(GDSL Containing Enzyme Rice 1): GDLS motívumot tartalmazó rizs lipáz 1
GLIP1	(GDSL Lipase-like 1): GDLS lipáz-szerű 1 enzim
GRX480	(Glutaredoxin 480): 480-as számú glutaredoxin
HR	(Hypersensitive Response): hiperszenzitív válaszreakció
IBS1	(Impaired in BABA induced sterility 1): csökkent BABA indukálta sterilitást mutató (fenotípus)
INA	(2,6-Dichloroisonicotinic Acid): 2,6-dikloro-izonikotinsav
ISR	(Induced Systemic Resistance): indukált szisztémás rezisztencia
JA	(Jasmonic Acid): jázmonsav
LPS	(Lipopolysaccharide): lipopoliszacharid
MAMP	(Microbe Associated Molecular Pattern): mikrobához köthető molekuláris mintázat
MAPK	(Mitogen-Activated Protein Kinases): mitogén aktivált protein kináz
MeSA	(Methyl Salicylate): metil szalicilát
MeJA	(Methyl Jasmonate): metil jázmonát
MKP4	(MAPK phosphatase 4): MAPK foszfatáz 4

MYC2	(transcription factor MYC2; a nuclear-localized basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor): MYC2 transzkripció faktor, egy sejtmagi bázikus hélix-loop-hélix-leucin cipzár transzkripció faktor
NahG	(Naphthalene Hydroxylase G): naftalin/szalicilsav hidroxiláz G enzim
NB-LRR	(Nucleotide-Binding site Leucine-Rich Repeat): nukleotid kötőhelyében leucinben gazdag
NIM1	(Noninducible Immunity): immunválaszban nem indukálható 1 (fenotípus)
NPR1	(Non-expressor of pathogenesis related genes-1): patogénekhez köthető fehérjéket nem expresszáló (fenotípus)
ORF	(Open Reading Frame): nyílt leolvasási keret
PAD4	(Phytoalexin-Deficient 4): fitoalexin hiányos mutáns 4
PAL	(Phenylalanine Ammonia-Lyase): fenilalanin ammónia liáz
PAMP	(Pathogen Associated Molecular Pattern): patogénhez köthető molekuláris mintázat
PDF2.1	(Defensin-like low-molecular-weight cysteine-rich protein): defenzin-szerű kis molekulatömegű ciszteinben gazdag fehérje 2.1
PGPF	(Plant Growth Promoting Fungi): növényi növekedést elősegítő gombák
PGPM	(Plant Growth Promoting Microorganism): növényi növekedést segítő mikroorganizmus
PGPR	(Plant Growth Promoting Rhizobacteria): növényi növekedést elősegítő talajbaktériumok
PR	(Pathogenesis Related): patogenezishez köthető
PRLIP	(Pathogenesis Related Lipase): patogenezishez köthető lipáz
PRR	(Pattern Recognition Receptor): mintázat felismerő receptor
PTI	(PAMP Triggered Immunity): PAMP molekulák által előidézett immunválasz
PVPP	(Polyvinyl Polypyrrolidone): polivinil polipirrolidon
SA	(Salicylic Acid): szalicilsav
SABP2	(Salicylic Acid Binding Protein 2): szalicilsav kötő fehérje 2
SAG101	(Senescence-Associated Gene 101): 101-es számú szenescenciához köthető gén
SAI1	(Salicylic Acid-Insensitive 1): szalicilsav kezelésre érzéketlen 1 (fenotípus)
SAR	(Systemic Acquired Resistance): szisztémás szerzett rezisztencia
TTSS	(Type III Secretion System): 3-as típusú szekréciós rendszer
WRKY70	(putative WRKY transcription factor 70): 70-es számú lehetséges WRKY transzkripció faktor

1. Bevezetés

A növények fotoszintézisre képes szervezetek, amelyek a tápláléklánc alapját képezik a földi ökoszisztémában. Az általuk előállított szerves anyag szolgál tápanyagul a heterotróf szervezetek számára, így jelenlétiük a diverz, a magasabb rendű élet kialakulásához nélkülözhetetlen. A növények nem rendelkeznek a magasabb rendű állatokéhoz hasonló adaptív innumrendszerrel, aktív mozgással vagy hőszabályozással, mégis hatékonyan képesek védekezni az őket érő kedvezőtlen környezeti tényezők ellen. Ezeknek a tényezőknek egy része az abiotikus környezet felől éri őket, ilyen stresszorok a magas vagy alacsony hőmérséklet, a kiszáradás, vagy az ultraibolya sugárzás. A másik kihívás az ökológiai értelemben vett környezet biotikus faktorai felől érkezik, amelyek megpróbálják saját céljukra hasznosítani a növények által megtermelt primer szerves produktumot. Élőlények egész sorát tartja el a növényvilág a legegyszerűbbektől (baktériumok, vírusok, mikrogombák) egészen a fejlett, magasabb rendű élőlényekig (növényevő emlősök, rovarok, parazita növények). A növényeknek tehát sokféle természetes védekező képességgel kell rendelkezni, hogy túléljenek ennyiféle környezeti kihívást. Ezen folyamatok, molekuláris mechanizmusok genetikai, epigenetikai, transzkriptomikai, metabolomikai és evolúciós vizsgálata a modern növényi stresszélettan központi területe.

Az emberiség történelme során akaratlanul is kiszolgáltatottá vált a növényvilággal szemben, a növénytermesztés és a jórészt erre épülő állattenyésztés által. A kultúrnövényeket ért patogén/herbivóra támadásoknak akár olyan nagymértékű hatása is lehet, mintha magát az emberi populációt közvetlenül érte volna katasztrófa. Mindezt jól szemlélteti az írországi burgonyavész járvány, amely az 1840-es évek közepétől több mint egymillió ember éhhalálát okozta. A modern mezőgazdaságot is folyamatos kihívás elé állítja a károsító állatok, illetve patogén mikrobák, modern, kémiai védekezéssel szemben fokozatosan kialakult ellenállóképessége, rezisztenciája. Mindezek alapján belátható, hogy a növények természetes védekezőképességének hatékonyabb kiaknázása, vagy akár módosítása nagy előrelépést jelenthet ebben a folyamatos versenyfutásban.

A növényi szervezetekben nem alakult ki speciális sejtek csoportja, amelyek kifejezetten a védelmi reakciókat szolgálná (hasonlóan pl. az állati fehérvérsejtekhez), hanem az egyes sejtek főleg önállóan védekeznek a károsodással szemben. Noha a növények sokfélesége rendkívüli, mégis akadnak a védelemnek olyan komponensei amelyek a legtöbb fajban közösek, így megfelelő modellszervezetek segítségével lehetőség van azok mélyreható vizsgálatára. Általánosságban elmondható, hogy a növényi védekező

rendszerekről – szemben pl. az állati immunrendszerrel – még manapság is relative keveset tudunk, annak pontos működését még messze nem értettük meg. Az már bizonyosnak látszik, hogy egy bonyolult hálózatról van szó, amelynek komponenseit sokszor nehéz egy modellbe integrálni.

Az általunk vizsgált *PRLIP* (patogenezishez köthető lipáz) gének családja is ennek a védelmi hálózatnak egy potenciálisan fontos része (Jakab és mtsai., 2003). Nem tudjuk még, hogy a *PRLIP* gének és a róluk képződő fehérjék milyen módon járulnak hozzá a növényi rezisztencia folyamatokhoz, de eddigi vizsgálataink alapján valószínű, hogy a gének lipáz vagy lipáz-szerű enzimeket kódolnak, ennek megfelelően a lipid anyagcserében vesznek részt, és növényi immunválasz egy újabb komponensét alkotják.

Napjaink egyik legelterjedtebb modellnövénye a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*), amelyet számos tulajdonsága ideálissá tesz a növénybiológia számára. Az utóbbi időkben kérdésessé vált azonban, hogy a növényi rezisztencia mechanizmusokkal kapcsolatos megállapítások mennyire terjeszthetők ki más, távoli evolúciós rokonságban lévő növényfajokra (Thaler és mtsai., 2012). Fontos tehát megvizsgálni a kutatott jelenségeket más modellnövényekben is. Jelen munkánkban a *PRLIP* gének működését az *Arabidopsis* mellett egy másik modell rendszerben, a szőlő (*Vitis vinifera*) növényben is vizsgáljuk, amely növényfaj gazdasági jelentősége miatt is figyelmet érdemel. Eredményeink a növényi immunválasz pontosabb megismerésében nyújtanak segítséget, valamint a géncsalád molekuláris evolúciójáról is információt szolgáltatnak.

2. Irodalmi áttekintés

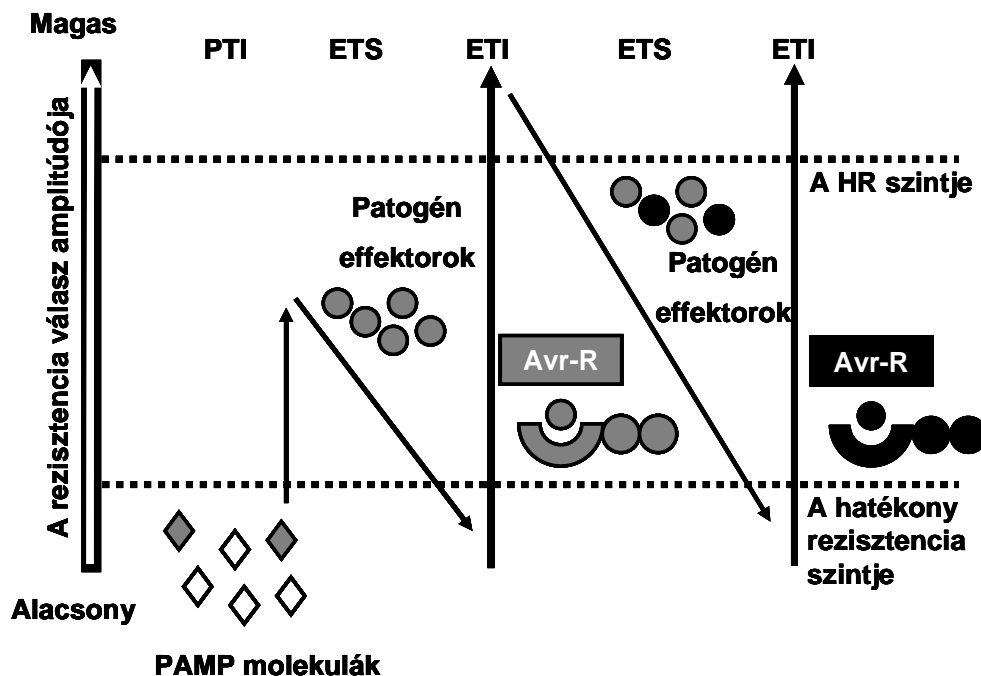
2.1. Az indukált rezisztencia jelensége növényekben

A növények sokféle mechanizmust fejlesztettek ki evolúciójuk során, amelyek révén képesek alkalmazkodni a számukra kedvezőtlen abiotikus és biotikus környezeti hatásokhoz, mint a szárazság, hőség, UV sugárzás, sérülések, és különböző kórokozó támadások. Ezek egy része passzív védelmi eszköz, amely permanensen jelen van a növényen/növényben (viaszos kutikula, tövisek, méreganyagok, trichómák stb.). Ezek mellett kialakultak dinamikusán működő, szabályozható védelmi rendszerek, amelyeket indukált rezisztenciának nevezünk. Ezek a rendszerek kontrollálnak olyan védelmi mechanizmusokat, mint a hiperszenzitív reakció, a sejthalál (Dangl és mtsai., 1996), az oxidációs stressz (Low és Merida 1996), a kallóz és lignin felhalmozás (Vance és mtsai., 1980; Kauss 1987), fitoalexinek termelése (Dixon 1986), valamint számos enzim fehérje termelése (Bol és mtsai., 1990; Bowles 1990; Linthorst 1991; Dangl és mtsai., 1996; Hammond-Kosack és Jones 1996). Az indukált rezisztencia egy – fiziológiai értelemben vett – megnövekedett védelmi kapacitás (Van Loon és mtsai., 1998). A szalicilsav (SA) indukálta Szisztémás Szerzett Rezisztencia (SAR - Systemic Acquired Resistance), a jázmonsav (JA), illetve az etilén (ET) jelátviteli utakhoz kötődő Rhizobaktérium Mediálta Indukált Szisztémás Rezisztencia (ISR - Induced Systemic Resistance), valamint a főleg abiotikus stressztényezők ellen hatékony, abszcizinsav által mediált szignálút az indukált rezisztencia mechanizmusok legismertebb formái növényekben.

A manapság leginkább elfogadott modell a növény-patogén kölcsönhatások bemutatására a Jones és Dangl (2006) által bevezetett ún. cikk-cakk modell (1. ábra). Ennek lényege, hogy a növények két szinten képesek felismerni a támadó kórokozókat és aktívan védekezni ellenük. Az első szinten a növények különböző, a kórokozókra jellemző, általában konzervált szerkezetű mikroba felszíni elcicatorokat (PAMP - Pathogen Associated Molecular Pattern) - képesek azonosítani, ami aktiválja az ún. PAMP által kiváltott immunválaszt (PTI - PAMP Triggered Immunity). A felismerésben főleg extracelluláris transzmembrán receptorok vesznek részt, ezek az ún. mintázat felismerő receptorok (PRR - Pattern Recognition Receptors). A növényi védelem érdekében MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) kaszkád aktiváció történik és a patogén invázió gyakorlatilag növényi sejtpusztulás nélkül kerül megfékezésre helyi válaszreakciókkal

(H₂O₂ felszabadulás, papilla képződés). A folyamat alapvetően nem specifikus felismerési reakción, hanem az evolúció során korán kialakult, és a konzervált szerkezetű molekulák azonosításán alapul. A kórokozók azonban szoros koevolúcióban fejlődnek gazdanövényeikkel, így képessé váltak elnyomni ezt a védelmi vonalat ún. effektor molekulákkal. Ilyen szupresszor fehérjék képesek pl. a MAPK jelátvitelt blokkolni, amelynek eredményeképpen a PTI válasz nem alakul ki. A kórokozó baktériumok, az ún. 3-as típusú szekréción rendszer (TTSS - Type III Secretion Systems) segítségével juttatják effektor molekuláikat a megtámadott növényi sejtekbe. Mivel a növények képtelenek időben felismerni a kórokozók jelenlétét, azok képesek behatolni a megtámadott növényi sejtekbe. Ez a folyamat az ún. effektor kiváltotta érzékenység (ETS - Effector-Triggered Susceptibility). Amennyiben a PTI választ sikeresen elkerüli a kórokozó, még mindig át kell jutnia a gazdanövény második védelmi vonalán ez az ún. effektor molekulák által kiváltott immunválasz (ETI – Effector Triggered Immunity). Ez a mechanizmus több aspektusában is jelentősen különbözik a PTI választól. A növényi sejtbe az élő patogén mikrobák által bejuttatott molekulákat egy intracelluláris receptor rendszer ismeri fel, amelynek tagjai általában olyan fehérje doméneket tartalmaznak amelyekben leucinben gazdag ismétlődő szekvenciák (NB-LRR - Nucleotide-Binding site Leucine-Rich Repeat) vannak. Ezek teljesen specifikus felismerési reakciók, szemben a PTI-vel. Bakteriális avirulencia gének termékeit (Avr) például hatékonyan képesek felismerni a növényi rezisztencia gének (R-gének), így ezt a folyamatot gén a gén ellen (gene for gene) rezisztencia névvel is illetik. Ez a védelmi mechanizmus már látható tünetekkel jár, amelyeket a hiperszenzitív válaszreakció (HR – Hypersensitive Response) okoz. Ennek során toxikus szabadgyökök és a reaktív oxigén származékok szaporodnak fel, amelyek egyúttal a megtámadott növényi sejt pusztulását is okozzák. Mindez sejtnekrózis formájában jelentkezik és az érintett sejtek számától függően, akár makroszkópos tüneteket is okozhat. Az ETI folyamata a növényi válaszreakciókban azért is kritikus, mert ezen a szinten dől el, hogy mely rezisztencia útvonalak a leghatékonyabbak az adott kórokozó ellen, és mely útvonalakat érdemes gátlás alá vonni (SA útvonal, vagy JA/ET útvonal, ld. később). Az ETI specifikus mivoltát a mikrobiális kórokozók képesek javukra fordítani. Amennyiben a növény által felismert mikrobiális fehérje mutáción esik át, a növény R-génje (ill. génterméke) már nem képes azonosítani azt, a növény védelmi rendszere nem aktiválódik, lehetőség nyílik a megtámadott szövetek kolonizációjára, és ismét megvalósul az ETS. A növény tehát szenzitív lesz az adott mikrobatámadással szemben, ekkor beszélünk a gazdanövény és patogén közötti kompatibilis kölcsönhatásról. A növényfajok

többségét azonban mégsem tudja megtámadni bármilyen patogén mikroba. Ennek az ún. „nem gazda” rezisztenciának (non host resistance) két alapvető mechanizmusa van. Egyrészt a mikrobiális effektorok nem univerzálisak, tehát nem hatékonyak minden növényi szervezetben így nem képesek ETS-t kialakítani. A másik mechanizmus a növényi R-gének nagy számán és folyamatos evolveálódásán alapul. Egy újonnan megjelent (mutálódott) R-gén képes lehet felismerni egy addig kompatibilis mikroba valamely jellemző molekuláját, így képes kialakítani egy vele szemben ellenálló növényvonalat, amely aztán szelektív előnyt élvez újonnan kialakult kórokozó rezisztenciája miatt. A növény tehát koadaptálódik a biotikus stresszorhoz, így a kapcsolat inkompatibilissá válik.



1. ábra A növényi immunválasz ún. cikk-cakk modellje Jones és Dangl (2006) alapján. PTI: effektor molekulák által előidézett immunválasz; ETS: effektor molekulák által kiváltott érzékenység; ETI: effektor molekulák által előidézett immunválasz; HR: hiperszenzitív válasz; PAMP: patogénhez köthető molekuláris mintázat; Avr: patogén eredetű avirulencia molekula; R: növényi rezisztencia gén.

Ugyan egy későbbi összefoglaló munka (Boller és Felix, 2009) a mikrobiális mintázatokat MAMP (Microbe Associated Molecular Pattern), a növényi sejtekből a penetráció után felszabaduló belső elicitorokat DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) néven említi, de a modell logikája ebben a munkában is hasonló az előbbiekhöz.

Megfigyelhető egy igen érdekes és fontos különbség is a növényi rezisztencia és az állati immunválasz között. Az ugyanis, hogy egy adott növény „rezisztens” vagy „szenzitív” fenotípust mutat egy adott kórokozóval szemben, az sokkal inkább a

rezisztencia válaszok mennyiségi, valamint időbeli jellemzőitől függ. A jelenséget jól példázza Tao és munkatársainak (2003) reprezentatív munkája, amelyben arról számoltak be, hogy az *Arabidopsis-Pseudomonas* kölcsönhatás kompatibilis vagy inkompatibilis volta nem a rezisztencia válaszok kvalitatív, sokkal inkább azok kvantitatív jellegétől függ.

2.2. A PR proteinek, mint az indukált rezisztencia fontos effektorai

Az indukált rezisztencia növényekben gyakran együtt jár az ún. patogenezishez köthető fehérjék (PR – Pathogenesis Related) felhalmozódásával (Van Loon és mtsai., 1999), amelyeknek fontos szerep jut a növényi rezisztencia válaszok kiváltásában. A PR fehérjéket ennek megfelelően eredetileg úgy definiálták, mint különböző kórokozó támadások (vagy a támadásokhoz köthető egyéb stressz folyamatok) hatására a gazdanövény szervezetében akkumulálódó proteinek. Az első képviselőiket dohány mozaik vírussal fertőzött dohány növények leveléből izolálták (Van Loon és Van Kammen 1970), majd szekvencia hasonlóságuk alapján a később azonosított képviselőikkel együtt először öt családba (PR1 – PR5) sorolták (Van Loon és Van Strien, 1999). A későbbi vizsgálatok során további PR fehérjéket azonosítottak, amely további családok bevezetését tette szükségessé, így azok száma a legutóbbi összefoglaló tanulmány szerint tizenhét (Van Loon és mtsai., 2006; 1. Táblázat). Minden csoportban többféle növényből izolált fehérje található. A legtöbb PR fehérjének létezik savas és bázikus formája is (Samac és mtsai., 1990; Brederode és mtsai., 1991). A savas karakterű PR fehérjék általában extracellulárisan fejtik ki hatásukat és termelődésük SA hatására indukálódik (Malamy és mtsai., 1990; Métraux és mtsai. 1990), míg a bázikus karakterű PR fehérjék ET (Brederode és mtsai., 1991; Eyal és mtsai., 1993) és/vagy JA szignál hatására (Penninckx és mtsai., 1996; Reymond és Farmer, 1998) termelődnek. Az általunk vizsgált patogenezishez köthető lipáz (PRLIP – Pathogenesis Related Lipase) család tagjai is valószínűleg ilyen PR fehérjék, de egyelőre kevés információ áll rendelkezésre ahhoz, hogy egy új PR családként definiáljuk azokat.

1. Táblázat A legfontosabb PR családok és bizonyított, vagy feltételezhető védelmi szerepük Van Loon és mtsai., (2006) munkája alapján.

Család neve	Legfontosabb biokémiai és biológiai tulajdonságok
PR-1	egyelőre ismeretlen funkció; a szisztémás szerzett rezisztencia fontos markere modellnövényekben
PR-2	béta-1,3 glükánázok; kórokozó gombák elleni védelem
PR-3	I, II, IV, V, VI és VII-es típusú kitinázok; antifungális hatás a kitin tartalmú gomba sejtfalak károsítása révén. Rovar, illetve <i>Nematoda</i> károsítás esetén is hatékonyak
PR-4	I és II-es típusú kitinázok; antifungális hatás a kitin tartalmú gomba sejtfalak károsítása révén. Rovar, illetve <i>Nematoda</i> károsítás esetén is hatékonyak lehetnek
PR-5	thaumatin szerű fehérjék; oomikóta gombák elleni védelem
PR-6	proteináz inhibitorok; <i>Nematoda</i> férgek és rovarok ellen védenek, gátolják az állatok emésztő enzimeit
PR-7	endoproteinázok; a mikrobák sejtfalának károsításában lehet szerepük
PR-8	III-as típusú kitinázok; antifungális hatás a kitin tartalmú gomba sejtfalak károsítása révén. Rovar, illetve <i>Nematoda</i> károsítás esetén is hatékonyak lehetnek, valamint lizozim hatásuk is van, ami baktérium-fertőzések elleni védelemben lehet hatékony
PR-9	peroxidázok; a lignifikáció katalizálása révén megerősíti a megtámadott növényi sejtek sejtfalát
PR-10	ribonukleáz-szerű fehérjék; valószínűleg a vírusfertőzésekkel szembeni védelemben van szerepük
PR-11	I-es típusú kitinázok; antifungális hatás a kitin tartalmú gomba sejtfalak károsítása révén. Rovar, illetve <i>Nematoda</i> károsítás esetén is hatékonyak lehetnek
PR-12	defenzinek; széles spektrumú antifungális és antibakteriális hatás
PR-13	thioninok; széles spektrumú antifungális és antibakteriális hatás
PR-14	lipid transzfer proteinek; néhány esetben észlelt antibakteriális és antifungális hatás
PR-15	oxalát oxidázok; hidrogén-peroxid termelést katalizálják, amely hatékonyan károsítja a mikrobiális kórokozókat
PR-16	oxalát oxidáz-szerű fehérjék; hidrogén peroxid termelést katalizálják, amely hatékonyan károsítja a mikrobiális kórokozókat
PR-17	egyelőre ismeretlen funkció; cink metalloproteinázokhoz hasonló szerkezet

2.3. Az indukálható növényi védelemi folyamatok

2.3.1. A szisztémás szerzett rezisztencia (SAR)

A növényi stressz tolerancia jelensége régóta ismert, amelyet mi sem bizonyít jobban, mint Chester „*The problem with acquired physiological immunity in plants*” címmel 1933-ban megjelent tanulmánya. Az ezt követő évtizedekben többen is leírták a teljes növényre kiterjedő később szisztémás szerzett rezisztenciának (SAR) elnevezett folyamatot. Ross (1961) megállapította, hogy a dohány mozaik vírus fertőzés ellenállóvá teszi a fertőzés helyétől távolabbi leveleket az újabb fertőzéssel szemben. Ugyanezt a jelenséget figyelte meg Cruickshank és Mandryk (1960) dohány és *Peronospora tabanica* esetében. A múlt század 80-as éveiben aztán több modellnövényen is vizsgálták a SAR jelenségét (uborka, bab, rizs, és lúdfű). Az eredményeket Sticher és mtsai., összegezték (1997).

A SAR biotikus faktorok mellett abiotikusan, kémiai ágensekkel is kiváltható. A mesterségesen kiváltott SAR ún. növényi aktivátorai között jól ismert a benzotiadiazol-karbotionsav metilészter (BTH), amelynek szerkezete és hatásmechanizmusa nagy hasonlóságot mutat a szalicilsavval (SA). A BTH mellett a két legtöbbit kutatott növényi aktivátor az izonikotinsav (INA – 2,6-dikloro-izonikotinsav) és az aminovajsav egyik izomerje (BABA – DL-3-aminovajsav; Ryals és mtsai., 1996; Sticher és mtsai., 1997; Jakab és mtsai., 2001). A SAR során növénytől és a kezeléstől/kórokozótól függően megindul a jellegzetes PR proteinek szintézise és az ehhez kapcsolt génexpressziós változások (Ward és mtsai., 1991; Cameron és mtsai., 1999). Jellemző SAR aktiválható PR proteinek a PR-1 (Sandoz 1991), a kitináz aktivitású PR-3 (Schlumbaum és mtsai., 1986), a béta glükánáz PR-2, a PR-4 (Ponstein és mtsai., 1994) és az ozmotin (PR-5) (Woloshuk és mtsai., 1991). A SA mindenesetre nélkülözhetetlen a folyamat iniciálásához. Azok a növények, amelyek kórokozók jelenlétében képtelenek a SA akkumulációra, nem mutatnak SAR reakciót (Gaffney és mtsai., 1993; Lawton és mtsai., 1993; Vernooij és mtsai., 1994). Bizonyos esetekben azonban (pl.: a felhalmozott endogén szalicilsavat folyamatosan lebontó *NahG* transzgenikus növények esetében) SA analóg kémiai kezelés kiválthatja a SAR-t (Friedrich és mtsai., 1996; Lawton és mtsai., 1996). Szükséges továbbá egy reguláló fehérje (NPR1 - Non-expressor of Pathogenesis Related genes; Cao és mtsai., 1994) jelenléte, amely nélkül ugyancsak képtelenek a növények a SAR válasza (Shah és mtsai., 1997; Spoel és mtsai., 2003; Koornneef és Pieterse 2008). Ugyan ezt a fehérjét NIM1

(Noninducible Immunity; Delaney és mtsai., 1995), illetve SAI1 (Salicylic Acid-Insensitive; Shah és mtsai., 1997) néven is leírták. Fontos kérdés volt, hogy a lokális fertőzés helyétől hogyan terjed az információ a növény egészséges részeibe, azaz milyen jelátviteli utak révén valósul meg a SAR. Dohány növényekben azonosították a SABP2 (Salicylic Acid Binding Protein) fehérjét, amelynek kiemelt szerepe van a SAR kialakításában (Kumar és Klessig 2003). Azóta kiderült, hogy a fehérje nem SA receptorként funkcionál, hanem észteráz aktivitásával a biológiailag inaktív MeSA-t alakítja aktív SA-vá. A lokális fertőzés helyén a SABP2 erősen gátolt a SA által, ami MeSA felhalmozódást okoz a SA-metiltransferáz által. Ez a vegyület a floém rendszeren át transzportálódik majd SABP2 jelenlétében aktív SA-á alakul (Kumar és Klessig 2008). Megállapították, hogy a rendszer Arabidopsisban is hasonló elven működik, ott a SABP2 funkcionális homológjai az AtMES észterázok közül kerülnek ki (Vlot és mtsai., 2008). A jelenlegi modell szerint a MeSA és a DIR1 lipid transfer protein lipid származékokkal alkotott komplexe együttesen alakítja ki a SAR mobil szignálját (Liu és mtsai., 2011), a választ pedig a növényeket ért megvilágítás alapvetően befolyásolja. A SAR szignalizációt azonban egy másik szinten is lehet értelmezni: a legújabb eredmények szerint a kórokozók által megtámadott növények képesek eleve felfokozott SAR választ mutató utódokat létrehozni, ez a „transz-generációs SAR”. A jelenség az utódokban nem jár együtt megváltozott stressz hormon szintekkel, az információ a megváltozott DNS metiláción keresztül epigenetikusan öröklődik és gyorsabb, hatékonyabb SAR válasszal ruházza fel a következő generáció növényeit (Luna és mtsai., 2012).

2.3.2. A rizobaktérium mediálta indukált szisztémás rezisztencia (ISR)

Az élővilágban számos példa figyelhető meg különböző fajok közötti kölcsönösen előnyös, mutualisztikus kapcsolatokra. Magasabb rendű növények és bizonyos talajmikroorganizmusok között is kialakulhat ilyen kapcsolat, amely egy sajátos védelmi mechanizmust kínál az adott növény számára.

Ennek a védelemnek a forrásai a rizoszférában élő, nem patogén, növekedést elősegítő baktériumok (PGPR - Plant Growth Promoting Rhizobacteria), amelyek képesek a föld feletti növényi részekben rezisztencia folyamatokat indukálni (Van Loon és mtsai., 1998). A védelmi mechanizmust más mikrobák, így a gyökérszónában élő számos gombafa is képes aktiválni, amely szervezeteket összefoglalóan növényi növekedést elősegítő gombák (PGPF - Plant Growth Promoting Fungi) névvel illetik. Az egyik első, szegfű

növényeken végrehajtott kísérletek bizonyították, hogy a PGPR mikroóakkal inokulált növényekben megnőtt a fitoalexinek termelése *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* fertőzés esetén, így a növények ellenállóbbá váltak a kórokozóval szemben (Van Peer és mtsai., 1991). Hasonló eredményekről számoltak be Benhamou és mtsai. (1996) bab növényeken végzett *Bacillus pumilus* SE34 és T4 törzsek kezeléseit követően, amelynek köszönhetően a beoltott növények ellenállóbbá váltak a *F. oxysporum* f. sp. *pisi* fertőzéssel szemben. A növényi indukált rezisztencia ezt a sajátos formáját végül Rhizobaktérium Mediálta Indukált Szisztémás Rezisztencia (ISR - Induced Systemic Resistance) néven írták le (Van Loon 1998). Az *Arabidopsis*-on végzett kísérletek már egyértelműen megmutatták, hogy az ISR molekuláris háttere, hatásspektruma, iniciátor vegyületei stb. egyértelműen elkülönítik azt a SAR-tól (Knoester és mtsai., 1999; Pieterse és mtsai., 1996, 1998; Ton és mtsai., 1999, 2001; Van Wees és mtsai., 1997). Fontos különbség, hogy míg a SAR széles körben elterjedt a növényvilágban, addig az ISR esetében specifitás fedezhető fel a folyamatot előidézni képes PGPR törzsek és bizonyos növényfajok, illetve genotípusok között (Van Wees és mtsai., 1997; Yan és mtsai., 2002). Kritikus lépés a mikrobiális szignál felismerése. Ennek során a növények mikróóákhoz köthető molekuláris mintázatokat (MAMP - Microbe Associated Molecular Pattern) azonosítanak (Schwessinger és Zipfel 2008).

Sok tanulmány alátámasztotta, hogy az ISR is sokféle stressztényező ellen biztosít védelmet a növényeknek, így mikrobiális kórokozók (Van Loon és mtsai., 1998; Pozo és Azcon-Aguilar 2007), növényevő rovarok (Van Oosten és mtsai., 2008), de akár abiotikus stressztényezőkkel (Yang és mtsai., 2009) szemben is hatékony.

Az SAR-ral ellentétben ezt folyamatot nem kíséri SA felhalmozódás és a SAR-hoz kötődő PR fehérjék expressziójának növekedése (Pieterse és mtsai., 1996). Szükség van viszont a JA és ET által regulált molekuláris útvonalakra (Knoester és mtsai., 1999; Pieterse és mtsai., 1998). Pieterse és mtsai. (1996) bizonyították, hogy a *Pseudomonas fluorescens* egyik biokontrol törzse (WCS417r) által indukált ISR kialakulásához mind az ET, mind a JA hormonok intakt szignálútja szükséges, a szignálutakban mutáns növényekben a jelenség nem váltható ki. Elmondható, hogy az ISR aktiválódása általában nem jár sem az ET, sem a JA szintjének számottevő emelkedésével, így a folyamat inkább nagyobb érzékenységet, semmint fokozott stresszhormon termelést okoz (Pieterse és mtsai., 2000). Ryu és mtsai. (2004) felfedezték, hogy a *Bacillus subtilis* GB03-as törzse 4 szénatomos illékony vegyületekkel idézik elő az ISR-t. Ez a mechanizmus független a SA és a JA által kiváltott molekuláris jelátviteli utaktól és az NPR1 fehérjétől is, viszont

szükséges hozzá az intakt ET szignál útvonal. A képet tovább bonyolítja, hogy bizonyos növény-mikroba kölcsönhatásokban az ISR megnyilvánulásához SA-ra is szükség van. A PGPR hatású *P. aeruginosa* prekondicionálás csak a vad típusú dohány növényekben volt képes ISR-t indukálni, a SA-t felhalmozni képtelen *NahG* transzgénikus vonalakban nem (De Meyer és mtsai., 1999).

A folyamat tehát meglehetősen komplex és jelenleg távol állunk a részletes ismeretétől. Kimutatták, hogy a baktérium jelenlétében a gyökerekben majdnem 100 gén expressziós szintje változik meg (Léon-Kloosterziel és mtsai., 2005; Verhagen és mtsai., 2004), a levelekben viszont nincs számottevő hatása a génexpresszióra az ISR-nak (Verhagen és mtsai., 2004), mégis hatékony védelmi mechanizmusként funkcionál a növényi stressz válaszokban.

2.3.3. Az abszcizinsav (ABA) szerepe a növényi rezisztenciában

Az abszcizinsav egy fontos növényi hormon, amelynek számos fejlődés és stresszélettani hatása ismert. Nevét az abszcisszió folyamatáról kapta, amelynek során a lehulló levelek elválnak a maradó növényi szövetektől, illetve a mag- és rügnyugalom fenntartásában is elsődleges szerepe van, innen a korábbi magyar neve: dormin. Míg az ABA abiotikus tényezők által kiváltott stresszhelyzetekben betöltött szerepe viszonylag régóta jól ismert (Tuteja 2007; Xiong és mtsai., 2002; Zhu 2002), addig a kórokozók elleni növényi védelemben játszott szerepére, illetve az általa szabályozott jelátviteli folyamatok sok tekintetben máig tisztázatlanok (Flors és mtsai., 2005; Mauch-Mani és Mauch 2005). Több jelenség igazolja, hogy az abiotikus stressz tényezők módosíthatják a növények biotikus stresszorokkal szembeni válaszreakcióját. Egyfelől növelhetik a megtámadott növény mikrobiális kórokozókkal szemben mutatott érzékenységét (Koga és mtsai., 2004; Mohr és Cahill 2003), vagy éppen ellenkezőleg, a rezisztencia emelését is előidézhetik, mint ahogy a fertőzés előtti szárazság képes növelni a paradicsom *Botrytis* fertőzéssel szemben mutatott ellenállóságát (Achuo és mtsai., 2006). Számos vizsgálat igazolta, hogy az ABA egyaránt gátolja mind a SA, mint pedig a JA szignálutakat. (Anderson és mtsai., 2004; Mauch-Mani és Mauch 2005; Yasuda és mtsai., 2008). Megfigyelhető egyúttal, hogy patogén fertőzés hatására módosulhat a növények ABA felhalmozódása. Arabidopsis növényekben mind a *P. syringae*, mind pedig a *Leptosphaeria maculans* fertőzés megemeli az ABA szinteket (de Torres-Zabala és mtsai., 2007; Kaliff és mtsai., 2007). Bizonyos növény-patogén interakciókban az ABA kiemelt rezisztencia faktor, elősegíti ugyanis a

kallóztartalmú papillaképződést, illetve a sztómazáródást (Flors és mtsai., 2008; Lee és Luan 2012), míg más esetekben érzékenyítő hatást fejt ki, amelyet jól példáz a *P. syringae* baktérium fertőzés hatására történő kallóz felhazmozódás ABA általi repressziója (de Torres-Zabala és mtsai., 2007). A folyamat olyannyira kifinomult, hogy bizonyos kórokozók az ABA szignálút egyoldalú módosításával próbálják elnyomni az ellenük irányuló növényi védelmi válaszokat. A *P. syringae* baktérium koronatin nevű vegyülettel akadályozza a sztómák ABA indukálta záródását (Melotto és mtsai., 2006). Egy másik kórokozó az *A. brassicicola* is az ABA szignálút elnyomásával segíti elő a megtámadott növény kolonizációját (Flors és mtsai., 2008). Egy újabb modell szerint az ABA a korai patogén elleni védelemben fejt ki hatását, amikor is a sztómák zárásával az ABA fizikailag gátolja a kórokozó bejutását és így megelőzi a biológiailag sokkal költségesebb SA, illetve ET/JA szignál utak aktiválását. Ha a kórokozó mégis bejut a növénybe az említett védekező rendszerek lépnek működésbe és megkísérlik megállítani a patogén inváziót (Ton és mtsai., 2009). Noha a folyamat teljes egészében nem ismert, az világossá vált, hogy az ABA nem egyszerű negatív regulátor, hanem sokkal inkább a rezisztencia szignálok egyik induktorának tekinthető, amely patogén rendszertől függően szinergisztikus és antagonisztikus hatást is kifejt egy adott szignálútra.

2.4. A párbeszéd és a szignál transzdukció a növényi rezisztenciában

Bár a SA és a JA más-más szignálutat aktiválnak a rezisztencia válasz során, ma már tudjuk, hogy ezek a jelátviteli utak nem teljesen függetlenek egymástól, sokkal inkább egy komplex szignálhálózatot alkotnak, amelyek befolyásolják és szabályozzák a különböző válaszok nagyságát (Kunkel és Brooks 2002). Míg a SA szignál út kiemelt jelentőségű a biotróf, illetve hemibiotróf kórokozók elleni indukált növényi védelemben (Grant és Lamb 2006), addig az ET/JA jelátviteli út a nekrotrof kórokozók és a növénykárosító rovarok elleni rezisztencia folyamatokat közvetíti (Beckers és Spoel 2006). A JA antagonista hatása a SA-függő válaszokra jól ismert (Creelman és Mullet 1997), ugyanakkor számos kísérlet kimutatta a SA gátló hatását a JA szignálútra (Pena-Cortez és mtsai., 1993; Doares és mtsai., 1995). Ez első közelítésben logikus is, hiszen a két eltérő stratégiájú kórokozó ellen más-más védelmi választ célszerű mozgósítani, egyúttal a hatástalan válaszokat célszerű elnyomni, hiszen ezek akár a kórokozó javára is módosíthatják a gazda-kórokozó interakció kimenetelét. Nem meglepő, hogy a mikrobák igen gyakran ki is használják ezt a lehetőséget, ahogy azt a *P. syringae* is teszi. A baktérium által termelt koronatin nevű

vegyület aktiválja az egyébként ellene hatástalan ET/JA szignál utat, míg a jelen kölcsönhatásban hatékony SAR válasz gátlás alá kerül a gazdanövényben (Laurie-Berry és mtsai., 2006). A SA és a JA/ET szignálút kölcsönhatásának mechanizmusa még nem teljesen ismert. A képet tovább bonyolítja, hogy bizonyos helyzetekben a két szignál rendszer szinergisztikus módon működik, így hatalmas jelentősége van a rezisztencia válaszok finomhangolásának (Beckers és Spoel 2006; Mur 2006). Valójában a kórokozók nem mindig sorolhatók be tisztán egyik vagy másik életstratégiába. A *Phytophthora* kórokozó például tipikusan biotróf életstratégiát folytat a fertőzés kezdetén, majd a betegség előrehaladtával nekrotizálja a megtámadott növényi szöveteket. Ezen kívül a természetben igen gyakori, hogy egy növényt többféle biotikus és/vagy abiotikus stresszor ér egyidőben, ezért a rezisztencia válaszok jóval összetettebbek az egyszerű SA-JA antagonizmusnál.

A korábban már említett multifunkcionális NPR1 fehérje fontos regulátor szereppel bír mind a SA, mind a JA/ET jelátviteli útvonalban (Spoel és mtsai., 2003; 2007), így az mind a SAR, mind jelenléte ISR normál működéséhez nélkülözhetetlen a növényekben. A SA és a JA/ET szignálút közötti gátló hatás kialakításában több komponenst is sikerült molekuláris szinten azonosítani. Ilyen a WRKY70 transzkripciós faktor (Li és mtsai., 2004; 2006), amely a SA út irányában fejt ki pozitív szabályozó hatást, csak úgy, mint a GRX480 glutaredoxin (Ndamukong és mtsai., 2007). Az MKP4 protein kináz (Brodersen és mtsai., 2006) ellenben az ET/JA jelátvitelt indukálja és a SA utat gátolja. Az ET és JA hormonok az előbbiekkal szemben általában szinergisztikus hatást fejtenek ki és részben ugyanazt a jelátviteli rendszert használják jeltovábbításra (Glazebrook 2005), ezért gyakran az ET/JA szignál út összefoglaló elnevezés használatos. A két jelátviteli út közötti szinergizmus a szabályozásban is jól megfigyelhető. A szignálút jellegzetes marker génje, a PDF1.2 (Defensin-like low-molecular-weight cysteine-rich protein) például sem JA, sem ET inszenzitív *Arabidopsis* mutánsokban nem indukálható (Thomma és mtsai., 2001). A két jelátviteli út erős kapcsoltságát az ERF1 (Ethylene Response Factor) faktor is jól példázza, mely mind az ET mind a JA jelátvitelre pozitív hatást fejt ki (Lorenzo és mtsai., 2003), vagy a CEV1 (Constitutive Expression of VSP1), amely viszont szimultán elnyomja mindkét szignálutat (Ellis és mtsai., 2002). Itt is lehetőség van azonban a rezisztencia válaszok diszkriminációjára, ahogy a MYC2 transzkripciós faktor esetében is láthatjuk. Ez a fehérje mediálja a sebzés esetén aktív rezisztencia válaszokat, ugyanakkor patogén támadás esetén a JA útvonalon keresztül indukálódó génexpressziós válaszokat gátolja (Dombrecht és mtsai., 2007), valamint negatív hatást gyakorol a SA szignál rendszerre is

(Laurie-Berry és mtsai., 2006). A növényi védelmi válaszokat tovább árnyalja az ABA hormon, amely általában negatív, de bizonyos esetekben pozitív védelmi regulátor szerepet is betölthet. Hatását valószínűleg egy CAT1 kataláz enzimen keresztül, illetve szimultán hidrogén-peroxid felhalmozódás elősegítésén keresztül fejt ki egy MAPK kaszkádon keresztül (Xing és mtsai., 2008). Egyre több tudományos munka vizsgálja ugyanakkor a klasszikus stressz hormonok mellett más, a növekedésben, a fejlődésben, vagy a szöveti differenciációban jelentős hormonok hatását. Ilyen az auxin, mely bizonyítottan szabályozza a stresszhormonok által kiváltott expressziós válaszokat (Paponov és mtsai., 2008), illetve egy sor további hormon (gibberellinek, citokininek, brassinoszteroidok), amelyek szerepét még csak most kezdjük feltérképezni (Bari és Jones 2009).

2.5. A béta-aminovajsav indukálta rezisztencia és a priming jelensége

Már korán megfigyelték, hogy a HR válasz is sokkal hatékonyabb azon növényeknél, amelyeket korábban már ért patogén támadás: a leveleken kisebbek a HR eredetű nekrotikus foltok, így a szövetek nagyobb hányada maradt intakt a fertőzés után (Ross 1961; Kuc 1995). Az első kísérletek egyikében, amely során a priming lehetősége előtérbe került, petrezselyem szövetkultúrát kezeltek *Phytophthora sojae* kórokozó gomba sejtfalából nyert PAMP vegyülettel. Ha kis dózisu PAMP elicitor vagy SA kezelést alkalmaztak nem nőtt számottevően a molekuláris védekező folyamatokat jelző PAL (Phenylalanine ammonia-lyase) gén expressziója. Amikor azonban a növényeket előbb kis dózisu SA-val előkezelték és csak utána az elicitorral, a PAL gén expressziója radikálisan megemelkedett (Kauss és mtsai., 1992; Thulke és Conrath 1998).

A „priming” vagy potenciációként ismert jelenséget Zimmerli és mtsai. (2000) definiálták elsőként Arabidopsisban, amelynek során béta-aminovajsav (BABA) kezelést követően megemelkedett a kísérleti növények rezisztenciája különböző kórokozókkal szemben. A BABA egy nem fehérjealkotó aminosav, amelynek hatására a növények sokkal gyorsabban és hatékonyabban védekeztek a patogén ágensek támadásaival szemben. A vegyület képes a SA függő és a SA független védelmi mechanizmusokat is potenciálni (Conrath és mtsai., 2002) mégpedig olyan módon, hogy a direkt védelmi válaszokat (például PR gének transzkripciója) csak minimális mértékben indukálja. A BABA hatékony védelmet biztosít a növényt ért abiotikus (Jakab és mtsai., 2005), valamint a legkülönbözőbb biotikus stresszek ellen, mint a kórokozó mikrobák (Cohen 2002; Jakab és mtsai., 2001), fonálférgek (Oka és mtsai., 1999) és rovarok (Hodge és

mtsai., 2005). Ma már a priming jelenséget jóval tágabb értelemben használjuk, és egyre bővül azon vegyületek, illetve kölcsönhatások száma, amelyek a BABA-hoz hasonló direkt aktiváció nélkül megvalósuló megnövekedett védelmi kapacitást képesek kialakítani növényekben. Érdekes, hogy több, a növényvédelemben használatos fungicid vegyület más kórokozókkal szemben is potenciálhatja a növény védelmi válaszait. Ilyen vegyület például a probenazol, amely hatékonyan potenciálja dohány növények TMV és *Pseudomonas* baktériumokkal szembeni rezisztenciáját, és bár a folyamat első közelítésben a SA jelátvitel aktiválását is előidézi, SA-t felhalmozni képtelen *NahG* mutánsokban is lejátszódik, tehát valójában inkább priming jelenségnek tekinthető (Nakashita és mtsai., 2002). Hasonló hatású a strobilurin nevű vegyület, amely erőteljesebb rezisztencia választ indukál vad típusú és *NahG* dohány növényekben, mind virális, mind bakteriális fertőzés esetében direkt SAR aktiváció nélkül (Herms és mtsai., 2002). Az alapvető növényi rezisztencia folyamatok, így tehát a SAR is hatékonyan potenciálható. Arabidopsisban például a PAL gén priming-ja jól megfigyelhető olyan kísérleti növényekben, amelyek kis dózisu (SAR induktor, SA analóg) BTH kezelést kaptak. Ha ezt követően történik a fertőzés a *P. syringae* pv. tomato DC3000 törzsszel, a PAL génexpressziója jóval magasabb lesz, mint a nem előkezelt növényeknél (Kohler és mtsai., 2002). A SA útvonal primingja egy ciklin függő protein kináz fehérjétől is függ (IBS1; Ton és mtsai., 2005), és nem meglepő módon a SA és JA/ET útvonal szabályozásában központi szerepet játszó NPR1 fehérje jelenléte is nélkülözhetetlen (Kohler és mtsai., 2002).

Tulajdonképpen maga az ISR is egyfajta priming folyamatnak tekinthető, hiszen a BABA-IR-hoz hasonlóan nem kíséri direkt PR protein akkumuláció, sem a rezisztencia folyamatok széleskörű aktiválása. Jelentős molekuláris szintű különbségek lehetnek azonban látszólag hasonló hatású priming folyamatok között is. A komplexitást szépen példázza, hogy *Pseudomonas* PGPM baktériumkezelés és a BABA más-más jelátviteli úton (egy NPR1 függő, illetve egy NPR1 független) fejt ki a hatását, noha mindkét kezelés hatékonyan potenciálja a kallóz-tartalmú papillák IBS2/IBS3-függő képződését *Hyaloperonospora* fertőzött Arabidopsis növényekben és hozzájárul a fokozott rezisztenciához (Van der Ent és mtsai., 2009). Mindkét kezelés érzékenyíti a kísérleti növényeket patogén *Pseudomonas syringae* támadással szemben is, amely azonban szintén eltérő jelátviteli útvonalakon keresztül valósul meg, amelyhez már nem szükséges az IBS2/IBS3 fehérje (Van der Ent és mtsai., 2009). A BABA hatása bizonyos esetekben mind a SA, mind a JA jelátviteltől függetlenül érvényesülhet. *Plectosphaerella cucumerina* fertőzéssel szemben mind a SA, a JA, az ET szignalizációban gátolt, továbbá a kamalexin

szintézisre képtelen Arabidopsis mutánsok is mutatták a BABA-IR-t (Ton és Mauch-Mani 2004), ilyen esetekben éppen az ABA szignál úton keresztül fejt ki priming hatását (Flors és mtsai., 2008). Noha a priming jelenség molekuláris háttere messze nem teljesen ismert, annyi bizonyosnak látszik, hogy – legalábbis Arabidopsis modellnövény esetében – kiemelt szerepe van a védelmi gének promóterében lejátszódó kromatin szintű változásoknak. Szerepet játszik továbbá az MPK3 és az MPK6 szignál protein, valamint fontosak a megemelkedett SA, valamint az azelainsav szintek is (Jaskiewicz és mtsai., 2011; Conrath 2011).

2.6. Transzgenerációs priming

Ugyancsak az utóbbi idők meglepő felfedezése a „transzgenerációs priming”. Megfigyelték, hogy a védelmi válaszokat nem mozgósító BABA kezelés érzékenyítő hatása a kezelt Arabidopsis növények utódait is ellenállóvá teszi patogén (*Pseudomonas* baktérium és *Hyaloperonospora* oomikóta gomba) támadással szemben, csakúgy mint a szülői generáció avirulens *Pseudomonas* baktériummal történő fertőzése. Az utódok, az ismételt kezelés hatására ráadásul még erőteljesebben potenciált „primed-primed” fenotípusú generációt hoztak létre (Slaughter és mtsai., 2012). A jelenség hátterében ugyanúgy epigenetikus tényezők (kromatin metiláció megváltozása) állhatnak, mint a transzgenerációs SAR esetében. További meglepő felfedezés, hogy a transzgenerációs érzékenyítés herbivóra rovar támadás esetén is működik, és felfokozott védelmi reakciókat indukál az utód növényekben (Rasmann és mtsai., 2012). A priming igencsak perspektivikus a mezőgazdaság számára, hiszen a növényi védelmi válaszok direkt indukciója igen nagy energiabefektetést igényel, ami a biomassza termelés rovására megy. Az érzékenyítéssel viszont a természetes növényi védelmi utak minimális energiabefektetéssel tehetőek hatékonyabbá. A jelenség minden bizonnyal kiemelt szerepet kap a modern növénytermesztés, növényvédelem, vetőmag előállítás kapcsán és a jövő mezőgazdaságának egyik sarokköve lehet.

Érdekes kitekintés, hogy a priming jelenség állatokban és emberben is megfigyelhető: például emlős monociták és makrofágok is fokozott immunválasszal reagálnak bakteriális lipopoliszacharid (LPS) előkezelésre, a fehérvérsejtek különböző citokineket szintetizálnak LPS hatására. A gamma interferon, amelyet a kórokozók által megtámadott sejtek termelnek, potenciálja a monocitákat és makrofágokat, így azok kisebb dózisu LPS kezelés esetén is megindítják a citokin bioszintézist (Gifford és

Lohman-Mattes 1987; Hayes és mtsai., 1995; Koerner és mtsai., 1987). Igen meglepő, hogy priming folyamatok még az adaptív immunválasszal nem rendelkező ecetmuslicában is képesek védelmet biztosítani *Streptococcus* baktériumfertőzéssel szemben, amely akár a rovar egész élete során fennmaradhat (Pham és mtsai., 2007).

2.7. A lipázok szerepe az indukált rezisztenciában

A lipázok olyan fehérjék, melyek az α/β hidroláz enzimek családjába tartoznak és elsősorban hosszú szénláncú lipid molekulákat hidrolizálnak glicerollá és szabad zsírsavakká, ezzel szemben az észterázok elsősorban rövid szénláncú lipideket hidrolizálnak. A proteinek aminosav szekvenciája egy jellegzetes pentapeptid motívumot tartalmaz, amelynek konszenzus szekvenciája GXSXG, amelyben a konzervált szerin aminosavnak kiemelt szerepe van az enzimaktivitás szempontjából (Ollis és mtsai., 1992). Az utóbbi években több tanulmány is felhívta a figyelmet arra, hogy a lipázok és a lipid alapú szignálok fontos szerepet tölthetnek be bizonyos növényi rezisztencia mechanizmusokban (Shah 2005; Matos és Pham-Thi 2009). Minthogy a JA mint növényi stressz hormon maga is lipid származék, már korán felismerték a lipid molekulák jelentőségét a JA szignál utat aktiváló sebzési válaszokban (Farmer és Ryan 1992; Conconi és mtsai., 1996). Évekkel később kimutatták, hogy dohány növényekben a SA segített SAR folyamatokban is jelentős a lipid alapú jelátvitel, amely egyrészt a SABP2 proteinen keresztül, annak SA gátolt lipáz aktivitása révén valósul meg (Kumar és Klessig 2003; Tripathi és mtsai., 2010; ld. korábban), illetve az *Arabidopsis* növényekben homológ funkciót betöltő AtMES (*Arabidopsis* Methyl Salicylate Esterase) proteineken keresztül (Vlot és mtsai., 2008), amelyeket észterázokként azonosítottak

A lipáz enzimek egy csoportja a GDSL lipázok (más nevezéktan szerint SGNH lipázok), amelyek nevüket az aminosav szekvenciájukban megfigyelhető jellegzetes motívumról kapták, különösen érdekesek a növényi rezisztencia folyamatok szempontjából. Ide tartozik a GLIP1 (GDSL lipase-like 1) enzim, amelyről megállapították, hogy erősen indukálódik ET analóg etefon kezelés hatására és fontos szerepet játszik az *Arabidopsis* növények *Alternaria brassicicola* elleni védekezésében, mint jelátviteli komponens, és mint direkt antimikrobiális aktivitással rendelkező fehérje egyaránt (Oh és mtsai., 2005). Később azt is felismerték, hogy a GLIP1 túltermelő lúdfű növények megemelkedett rezisztenciát mutatnak az *Alternaria* fertőzéssel szemben, és egy lehetséges GLIP1-ET szignálút lehetőségét is felvetették, amely a SAR-tól függetlenül

működhet (Kwon és mtsai., 2009). Az Arabidopsis GLIP fehérjék egy másik tagja a GLIP2 amelyet mRNS szinten, antagonisztikus hatású kémiai kezelések így a SA, a MeJA és a 2-klóretil-foszfonsav (etefon) egyaránt indukáltak, szintén befolyásolja a növényi rezisztencia válaszokat az auxin szignálút gátlása révén (Lee és mtsai., 2009). A CaGLIP1 ugyancsak egy GDSL lipáz amelyet Hong és mtsai. (2008) izoláltak paprikából, expressziója kifejezett szövet specifitást mutat. Olyan transzgenikus lúdfű növényekben, melyekben mesterségesen csendesítették a *CaGLIP1* gént a *Xanthomonas campestris* fertőzés tünetei jelentősen csökkentek, a baktériumok növekedése pedig korlátozott volt a kontroll növényekhez képest. Ezzel szemben a gén túltermeltetése növelte az Arabidopsis növények fogékonyságát a kórokozóra. Egy másik paprikából izolált GDSL lipáz erősen indukálódott MeJA kezelés hatására és sebzés hatására is, és valószínű, hogy fontos szerepe lehet a CaPR4 (Capsicum Pathogenesis-Related protein 4) expresszió szabályozásában (Kim és mtsai., 2008). A Br-Si1 szintén egy lipáz enzim, amelyet kínai kel levelekben és szárákban azonosítottak elsőként és erős indukciót mutat a BTH kezelés esetén csakúgy, mint a *Pseudomonas syringae* bakteriális fertőzés hatására, a JA vagy az ET hormonok hatására viszont nem (Lee és Cho 2003). A GER1 GDSL lipázt rizs növényekben azonosították és megállapították, hogy a JA stressz hormon, valamint a vörös/távoli vörös hullámhossz tartományba eső fénysugárzás egyaránt indukálja a kifejeződését, így valószínűleg többféle celluláris funkcióban is részt vehet (Riemann és mtsai., 2007). A GDSL lipázoknak az abiotikus stressz válaszokban is jelentőségük lehet. Az AtLTL1 (*A. thaliana* Li-Tolerant Lipase 1) lipázt kódoló gén sóstressz hatására indukálódik erőteljesen és átmenetileg SA hatására is, míg a fehérje túltermeltetése növelte a toxikus NaCl és LiCl kezelésekkal szembeni ellenálló képességet a transzgenikus növényekben (Naranjo és mtsai., 2006).

Egy másik, a növényi stressz válaszokban kiemelt jelentőségű fehérje család a 3-as típusú lipázok csoportja (class 3 lipases). Ezek közé a 3-as típusú lipáz doménnel rendelkező α/β hidrolázok közé tartozik három fehérje, amelyeknek alapvető szerepét mutatták ki az Arabidopsis stressz válaszokban. Ezek a PAD4 (Phytoalexin-Deficient 4; Zhou és mtsai., 1998), az EDS1 (Enhanced Disease Susceptibility 1; Falk és mtsai., 1999) és a SAG101 (Senescence-Associated Gene 101) amelyek mind egy regulációs rendszer részei, ami a patogén támadások elleni elsődleges védelmi vonal Arabidopsisban (Wiermer és mtsai., 2005; Xing és Chen, 2006; Zhu és mtsai., 2011). Egy további stressz indukált 3-as típusú lipázt karakterizáltak Arabidopsisban, amelynek expresszióját az UV-B sugárzás erősen fokozta (Lo és mtsai., 2004). Megfigyelték, hogy azok a kísérleti növények,

amelyekben csendesítették a gént, jobban tolerálták az UV sugárzást, ugyanakkor gyengébben akkumulálták a PR-1 fehérjét, a szisztémás szerzett rezisztencia markerét. Összességében számos kísérlet vizsgálta a 3-as típusú lipázok biológiai szerepeit, mégis keveset tudni a fehérjék *in vivo* szubsztrátjairól, illetve lipolitikus aktivitásáról. Tulajdonképpen csak szekvenciájukban megfigyelhető 3-as típusú lipáz domén alapján kategorizálták őket lipolitikus enzimeként, valójában korántsem biztos, hogy ténylegesen rendelkeznek-e ilyen biokémiai aktivitással (Wiermer és mtsai., 2005). Az általunk vizsgált PRLIP fehérjék, amelyeket elsőként Jakab és mtsai. (2003) jellemeztek és írtak le, szintén a 3-as típusú lipázok közé tartoznak. Kilenc gént azonosítottak a lúdfű genomban amelyek PRLIP fehérjéket kódolnak, három génnek – *PRLIP3*, *PRLIP8*, *PRLIP9* – a rizs genomban is megtalálták az ortológjait. Kimutatták, hogy a *PRLIP1* és a *PRLIP2* gének erőteljesen indukálódnak *Pseudomonas syringae* fertőzés, SA, valamint BTH kezelés hatására is, míg a *PRLIP6* gén megnyilvánulását a MeJA és az ET kezelés fokozta. A PRLIP1 fehérje *in vitro* körülmények között észteráz aktivitást mutatott p-nitrofenil-butiráton, mint mesterséges szubsztráton, de triacilglicerol lipáz aktivitást nem sikerült detektálni triolein szubsztrát segítségével. Összességében a *PRLIP* géncsalád több tagja is erős hasonlóságot mutat a patogenezishez köthető (pathogenesis related – PR) fehérjéket kódoló gének expressziós tulajdonságaival. Ez igaz mind a szövet és szerv specifikus alapexpresszió, mind pedig az erőteljes patogén indukálhatóság tekintetében. A PR fehérjék általánosan elterjedtek a növényvilágban, számos csoportjukat behatóan tanulmányozták, de lipáz vagy lipáz szerű fehérjéket tartalmazó családot eddig még nem azonosítottak. Ez részben annak is köszönhető, hogy a fent ismertetett stresszfolyamatokhoz köthető lipázokat általában egymástól függetlenül, sokszor más-más kísérleti növényben vizsgálták és nem géncsalád vagy fehérje család szinten. Jelen munkánkban ezért szeretnénk egy áttekintést nyújtani a *PRLIP* ortológ gének elterjedéséről és molekuláris evolúciójáról a növényvilágban.

3. Célkitűzések

A *PRLIP* géncsalád tagjait *Arabidopsis* növényekben 2003-ban azonosították elsőként. A vizsgálatok során leírták az ötödik kromoszómán lévő *PRLIP* génklaszter egyes tagjainak növényi stressz hormonokra, BABA-ra, valamint *Pseudomonas* baktérium fertőzésre adott expressziós válaszait, valamint az egyes gének szövet specifikus alapexpresszióját. Vizsgálták a rekombináns *PRLIP1* fehérje lipáz enzimaktivitását, illetve *in silico* analízisek során jellemezték a prediktált *PRLIP* fehérjék domén szerkezetét és hasonlósági viszonyait. A további vizsgálataink során a következő kérdéseket szeretnénk volna megválaszolni:

I. *In silico* vizsgálataink során:

1. Összehasonlítottuk a *PRLIP* aminosav szekvenciákat a lúdfű genomból prediktált lipolítikus enzimek széles csoportjával, hogy feltérképezzük a hasonló biokémiai funkciót betöltő enzimek közötti strukturális hasonlóságokat.
2. Filogenetikai elemzések segítségével szeretnénk volna rekonstruálni a géncsalád molekuláris evolúcióját magasabb rendű növényekben, hogy megtudjuk, az *Arabidopsis PRLIP* gének ortológjai előfordulnak-e más fajokban is.
3. Átvizsgáltunk microarray adatbázisokat, hogy újabb adatokat nyerjünk a különböző *Arabidopsis PRLIP* gének stresszhatásokra bekövetkező expressziós változásairól.

II. Kísérletes munkánk során:

1. Megvizsgáltuk az eddig részletesen nem jellemzett *Arabidopsis PRLIP* géneket (*PRLIP3*, *PRLIP8* és *PRLIP9*), különös tekintettel a stresszhormon kezelések hatására megjelenő, illetve a szerv specifikus expressziós különbségekre, hogy megtudjuk hasonlóan reagálnak-e ezekre a határokra, mint a géncsalád többi paralóg tagja.
2. Megvizsgáltuk a szőlő *PRLIP* génjeinek kórokozó támadás hatására bekövetkező expressziós válaszait Pinot Noir és Cabernet Sauvignon szőlőfajtákban, hogy megtudjuk vajon mutatnak-e hasonló, intenzív stresszválaszokat egy másik növényfaj ortológ génjei is.
3. Összehasonlítottuk antagonistá hatású stresszinduktor kezelések hatását a szőlő *PRLIP* génjeinek expressziójára Pinot Noir szőlőnövények leveleiben, hogy megismerjük melyik növényi szignálutakhoz köthető a gének szabályozása.

4. Anyag és módszer

4.1. A Microarray adatbázis keresés

A *PRLIP1* (génbanki azonosító: At5g24210; microarray azonosító: 249777_at), *PRLIP6* (génbanki azonosító: At5g24230; microarray azonosító: 249779_at), *PRLIP3* (génbanki azonosító: At2g05260; microarray azonosító: 263049_at), *PRLIP9* (génbanki azonosító: At4g10955; microarray azonosító: 254959_at) és *PRLIP8* (génbanki azonosító: At5g50890; microarray azonosító: 248476_at) expressziós értékeket az NCBI Gene Expression Omnibus adatbázisból gyűjtöttük (<http://ncbi.nlm.nih.gov/geo>). Ez az adatbázis grafikus, könnyen áttekinthető formában tartalmaz microarray adatsorokat. A kísérletek mindegyikét az Affymetrix cég ATH1 Genom Array rendszerében végezték. A részletes kísérleti körülmények és technikai paraméterek az adatbázisban megtalálhatóak (<https://www.pubmedcentral.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL198>). Igyekeztünk a leginkább összevethető és legjobban definiált vizsgálatokat kiválasztani, amelyek hozzáférési számai: SA kezelések: GDS2207 és GSE14961; ET kezelések: GDS414 és GSE14961; MeJA kezelések: GSE21762 és GSE17464; NaCl kezelések: GDS3216 és GSE7641.

4.2. A szekvencia vizsgálatok

Az Arabidopsis 3-as típusú lipáz szekvenciáit a JalView számítógépes programmal illesztettük a ClustalW metódus (pairwise progressive sequence alignment) segítségével (Clamp és mtsai., 2004; Waterhouse és mtsai., 2009). A különböző növénykeből származó PRLIP protein szekvenciákat a MUSCLE algoritmus (Edgar 2004) segítségével illesztettük a nagyobb adatmennyiség és szekvencia diverzitás miatt. A filogenetikai vizsgálatokat PaupUp grafikus felület alatt a PAUP 4.0 szoftverrel végeztük (Swofford 2003). A távolság alapú módszerek közül a szomszéd összevonás algoritmusát alkalmaztuk (Neighbour Joining), a távolságokat az átlagos karakterdifferenciák alapján állapítottuk meg. A filogenetikai fák topológiáját bootstrap teszt segítségével ellenőriztük, amelyet 1000 ismétlésben végeztünk. A PRLIP fehérjéket bemutató törzsfá esetében az <50% támogatást kapott csoportokat összeolvasztottuk. A törzsfákat a MEGA4 program Tree Explorer alkalmazásával vizualizáltuk (Tamura és mtsai., 2007).

4.3. A növénynevelés

Vizsgálatainkhoz a lúdfű (*Arabidopsis thaliana* L.) Columbia ökotípusát alkalmaztuk. A magokat palántaneveléshez ajánlott földkeverékben tartottuk 3 napig, hogy lehetőleg egyszerre csírázzanak. Ezután 24°C-on csíráztattuk őket 56-70% páratartalom és 12 órás fényperiódus mellett, $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ megvilágítást alkalmazva. A magoncokat 1 hetes korban tűzdeltek tőzegkockákba (Jiffy® pot, Jiffy products). A fejlődő töveket 2 héttel a tűzdelés után 0,4%-os Wuxal® (WuxImpex) tápoldattal öntöztük. A cirkadián génexpressziós válaszok tanulmányozásához a növényeket 10 órás fényperiódus alkalmazásával neveltük.

A Pinot Noir és Cabernet Sauvignon szőlőfajtákat (*Vitis vinifera* L.) a PTE Szőlészeti és Borászati Intézete bocsátotta rendelkezésünkre. A kísérleti növényeket vernalizált szőlővesszőkből sötétszobában, 30°C-on perlitben hajtattuk. Amikor a hajtások elérték az 1-2 cm hosszúságot, a növények 6 hetes korrig történő nevelését 16 órás fényperiódust alkalmazva, 28°C-on, 60%-os relatív páratartalom mellett, fényszobában folytattuk. A gyökeresedést 0,8% naftil ecetsavas kezeléssel segítettük (INCIT-8, Bioplant) és rendszeresen ellenőriztük.

4.4. A kémiai kezelések

Az *Arabidopsis* növényeken végzett vizsgálatainkhoz a jázmonsavat (Sigma) 100 mM végkoncentrációban, 96%-os etanolban oldottuk, amelyből a kezelőoldat 1 mM-os végkoncentrációra történő beállítását vízzel végeztük. Az 1 mM-os szalicilsav és a 3 M-os konyhasó kezelőoldatok előállításához a nátrium szalicilát (Sigma) és a NaCl (Reanal) oldása vízben történt. A hormonkezelésekhez hét hetes *Arabidopsis* növényeket alkalmaztunk, amelynek során 50 növényenként 20 ml hormon oldatot permeteztünk ki. A konyhasóoldatot közvetlenül a földbe injektáltuk olyan mennyiségben, hogy annak talajoldatra vonatkoztatott végkoncentrációja 300 mM legyen. Az etilén kezelést zárt térben 100 $\mu\text{l/l}$ koncentrációban végeztük. A mintákat 0, 6, 24, 30, és 48 órával a kezelést követően gyűjtöttük.

Szőlő növények esetében a szalicilsavas permetezés helyett – a fiatal szőlő növények korlátozott lombfelülete miatt – BTH (1, 2, 3- benzotiadiazol-7-tiokarboxilsav-S-metilészter; Bion, Syngenta) oldattal történő beöntözést alkalmaztunk. A BTH-t vízben oldottuk, amelynek végkoncentrációja a perlitben 600 μM volt. A mintákat 0, 48 és 96 órával a kezelést követően gyűjtöttük. Az ET kezelés az *Arabidopsis* növények esetében

alkalmazottakhoz hasonlóan történt. A mintákat 0, 24, és 48 órával a kezelést követően gyűjtöttük, mert a további mintavételi időpontokban a levelek már erős szeneszenciát mutattak. A liszthatmattal (*Uncinula necator* syn. *Erysipe necator*) fertőzött szőlőleveleket szabadföldön nevelt növényekről gyűjtöttük. A lisztharmat borítottság becslésével (fertőzött/egészséges levélfelület arány) a vizsgálatokhoz használt leveleket négy kategóriába soroltuk: 5-10%; 30-40%; >75%-os fertőzöttség, valamint kontrollként egészséges leveleket alkalmaztunk.

4.5. A génexpressziós vizsgálatok

Génexpressziós vizsgálatainkhoz öt *Arabidopsis* növény 3-3 levelét folyékony nitrogénben eldörzsöltük és a mintákat felhasználásig -80°C -on tároltuk. Az RNS kivonáshoz Zimmerli és mtsai. (2000) módosított protokollját alkalmaztuk. 500 mg porított növényi mintát feltáró puffer jelenlétében (0,5 M Tris pH: 8,0; 250 mM EDTA pH: 8,0; 5% SDS) 30 másodpercig erőteljesen rázattuk, majd 0,5 ml fenol-kloroform (1:1) eleggyel extraháltuk. 10 perc (13 000 rpm) centrifugálást követően a vizes fázist egy térfogatnyi kloroformmal extraháltuk, és 3 percig ismét centrifugáltuk. A vizes fázishoz annyi 8 M-os dietil-pirokarbonát (DEPC; Sigma) kezelt LiCl oldatot adtunk, hogy az oldat végkoncentrációja LiCl-ra nézve 2 M legyen. Egy éjszakán át 4°C -on történő inkubálást követően az RNS-t 20 perc, 13 000 rpm-en történő centrifugálással ülepítettük, majd az RNS csapadékot 200 μl RN-áz mentes vízben oldottuk. A mintákhoz 0,1 térfogatnyi 3M-os DEPC kezelt Na-acetát oldatot (pH: 4,8) és 3 térfogatnyi 96%-os etanolt adtunk és elkeverést követően egy éjszakán keresztül -20°C -on tartottuk őket. Az inkubálást követően az elegyet centrifugáltuk (10 min, 13000 rpm), majd az RNS-t 0,4 ml 70%-os etanollal mostuk. Az RNS csapadékot szárítás után 30 μl RNáz mentes vízben oldottuk és felhasználásig -80°C -on tároltuk. A szőlő növényekből történő nukleinsav izolálást a szövetekben nagy mennyiségben előforduló szekunder metabolitok (főleg a polifenolok) jelenléte nehezíti, ezért az RNS kivonáshoz speciális feltáró puffert alkalmaztunk: 2% CTAB; 2% PVPP; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 25 mM EDTA; 2 M NaCl; és 0,5 g/l spermidin (Hamiduzzaman és mtsai., 2005 – módosítva). A minták 5 különböző növény 2-2 levélből származtak, amelyeket folyékony nitrogénben porítottunk és felhasználásig ultramélyhűtőben, -80°C -on tároltuk. A porított szövetek 500 mg-ját feltáró pufferben (2% CTAB; 2% PVPP; 100 mM Tris-HCl pH: 8,0; 25 mM EDTA; 2 M NaCl; és 0,5 g/l spermidin), 2 percig 60°C -on inkubáltuk, majd erőteljesen rázattuk. Ezt követően a

mintákat 0,5 ml kloroformmal extraháltuk, majd 5 percig centrifugáltuk (13 000rpm). A vizes fázist azonos térfogatú kloroformmal extraháltuk, majd centrifugálást követően (3 min, 13000 rpm) a felülúszóhoz annyi 8 M-os DEPC kezelt LiCl oldatot adtunk, hogy annak LiCl-ra vonatkoztatott végkoncentrációja 2 M legyen. Egy éjszakán át 4°C-on történő inkubálást követően a mintákat 20 percig rencrifugáltuk (4°C, 13 000 rpm), a pelletet 300 µl 0,5%-os DEPC kezelt SDS oldatban oldottuk, majd azonos térfogatnyi kloroformmal ismét extraháltuk. Az elegyet centrifugáltuk (3 min 13 000 rpm) és a felülúszóhoz 0,1 térfogatnyi 3 M-os DEPC kezelt Na-acetát oldatot (pH 4,8), valamint 3 térfogatnyi 96%-os etanolt adtunk, majd -20°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. Az inkubálást követően a mintákat 10 percig centrifugáltuk (13 000rpm), majd 400 µl 70%-os etanollal mostuk. Az RNS pelleteket szárítottuk, majd 50 µl RNáz mentes vízben oldottuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk. Az RNS minták minőségét 1,2 %-os denaturáló agaróz gélen ellenőriztük (Sambrook és mtsai., 1989).

Az RNS mintákat 1 órán keresztül DNáz I (Fermentas) kezelésnek vetettük alá (1 µl RNS oldat; 2 µl 10-szeres DNáz I puffer; 2 µl víz és 1 U DNáz I), majd a DNáz I enzimet 10 percen keresztül 75°C-os melegítéssel inaktiváltuk. A DNS mentes RNS oldatok koncentrációját és szennyezettségét NanoDrop 1000 UV/VIS spektrofotométer segítségével állapítottuk meg. A reverz transzkripcióhoz a First Strand cDNA Synthesis Kit-et alkalmaztuk (Fermentas). A cDNS szintézist Arabidopsis mintákból 4 µg, míg szőlő esetén 200 ng totál RNS felhasználásával mértük össze. 1 µl oligodT(18) primerrel 10 µl végtérfogatra, majd 70°C-on inkubáltuk 5 percig, végül jégen visszahűtöttük 0°C-ra. Ezután 4 µl 5 x RT puffert adtunk a reakciókhoz valamint 2 µl dNPT mixet (amely 10-10 mM koncentrációjú volt mind a négy féle dNTP-re nézve). Ezután a mintákat 37°C-on tartottuk 5 percig, majd 200 U RevertAid™ reverz transzkriptázt adtunk hozzá és 20 µl végtérfogatra egészítettük ki vízzel. A reverz transzkripció 1 órán keresztül folyt 42°C-on, majd az enzimet 10 percig 70°C-ra való hevítéssel inaktiváltuk. A cDNS oldatokat az Arabidopsis minták esetében 0,1-szeres koncentrációra, szőlő minták esetében 0,2-szeres koncentrációra, az ET kezelt szőlő minták esetében a *VvPRLIPA* és *VvPERLIPC* gének méréséhez pedig 0,5-szeres koncentrációra hígítottuk. A reakciók sikerességét végpont PCR alkalmazásával és az ampikonok 1,5%-os agaróz gélen történő gélelektroforézisével ellenőriztük. A DNáz kezelt RNS minták PCR templátként való alkalmazásával arról is megbizonyosodtunk, hogy a DNáz kezelés sikeres volt és nem maradt szennyező genomi DNS a mintáinkban.

A kvantitatív valós idejű PCR vizsgálatokat (qPCR) Step One™ Real-Time PCR System segítségével végeztük (Applied Biosystems). A génexpressziós változások mérésére a Step One™ 2.0 számítógépes programba integrált, relatív kvantifikációt alkalmazó ún. $\Delta\Delta$ CT módszert (Livak és Schmittgen 2001) alkalmaztuk. Belső kontrollként szakirodalmi adatok alapján az *Ubiquitin* gént választottuk (Yuan és mtsai., 2006) az Arabidopsis minták esetében. A szőlő génexpressziós méréseknél már korábban teszteltünk egy elongációs faktor génre, egy aktin génre, valamint két tubulin génre tervezett primerpárt, amelyek közül az első (*EF-1 α* – GenBank azonosító: XM_002282094) expressziós szintje bizonyult a legállandóbbnak, így ezt alkalmaztuk méréseinkhez. Referencia mintaként a kezeléseknél a 0 időpontban vett mintákat, szerv specifikus expresszió vizsgálatokban pedig a magoncokból (lúdfű esetében), illetve a szárakból (szőlő esetében) származó cDNS mintákat választottuk. A génspecifikus primereket az Oligo Explorer 1.2 számítógépes programmal (<http://www.genelink.com>) terveztük. Az amplifikáció 20 μ l térfogatban történt, amelybe összemértünk 10 μ l ROX tartalmú Maxima™ SybrGreen 2 x Mix-et (Fermentas), 0,6 μ l-t mindkét 10 pmol/ μ l koncentrációjú primerből, 8,5 μ l vizet és 2 μ l-t a hígított cDNS mintákból, a következő PCR programmal: 10 min elődenaturáció 95°C-on, amelyet 15 s denaturáció követett 95°C-on, 30 s tapadás 60°C-on, és 30 s elongáció 72°C-on, 45 cikluson keresztül. A mérések során 3 technikai replikátumot alkalmaztunk mintánként. Az amplikonok homogenitását minden esetben olvadási görbe felvételével ellenőriztük. Ennek során a reakció elegyet 95°C-ra melegítettük, majd 60°C-ra hűtöttük vissza. Ezt követően fokozatosan ismét denaturációs hőmérsékletre melegítettük, miközben 0,3°C-onként regisztráltuk a fluoreszcencia értékeket. Az alkalmazott primerek szekvenciáit a 2. Táblázat tartalmazza.

2. Táblázat A PCR amplifikációhoz használt primerek szekvenciái, és az amplifikált gének azonosítói.

Amplifikált gén	Hozzáféresi szám	Primer név	Primer szekvencia
<i>PRLIP3</i>	At2g05260	Lip3qfw	TGGAACAGATTGGGTATGGAG
		Lip3qrv	GAGCGTCCTTGTAATCTTCGG
<i>PRLIP8</i>	At5g50890	Lip8qfw	CAGGATGGAGTAGCAGAGAAG
		Lip8qrv	GAGTTGCTGACTGATCAACCTG
<i>PRLIP9</i>	At4g10955	Lip9qfw	CGACCGTGCATTACCCGCACC
		Lip9qrv	CTTCCATCTTGTTTCGGTGCTC
<i>Ubiquitin</i>	AT4G05320	Ubq2fw	CACACTCCACTTGGTCTTGCG
		Ubq2rv	TGGTCTTTCGGTGAGAGTCTTCA
<i>VvPRLIP3/9</i>	LOC100266730	Vv39fw	CTTTAATCCACCATACTCTCAGC
		Vv39rv	CTCCTGCTCCAATGTCCTTC
<i>VvPRLIP8</i>	LOC100265965	Vv88fw	TGAGGATGATCTCCGCTTTCTG
		Vv88rv	GGTTGAACAAATGGGTGTCCAC
<i>VvPRLIPA</i>	LOC100257345	Vv23fw	TCAATCCACCTTTCTTGAGGTATTC
		Vv23rv	TTGCACTCCTTATTGAACGTATCTC
<i>VvPRLIPC</i>	LOC100854885	VvCfw	CCACGTTTGGAGAATGTAATCTGC
		VvCrv	CCATGAGCTTCCAAAACATCGC
Bármely specifikus <i>VvPRLIP</i> gén	–	VvUNIVfw	GATAAAGATTCATCCATCTACGGTG
		VvUNIVrv	GGGCCATGGATTTTCCAAC
<i>Elongációs faktor 2 alfa</i>	XM_002282094	VvElongUPP	GATTGACAGGCGATCTGGCAAG
		VvElongLOW	CTTTGCTGCAGACTTGGTGAC

4.6. A klónozás és a szekvenálás

A klónozendó PCR termékeket DreamTaq™ DNS polimeráz (Fermentas) segítségével állítottuk elő 23 µl térfogatú reakciókban, amelynek összetétele: 2,3 µl 10-szeres DreamTaq™ puffer; 0,5 mM dNTP mix (mind a négyféle nukleotidra 0,5 mM végkoncentráció); 1-1 µM az egyes primerekből; 4 µl genomi DNS illetve cDNS minta; 1,25 U enzim és 12,5 µl víz. A PCR termékeket 0,5-szeres TBE tartalmú 1,5%-os agaróz gélen futtattuk (120 V; 1 óra) és etidium-bromiddal vizualizáltuk, UV fény alatt. A gélből a

fragmenteket a GeneJet Gel Extraction Kit (Fermentas) segítségével a gyártó utasításait követve izoláltuk. A gél szelethez, tömegével (mg) azonos térfogatú (μl) feltáró oldatot adtunk, majd 60°C -on tartottuk. Ezután egy térfogatnyi izopropanolt adtunk az oldathoz, majd $800\ \mu\text{l}$ -es részletekben felpipettáztuk a GeneJET™ oszlopokra. Az oszlopokat 1 perc centrifugálás után ($1\ 000\ \text{rpm}$) $700\ \mu\text{l}$ mosó pufferrel átmostuk (centrifugálás: 1 min, $13\ 000\ \text{rpm}$), a DNS fragmenteket pedig $50\ \mu\text{l}$ elúciós pufferrel eluáltuk (centrifugálás: 1 min, $13\ 000\ \text{rpm}$). A fragmenteket a pJET1.2 plazmid vektorba a CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) segítségével klónoztuk. Ennek során a PCR fragmentek túlnyúló végeit tompa végekké alakítottuk. Összemértünk $10\ \mu\text{l}$ 2-szeres reakció puffert, $2\ \mu\text{l}$ PCR terméket, $5\ \mu\text{l}$ vizet, és $1\ \mu\text{l}$ DNA Blunting enzimet, az elegyet 70°C -ra melegítettük 5 percre, majd jégen hűtöttük. A ligáláshoz hozzámértünk $1\ \mu\text{l}$ pJET1.2/blunt Cloning vektort ($50\ \text{ng}/\mu\text{l}$) és 5 U T4 DNS ligáz enzimet, majd 22°C -on 5 percig inkubáltuk.

A transzformálást Sambrook és mtsai. (1989) munkája alapján végeztük: $5\ \mu\text{l}$ ligálási reakciót mértünk össze $5\ \mu\text{l}$ térfogatú DH5-alpha *E. coli* kompetens sejttel. A mintákat 30 percre jégre tettük, majd 1 perc 42°C -os hőshockot alkalmaztunk, amelyet 5 perces hűtés követett jégen. A sejtekhez $700\ \mu\text{l}$ LB tápoldatot adtunk, és 1 óráig 37°C -os rázatást követően $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin (Sigma) tartalmú LB táptalajra szélesztettük és egy éjszakán át nőni hagytuk. A transzformálást a pJET1.2 forward és pJET1.2 reverse primerek segítségével ellenőriztük kolónia PCR segítségével. Az alkalmazott PCR program: 10 min elődenaturáció 95°C -on, 15 s denaturáció 94°C -on, 30 s tapadás 60°C -on, és 1 min elongáció 72°C -on, 35 cikluson keresztül.

A DNS szekvenálást a PTE ÁOK Orvosi Genetikai Intézetében végeztük BigDye Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) felhasználásával ABI PRISM 3100 Genetic Analyser készülék segítségével (Applied Biosystems).

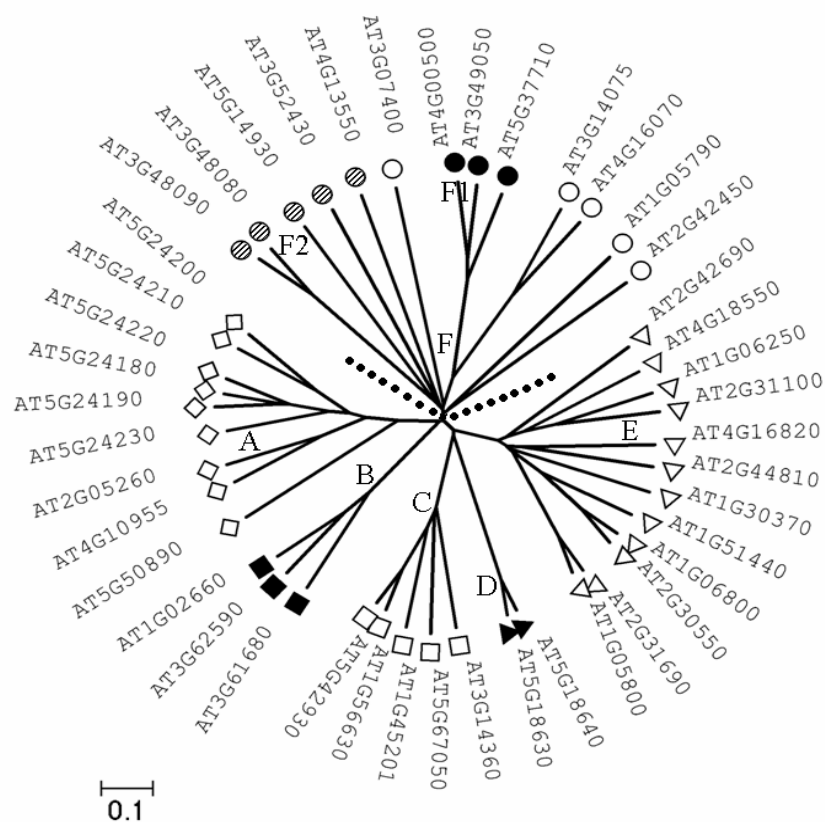
5. Eredmények

5.1. A PRLIP fehérjék egy különálló csoportot alkotnak az Arabidopsis 3-as típusú lipáz enzimjei között

A lúdfű genomában kilenc *PRLIP* gént azonosítottak. Az általuk kódolt fehérjék mindegyikében egy 3-as típusú lipáz domén (class 3 lipase) található (Jakab és mtsai., 2003). Egy átfogó szekvencia analízis során ezeket a fehérje szekvenciákat hasonlítottuk össze az Arabidopsis proteomból eddig annotált 116 lipáz, észteráz és foszfolipáz szekvenciákkal, és megállapítottuk, hogy a PRLIP család tagjai monofiletikus csoportot alkotnak a 3-as típusú lipázok között. Az Európai Bioinformatikai Intézet (European Bioinformatics Institute – EBI) InterProScan szolgáltatása segítségével (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) azonosítottuk és összehasonlító elemzésbe vontuk mindazokat a lúdfű fehérjéket, amelyek rendelkeznek a 3-as típusú lipáz doménnel (adatbázis azonosítója: IPR002921). A redundáns szekvenciák eltávolítása után 46 fehérje hasonlósági viszonyait elemeztünk tovább. Mivel a fehérjék hosszúságukat tekintve meglehetősen változatosnak mutatkoztak (237-től 1003 aminosav között), csak a 3-as típusú lipáz doméneket hordozó és így megfelelően illeszthető szekvencia régiót használtuk az elemzéshez. A filogenetikai elemzés végeredményét egy gyökértelen törzsfán ábrázoltuk (2. ábra).

A törzsfán F jelzéssel láttuk el azt a csoportot amelynek tagjai egymással alacsony homológiát mutattak, és szinte alapi helyzetbe kerültek a törzsfán. Mindössze két alcsoport különíthető el a homológia viszonyok alapján amelyeket F1 és F2 jelzéssel láttunk el. Itt jelentek meg olyan fontos és jól ismert fehérjék, mint a PAD4 (At3g52430), EDS1 (At3g4890) és a SAG101 (At5g14930), amelyek az F2 alcsoportba kerültek. Ezek mind fontos szabályozó elemei az Arabidopsis biotikus stressz válaszainak, ahogy a korábbiakban láthattuk (Zhou és mtsai., 1998; Falk és mtsai., 1999; Feys és mtsai., 2005). Az F csoport többi szekvenciája – az At3g07400 kivételével – a PTHR21493 család tagjaival mutat hasonlóságot (amelyet eddig nem láttak el külön névvel) a PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) 7.0 Beta osztályozó rendszer szerint (<http://pantherdb.org>). A PTHR21493 családot az adatbázis további 27 alcsoportra osztja. Az F1 alcsoport szekvenciái az első PANTHER alcsaládba (SF1: kalmomodulin kötő hősokk fehérjék), az At3g14075 és az At4g1670 fehérjék a második alcsaládba (SF2:

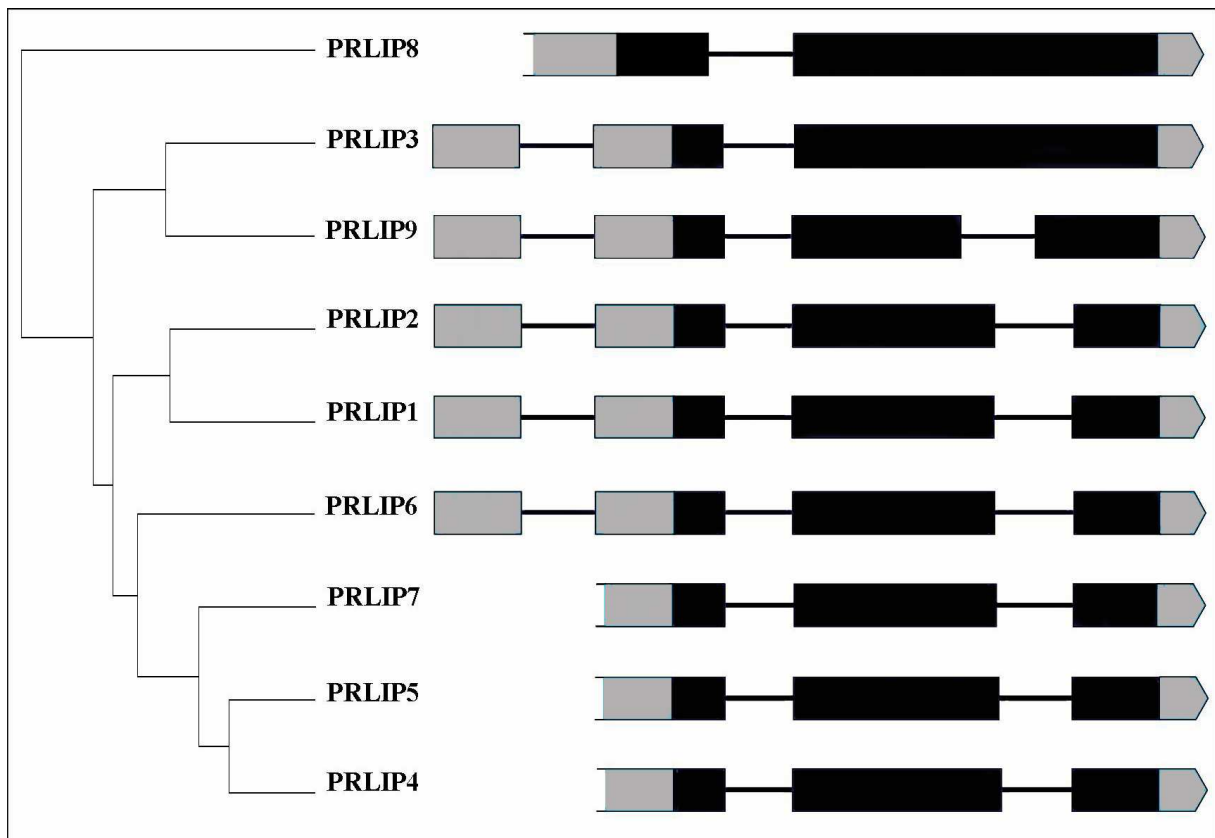
jelenleg még nincs neve), az At1g 05790 a harmadik alcsaládba (SF3: T20M3.5 fehérjék) és végül az At2g42450 a negyedik alcsaládba (CGI-141 homológ fehérjék). Az F csoport tagjai nagy változatosságot mutatnak a 3-as típusú lipáz domén mellett megjelenő egyéb fehérje domének tekintetében is. Ilyen az F1 alcsoport tagjainál a lipáz 3 N terminális domén (IPR005592); az F2 alcsoportba tartozó At4g13550C2 fehérje esetében a membrán targeting (IPR018029) és a C2 kalmodulin/lipid kötő domén (IPR008973); az At4g1670 hozzáférési számú fehérje esetében egy szignálpeptid szerű szekvencia; illetve egy p-hurok tartalmú nukleotid trifoszfát hidroláz domén (az azonosítója SSF52540 a SUPERFAMILY adatbázisban – <http://supfam.cs.bris.ac.uk>) az At3g07400 jelű fehérjénél.



2. ábra. A lúdfű (*A. thaliana*) 3-as típusú lipáz enzimjeinek hasonlósági viszonyai. Az egyes kládokat nagy betűk és különböző szimbólumok jelölik. A hozzáférési számok a TAIR adatbázisból (<http://www.arabidopsis.org>) származnak.

A törzsfá másik oldalán öt paralóg fehérje szekvencia csoportot tartalmazó klád figyelhető meg, amelyeket A–E betűkkel jelöltünk. Az E csoportban található a behatóan tanulmányozott DAD1 fehérje (At2g44810), amely a porzószalakban expresszálódik erőteljesen és a JA bioszintézisben jut kitüntetett szerephez (Ishiguro és mtsai., 2001). A C kládban található az AtTLL1 fehérje (At1g45201) amely az Arabidopsis cirkadián oszcillátor rendszer egy komponense (Schöning és mtsai., 2007).

Az InterProScan szekvencia elemzéseink arról árulkodnak, hogy az A-E kládok képviselői a 3-as típusú lipáz doménon kívül kevés egyéb fehérje domént hordoznak. Az A-E csoportba tartozó 31 fehérje InterProScan analízise mindössze két további fehérje domént eredményezett: az At5g67050 esetben egy peptidáz domént (IPR013128), míg az At5g42930 fehérjében egy alfa/béta hidroláz szerű régiót (PTHR10992:SF17) azonosítottunk. Az A jelű kládot a PRLIP fehérjék csoportja alkotja, amelyben a PRLIP8 (At5g50890) szekvencia jelentkezik alapi helyzetben. Ez a fehérje a leghosszabb és a leginkább különböző a többi PRLIP szekvenciához viszonyítva. A klád következő leágazását a PRLIP3 (At2g05260) és a PRLIP9 (At4g10955) fehérjék adják. A csoport monofiletikus eredetét a génjeik exon-intron struktúrája is megerősíti (3. ábra).



3. ábra. A lúdfű (*A. thaliana*) PRLIP génjeinek exon-intron szerkezete és hasonlósági viszonyai. Fekete szín jelöli a kódoló régiókat, szürke a 3' illetve az 5' nem transzlálódó régiókat, egyszerű vonal pedig az intronokat. A PRLIP8, PRLIP7, PRLIP5 és PRLIP4 gének 3' nem transzlálódó régiójáról jelenleg nincs szekvencia információ.

Mindegyik gén tartalmaz egy konzervált helyzetű intront a kódoló régióban nem sokkal a START kodon után. Az egy génklaszterben található PRLIP1, PRLIP2, PRLIP4, PRLIP5, PRLIP6 és a PRLIP7 gének ezen kívül egy második intront is tartalmaznak a kódoló régió belül, míg a a PRLIP9 gén esetében a második CDS intron ezekhez képest

eltolt helyzetben található (Jakab és mtsai., 2003). Igen érdekes, hogy minden *PRLIP* gén, amelynek a szekvenciáját cDNS szinten is meghatározták, tartalmaz egy további intront is az 5' nem transzlálódó régióban. Ennek az intronnak a hossza nagy változatosságot mutat az egyes génekben (*PRLIP3*: 287 bp; *PRLIP9*: 127 bp; *PRLIP1*: 392 bp; *PRLIP2*: 158 bp; *PRLIP6*: 179 bp) és a CDS intronokkal ellentétben azok helyzete sem konzervált az Arabidopsis genom adatbázis alapján (<http://arabidopsis.org>).

5.2. A *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* gének eltérő expressziós válaszai stressz indukció hatására

Annak ellenére, hogy a géncsalád több tagjának expressziós mintázata leírásra került korábban, keveset tudunk a *PRLIP3*, *PRLIP9* és a *PRLIP8* gének működéséről. Elsőként a nyilvános microarray adatbázisokat tekintettük át, amelyek gyors és költséghatékony lehetőséget nyújtanak ismeretlen funkciójú gének működésének vizsgálatához. Az amerikai Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (National Center for Biotechnology Information – NCBI) és a Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisait felhasználva gyűjtöttünk információkat az Arabidopsis *PRLIP* gének működéséről. Két független kísérlet (egy ún. GEO dataset és egy GEO series record) biológiai ismétléseinek átlagát véve értékeltük az eredményeket.

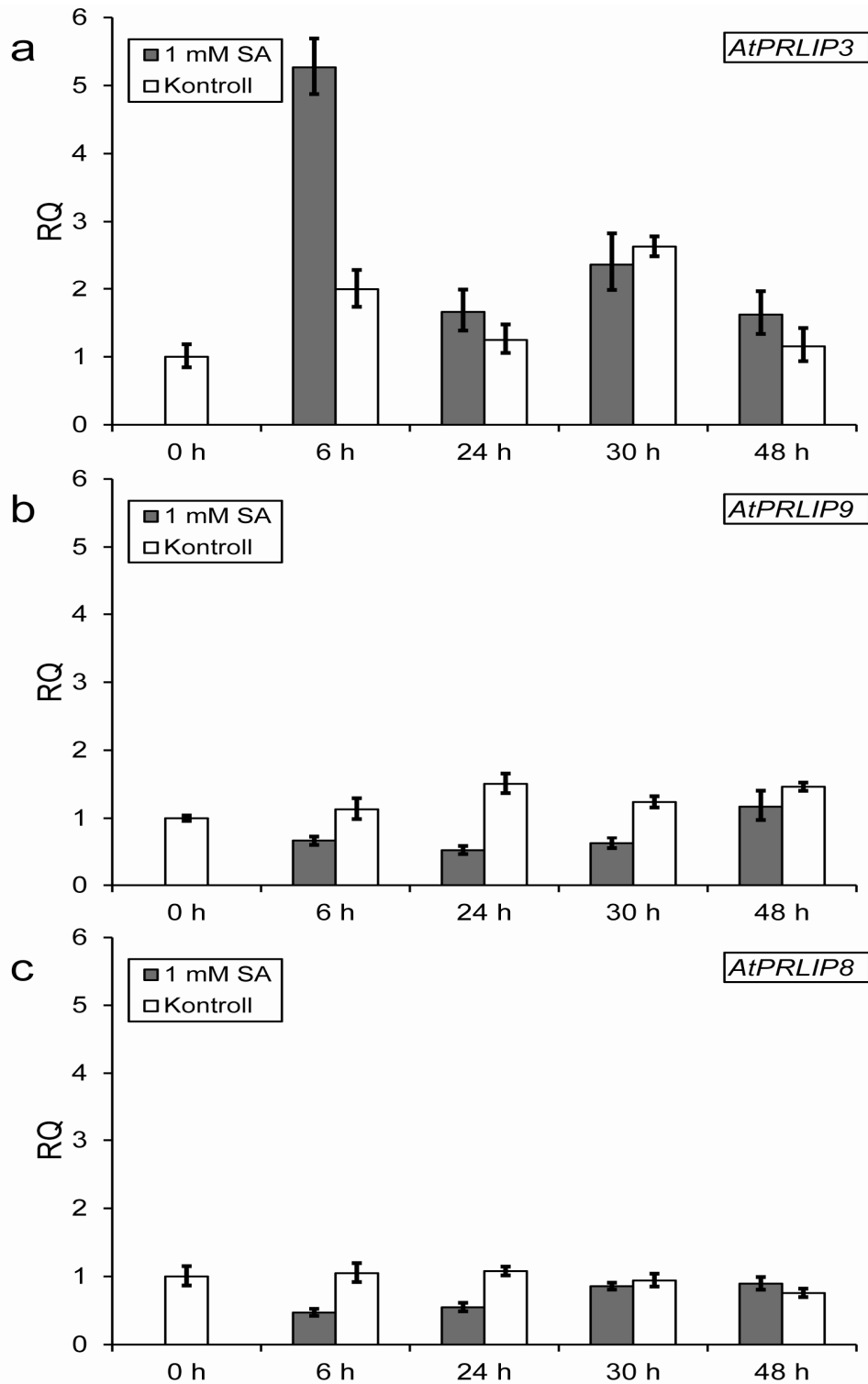
Meglepő módon a géncsalád minden adatbázisban (NCBI, GEO, EBI) alulreprezentáltnak tűnt. Annak érdekében, hogy megbecsüljük az egyes adatbázisok megbízhatóságát elsőként a Jakab és mtsai. (2003) által korábban már részletesebben jellemzett gének (*PRLIP1*, *PRLIP2*, *PRLIP4*, *PRLIP5*, *PRLIP6* és *PRLIP7*) expressziós értékeit hasonlítottuk össze. Nem sikerült érdemleges információt nyernünk a *PRLIP2*, *PRLIP4*, *PRLIP5* és a *PRLIP7* gének működésével kapcsolatban. Kétség kívül megerősíthető a *PRLIP1* gén indukciója SA hatására (az elemzett SA indukciót vizsgáló microarray kísérletek azonosítói: GDS2207 és GSE 14961), de az ET indukálhatóság nem (ET kísérletek azonosítói: GDS414 és GSE7432). Ugyanezek a kísérletek valószínűsítették a *PRLIP6* gén SA indukálhatóságát is, amelyet azonban a korábbi részletes qPCR kísérletek során nem sikerült megfigyelni. Meglepő hogy az array adatok ugyanezen gén represszióját jelezték MeJA kezelés hatására (MeJA kísérletek azonosítói: GSE21762, GSE17464), amely azonban kifejezetten ellentétben áll a korábbi kísérleti eredményekkel, amelyek a *PRLIP6* gén indukcióját bizonyították a szóban forgó kezelés hatására (Jakab és mtsai., 2003).

Szerettünk volna minél több, stressz kezelés során mért expressziós adatot összegyűjteni a korábban még nem jellemzett *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* génekről is. A microarray adatok alapján a *PRLIP3* gén megnyilvánulását mind a SA, mind a MeJA kezelés növelte, az ET kezelés viszont elnyomta. A *PRLIP9* gén expressziója ezzel szemben ET hatására növekedett, SA kezelést követően csökkent, míg a MeJA kezelés nem volt szignifikáns hatással a gén transzkripciójára. A *PRLIP8* gén esetében a SA kezelés represszív hatása figyelhető meg, míg a MeJA kifejezetten emelte a gén expresszióját, az ET kezelés pedig hatástalannak tűnt. A biotikus kórokozók esetében fontos stressz hormonokon kívül egy abiotikus környezeti stressz (140 mM-os NaCl kezelés) hatását is vizsgáltuk. Ebben az esetben azonban a microarray adatok egymásnak is ellentmondani látszottak. Amíg a GSE7641 kísérlet például a *PRLIP3* gén represszióját mutatja a kezelés hatására, miközben a *PRLIP8* cDNS szintje gyengén emelkedni látszik; addig a GDS3216 array kísérlet adatai szerint a *PRLIP3* gén expressziója nem mutatott változást konyhasó hatására, a *PRLIP8* gén viszont határozottan repressziót mutatott. A *PRLIP9* gén megnyilvánulása mindkét array kísérlet szerint csökkent NaCl kezelés hatására.

Összességében az array adatok meglehetősen zavaros képet mutattak. Noha a microarray alapú transzkriptomikai vizsgálatok kétségtelenül napjaink legmodernebb módszerei közé tartoznak, a közelmúltban több tanulmány is aggályokat fogalmazott meg a technikával kapcsolatban (Ioannidis és mtsai., 2009; Kim és mtsai., 2010). Fontos megjegyezni, hogy a problémát nem elsősorban a módszer jelenti, hanem sokkal inkább a vele kapcsolatos emberi tényezők (kísérleti protokoll, adatok normalizálása stb.). A kapott adatokat ennek megfelelően standardizált körülmények között végzett qPCR alapú génexpresszió mérésekkel szokás ellenőrizni, így mi is ezt az eljárást alkalmaztuk.

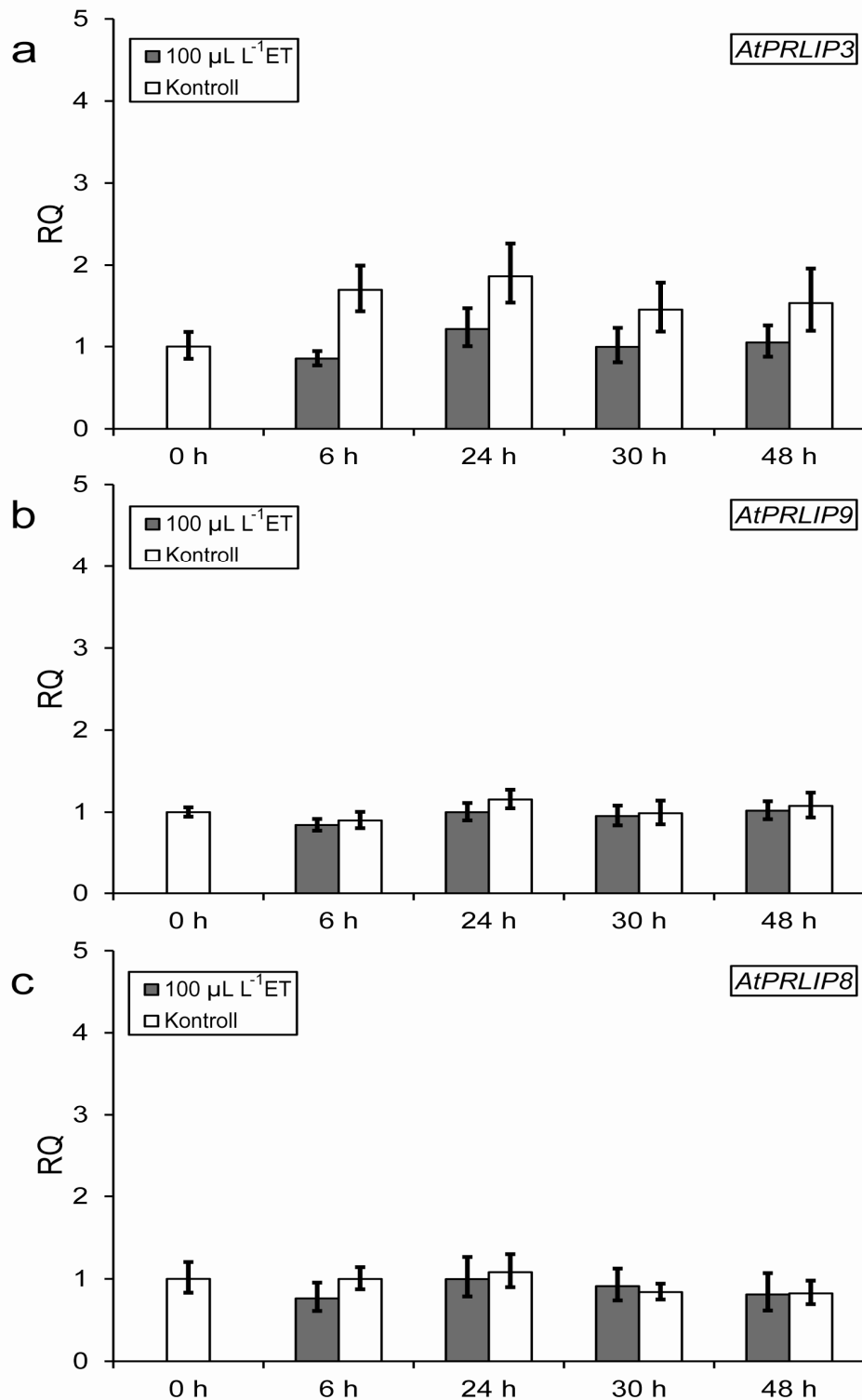
Minthogy a *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* génekről nem állt rendelkezésre kísérleti adatunk, az *Arabidopsis* növényeket exogén hormonoldatokkal kezeltük, majd mértük a kezelésre adott expressziós változásokat. Az 1 mM-os SA kezelés megnövelte a *PRLIP3* gén megnyilvánulását ugyan, de ez a változás csak 6 órával a kezelést követően érvényesült. Más időpontokban nem volt detektálható különbség a kezelt és a kontroll növények között (4a ábra).

Azonos SA kezelés a *PRLIP9* és *PRLIP8* gének esetében jelentős csökkenést váltott ki 6, 24, és 30 órával a kísérlet kezdete után, majd két nap múlva a kezelés hatása elmúlni látszott (4b és 4c ábra).



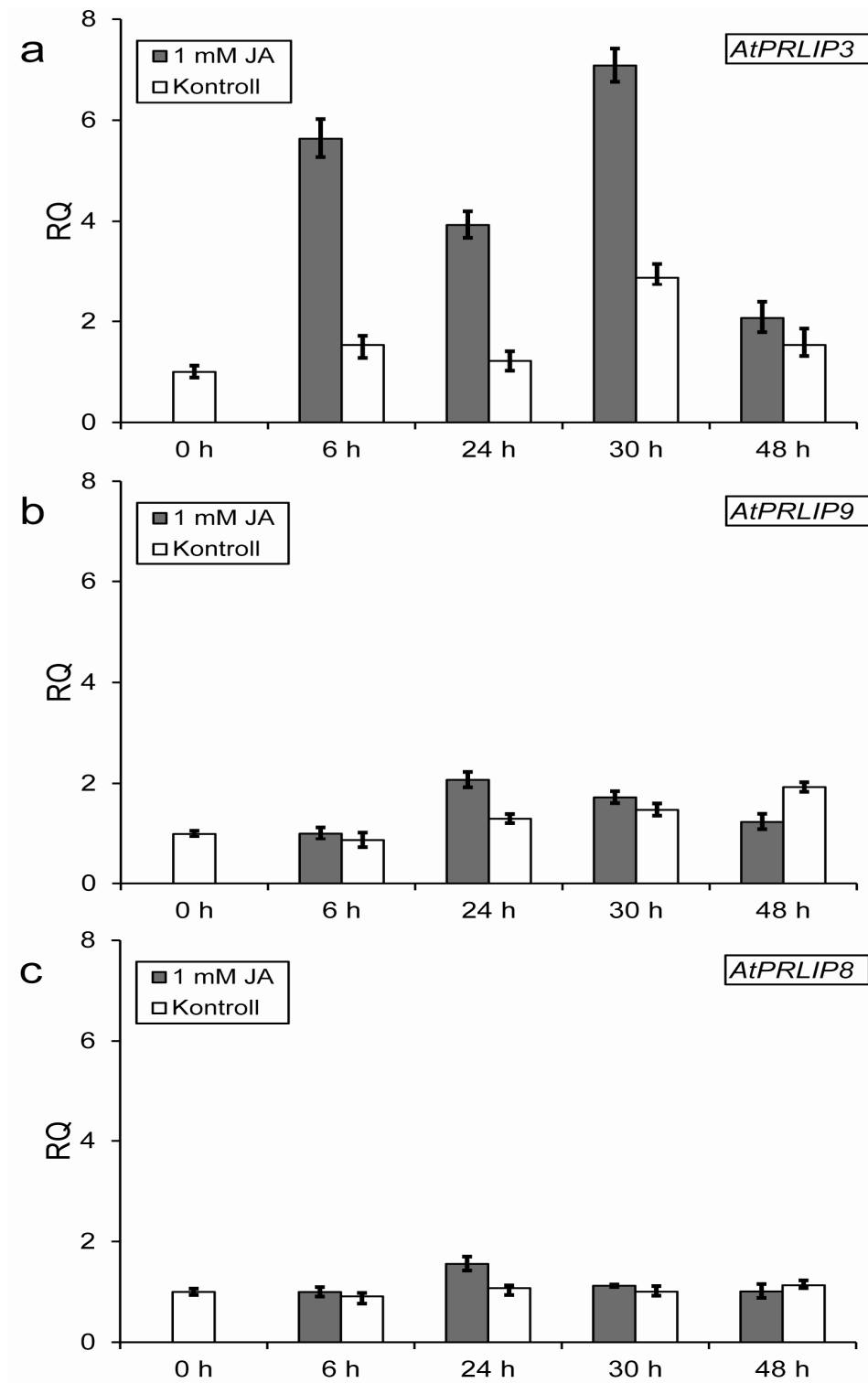
4. ábra. SA kezelés hatása a lúdfű (*A. thaliana*) *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* génjeinek megnyilvánulására. RQ: relatív génextresszió. Az időpontok a kezelés időtartamát jelölik.

Az ET kezelés gyenge hatást gyakorolt a vizsgált génekre, amelyek közül a *PRLIP3* expressziója gyenge redukción mutatott 6 óra után, azonban a többi gén, illetve kezelés esetében nem találtunk szignifikáns eltéréseket a kontroll növényekhez képest (5. ábra).



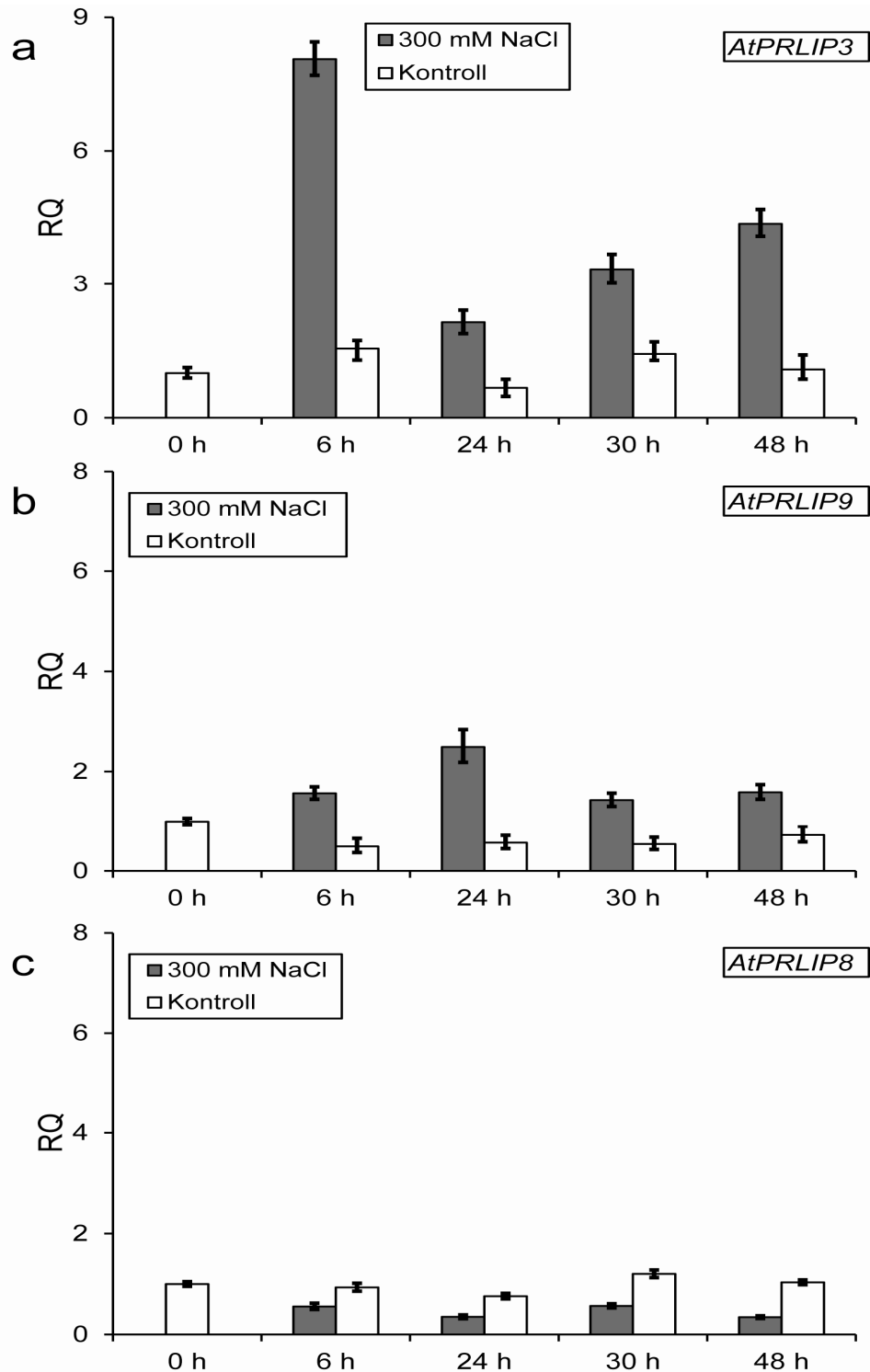
5. ábra. ET kezelés hatása a lúdfű (*A. thaliana*) *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* génjeinek megnyilvánulására. RQ: reaktív génextresszió. Az időpontok a kezelés időtartamát jelölik.

A *PRLIP3* gén mRNS szintje a JA kezelést követő 6. és 24. órában mintegy 3,6-szeres, majd a 30 órában kétszeres expresszió növekedést mutatott a kezeltlen kontrollhoz képest (6a ábra).



6. ábra. JA kezelés hatása a lúdfű (*A. thaliana*) *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* génjeinek megnyilvánulására. RQ: reaktív génextpresszió. Az időpontok a kezelés időtartamát jelölik.

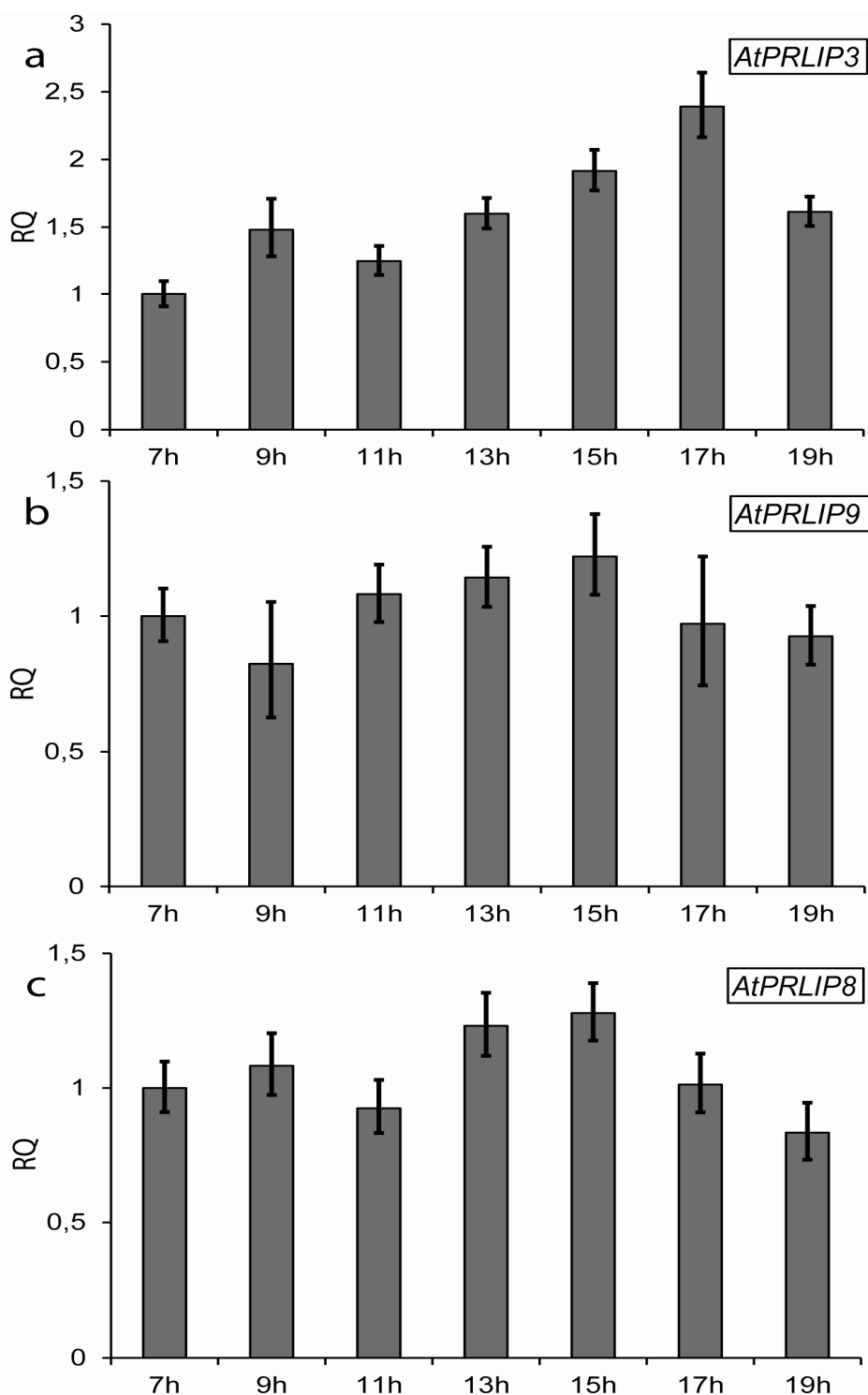
Mérsékelt hatása volt viszont a JA-nak a *PRLIP9* és *PRLIP8* transzkripció szintjeire: mindkét gén esetében egy gyenge emelkedést figyelhetünk meg a 24 órás mintavételi időpontban (6b és 6c ábra).



7. ábra. NaCl kezelés hatása a lúdfű (*A. thaliana*) *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* géneinek megnyilvánulására. RQ: reaktív génexpresszió. Az időpontok a kezelés időtartamát jelölik.

A legerőteljesebb hatása a 300 mM-os NaCl kezelésnek volt, amely jelentősen emelte a *PRLIP3* gén átíródását, különösen a kezelést követő 6. órában, amely időpontban a *PRLIP3* gén a kezeletlen növény "0" időpontban mért expresszió értékéhez képest 5,5-szeres növekedést mutatott. A *PRLIP9* gén esetében a NaCl kezelés 3, illetve 5-szörös expressziós érték emelkedést okozott a mintavételek 6 és 24 órájában (7a és 7b ábra). Ellentétes hatást figyeltünk meg a *PRLIP8* gén esetében, ahol a só kezelés egyre erősebben gátolta a gén megnyilvánulását az idő előrehaladtával (7c ábra).

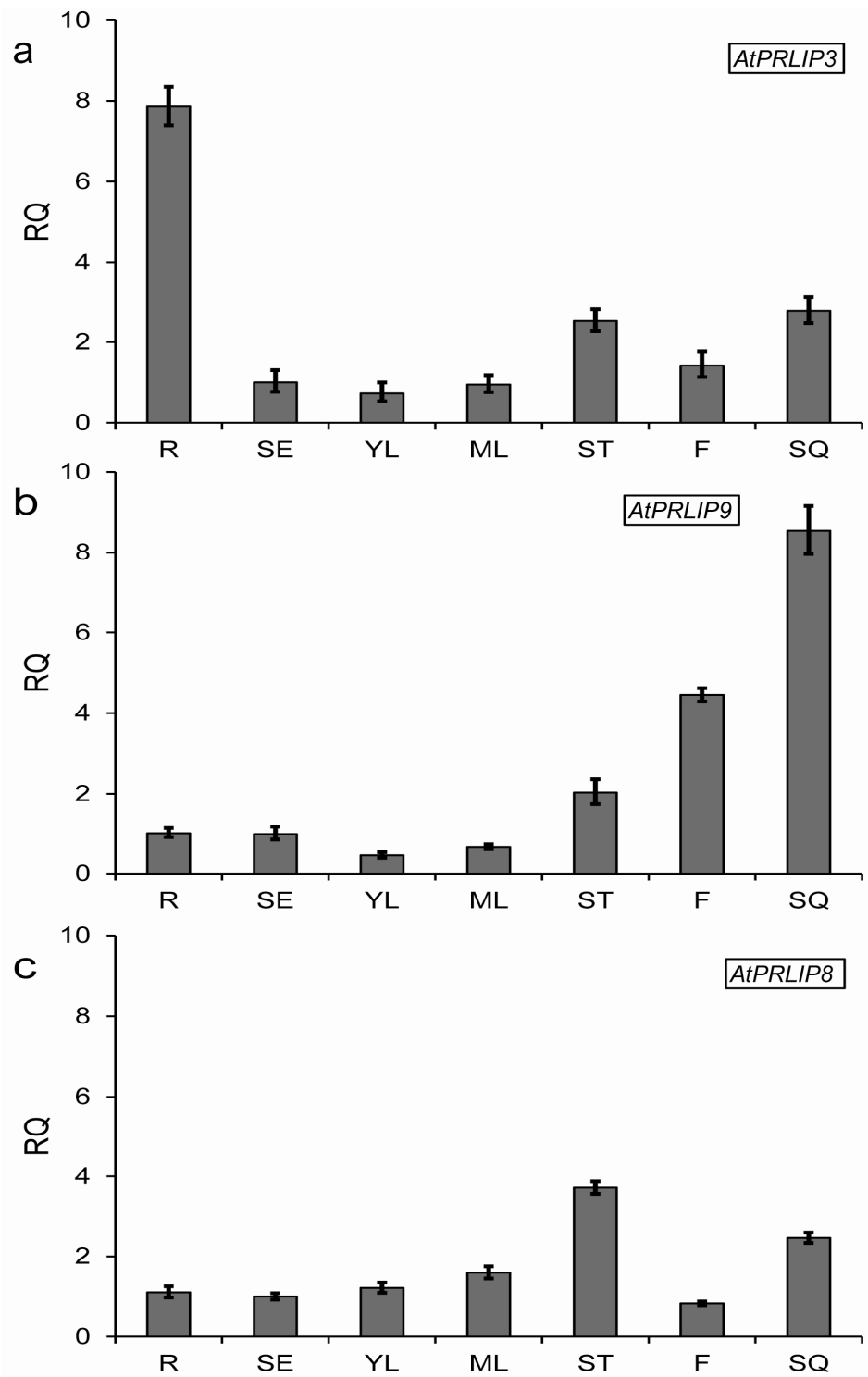
Érdekes jelenséget figyeltünk meg a *PRLIP3* gén expressziójának napi változásában: a reggeli (0 h; 24 h; 48 h minták) és a délutáni időpontban vett minták között (6 h; 30 h), amelyek rendre magasabb *PRLIP3* mRNS szinteket mutattak.



8. ábra. A lúdfű (*A. thaliana*) *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* gének expressziójának napi ritmusa. RQ: reatív génextpresszió. A 7 h-ás és a 19 h-ás mintavételek sötétben, a többi mintavétel fényben történt. A világítás a 8. órában kapcsolt be és a 18. órában kapcsolt ki.

Ezért megvizsgáltuk a gén napi expressziós mintázatát kezeletlen, 10 órás fény és 14 órás sötét periódus alatt nevelt növényekben. Méréseink szerint a *PRLIP3* gén a fény periódus alatt kezelések nélkül is gyenge, de határozott transzkripciós emelkedést mutatott, amelynek eredményeképpen a megvilágítási ciklus végére mintegy kétszeres expressziónövekedést tapasztaltunk (8a ábra). A sötét periódusban a gén megnyilvánulása ismét visszaesett, tehát a fénynek szabályozó szerepe van a *PRLIP3* expressziójában. A másik két gén esetében, csak kisebb expressziós különbségeket detektáltunk melyek nem kapcsolódtak a megvilágítás napi ritmusához (8b és 8c ábra).

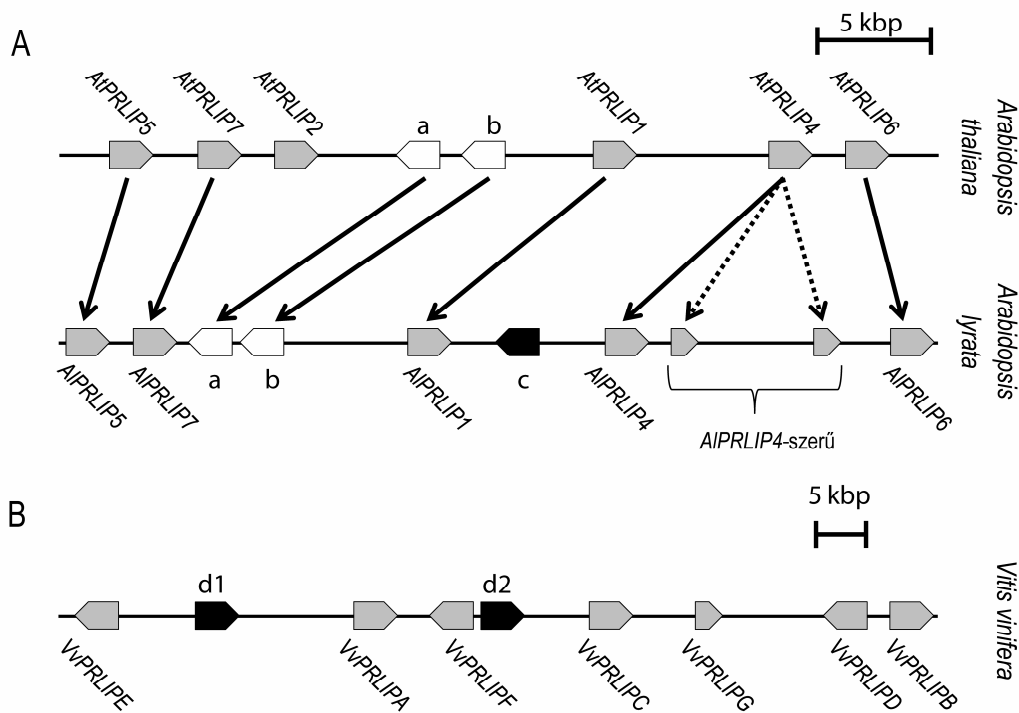
Ugyancsak kezeletlen Arabidopsis növényekben vizsgáltuk a *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* gének szerv specifikus megnyilvánulását, révén a szövet ill. szerv specifikus különbségek számos PR fehérje alapexpressziójában megfigyelhetőek (Van Loon és mtsai., 2006). Vizsgálatainkban a kezeletlen lúdfű növények hét különböző szervét dolgoztuk fel és hasonlítottuk össze (1 hetes magoncok; gyökerek; fiatal levelek; idős levelek; virágszárak; virágok; termések). A *PRLIP3* gén erőteljesen expresszáldott a növények gyökereiben. Mintegy nyolcszoros mértékben nyilvánult meg a magoncokhoz és a levelekhez viszonyítva és három- négyeszeres mennyiségben a virágokhoz és a becőkhöz képest (9a ábra). Ezzel szemben a *PRLIP8* gén minden vizsgált szervben meglehetősen stabil expressziós értékeket mutatott, mindössze a szárákban és a levelekben figyelhetünk meg némi emelkedést a többi szervhez viszonyítva (9b ábra). Érdekes jelenség mutatható ki a *PRLIP9* mRNS szintekben. Fokozatos expresszió emelkedés figyelhető meg ugyanis a növények föld feletti részeiben a fiatal levelektől kezdve az idős levelek, majd a szárák és a virágok irányába egészen a termésekig (9c ábra).



9. ábra. A lúdfű (*A. thaliana*) *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* géneinek szerv specifikus megnyilvánulására. RQ: reaktív génexpresszió. A mintákat gyökerekből (R), fiatal magoncokból (SE), fiatal levelekből (YL), idős levelekből (ML), virágokból (F) és zöld, még be nem érett becőkből (SQ) vettük.

5.3. Az *Arabidopsis thaliana* és az *A. lyrata* *PRLIP* régiójának az összehasonlítása

A *PRLIP* géncsaládot elsőként lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) modellnövényben jellemezték (Jakab és mtsai., 2006). Azóta meghatározták egy közel rokon faj, az *Arabidopsis lyrata* teljes genom szekvenciáját is, amely elérhető a DOE Joint Genome Institute adatbázisából (<http://www.jgi.doe.gov>). Ez jó lehetőséget kínált, hogy összehasonlítva a két faj *PRLIP* génjeit, információkat kapjunk a géncsalád molekuláris evolúciójáról. A *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* gének ugyan különböző kromoszómákon és különböző genomi régiókban elszórtan lokalizálódtak, de mindkét fajban megtalálhatóak voltak. A géncsalád többi tagja ezzel szemben mindkét faj esetében egy-egy génklaszterben csoportosult mindkét fajban. Ha összehasonlítjuk a két faj *PRLIP* génklasztereit (10A ábra), megállapítható, hogy a legtöbb gén azonos sorrendben és orientációban fordul elő mindkét genom esetében.



10. ábra. Az *A. thaliana*, az *A. lyrata* (A) és a *V. vinifera* (B) növényfajok *PRLIP* génklaszterének vázlatos szerkezete. A nyilak a gének orientációit jelzik. Szürke nyilak jelölik a *PRLIP* homológ géneket, fekete nyilak a nem *PRLIP* homológ géneket, fehér nyilak a nem kódoló RNS géneket (a és b). * jelölt két *PRLIP4*-szerű gént az *A. lyrata* *PRLIP* régiójában. A d1 és d2 két pszeudogént jelöl a *Vitis vinifera* *PRLIP* régiójában. Az ábrázolt genomi régiók hosszának hozzávetőleges különbségeit 5 kilobázispáros (kbp) aránymértékkel érzékeltettük.

A hasonlóságok mellett azonban jelentős különbségek is megfigyelhetők a homológ genomi szegmensek között. A *PRLIP2* gén például teljes egészében hiányzik az *A. lyrata* genomából. További különbség az *A. lyrata PRLIP1* és *PRLIP4* génje között megtalálható kis kódoló régió (amely egy feltételezett GTP kötő fehérjét kódol), amely azonban hiányzik az *A. thaliana PRLIP* klaszteréből. További példa a fajok közötti különbségre a *PRLIP4* gén kópiáinak száma, amelyekből kettővel több található meg az *A. lyrata*-ban, mint az *A. thaliana*-ban. Ez a két plusz ortológ gén igen erős hasonlóságot mutat mindkét faj *PRLIP4* génjével, de az 5' régiója mindkettőnek hiányzik és inkább parciális duplikációknak tűnnek, noha az adatbázis mindkettőhöz rendel cDNS szekvencia adatot is, így valószínűleg transzkriptálódnak. Az 5' régió hiánya megfigyelhető a *PRLIP1* és a *PRLIP9* gének esetében is az *A. lyrata* genomban és ez a különbség a kódoló régiók manuális revíziójával sem korrigálható. Érdekesség, hogy a két nem kódoló RNS gén is kijelölésre került az *A. thaliana* genom adatbázisban a *PRLIP2* és a *PRLIP1* gének között, amelyeket eddig nem azonosítottak az *A. lyrata* esetében, noha kódoló régióik megtalálhatóak a kromoszóma megfelelő pozícióiban. Homológia kereséssel megpróbáltunk azonosítani áthelyeződő genetikai elemeket, amelyek felelősek lehetnek ezekért a fajok közötti különbségekért. Az *A. thaliana* esetében nem találtunk szignifikáns hasonlóságot mozgó genetikai elemekkel, ellenben az *A. lyrata PRLIP* régiójában több ilyen szekvenciát is azonosítottunk. Egy nem-LTR típusú (Non-Long Terminal Repeat) retrotranszpozon reverz transzkriptáz-szerű fehérjét kódoló gént figyeltünk meg a két *PRLIP4* paralóg gén között (10,474,059 és a 10,472,918 bázispár pozíciók között reverz orientációban). Egy mutátor-szerű transzpozáz gén homológja szintén megtalálható a *PRLIP1* gén és a GTP kötő fehérje génje között a 10,459,890 és a 10,461,216 pozíció között. Ezek a mozgó genetikai elemek minden bizonnyal aktívan befolyásolták a génklaszter molekuláris evolúcióját és valószínűleg részben felelősek lehetnek a két vizsgált Arabidopsis faj *PRLIP* klasztere közötti különbségekért ahol tehát az *AtPRLIP1*, *AtPRLIP2*, *AtPRLIP4*, *AtPRLIP5*, *AtPRLIP6* és *AtPRLIP7* gének megtalálhatóak. A vizsgált gének adatbázis azonosítóit a 3. Táblázat tartalmazza.

3. Táblázat A részletesen vizsgált *A. thaliana*, *A. lyrata* és *V. vinifera* PRLIP homológok hozzáférési számai. A *-al jelölt szekvenciákat manuálisan korrigáltuk. A korrigált szekvenciákat a 2. Melléklet tartalmazza.

Növényfaj/adatbázis	Lókuszt neve	Hozzáférési szám
<i>Arabidopsis thaliana</i> www.arabidopsis.org	AtPRLIP1	At5g24210
	AtPRLIP2	At5g24200
	AtPRLIP3	At2g05260
	AtPRLIP4	At5g24220
	AtPRLIP5	At5g24180
	AtPRLIP6	At5g24230
	AtPRLIP7	At5g24190
	AtPRLIP8	At5g50890
	AtPRLIP9	At4g10955
<i>Arabidopsis lyrata</i> www.jgi.doe.gov	AIPRLIP1	894311
	AIPRLIP3	905858
	AIPRLIP4	351441
	Egyedi, AIPRLIP4-szerű paralóg gének	941960 941961
	AIPRLIP5	894309
	AIPRLIP6	941962
	AIPRLIP7	489279
	AIPRLIP8	331477
	AIPRLIP9	942922
<i>Vitis vinifera</i> www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview (LOC azonosítók) www.genoscope.cns.fr/spip (GSVIV azonosítók)	VvPRLIPA	LOC100257345 (GSVIVT01038697001)
	VvPRLIPB	LOC100248600
	VvPRLIPC	LOC100854885 * (GSVIVG01038696001)
	VvPRLIPD	LOC100253699
	VvPRLIPE	LOC100260693
	VvPRLIPF	LOC100251999 * (GSVIVG01038695001)
	VvPRLIPG	Az adatbázisban nem azonosított *
	VvPRLIP3/9	LOC100266730 (GSVIVT01019548001)
VvPRLIP8	LOC100265965 (GSVIVT01020848001)	

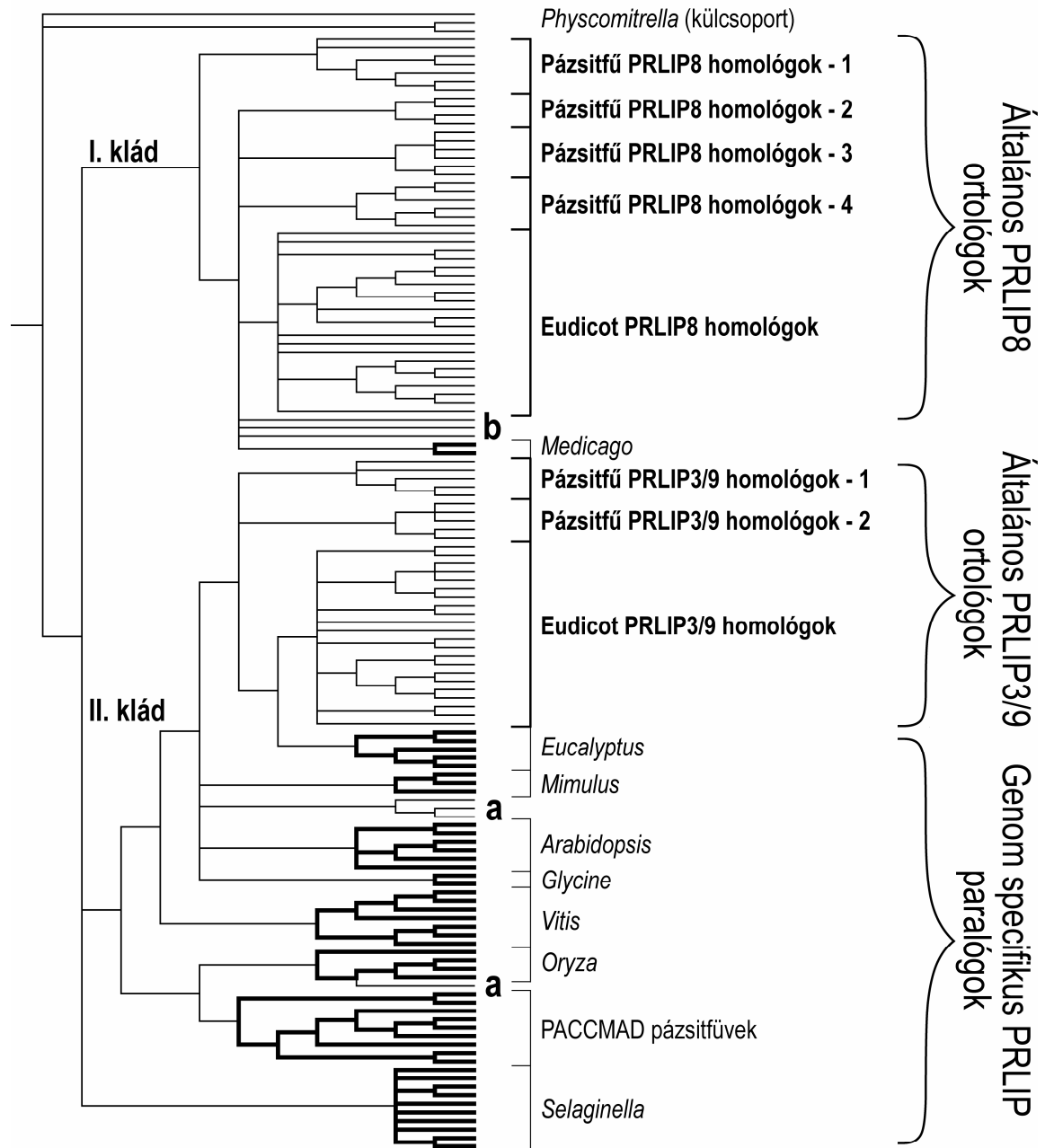
5.4. PRLIP homológok távoli rokon növényfajokban

Ahogy az a két taxonómiaiailag közeli rokon *Arabidopsis* faj esetében megfigyelhető, mindössze 5 millió évnyi független evolúció (Lysak és mtsai., 2006) is elég volt ahhoz, hogy jelentős különbségek alakuljanak ki a *PRLIP* génklaszterek között. Szerettük volna

azonban távolabbi taxonómiai szinteken is rekonstruálni a géncsalád evolúcióját, ezért átvizsgáltuk a jelenleg hozzáférhető (2011. október) 25 növényi genomot a Phytozome adatbázisban (<http://phytozome.net>) és azonosítottuk a PRLIP fehérjék homológjait. A BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) keresések eredményeit tüzetesen ellenőriztük, hogy kiszűrjük az adatbázis hibákat (pl. hibásan prediktált exon-intron szerkezetek), redundanciákat stb. A szekvencia illesztés pontosságát több esetben sikerült növelnünk azzal, hogy manuálisan ellenőriztük a számítógép által prediktált exon-intron határokat. A PRLIP fehérjék erősen konzervált másodlagos szerkezettel rendelkeznek, amelynek fontos részei a katalitikus egység kialakításában résztvevő konzervált helyzetű aminosavak (egy béta-lemez és egy alfa-hélix). Mindezek elengedhetetlenek a lipáz aktivitáshoz, így a számítógépes programok által prediktált részleges fehérje szekvenciákat is manuálisan ellenőriztük, hogy nem rendelhető-e mégis hozzájuk teljes nyílt leolvasási keret (ORF - Open Reading Frame). Végül mindazokat a protein szekvenciákat, amelyek töredékeknek bizonyultak és semmiképpen nem kódolhattak intakt, működő lipáz fehérjét eltávolítottuk az illesztésből.

Így összesen 135 teljes hosszúságú PRLIP homológ protein szekvenciát azonosítottunk 23 növényi genomból. A két zöldalga faj esetében (*Volvox carteri*, *Chlamydomonas reinhardtii*) nem tudtunk egyértelmű PRLIP ortológokat azonosítani. A filogenetikai vizsgálathoz a *Physcomitrella patens* lombosmoha három PRLIP fehérjéjét alkalmaztuk külcsoportként, a belcsoportot pedig a Tracheofita növények szekvenciái alkották (11. ábra). A *Selaginella moellendorffii* szekvenciák jelentkeztek alapi helyzetben a törzsfán, a zárwatermők szekvenciái pedig két nagy kládot alkottak. Mindkét nagy klád esetében a terminális ágakon többféle zárwatermő növények PRLIP fehérjéjét találtuk. Az első ilyen csoportba került az *Arabidopsis* PRLIP8 szekvencia, míg a másodikba a PRLIP3 és a PRLIP9 szekvenciák. Megállapítottuk tehát, hogy ezeknek az ősi proteineknek az ortológjai minden megszekvenált zárwatermő genomban megtalálhatóak, így „általános” PRLIP fehérjéknek neveztük őket. A PRLIP9 fehérje a PRLIP3 fehérje *Arabidopsis*-ban kialakult egyedi paralógja, így a fehérjét a továbbiakban PRLIP3/9-ként említjük. Érdekes jelenség hogy a pázsitfűvek genomjaiban általában négy paralóg PRLIP8 szekvencia és két PRLIP3/9 szekvencia figyelhető meg. A törzsfa többi ágára olyan csoportok kerültek, amelyek szinte kizárólag egy-egy adott növényfajból származó PRLIP szekvenciákat tartalmaznak. Hét ilyen klád különíthető el a filogenetikai fán, amelyek az *Oryza sativa* (4 szekvencia), *Sorghum bicolor* (3 szekvencia), *Setaria italica* (6 szekvencia), *Vitis vinifera* (7 szekvencia), *Glycine max* (2 szekvencia), *Arabidopsis thaliana* (6 szekvencia), *Mimulus*

guttatus (3 szekvencia), *Eucalyptus grandis* (5 szekvencia) és a *Medicago truncatula* (2 szekvencia) növényekből származó szekvenciákat tartalmaznak. Az általános *PRLIP* génekkel szemben ezen fehérjék génei általában egy génklaszterben lokalizálódtak az *Arabidopsis PRLIP* klaszterekhez hasonlóan (ez alól csak a *Mimulus* és a *Glycine* specifikus *PRLIP* gének kivételek, amelyek sporadikusan fordulnak elő a genomokban).



11. ábra. A szekvenált növényi genomokból származó, azonosított PRLIP fehérjék hasonlósági viszonyait bemutató egyszerűsített kladogram. Vastag vonalak jelölik a genomok specifikus PRLIP szekvenciáit tartalmazó kládokat, amelyeknél azoknak a növényeknek/növénycsoportoknak a neveit is feltüntettük, amelyekből származnak. Az a és b betűkkel jelölt csoportok parafiletikus kládokat jelölnek, amelyek részletes magyarázata a szövegben található. A részletes kladogramot a hozzáférési számokkal és a bootstrap támogatottsági értékekkel ld Az 1. Mellékletben.

Ez az elrendezés egymástól függetlenül megvalósult többszörös génduplikációs eseményeket sejtet, amely még a *Selaginella* esetében is jól megfigyelhető, ugyanis itt találjuk a legnagyobb *PRLIP* génklasztert, amely kilenc paralóg gént tartalmaz. Összességében ilyen specifikus *PRLIP* géneket tartalmazó csoportot, a 23 vizsgált növényi genomról 9 esetben sikerült kimutatnunk. Ezek mindegyike a második nagy kládon lokalizálódik és csak egy, a *Medicago truncatula* specifikus *PRLIP* fehérjéi jelentkeznek az első nagy kládon. Érdekes továbbá, hogy egyedi *PRLIP* szekvenciák (amelyek nem homológok sem a *PRLIP8* sem a *PRLIP3/9* proteinekkel) is megfigyelhetőek a *Brachypodium distachyon*, a *Manihot esculenta* fajok és a két *Citrus* faj esetében is (egy-egy szekvencia minden faj esetében). Feltételezhető, hogy ezekben az esetekben a génduplikációs események még nem következtek be, ezért ezek a fehérjék parafiletikus kládokat alkotnak az előbbi az *Oryza* szekvenciákkal, az utóbbi három pedig egymással (a 11. ábrán a-val jelzett kládok). Mindezek tükrében megállapítható, hogy a géncsalád első jellemzése során vizsgált *PRLIP1*, *PRLIP2*, *PRLIP4*, *PRLIP5*, *PRLIP6* és *PRLIP7* gének által kódolt fehérjék is egy ilyen egyedi, az *Arabidopsis thaliana*-ra specifikus szekvencia csoportot alkotnak. Érdekes továbbá, hogy több fajban egyáltalán nem találtunk ilyen specifikus *PRLIP* szekvenciákat, kizárólag a általános *PRLIP* fehérjék ortológjait. Ezek a fajok a *Zea mays*, a *Populus trichocarpa*, a *Cucumis sativus*, a *Carica papaya*, a *Prunus persica*, az *Aquilegia coerulea* és a *Ricinus communis*. A törzsfán b-vel jelöltük a *Mimulus guttatus* *PRLIP8* szekvenciáit, amelyek egy *Glycine* szekvenciával együtt kívül esnek az Eudicot növények *PRLIP8* ortológjainak csoportjától.

5.5. A szőlő *PRLIP* gének expressziós vizsgálata

Ahogy a szekvencia vizsgálataink rámutattak, a *PRLIP* gének széles körben előfordulnak a növényvilágban (más szervezetekben viszont nem sikerült azonosítanunk homológ szekvenciákat). Szerettük volna összehasonlítani a részletesen vizsgált *Arabidopsis PRLIP* géneket egy rendszertanilag távol álló növényfaj ortológ génjeivel, különösen a stressz folyamatokhoz köthető génextpressziós változások tekintetében. A vizsgálatainkat a szőlő (*Vitis vinifera*) modellnövényen végeztük.

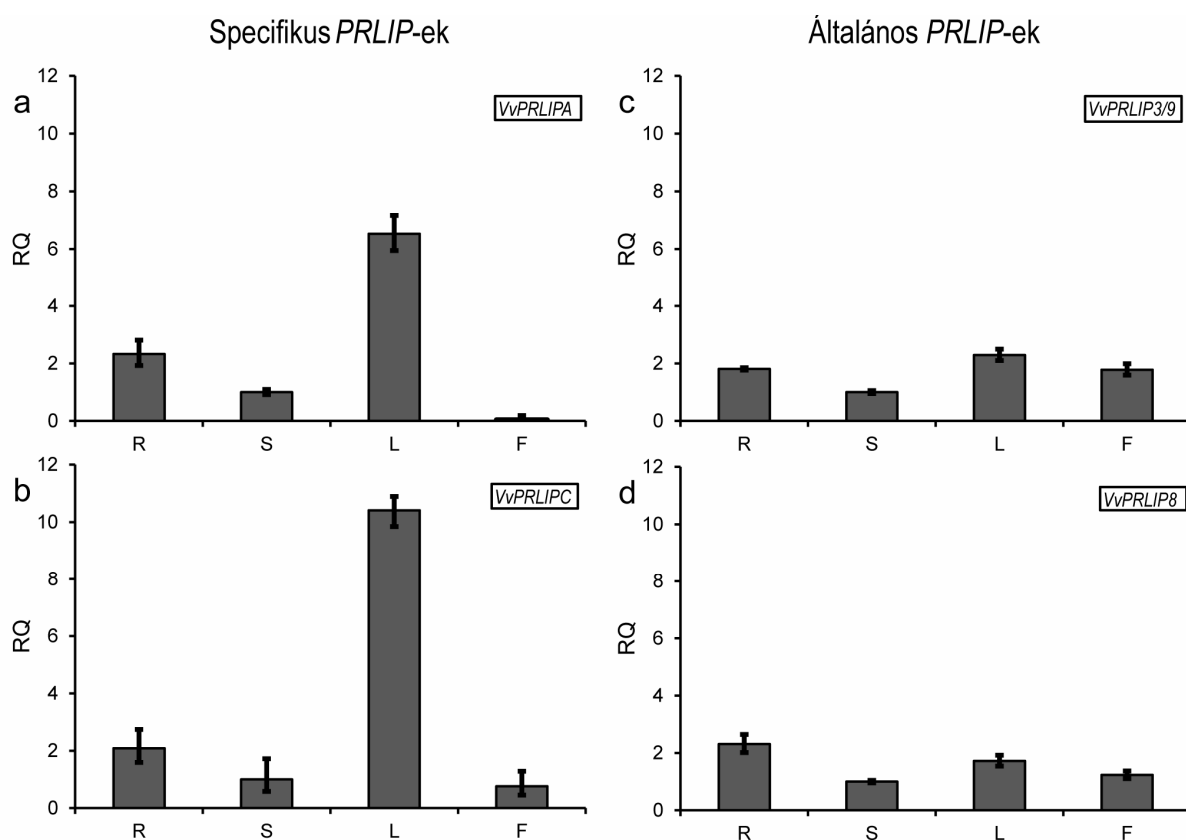
A szőlő (*Vitis vinifera*) genom elsődleges adatbázisa a Genoscope adatbázis (<http://www.genoscope.cns.fr/spip>), amely a Pinot Noir fajta teljes genom szekvenciáját tartalmazza, jelenleg 12x-es lefedettségben meghatározva. A gének hozzáférési számai GSVIVT01 kezdetűek, megkülönböztetendő az adatbázis korábbi verziójában alkalmazott

GSVIVT00 kezdetű azonosítóktól. A *PRLIP* génekre vonatkozó automatikus génpredikciók azonban nagyon sok hibát tartalmaztak, sőt azt is megfigyeltük, hogy a korábbi, 8x-os lefedettségben megszekvenált genom adatbázisban sokkal pontosabban sikerült a *PRLIP* kódoló régiókat meghatározni. Mindezek alapján végül egy harmadik adatbázist, az NCBI MapViewer-t (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview) elemeztünk, amely sokkal pontosabb adatokat tartalmazott a szőlő *PRLIP* gének szekvencia adatait illetően. Három gén esetében további manuális génpredikcióval/annotációval korrigáltuk az adatbázisban található *PRLIP* homológokat. A korrigált szekvenciákat a 2. Mellékletben tüntettük fel.

Összességében a *Vitis* genomban egy-egy kópia található az általános *PRLIP* génekből, amelyeket *VvPRLIP8* és *VvPRLIP3/9*-nek neveztünk. A 16. kromozómán található továbbá egy specifikus, *VvPRLIP* géneket tartalmazó génklaszter is. Összesen hét lókuszt található ebben a génklaszterben, amelyek DNS szinten erős homológiát mutatattak más növények *PRLIP* génjeivel. Ezeket *VvPRLIPE*, *VvPRLIPA*, *VvPRLIPF*, *VvPRLIPC*, *VvPRLIPG*, *VvPRLIPD* és *VvPRLIPB* nevekkel jelöltük (10B ábra), hogy megkülönböztessük őket az *Arabidopsis* specifikus *PRLIP* génektől (amelyeket korábban számokkal jelöltek). A *VvPRLIPG* lókuszt egy csonka *PRLIP* gén, amelyhez az adatbázis nem rendelt kódoló régiót. A vizsgált szőlő *PRLIP* gének azonosító számait a 3. Táblázat tartalmazza.

Kérdéses volt azonban, hogy a három prediktált gén, vagy esetleg a többi *PRLIP* homológ régió közül, amelyek transzkriptálódnak ténylegesen és megjelennek mRNS szinten is. Ennek vizsgálatára terveztünk egy univerzális primert (*VvUNIV*), amelynek segítségével képesek voltunk amplifikálni bármely *PRLIP* homológ régiót a hét közül. A kapott PCR fragmenteket klónoztuk, majd szekvenáltuk, így megbizonyosodtunk róla, hogy az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között a hét potenciális specifikus *PRLIP* homológ régióból csak kettő – *VvPRLIPA* és a *VvPRLIPC* – transzkriptálódik az általunk vizsgált mintákban. A vizsgálatunkat különböző szervekből származó, illetve fertőzött és fertőzetlen levélmintákon is elvégeztük. Megbizonyosodtunk róla továbbá, hogy az univerzális primer genomi DNS mintáról képes volt amplifikálni a többi *PRLIP* homológ régiót is. Megjegyzendő azonban, hogy a többi *VvPRLIP* paralóg gén is expresszáldhat bizonyos, általunk nem vizsgált szövetekben vagy speciális körülmények között, illetve a *VvPRLIPA* és a *VvPRLIPC* templátok erős kompetíciója is okozhatta, hogy nem sikerült a többi specifikus *VvPRLIP* gént transzkripció szinten ezzel a módszerrel detektálnunk.

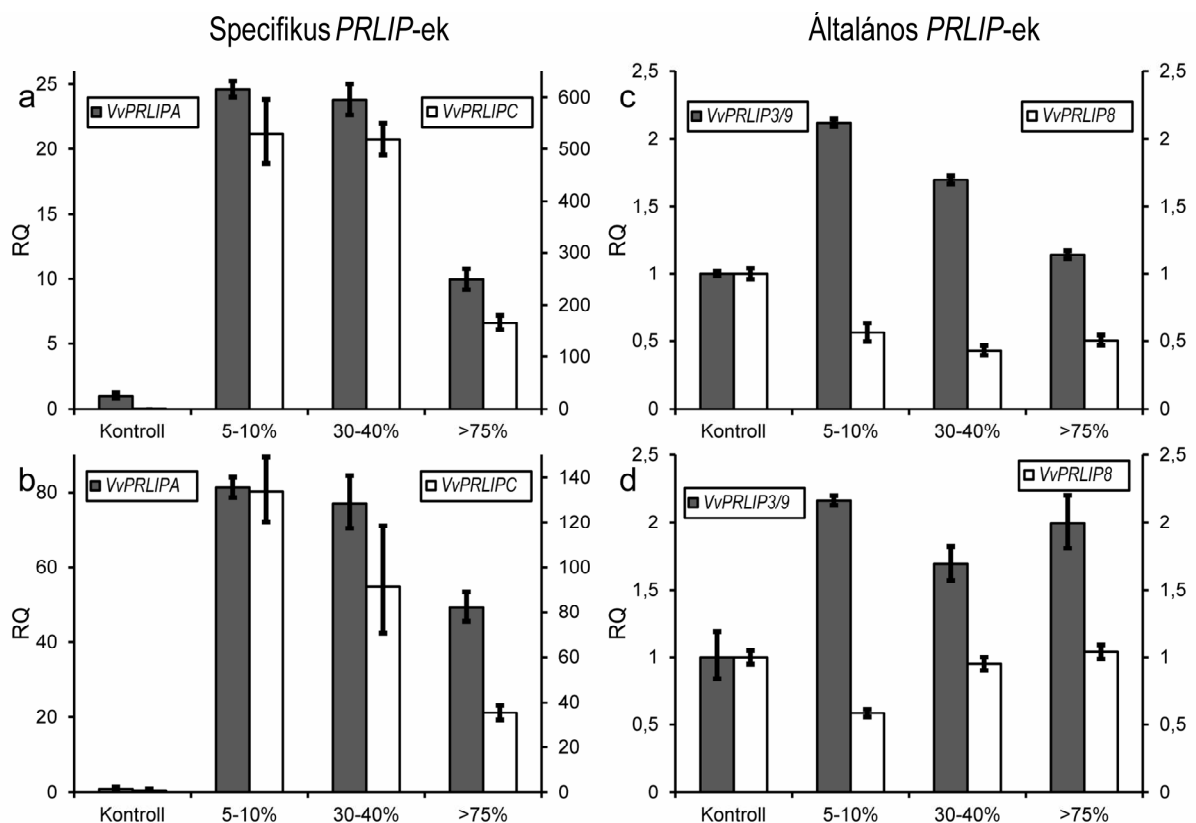
Expressziós vizsgálataink során elsőként a *VvPRLIP* gén transzkripció különbségeit mértük meg a kezeletlen szőlő növények különböző szerveiben. Az általános *PRLIP* gének közül mind a *VvPRLIP8*, mind a *VvPRLIP3/9* gének viszonylag egyenletes transzkripció szintet mutattak a vizsgált szövetekben, a legnagyobb mért különbség is mindössze 2,5-szeres érték volt (12. ábra). Ezzel szemben a specifikus szőlő *PRLIP* gének sokkal kifejezettebb különbségeket mutattak az alapexpressziós értékeikben, mintegy 160-szoros különbséget is detektáltunk a *VvPRLIPA* gén esetében a virágok és a levelek között (12a ábra, L és F minták hányadosa). Mindkét specifikus gén a levelekben fejeződik ki a legerőteljesebben.



12. ábra. A szőlő (*V. vinifera*) *PRLIP* gének szerv specifikus expressziója Pinot Noir szőlőfajtában. RQ: relatív génextpresszió. A vizsgált növényi szervek: gyökér (R), szár (S), levél (L) és virág (F).

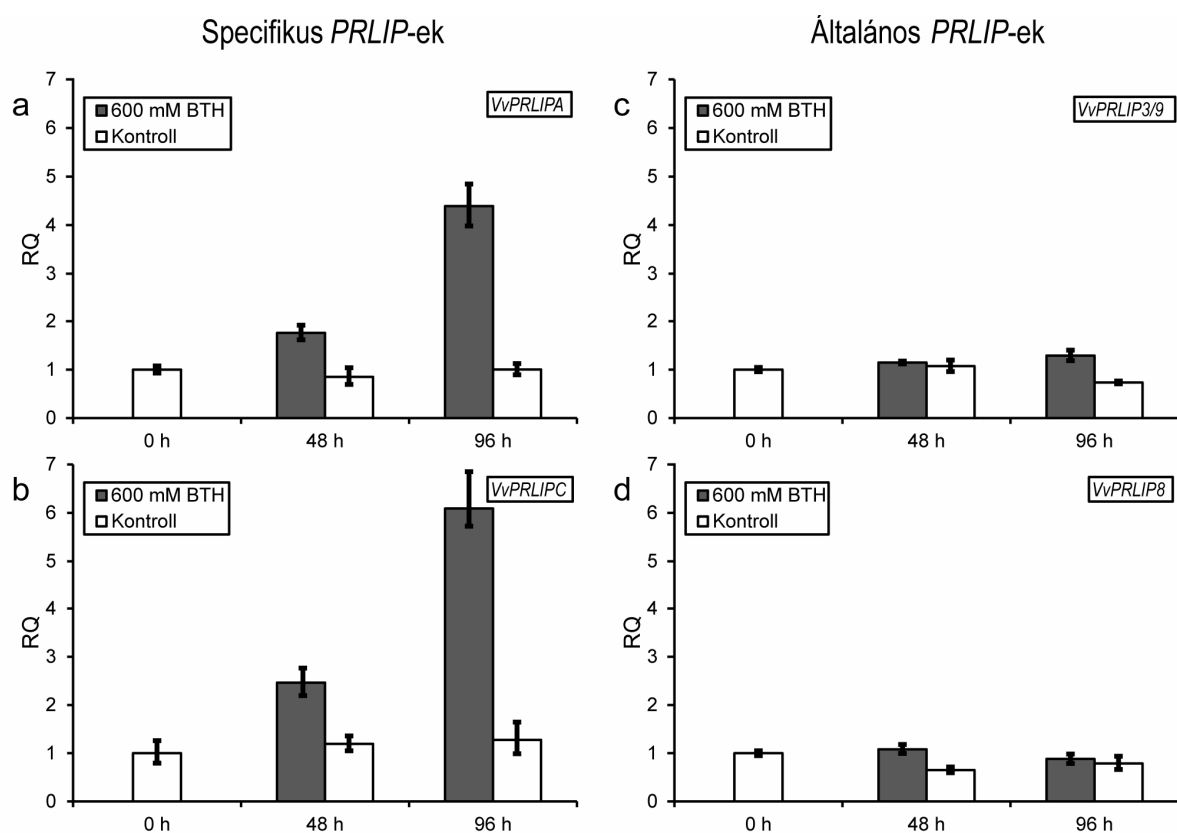
Megvizsgáltuk továbbá, hogy a szőlő *PRLIP* géncsalád tagjai mennyire köthetők különböző stressz folyamatokhoz, ezért megmértük a szőlő *PRLIP* gének expressziós változásait különféle stressz-hatásoknak kitett levelekben. Elsőként a Pinot Noir és a Cabernet Sauvignon szőlő fajták lisztharmattal (*Erysiphe necator*) fertőzött leveleit dolgoztuk fel. Vizsgálataink során a különböző mértékben fertőzött levelekben mértük meg az expressziós különbségeket, az egészséges leveleket pedig kontrollként használtuk. Megfigyeltük, hogy a specifikus *VvPRLIP* gének expressziója markánsan emelkedett a

fertőzés hatására mindkét szőlő fajtában. A gyenge fertőzés majdnem 25-szörös (a Pinot Noir fajta esetében), illetve 80-szoros (a Cabernet Sauvignon fajta esetében) emelkedést okozott a *VvPRLIPA* gén mRNS szintjében, míg a *VvPRLIPC* ennél is magasabb, mintegy 500-, illetve 125-szörös indukciót mutatott az egyes fajtákban (13a és 13b ábra). Az erős fertőzöttség azonban mindkét gén esetében csökkentette a transzkripciós szinteket, bár azok még így is jóval meghaladták az egészséges levelekben mértéket. Ennek valószínű oka, hogy a nagyarányú lisztharmatfertőzés olyan egyéb szeneszcencia-szerű folyamatokat indít el, amelyek globális génextpresszió csökkenést okoznak, és ez már hatással van a belső kontrollként alkalmazott elongációs faktor gén megnyilvánulására is. Az általános *PRLIP* gének megnyilvánulásában viszont jóval gyengébb különbségeket figyeltünk meg (13c és 13d ábra). A két szélső értéket a *VvPRLIP8* gén mutatja, amelynek mRNS szintje 0,5-szeres csökkenést mutatott a fertőzés hatására (a Pinot Noir fajtában), illetve a *VvPRLIP3/9*, amely maximálisan is csak 2-szeres indukciót mutat a gyengén fertőzött szőlőlevelekben. Összességében ezek a különbségek szinte elhanyagolhatóak a specifikus *PRLIP* gének expressziójában bekövetkezett erőteljes emelkedéshez viszonyítva.



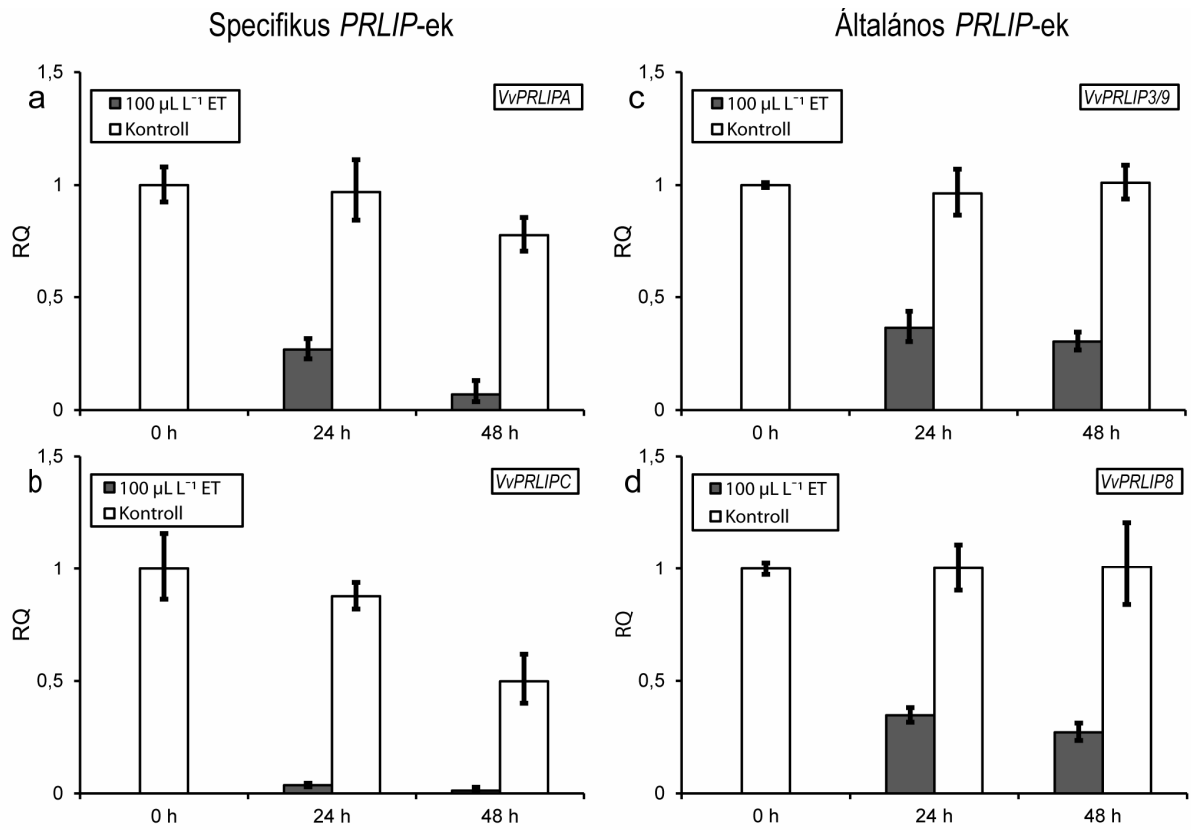
13. ábra. A szőlő (*V. vinifera*) *PRLIP* gének expressziós változásai lisztharmat fertőzés hatására. RQ: relatív génextpresszió. A százalékos értékek a fertőzött levélfelszín hozzávetőleges arányát reprezentálják. Az a és c grafikonok a Pinot Noir, a b és d grafikonok pedig a Cabernet Sauvignon szőlő fajtában mért értékeket ábrázolják. A bal oldali skálák a *VvPRLIPA* (a,b), illetve a *VvPRLIP3/9* (c,d) gének expressziós változásait, a jobb oldali skálák a *VvPRLIPC* (a,b), illetve a *VvPRLIP8* (c,d) gének expressziós változásait reprezentálják.

A megfigyelt jelenségeket laboratóriumi körülmények között hajtattott szőlővesszőkön is megvizsgáltuk, amelyeket különböző rezisztencia folyamatokat indukáló kémiai ágensekkel kezeltünk. Ezeket a vizsgálatokat a Pinot Noir szőlőfajtán végeztük, mert ennek a fajtának ismert és nyilvános a teljes genom szekvenciája. Minthogy a lisztharmat fertőzés szőlőben a SA szignálutat indukálja, a kísérleti növényeken az útvonal mesterséges induktorát, a BTH kezelést alkalmaztuk. A fertőzéshez hasonlóan ebben az esetben is megfigyelhető mindkét specifikus *VvPRLIP* gén indukciója (igaz alacsonyabb mértékben), míg az általános *PRLIP* géneknél, csak gyenge, vagy nem szignifikáns fluktuációkat figyelhettünk meg az mRNS szintekben (14. ábra).



14. ábra. A szőlő (*V. vinifera*) *PRLIP* gének expressziós változásai BTH kezelés hatására Pinot Noir szőlőfajta leveleiben. RQ: relatív génextresszió. Az időpontok a kezelés időtartamát jelölik.

A kísérleti növényekben indukáltuk a SA jelátviteli útvonallal antagonisztikus rezisztencia utat is, az ET/JA szignálutat ET kezeléssel. Az ET az összes szőlő *PRLIP* génextressziós szintjét csökkentette, de a specifikus *PRLIP* gének bizonyultak rá a legérzékenyebbeknek (15. ábra). Az általános *PRLIP* gének expressziós értéke ezzel szemben mintegy 30%-ra csökkent a két napos kezelés végére.



15. ábra. A szőlő (*V. vinifera*) PRLIP gének expressziós változásai ET kezelés hatására Pinot Noir szőlőfajta leveleiben. RQ: relatív génextpresszió. Az időpontok a kezelés időtartamát jelölik.

6. Az eredmények megvitatása

Munkánk során a *PRLIP* géncsalád átfogó molekuláris szintű karakterizálását tűztük ki célul. Elsőként lúdfű modellnövényben vizsgáltuk a korábban még nem jellemzett *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* gének expressziós tulajdonságait, különös tekintettel a stressz helyzetekben detektálható indukciós változásokra, valamint a szövetspecifikus expresszióra nézve. Szekvencia vizsgálatainkkal rekonstruálni kívántuk a géncsalád evolúcióját más növényfajokban és különböző növénycsoportokban. Ahhoz, hogy megerősítsük a *PRLIP* gének stresszválaszokhoz való kötődését egy másik növényfajban, a szőlőben (*Vitis vinifera*), kísérletesen is megvizsgáltuk mennyire köthetők patogén válaszokhoz a szőlő *PRLIP* géncsaládjának egyes tagjai. Eredményeinkkel igazolni szeretnénk, hogy az eddigi adataink alapján a *PRLIP* gének és az általuk kódolt fehérjék alkothatnák a PR családok egy új tagját.

6.1. A *PRLIP* géncsalád Arabidopsisban

A patogenezishez köthető fehérjék szerte a növényvilágban elterjedtek. A legutóbbi összefoglaló munka szerint 17 csoportba sorolhatók a biológiai és biokémiai tulajdonságaik alapján. A nevezéktanjuk körüli anomáliák kiküszöbölésére jelenleg az indukálható védelemhez köthető fehérjék (inducible defense related proteins) kifejezés javasolt (Van Loon és mtsai., 2006), bár ezt az elnevezést jelenleg sem használja minden szerző. A különböző növényi stresszhormonok, mint a SA, az ET és a JA eltérő módon szabályozzák a legtöbb ilyen fehérje expresszióját. Számos esetben megfigyelték, hogy az egy családba tartozó fehérjék a különböző (akár antagonisztikus hatású) stresszhormonok szabályozó hatása mellett, eltérő mértékben fejeződnek ki az egészséges növények különböző szöveteiben és szerveiben is (Van Loon és mtsai., 2006). Az általunk elsőként lúdfűben leírt és jellemzett *PRLIP* géncsalád tagjainak transzkripciós mintázata sok tekintetben hasonlít más korábban jellemzett génekhez, amelyek patogenezishez köthető fehérjéket kódolnak. Eredményeink alapján a korábban vizsgált *PRLIP1*, *PRLIP2*, *PRLIP4*, *PRLIP5* és *PRLIP7* gének, és a jelenleg vizsgált három másik gén, különbözőképpen reagál a stresszhormon kezelésekre, és kezeletlen Arabidopsis növények szerveiben is eltérő arányban nyilvánulnak meg. Az előbbi öt gén tipikusan „indukálható gén”, azaz gyenge alapexpressziót mutat kezeletlen növényekben, vagy szelektíven, csak bizonyos szervekben aktív. Monofiletikus eredetüket nemcsak a szekvenciájukban megfigyelhető

hasonlóság mutatja, hanem az exon-intron szerkezetük is, különösen a kódoló régióban lévő második intron erősen konzervált pozíciója, amely a másik három paralógnál egyáltalán nem található (*PRLIP8*, *PRLIP3*), vagy eltérő pozícióban van (*PRLIP9*). Érdekes jelenség továbbá, hogy az 5' nem transzlálódó régióban lokalizálódó további intronok is megfigyelhetők, amelyet a későbbi vizsgálatainkban más fajok ortológ szekvenciáiban is megtaláltunk. Ez a sajátos régió fontos szerepet tölthet be a mögötte álló gén szabályozásában (Chung és mtsai., 2006). A *PRLIP3*, *PRLIP8* és *PRLIP9* gének mindegyike magasabb alapexpressziót mutat a vizsgált szövetekben, mint a többi paralóg gén a géncsaládban. Noha kisebb szervspecifikus eltérések itt is előfordulnak, megnyilvánulásuk inkább konstitutívnek tekinthető. Érdekes továbbá, hogy a *PRLIP5* és a *PRLIP7* géneket ez idáig egyik vizsgálat során sem sikerült mRNS szinten detektálni, így lehetséges, hogy ezek inkább pszeudogének és valószínűleg a promóter régiójuk hiányzik. Aminosav szinten vizsgálva a PRLIP fehérjéket, egy-egy jellegzetes GX SXG aminosav mintázattal jellemezhető 3-as típusú lipáz domént hordoztak. A PRLIP család tagjai ennek megfelelően a 3-as típusú lipáz enzimekkel mutatnak homológiát, és egy monofiletikus eredetű, jól körülhatárolható csoportot alkotnak a lúdfű 3-as típusú lipázai között, amit összehasonlító elemzéseink igazoltak.

6.2. Genom specifikus *PRLIP* gének indukciója stressz hatására

Kutatásaink során a géncsalád molekuláris evolúciós fejlődését is tanulmányoztuk ismert genom szekvenciájú növényekben. Eredményeink rámutatnak, hogy a PRLIP homológ szekvenciák két nagy csoportba sorolhatók az aminosav sorrendjükben detektálható hasonlóság alapján. Az első csoportba nagyszámú szekvencia került, amelyek mind az *Arabidopsis* *PRLIP8* protein szekvenciájával mutattak homológiát. A második nagy csoport tartalmazza a lúdfű *PRLIP3* és *PRLIP9* fehérjéit, valamint specifikus alcsoportokat amelyek egy-egy fajból származó paralóg szekvenciákból állnak (11. ábra). Az ezeket a fehérjéket kódoló gének általában génklaszterekben rendeződtek, tagjaik pedig jóval inkább hasonlítanak egymásra, mint az azonos növény genomjában jelenlévő *PRLIP8*, *PRLIP3* és *PRLIP9* homológok, vagy más növények ortológ *PRLIP* szekvenciái. Ennek fényében a korábban leírt és részletesen jellemzett *PRLIP1*, *PRLIP2* és *PRLIP6* fehérjéket kódoló gének, – a melyek több tulajdonságukban is nagyon hasonlóak az indukálható védelemhez köthető fehérjékhez –, valószínűleg egy ilyen specifikus csoportot alkotnak és így egyedinek tekinthetők az *Arabidopsis* genomra. Hipotézisünk szerint tehát ezek a specifikus gének a

növény - patogén kölcsönhatás valamely folyamatában vehetnek részt, és potenciálisan a növény védelmi rendszerét szolgálják. Ezt a feltételezésünket egy másik modellnövény a szőlő *PRLIP* génjeinek vizsgálatával szeretnénk igazolni. A szőlő genomában két specifikus *PRLIP* gént tudunk mRNS szinten is detektálni, amelyeket *VvPRLIPA* és *VvPRLIPC* nevekkel jelöltünk. Megállapítottuk, hogy ezen gének mindegyike erőteljesen indukálódott mind a Pinot Noir, mind a Cabernet Sauvignon szőlőfajták esetében lisztharmat fertőzés hatására. Minthogy a lisztharmat kórokozója szőlőben a SA szignál utat aktiválja, a SA analóg BTH kezelés hatására is indukciót figyeltünk meg ezen specifikus *PRLIP* gének megnyilvánulásában. Érdekes jelenség tehát, hogy noha a specifikus *PRLIP* gének mind a lúdfű, mind a szőlő esetében egymástól függetlenül alakultak ki (tandem génduplikációs események során), mindkét faj esetében találunk SA szignál hatására indukálódó tagokat. Ezek tehát az *AtPRLIP1* és *AtPRLIP2* gének Arabidopsisban, amelyek SA, BTH és *P. syringae* fertőzés hatására indukálódnak, illetve a *VvPRLIPA* és *VvPRLIPC* gének a szőlő genomában, amelyek megnyilvánulását a BTH és a lisztharmat fertőzés is erőteljesen serkenti. Másfelől különbségek is megfigyelhetők a két fajspecifikus *PRLIP* génjeinek működésében. ET kezelés hatására ugyanis az *AtPRLIP1* megnyilvánulása fokozódik, az *AtPRLIP2* nem változik számottevően, ellenben a szőlő specifikus *PRLIP* génjeinek mRNS szintjei drasztikusan csökkennek ET kezelés hatására.

Kézenfekvőnek tűnik tehát, hogy a genom specifikus *PRLIP* klaszterek olyan paralóg géneket tartalmaznak, amelyek evolúciós értelemben később alakultak ki és ez okozza erős szekvencia szintű hasonlóságukat. Más magyarázat is lehetséges azonban a magas fokú intraspecifikus (vagy intragenomiális) hasonlóságra, mégpedig az összehangolt evolúció (concerted evolution) lehetősége (Liao 1999). Régóta ismert, hogy ez a jelenség (amelynek mára molekuláris alapjai is ismertek) erősen befolyásolhatja a klaszterekben rendeződött gének molekuláris evolúcióját (Sharp és Li 1987). A PR családok közül a PR-10 csoport tagjai esetében állnak rendelkezésre kísérleti bizonyítékok a jelenségre. Kladisztikai bizonyítékot találtak a *Betula* fajok *PR-10* génjeinek összehasonlító vizsgálatakor az összehangolt evolúció hatására (Schenk és mtsai., 2009), csakúgy mint a szőlő *PR-10* gének esetében (Lebel és mtsai., 2010). Ugyancsak megfigyelhető, hogy a *Passiflora PR-10* gének molekuláris evolúcióját is befolyásolja az összehangolt evolúció (Finkler és mtsai., 2005). Összességében valószínűnek tűnik, hogy a klaszterezett gének nagy intragenomiális homológiája az összehangolt evolúció és a késői génduplikációs eseményeket követő génszelekció együtt alakítja ki (Lebel és mtsai., 2010), és a két folyamat együttesen alakíthatja, illetve tarthatja fenn az általunk vizsgált genom specifikus

PRLIP gének közötti nagy hasonlóságot is. Mindenesetre a diszfunkciós paralógok (amelyek pszeudogének is lehetnek), illetve a DNS szinten azonosítható szekvencia töredékek, az evolúciós léptékekkel nézve később duplikálódtak, majd szelekción keresztül ment paralóg csoportok független evolúciójára utalnak, ahogy Nei és Rooney (2005) „gén-születés és -halál” modellje alapján valószínűsíthető.

6.3. Az általános *PRLIP* gének ősi csoportja

Kutatásaink során a *PRLIP3*, *PRLIP9* és *PRLIP8* géneket is részletesen vizsgáltuk (a *PRLIP9* gén filogenetikai vizsgálataink alapján a *PRLIP3* gén sajátos paralógja az *Arabidopsis* nemzetségben, így általánosságban *PRLIP3/9*-ként utalunk rá). Eredményeink alapján a specifikus *PRLIP* gének indukálhatóságával szemben ezek a gének erőteljes alap expressziót mutatnak az egészséges, kezeletlen lúdfű növények minden általunk vizsgált szervében. Evolúciós rekonstrukciónk alapján ezek a gének általánosan elterjedtek a növényvilágban és általában 1-2 paralóg génkópia formájában minden szekvenált növényi genomban azonosíthatók. Mindezek alapján általános *PRLIP* géneknek neveztük el őket. Érdekes jelenség, hogy lúdfűben mind a *PRLIP3*, mind a *PRLIP9* gén jelentősen indukálódott konyhasó okozta ozmotikus stressz hatására, az előbbi ezen kívül még JA kezelés hatására is. Összességében azonban a stresszorok hatására bekövetkezett változások jóval mérsékeltebbek voltak a specifikus *PRLIP* gének esetében mérteknél. SA kezelés is csak egy tranzienst indukciót okozott a *PRLIP3* gén megnyilvánulásában, mely csak 6 órával a kezelés után volt kimutatható. Ezzel összhangban a szőlő növények általános *PRLIP* génjei ugyancsak elenyésző változásokat mutattak expressziójukat tekintve stressz-hatásokra. Összességében megállapítható, hogy sem az *AtPRLIP8* gének sem pedig a *VvPRLIP8* gének nem köthetők szorosabban stressz válaszokhoz. Egyik fajban sem figyeltünk meg ugyanis számottevő expressziós választ semmilyen általunk alkalmazott kezelés esetében sem. A szerv specifikus alapexpressziós értékek különbségei is általánosságban sokkal alacsonyabbak voltak az általános *PRLIP* gének esetében, különösen a *PRLIP8* gén esetében *Arabidopsis*-ban, valamint mindkét szőlő általános *PRLIP* gén esetében. Eredményeink alapján feltételezzük tehát, hogy az általános *PRLIP* gének minden növényi genomban jelen vannak és ezek mellett megjelentek egy-egy taxonra nézve egyedi *PRLIP* csoportok is amelyek általában génklaszterekben találhatóak. Ezek valószínűleg az ősi általános *PRLIP* génekből fejlődtek ki méghozzá egymástól függetlenül a különböző taxonokban. Ezek közé az egyedi gének közé sorolható

Arabidopsisban a *PRLIP1*, *PRLIP2*, *PRLIP4*, *PRLIP5*, *PRLIP6*, és *PRLIP7* gén, illetve szőlőben a *PRLIPE*, *PRLIPA*, *PRLIPF*, *PRLIPC*, *PRLIPG*, *PRLIPD* és *PRLIPB* lókuszek. Ezzel szemben valószínűsíthető tehát, hogy léteznek általános *PRLIP* gének is, a *PRLIP8* illetve a *PRLIP3/9* ortológjai, amelyek széles körben megtalálhatóak a különböző zárwatermő növényekben és nem kapcsolhatók szorosabban növény – patogén interakciókhoz – ellentétben a specifikus *PRLIP* génekkel. Mindezek alapján az általános *PRLIP* géneket inkább PR-szerű géneknek (Patogenesis Related-like, PRI) lehet tekinteni Van Loon és mtsai. eredeti nomenklatúrája alapján (Van Loon és mtsai., 2006). Ezekkel a kifejezésekkel jelölték a PR családok azon tagjait, amelyek nem a védekezésben játszanak szerepet, hanem az egészséges növényekben látnak el különböző biokémiai funkciókat. Hasonló érdekes jelenség mutatkozik meg a paradicsom treonin deamináz enzimei esetében. Egy ősi, az elsődleges anyagcsere szempontjából esszenciális, minden növényben jelenlévő TD1 enzimből a *Solanaceae* család néhány tagjában evolveálódott egy második paralóg (TD2), amely patogén támadásra indukálódik és hatékonyan védi a paradicsom növényeket a Lepidoptera kártevők támadásaitól (Gonzales-Vigil és mtsai., 2011).

6.4. A PR gének eltérő indukciója

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a *PRLIP* géncsalád tagjai több tulajdonságukban is erős hasonlóságot mutatnak más, PR fehérjéket kódoló géncsaládok tagjaival. Szembetűnő, hogy az adott géncsalád tagjait igen eltérő hatások indukálják transzkripció szinten. Klasszikus példája a jelenségnek az Arabidopsis *PR-I* géncsalád, ahol mindössze egyetlen paralóg gén indukálódik kórokozó támadás esetén, a többi tagja a géncsaládnak nem köthető stressz válaszokhoz (Van Loon és mtsai., 2006). Ezzel teljesen ellentétesen viselkednek a rizs *PR-I* génjei, amelyek mindegyikét eltérő stressz szignálok indukálják és végeredményben minden paralóg tagnak egy egyedi expressziós mintázata van (Mitsuhara és mtsai., 2008). Igen érdekes az alma *PR-I* géncsaládja, amelynek jelen tudásunk szerint egyik tagja sem indukálódik stresszhatásokra (Bonasera és mtsai., 2006). Ahogy láthattuk a *PRLIP* géncsalád tagjai Arabidopsis és szőlő növények esetében is feloszthatók patogén indukálható, illetve stressz válaszokat alig mutató tagokra. Meglepő, hogy az indukálható tagok közül az *AtPRLIP1* gént két antagonisztikus szignál útvonalat mediáló stressz hormon is indukálja: az ET és a SA is (Jakab és mtsai., 2003). Hasonló jelenséget tapasztaltak a már említett rizs *PR-I* gének körében is különös tekintettel az *OsPRIa* gén

esetében (Mitsuhara és mtsai., 2008). A szőlő specifikus *PRLIP* gének ezzel szemben ellentétesen regulálódnak az antagonisztikus hatású szignálok hatására: a SA analóg BTH növeli, az ET viszont csökkenti a megnyilvánulásukat. Kimutatták továbbá, hogy az Arabidopsisra specifikus *PRLIP6* gén, – amely a SA indukálható *PRLIP1* és *PRLIP2* génekkel egy klaszterben helyezkedik el – MeJA és ET hatására indukálódik, SA vagy BTH kezelés viszont nem befolyásolja az mRNS szintjét. Az eltérő gén reguláció másik aspektusa a szervi, illetve szöveti lokalizációhoz kötött szelektív indukció egészséges növényekben. A jelenség jól ismert több klasszikus PR családban is, így a thaumationok szupercsaládjában (Liu és mtsai., 2010). A stressz hatásokra bekövetkező indukció természetesen ezen gének esetében is megfigyelhető. A lipid transzfer fehérjék génjei is egymástól eltérő patogén választ mutatnak, de a gének szövet specifikus expressziója is jól megfigyelhető paprika növényekben (Jung és mtsai., 2003). További példa a jelenségre a rizs és a búza thionin fehérjéi, amelyek szintén jól megfigyelhető szövet specifikus expressziós szabályozást mutatnak kezeletlen növényekben (Stec 2006). Az általunk vizsgált *PRLIP* gének is eltérő megnyilvánulást mutatnak egészséges növényi szövetekben mindkét vizsgált fajban, így megfigyelhetők gyökér, termés, és levél specifikus tagok egyaránt.

6.5. A PR gének genomi elhelyezkedése

Egy másik érdekes analógia a *PRLIP* gének és más PR családok génjei között a paralóg tagok genomi organizációja. Kimutattuk, hogy a specifikus *PRLIP* gének a legtöbb növényben klaszterekbe rendeződve fordulnak elő. Hasonló a germin-szerű fehérjéket kódoló gének csoportosulása, amelyek árpában mutattak ki (Zimmermann és mtsai., 2006). Az egyes tagok eltérő indukálhatósága ebben az esetben is jól megfigyelhető. A szőlő 21 paralóg *PR-1* homológjából 14 ugyancsak egy génklaszterben található (Li és mtsai., 2011). Tandem elrendezésben helyezkednek el az Arabidopsis és a rizs genomában is egyes *PR-1* gén homológok. Ezen klaszterek tagjai sokkal nagyobb hasonlóságot mutatnak egymással, mint az adott genomában jelenlévő más paralóg *PR-1* génekkel (Van Loon és mtsai., 2006). Érdeemes megemlíteni, hogy ezek a klaszterek gyakran tartalmazzak pszeudogéneket is. Ezt a jelenséget valószínűleg helyi duplikációs események eredményezik, ahogy Lebel és mtsai. (2010) magyarázzák a *PR-10* géncsaláddal kapcsolatos munkájukban.

A génklaszterekbe szerveződött gének operon-szerű struktúrákat alkothatnak eukarióta szervezetekben is. Ez lehetőséget biztosít az adott gének szimultán regulációjára. Klasszikus példa erre a jelenségre *Arabidopsis* növényekben a benzoxazonid di- és triterpének bioszintézise (Osbourn és Field 2009), amelyek a patogének elleni védelemben játszanak szerepet. Behatóan tanulmányozott a thalianol vegyület bioszintézisét mediáló enzimek génklasztere (Field és Osbourn 2008). Érdekes megfigyelés hogy a gének mindegyike hordoz egy H3 lizin 27 trimetilációs helyet, amely lehetőséget ad egy közös, kromatin szintű génregulációra. Yi és Richards (2007) az *RPP5* génklasztert vizsgálta *Arabidopsis*-ban amely rezisztencia géneket kódol. Eredményeik alapján az egyes paralógok transzkripcióját közös mechanizmus szabályozza, amely együttes transzkripció indukción és RNS interferencián keresztül valósul meg. Elméleteik szerint a szimultán transzkripció szabályozás például a lokális kromatin struktúra megváltoztatásával lehetséges, amely szintén együttesen hat a paralóg génekre. Felvetik továbbá, hogy a fordított orientációjú paralógokról antiszensz RNS-ek is képződhetnek, amelyek szintén fontos regulátor elemek lehetnek. Más eukarióta szervezetekben is előfordul, hogy a stressz válaszokban résztvevő gének operon szerű struktúrákba rendeződnek. Éhezés hatására indukálódó gének klaszterét azonosították élesztőben, amelyek valószínűleg egy kromatin szintű gátlás alatt állnak megfelelő tápanyagellátás esetén (Burhans és mtsai., 2006). Összességében elmondható tehát, hogy az azonos biokémiai folyamatban résztvevő enzimek géneinek klaszterezése egy figyelemre méltó regulációs lehetőséget biztosít eukariótákban is, amely akár a stresszválaszokat is felgyorsíthatja. Az *A. thaliana* és a közel rokon *A. lyrata* fajok *PRLIP* génklaszterének összehasonlítása megmutatta, hogy kis léptékű evolúciós változások is jelentős molekuláris szintű különbségeket eredményezhetnek. Ez a mozgékony genetikai elemek jelenlétében, illetve a *PRLIP4* ortológok kópia-számbeli különbségében is megmutatkozik. A jelenség azonban korántsem szokatlan. Egy, a két *Arabidopsis* faj közötti összehasonlító elemzés kimutatta, hogy sok áthelyeződött gént határol az eredeti génkópiából képződött duplikálódott szekvencia (Woodhouse és mtsai., 2010). A kukorica kitináz géneinek vizsgálata kimutatta, hogy közeli fajok esetében is igen különböző szelekciós nyomás hathat az azonos biológiai funkciót betöltő fehérjékre (Tiffin és mtsai., 2004). Ez kedvez a közel rokon fajok közötti, molekuláris szintű különbségek kialakulásához. Egy másik tanulmány rámutat, hogy a tandem módon duplikálódott gének sokkal változatosabbak expressziós mintázatukat tekintve, mint a szegmentális duplikáció során kialakult paralógok (Kliebenstein 2008). A gén duplikáció során képződött *Arabidopsis PRLIP* gének is igen

nagy változatosságot mutatnak. Ezen belül minden paralógnak megvan a saját, karakterisztikus expressziós mintázata, mind stressz-válaszokat tekintve, mind szerv specifikus expresszió tekintetében. Ez lehetőséget biztosíthat a növényi rezisztencia válaszok finomhangolására.

6.6. Taxon specifikus paralóg PR gének a növényvilágban

A harmadik feltűnő hasonlóság a *PRLIP* gének és más növényi PR családok között a taxon specifikus, egyedi paralóg tagok megjelenése különböző növénycsoportokban. Rizs, illetve egyszikű-specifikus tagokat kimutattak a 3-as típusú peroxidáz gének között. Ezek a nagyszámú gént tartalmazó paralóg csoportok általában klaszterekben szerveződnek (Passardi és mtsai., 2004). Az endoglukanáz gének esetében is azonosítottak taxon specifikus géneket az *Arabidopsis* genomban (Libertini és mtsai., 2003). Vingolis és mtsai. (1997) leírták, hogy különböző lipid transzfer proteinek kódoló gén klaszterek ugyancsak egymástól függetlenül alakultak ki különböző növény csoportokban. Ha összehasonlítjuk az *Arabidopsis* és a rizs *PR-1* géncsaládját, meglepő módon a rengeteg paralóg tag közül mindössze egy az, amely mindkét növényben megtalálható ortológ párt alkot. Az összes többi tag az egyszikű/kétszikű fejlődési vonalak szétválása után evolválódott (Van Loon és mtsai., 2006). A genom specifikus *PRLIP* génekhez hasonlóan a defenzin-szerű fehérjék génjei is génklaszterekben csoportosulnak (amelyek a gének tandem duplikációjával jöttek létre) és taxon-, illetve szövet-specifikus alcsoportokba sorolhatók (Silverstein és mtsai., 2005). Eredményeink alapján a *PRLIP* gének különböző, egy-egy genomra specifikus csoportjai is feltehetőleg az ősi *PRLIP8* illetve *PRLIP3/9* génekből alakultak ki és hasonló speciáció során jöttek létre a növényi patogén válaszhoz köthető paralógok. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy nem minden vizsgált genomban azonosíthatunk ilyen specifikus *PRLIP* klasztert, a folyamat úgy tűnik inkább véletlenszerűen, játszódik le. Ez a jelenség sem ismeretlen azonban, ugyanis más PR családok sem fordulnak elő minden növényben. A Bowman-Birk típusú proteináz inhibitorok például csak a pázsitfűvek és a pillangós virágúak családjából kerültek elő (Mello és mtsai., 2003). Összességében az *Arabidopsis* és szőlő növényeken folytatott kísérleteink eredményei egymással összhangban igazolják, hogy a *PRLIP* géncsalád érdemes stresszfiziológiai kutatásokra és a tagjai potenciálisan egy új csoportot alkothatnak a növényi PR családok között. A *PRLIP* család tagjainak soronkövetkező, fehérje szintű vizsgálata minden bizonnyal értékes információkkal szolgál majd a pontos biológiai funkciójuk megértéséhez.

7. Összefoglaló

Különböző indukálható védelmi mechanizmusok már évtizedek óta ismertek növényekben. A szisztémás szerzett rezisztencia (SAR - Systemic Acquired Resistance), a rizobaktérium mediálta indukált szisztémás rezisztencia (ISR - Induced Systemic Resistance) vagy a béta-aminovajsav indukálta rezisztencia (BABA-IR - BABA Induced Resistance) mindegyike aktívan szabályozható mechanizmus, amely hatékonyan védi a növényeket a különböző kórokozókkal szemben. Ezen folyamatok molekuláris hátterének megismerése manapság a növényi stressz fiziológia egyik fontos területe.

A patogenezishez köthető (PR - Pathogenesis Related) fehérjék fontos effektor molekulái ezeknek a védelmi rendszereknek. A PR fehérjék általánosan elterjedtek a növényvilágban és jelenleg 17 PR családra oszthatók a biológiai és a biokémiai tulajdonságaik alapján. Mindeztidáig lipáz enzimeket, vagy lipáz-szerű fehérjéket tartalmazó családot nem sikerült azonosítani, noha számos tanulmány mutatja, hogy ezeknek a fehérjéknek, illetve a lipid eredetű szignáloknak kiemelt szerepe lehet a különböző növényi rezisztencia mechanizmusokban.

A lipázok az észterázokhoz hasonlóan az alfa/béta hidroláz enzimek nagy csoportjába tartoznak. Míg az előbbieket elsősorban hosszú szénláncú lipid molekulákat hidrolizálnak glicerinné és szabad zsírsavakká, az utóbbiak a rövid szénláncú szubsztrátokat részesítik előnyben. Polipeptid láncuk egy jellegzetes motívumot tartalmaz (GXSG).

A *PRLIP* (Pathogenesis Related Lipase) géncsalád tagjai ilyen ún. 3-as típusú lipáz (class 3 lipase) enzimeket kódolnak. A géncsaládot eredetileg *Arabidopsis thaliana*-ban írták le és jellemezték. Az expressziós mintázatok és a patogén válaszok alapján a géncsalád kilenc tagja három csoportba sorolható. Az első csoport tagjai (*PRLIP1*, *PRLIP2* és *PRLIP6*) erősen indukálódnak különböző stresszhormon kezelésekre, illetve patogén támadásra. Ezzel szemben a második csoport tagjai (*PRLIP4*, *PRLIP5* és *PRLIP7*) nem detektálhatóak mRNS szinten, és nem is indukálhatók semmilyen eddig alkalmazott kezeléssel. Mindkét csoport tagjai az ötödik kromoszómán egy génklaszterben helyezkednek el.

Jelen munkánkban megvizsgáltuk a harmadik csoport tagjait (*PRLIP3*, *PRLIP8* és *PRLIP9*), amelyek különböző kromoszómákon elszórtan találhatóak az *Arabidopsis* genomban. Az előbbiekkal szemben, ezen csoport tagjai magasabb szintű, inkább konstitutív expressziót mutatnak minden általunk megvizsgált szövetben. Különböznek az

első csoport tagjaitól olyan szempontból is, hogy a biotikus stresszkezelésekre jóval mérsékeltebben reagálnak transzkripciós szinten. További célunk volt, hogy megvizsgáljuk a géncsalád molekuláris evolúcióját a növényvilágban. Ehhez átvizsgáltuk a nyilvánosan hozzáférhető növényi genom adatbázisokat. A konstitutívan aktív gének (*PRLIP3*, *PRLIP8* és *PRLIP9*) ortológjait minden átvizsgált Eudicot növényi genomban azonosítani tudtuk, ezért „általános” *PRLIP* géneknek neveztük el őket. Ezzel szemben a család többi tagja specifikusan csak az *Arabidopsis* genomban volt megtalálható. Ezen genomi régió gyors molekuláris evolúciós változások színtere, ahogy a két közeli rokon *Arabidopsis* faj *PRLIP* klaszterének összehasonlítása bizonyítja. Hipotézisünk szerint a speciális *PRLIP* gének a növény-mikróba kölcsönhatásokban vesznek részt, ezzel szemben az általános *PRLIP* gének más biológiai funkciókhoz rendelhetők. Ennek tesztelésére kiválasztottunk egy távoli rokon kétszikű növényt, a szőlőt (*Vitis vinifera*), amely ugyancsak rendelkezik specifikus (csak ebben a fajban megtalálható) *PRLIP* génekkel. A specifikus *PRLIP* gének közül kettőt (*VvPRLIPA* és *VvPRLIPC*) sikerült mRNS szinten detektálnunk. Ezek mindegyike erősen indukálódott lisztharmatfertőzés és benzotiadiazol (BTH) kezelés hatására az általunk vizsgált Pinot Noir és Cabernet Sauvignon szőlő fajtákban. Ezzel szemben a *PRLIP3* és *PRLIP8* gének szőlő ortológjai sem a kémiai kezelésre, sem a fertőzés hatására nem mutattak jelentős reakciót. Nem expresszázó géneket mindkét faj (*Arabidopsis*, *Vitis*) vizsgálatokor kimutattunk. Ezek is valószínűleg a gyors adaptív evolúció melléktermékei és pszeudogének is lehetnek. Adataink egy potenciális PR család molekuláris evolúcióját mutatják és több fontos közös tulajdonságra is rámutatnak a már korábban leírt PR családokkal.

8. Summary

Inducible resistance mechanisms in plants have been described for over decades. Systemic acquired resistance (SAR), inducible systemic resistance (ISR) or beta-aminobutyric acid induced resistance (BABA-IR) are active, regulable systems, commonly known to protect plants against different pathogens. Investigation of the molecular background of these processes is particularly still an interesting field of plant stress physiology.

The pathogenesis related (PR) proteins are important effector molecules, of these machineries. PR proteins are commonly found in plants and currently classified into 17 PR families based on biological and biochemical properties, but no family consisting of lipases or lipase-like proteins has been established yet, although recent studies highlight the importance of lipases and lipidic signals in different stress responses of plants.

Lipases, along with esterases, belong to the alpha/beta-hydrolase fold family of enzymes. They preferentially hydrolyze long-chain acylglycerols into glycerols and free fatty acids, while the latter primarily hydrolyze short chain acylglycerols. Their polypeptide chain contains a pentapeptide motif of GX SXG amino acids with an active serine residue.

PRLIP (Pathogenesis Related Lipase) is a gene family encoding class 3 lipase-like proteins originally described and first characterized in *Arabidopsis thaliana*. Nine paralog genes of *Arabidopsis* can be separated into three groups based on expression characteristics and pathogen responses. Group 1 (*PRLIP1*, *PRLIP2* and *PRLIP6*) shows high inducibility to different stress hormones and in response to pathogen attack. In contrast, members of group 2 (*PRLIP4*, *PRLIP5* and *PRLIP7*) are undetectable at transcript level and could not be induced. These genes are clustered on chromosome 5.

In the present study we identified Group 3 containing the remaining genes (*PRLIP3*, *PRLIP8* and *PRLIP9*). They are spread over the genome and are expressed constitutively in all the tested tissues and show only lower transcriptional differences in stress conditions, thus being dissimilar to members of the other 2 groups. Our further goal was also to reconstruct the evolution of this gene family by screening different plant genomes with available sequence information. Orthologs of constitutively active members were found in all angiosperms. Therefore, they are referred to as "core *PRLIPs*", while the clustered genes were only found in *Arabidopsis*. A rapid way of molecular evolution in the *PRLIP* cluster was revealed by comparing homolog genome segments of *A. thaliana* and *A. lyrata*, a close relative species. This suggests that these specific genes have evolved to serve plant pathogen responses, while the core *PRLIPs* are not closely involved in host-

pathogen interactions. Grapevine (*Vitis vinifera*) - as another angiosperm - also possesses such genome specific groups of PRLIP proteins. We therefore assessed the expression patterns of the *PRLIPs* of grapevine. The specific *Vitis PRLIPs*, *VvPRLIPA* and *VvPRLIPC*, were both highly induced in response to powdery mildew infection and chemical inducer treatment in the two grapevine cultivars Pinot Noir and Cabernet Sauvignon. In contrast, the core *VvPRLIP3* and *VvPRLIP8* were only slightly induced by either pathogen attack or the chemical inducers. Disfunctional genes (which can be observed in the *PRLIP* cluster of both species) may be by-products of the rapid adaptive evolution at molecular level. Our data provide new insights into the molecular evolution of a pathogenesis related gene family and might reveal a common scheme of evolution with other inducible defense-related gene families.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak akik segítettek kutatásaimat, mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Jakab Gábor egyetemi tanárnak, valamint kollégáimnak Dr. Szabadfi Krisztinának és Dr. Stranczinger Szilviának a sok önzetlen baráti segítségért. Dr. Fekete Csabának és Dr. Jakab Ferencnek a kísérletekkel kapcsolatos technikai segítségért és tanácsokért, Pálfalvi Gergőnek az ábraanyag elkészítésében nyújtott lelkes közreműködéséért. Dr. Brigitte Mauch-Maninak a publikációk elkészítésében nyújtott kiemelkedő segítségét, Csikászné Dr. Krizsics Annának a lisztharmat-fertőzéssel kapcsolatos kísérletekhez gyűjtött anyagokért, Dr. Teszlák Péternek a szőlőneveléshez adott tanácsaiért, Kuczmog Anettnak a mindennapi laboratóriumi munkában nyújtott önzetlen segítségét. Továbbá kollégáimnak Galambos Anikónak, Németh Viktóriának és Horváth Szabinának is szeretnék külön köszönetet mondani. Köszönöm Dr. Hideg Évának, a statisztikai feldolgozásban nyújtott segítségét és köszönettel tartozom Dr. Gábrriel Róbertnek, aki állást biztosított nekem a doktori munkám befejezéséig.

Szeretnék köszönetet mondani más kutatásokban együttműködő partnereimnek, Dr. Csiky Jánosnak, Dr. Reglődi Dóranak, Dr. Helyes Zsuzsának, Dr. Vadkerti Editnek és Szivák Ildikónak. Köszönöm továbbá családom és barátaim töretlen támogatását.

A munkánkat a TÁMOP 4.2.2/B–10/1–2010–0029 számú pályázata, az OTKA K101430 számú pályázata, a SCOPES program IZ73Z0_128031 számú pályázata, valamint a PTE TTK HÖT pályázata támogatta.

Végül hálás köszönetem Dr. Borbély Györgynek és Dr. Fekete Csabának, hogy előopponensi véleményükkel és hasznos kritikáikkal segítettek a disszertációm megírását, valamint azoknak az ismeretlen bírálóknak, akik publikációink minőségét emelték értékes kritikáikkal.

10. Hivatkozások

Achuo AE, Audenaert K, Meziane H, Höfte M (2002) The SA-dependent defense pathway is active against different pathogens in tomato and tobacco. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet* 67(2):149-157.

Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16(12):3460-3479.

Bari R, Jones JD (2008) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69(4):473-488.

Benhamou N, Kloepper JW, Quadt-Hallman A, Tuzun S (1996) Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol* 112:919-929.

Beckers GJ, Spoel SH (2006) Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biol (Stuttg)* 8(1):1-10.

Bol JF, Linthorst HJM, Cornelissen BJC (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu Rev Phytopathol* 28:113-138.

Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379-406.

Bonasera JM, Kim JF, Beer SV (2006) PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biol* 6:23.

Bowles DJ (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* 59:873-907.

Brederode FT, Linthorst HJ, Bol JF (1991) Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Mol Biol* 17:1117-1125.

Brodersen P, Petersen M, Bjørn Nielsen H, Zhu S, Newman MA, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J (2006) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J* 47(4):532-546.

Burhans DT, Ramachandran L, Wang J, Liang P, Patterton HG, Breitenbach M, Burhans WC (2006) Non-random clustering of stress-related genes during evolution of the *S. cerevisiae* genome. *BMC Evol Biol* 6:58.

Calendini F, Martin JF (2005) PaupUP v1.0.3.1 A free graphical frontend for PAUP* Dos software.

- Camera SL, GeoVroy P, Samaha H, Ndiaye A, Rahim G, Legrand M, Thierry H (2005) A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*. *Plant J* 44:810-825.
- Cameron RK, Paiva NL, Lamb CJ, Dixon RA (1999) Accumulation of salicylic acid and *PR-I* gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato in *Arabidopsis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:121-130.
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X (1994) Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 6(11):1583-1592.
- Chester KS (1933) The Problem of Acquired Physiological Immunity in Plants. *Quart Rev of Biol* 8(3):275-324
- Chung BY, Simons C, Firth AE, Brown CM, Hellens RP (2006) Effect of 5'UTR introns on gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 7:120.
- Creelman RA, Mullet JE (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:355-381.
- Cruickshank IAM, Mandryk M (1960) The effect of stem infestations of tobacco with *Peronospora tabacina* Adam. on foliage reaction to blue mold. *J Aust Inst Agric Sci* 26:369-372.
- Clamp M, Cuff J, Searle SM, Barton GJ (2004) The Jalview Java Alignment Editor. *Bioinformatics* 20:426-427.
- Cohen Y (2002) β -Aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Dis* 86:448-457.
- Conconi A, Miquel M, Browse JA, Ryan CA (1996) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol* 111(3):797-803.
- Conrath U, Pieterse CM, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7:210-216.
- Conrath U (2011) Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci* 16(10):524-531.
- Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8:1793-1807.
- De Meyer G, Audenaert K, Höfte M (1999) *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with *PR1a* expression. *Eur J Plant Pathol* 105:513-517

- Delaney TP, Friedrich L, Ryals JA (1995) Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(14):6602-6606.
- Dixon RA (1986) The phytoalexin response: Elicitation, signaling, and control of host gene expression. *Biol Rev Camb Philos SOC* 61:239-292.
- Doares SH, Narvaez-Vasquez J, Conconi A, Ryan CA (1995) Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol* 108:1741-1746.
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM, Kazan K (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *Plant Cell* 19(7):2225-2245.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32(5):1792-1797.
- Ellis C, Karafyllidis I, Wasternack C, Turner JG (2002) The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* 14(7):1557-1566; Erratum in: *Plant Cell* 14(8):1981.
- Eyal Y, Meller Y, Lev-Yadun S, Fluhr R (1993) A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. *Plant J* 4:225-234.
- Falk A, Feys BJ, Frost LN, Jones JD, Daniels MJ, Parker JE (1999) EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3292-3297.
- Farmer EE, Ryan CA (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4(2):129-134.
- Feys BJ, Wiermer M, Bhat RA, Mosian LJ, Medina-Escobar N, Neu C, Cabral A, Parker JE (2005) Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATE D GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *The Plant Cell* 17:2601-2613.
- Field B, Osbourn AE (2008) Metabolic diversification-independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science* 320(5875):543-547.
- Finkler C, Giacomet C, Muschner VC, Salzano FM, Freitas LB (2005) Molecular investigations of pathogenesis-related Bet v 1 homologues in Passiflora (Passifloraceae). *Genetica* 124(2-3):117-125.
- Flors V, Ton J, Jakab G, Mauch-Mani B (2005) Abscisic Acid and Callose: Team Players in Defence Against Pathogens? *J Phytopathol* 153(7-8):377-383.

Flors V, Ton J, van Doorn R, Jakab G, García-Agustín P, Mauch-Mani B (2008) Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J* 54(1):81-92.

Forouhar F, Yang Y, Kumar D, Chen Y, Fridman E, Park SW, Chiang Y, Acton TB, Montelione GT, Pichersky E, Klessig DF, Tong L (2005) Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1773-1778.

Friedrich L, Lawton K, Dincher S, Winter A, Staub T, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1996) Benzothiadiazole induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J* 10:61-70.

Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43:205-227.

Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negmtto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261:754-756.

Gifford GE, Lohmann-Matthes ML (1987) Gamma interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide. *J Natl Cancer Inst* 78:121-124.

Gonzales-Vigil E, Bianchetti CM, Phillips GN Jr, Howe GA (2011) Adaptive evolution of threonine deaminase in plant defense against insect herbivores. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(14):5897-5902.

Grant M, Lamb C (2006) Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol* 9(4):414-420.

Hamiduzzaman MM, Jakab G, Barnavon L, Neuhaus JM, Mauch-Mani B (2005) β -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Mol Plant Microbe Interact* 18(8):819-829.

Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.

Hayes MP, Freeman SL, Donnelly RP (1995) IFN-gamma priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. *Cytokine* 7:427-435.

Herms S, Seehaus K, Koehle H, Conrath U (2002) A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Physiol* 130(1):120-127.

Hodge S, Thompson GA, Powell G (2005) Application of DL-beta-aminobutyric acid (BABA) as a root drench to legumes inhibits the growth and reproduction of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). *Bull Entomol Res* 95:449-455.

- Hong JK, Choi HW, Hwang IS, Kim DS, Kim NH, Choi du S, Kim YJ, Hwang BK (2008) Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. *Planta* 227(3):539-558.
- Ioannidis JP, Allison DB, Ball CA, Coulibaly I, Cui X, Culhane AC, Falchi M, Furlanello C, Game L, Jurman G, Mangion J, Mehta T, Nitzberg M, Page GP, Petretto E, van Noort V (2009) Repeatability of published microarray gene expression analyses. *Nat Genet* 41(2):149-155.
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okada K (2001) The DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* 13:2191-2210.
- Jaskiewicz M, Conrath U, Peterhänsel C (2011) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep* 12(1):50-55.
- Jakab G, Cottier V, Toquin V, Rigoli G, Zimmerli L, Métraux JP, Mauch-Mani B (2001) β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Europ J Plant Pathol* 107:29-37.
- Jakab G, Manrique A, Zimmerli L, Métraux JP, Mauch-Mani B (2003) Molecular characterization of a novel lipase-like pathogen-inducible gene family of Arabidopsis. *Plant Physiol* 132:2230-2239.
- Jakab G, Ton J, Flors V, Zimmerli L, Métraux JP, Mauch-Mani B (2005) Enhancing Arabidopsis salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol* 139:267-274.
- Jirage D, Tootle TL, Reuber TL, Frost LN, Feys BJ, Parker J E, Ausubel, FM, Glazebrook J (1999) Arabidopsis thaliana PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13583-13588.
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444(7117):323-329.
- Jung HW, Kim W, Hwang BK (2003) Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant Cell Environ* 26(6):915-928.
- Kaliff M, Staal J, Myrenås M, Dixelius C (2007) ABA is required for *Leptosphaeria maculans* resistance via ABI1- and ABI4-dependent signaling. *Mol Plant Microbe Interact* 20(4):335-345.
- Katz V, Thulke O, Conrath U (1998) A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol* 117:1333-1339.
- Katz V, Fuchs A, Conrath U (2002) Pretreatment with salicylic acid primes parsley cells for enhanced ion transport following elicitation. *FEBS (Fed Eur Biochem Soc) Lett* 520:53-57.

- Kauss H (1987) Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* 38:47-72.
- Kauss H, Theisinger-Hinkel E, Mindermann R, Conrath U (1992) Dichloroisonicotinic and salicylic acid, inducers of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *Plant J* 2:655-660.
- Kim KJ, Lim JH, Kim MJ, Kim T, Chung HM, Paek KH (2008) GDA-lipase1 (CaGL1) contributes to wound stress resistance by modulation of CaPR-4 expression in hot pepper. *Biochem Biophys Res Commun* 374(4):693-698.
- Kim K, Zakharkin SO, Allison DB (2010) Expectations, validity, and reality in gene expression profiling. *J Clin Epidemiol* 63(9):950-959.
- Kliebenstein DJ (2008) A role for gene duplication and natural variation of gene expression in the evolution of metabolism. *PLoS One* 3(3):e1838.
- Knoester M, Pieterse CMJ, Bol JF, Van Loon LC (1999) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol Plant-Microb Interact* 12:720-727.
- Koga H, Dohi K, Mori M (2004) Abscisic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection of *Magnaporthe grisea*. *Physiol Mol Plant Pathol* 65(1):3-9.
- Kohler A, Schwindling S, Conrath U (2002) Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 128:1046-1056.
- Koornneef A, Pieterse CM (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol* 146(3):839-844.
- Koerner TJ, Adams DO, Hamilton TA (1987) Regulation of tumor necrosis factor (TNF) expression: Interferon- γ enhances the accumulation of mRNA for TNF induced by lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages. *Cell Immunol* 109:437-443.
- Kuč J (1995) Systemic acquired resistance. *Asp Appl Biol* 42:235-242.
- Kunkel BN, Brooks DM (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 5:325-331.
- Kumar D, Klessig DF (2003) The high affinity salicylic acid binding protein (SABP2) is required for plant innate immunity and has SA-stimulated lipase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:16101-16106.
- Kumar D, Klessig DF (2008) The search for the salicylic acid receptor led to discovery of the SAR signal receptor. *Plant Signal Behav* 3(9):691-692.

- Kwon SJ, Jin HC, Lee S, Nam MH, Chung JH, Kwon SI, Ryu CM, Park OK (2009) GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* 58(2):235-245.
- Laurie-Berry N, Joardar V, Street IH, Kunkel BN (2006) The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 19(7):789-800.
- Lawton K, Uknes S, Friedrich L, Gaftney T, Alexander D, Goodman R, Métraux JP, Kessmann H, Ahl-Goy P, Gut-Rella M, Ward E, Ryals J (1993) The molecular biology of systemic acquired resistance. In *Mechanisms of Defence Responses in Plants*, B. Fritig and M. Legrand, eds (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 422-432.
- Lawton K, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Staub T, Kessmann H, Ryals J (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J* 10:71-82.
- Lebel S, Schellenbaum P, Walter B, Maillot P (2010) Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family. *BMC Plant Biol* 10:184.
- Lee KA, Cho TJ (2003) Characterization of a salicylic acid- and pathogen-induced lipase-like gene in Chinese cabbage. *J Biochem Mol Biol* 36(5):433-441.
- Lee DS, Kim BK, Kwon SJ, Jin HC, Park OK (2009) *Arabidopsis* GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling *Biochem Biophys Res Commun* 379(4):1038-1042.
- Lee SC, Luan S (2012) ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Environ* 35(1):53-60.
- Léon-Kloosterziel KM, Verhagen BW, Keurentjes JJ, VanPelt JA, Rep M, VanLoon LC, Pieterse CM (2005) Colonization of the *Arabidopsis* rhizosphere by fluorescent *Pseudomonas* spp. activates a root-specific, ethylene-responsive PR-5 gene in the vascular bundle. *Plant Mol Biol* 57(5):731-748.
- Li ZT, Dhekney SA, Gray DJ (2011) PR-1 gene family of grapevine: a uniquely duplicated PR-1 gene from a *Vitis* interspecific hybrid confers high level resistance to bacterial disease in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* 30(1):1-11.
- Li J, Brader G, Palva ET (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16(2):319-331.
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* 46(3):477-491.
- Liao D (1999) Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *Am J Hum Genet* 64(1):24-30.

- Libertini E, Li Y, McQueen-Mason SJ (2004) Phylogenetic analysis of the plant endo-beta-1,4-glucanase gene family. *J Mol Evol* 59(5):506-515.
- Linthorst HJM (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit Rev Plant Sci* 10:123-150.
- Liu JJ, Sturrock R, Ekramoddoullah AK (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep* 29(5):419-436.
- Liu PP, von Dahl CC, Klessig DF (2011) The extent to which methyl salicylate is required for signaling systemic acquired resistance is dependent on exposure to light after infection. *Plant Physiol* 157(4):2216-2226.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods* 4; 402–408.
- Lo M, Taylor C, Wang L, Nowack L, Wang TW, Thompson J (2004) Characterization of an ultraviolet B-induced lipase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135:947-958.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15(1):165-178.
- Low PS, Merida JR (1996) The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol Plant* 96:533-542.
- Luna E, Bruce TJ, Roberts MR, Flors V, Ton J (2012) Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol* 158(2):844-853.
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K, Schubert I (2006) Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related *Brassicaceae* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(13):5224-5229.
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I (1990) Salicylic-acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002-1004.
- Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in *Arabidopsis*. *Nature* 419(6905):399-403.
- Mauch-Mani B, Mètraux JP (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Ann Botany* 82:535-540.
- Mauch-Mani B, Mauch F. (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* 8(4):409-414.
- Matos AR, Pham-Thi AT (2009) Lipid deacylating enzymes in plants: Old activities, new genes. *Plant Physiol Biochem* 47(6):491-503.

- Mello MO, Tanaka AS, Silva-Filho MC (2003) Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. *Mol Phylogenet Evol* 27(1):103-112.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126(5):969-980.
- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M (1990) Increase in salicylic-acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250:1004-1006.
- Mitsuhara I, Iwai T, Seo S, Yanagawa Y, Kawahigasi H, Hirose S, Ohkawa Y, Ohashi Y (2008) Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Mol Genet Genomics* 279(4):415-427.
- Mohr P, Cahill D (2003) Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Peronospora parasitica*. *Funct plant biol* 30(4):461-469.
- Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* 140(1):249-262.
- Nakashita H, Yasuda M, Nishioka M, Hasegawa S, Arai Y, Uramoto M, Yoshida S, Yamaguchi I (2002) Chloroisonicotinamide derivative induces a broad range of disease resistance in rice and tobacco. *Plant Cell Physiol* 43(7):823-831.
- Nandi A, Welti R, Shah J (2004) The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene SUPPRESSOR OF FATY ACID DESAT URASE DEFICIENCY1 is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 16:465-477.
- Naranjo MA, Forment J, Roldán M, Serrano R, Vicente O (2006) Overexpression of *Arabidopsis thaliana* LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants. *Plant Cell Environ* 29(10):1890-1900.
- Ndamukong I, Abdallat AA, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R, Gatz C (2007) SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant J* 50(1):128-139.
- Nei M, Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* 39:121-152.
- Oh IS, Park AR, Bae MS, Kwon SJ, Kim YS, Lee JE, Kang NY, Lee S, Cheong H, Park OK (2005) Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *Plant Cell* 17:2832-2847.
- Oka Y, Cohen Y, Spiegel Y (1999) Local and systemic induced resistance to the root-knot nematode in tomato by DL- β -amino-*n*-butyric acid. *Phytopathol* 89:1138-1143.

Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, Sussman JL, Verschueren KHG, Goldman A (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 5(3):197-211.

Osbourn AE, Field B (2009) Operons. *Cell Mol Life Sci* 66(23):3755-3775.

Paponov IA, Paponov M, Teale W, Menges M, Chakrabortee S, Murray JA, Palme K (2008)

Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 1(2):321-337.

Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318:113-116.

Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65(13):1879-1893.

Penninckx IA, Eggermont K, Terras FR, Thomma BP, De Samblanx GW, Buchala A, Métraux JP, Manners JM, Broekaert WF (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323.

Pham LN, Dionne MS, Shirasu-Hiza M, Schneider DS (2007) A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog* 3(3):e26.

Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Sela-Buurlage MB, van den Elzen PJM, Melchers LS, Cornelissen BJC (1994) A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiol* 104:109-118.

Pozo JM, Azcon-Aguilar C (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Opin Plant Biol* 10:393-398.

Pena-Cortes H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191; 123-128.

Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Hoffland E, Van Pelt JA, Van Loon LC (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8:1225-1237.

Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, Van Loon LC (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1571-1580.

Pieterse CMJ, Van Pelt JA, Ton J, Parchmann S, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Van Loon LC (2000) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol Mol Plant Pathol* 57:123-134.

- Rasmann S, De Vos M, Casteel CL, Tian D, Halitschke R, Sun JY, Agrawal AA, Felton GW, Jander G (2012) Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant Physiol* 158(2):854-863.
- Reymond P, Farmer EE (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol* 1:404-411.
- Riemann M, Gutjahr C, Korte A, Riemann M, Danger B, Muramatsu T, Bayer U, Waller F, Furuya M, Nick P (2007) GER1, a GDSL motif-encoding gene from rice is a novel early light- and jasmonate-induced gene. *Plant Biol (Stuttg)* 9(1):32-40.
- Ross AF (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14:340-358.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steine H-Y, and Hunt MD (1996) Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell* 8; 1809-1819.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Paré PW (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134:1017-1026.
- Samac DA, Hironaka CM, Yallaly PE, Shah DM (1990) Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 93:907-914.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA Flors.
- Sandoz L (1991) Plant pathogenesis-related proteins. International application published in the Patent Cooperation Treaty, No. WO. 92/20800. 175-180.
- Schöning JC, Streitner C, Page DR, Hennig S, Uchida K, Wolf E, Furuya M, Staiger D (2007) Auto-regulation of the circadian slave oscillator component AtGRP7 and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation. *Plant J* 52:1119-1130.
- Schenk MF, Cordewener JH, America AH, Van't Westende WP, Smulders MJ, Gilissen LJ (2009) Characterization of PR-10 genes from eight *Betula* species and detection of Bet v 1 isoforms in birch pollen. *BMC Plant Biol* 9:24.
- Schlumbaum A, Mauch F, Vogeli U, Boller T (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324:365-367.
- Schwessinger B, Zipfel C (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol* 11(4):389-395.
- Shah J, Tsui F, Klessig DF (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana* identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the TMS2 gene. *Mol Plant Microbe Interact* 10:69-78.

- Shah J (2005) Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 43:229-260.
- Sharp PM, Li WH (1987) Ubiquitin genes as a paradigm of concerted evolution of tandem repeats. *J Mol Evol* 25(1):58-64.
- Silverstein KA, Graham MA, Paape TD, VandenBosch KA (2005) Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138(2):600-610.
- Slaughter A, Daniel X, Flors V, Luna E, Hohn B, Mauch-Mani B (2012) Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiol* 158(2):835-843.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CM (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15:760-770.
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(47):18842-18847.
- Stec B (2006) Plant thionins – the structural perspective. *Cell Mol Life Sci* 63(12):1370-1385.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 35:235-270.
- Swofford DL (2000) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F (2003) Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15(2):317-330.
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* 17(5):260-270.
- Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* 13(1):63-68.
- Thulke O, Conrath U (1998) Salicylic acid has a dual role in the activation of defense-related genes in parsley. *Plant J* 14:35-42.
- Tiffin P (2004) Comparative evolutionary histories of chitinase genes in the genus *Zea* and family *Poaceae*. *Genetics* 167(3):1331-1340.

- Ton J, Pieterse CMJ, Van Loon LC (1999) Identification of a locus in *Arabidopsis* controlling both the expression of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) and basal resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Mol Plant-Microb Interact* 12:911-918.
- Ton J, Davison S, Van Wees SCM, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2001) The *Arabidopsis* ISR1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol* 125:652-661.
- Ton J, Jakab G, Toquin V, Flors V, Iavicoli A, Maeder MN, Métraux JP, Mauch-Mani B (2005) Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17(3):987-999.
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci* 14(6):310-317.
- de Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez Egea P, Bögre L, Grant M (2007) *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J* 26(5):1434-1443.
- Tripathi D, Jiang YL, Kumar D (2010) SABP2, a methyl salicylate esterase is required for the systemic acquired resistance induced by acibenzolar-S-methyl in plants. *FEBS Lett* 584(15):3458-3463.
- Tuteja N (2007) Abscisic Acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav* 2(3):135-138.
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 18:258-288.
- Van der Ent S, Van Hulten M, Pozo MJ, Czechowski T, Udvardi MK, Pieterse CM, Ton J (2009) Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and beta-aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytol* 183(2):419-431.
- Van Loon LC, 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* 40:190-211.
- Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36:453-483.
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:85-97.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135-162.

- Van Oosten VR, Bodenhausen N, Reymond P, Van Pelt JA, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CMJ (2008) Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 21:919-930.
- Van Peer R, Niemann GJ, Schippers B (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathol* 81:728-734.
- Van Wees SC, Pieterse CM, Trijssenaar A, Van 't Westende YA, Hartog F, Van Loon LC (1997) Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol Plant-Microb Interact* 6:716-724.
- Van Wees SCM, Luijendijk M, Smoorenburg I, Van Loon LC, Pieterse CMJ (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol Biol* 41:537-549.
- Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* 17(8):895-908.
- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6:959-965.
- Vignols F, Wigger M, García-Garrido JM, Grellet F, Kader JC, Delseny M (1997) Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated. *Gene* 195(2):177-186.
- Vlot AC, Liu PP, Cameron RK, Park SW, Yang Y, Kumar D, Zhou F, Padukkavidana T, Gustafsson C, Pichersky E, Klessig DF (2008) Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 56(3):445-456.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Métraux JP, Ryals JA (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3:1085-1094.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189-1191.
- Wiermer M, Feys BJ, Parker JE (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol* 8:383-389.
- Woloshuk CP, Meulenhoff JS, Sela-Burlage M, van den Elzen PJM, Cornelissen BJC (1991) Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward by *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 3:619-628.

- Woodhouse MR, Pedersen B, Freeling M (2010) Transposed genes in Arabidopsis are often associated with flanking repeats. *PLoS Genet* 6(5):e1000949.
- Xing D, Chen Z (2006) Effects of mutations and constitutive overexpression of EDS1 and PAD4 on plant resistance to different types of microbial pathogens. *Plant Science* 171:251-262.
- Xing Y, Jia W, Zhang J (2008) AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in Arabidopsis. *Plant J* 54(3):440-451.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14:Suppl:S165-183.
- Yang J, Kloepper JW, Ryu CM (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci* 14:1-4
- Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, Seki M, Umezawa T, Asami T, Maruyama-Nakashita A, Kudo T, Shinozaki K, Yoshida S, Nakashita H. (2008) Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. *Plant Cell* 20(6):1678-1692.
- Yi H, Richards EJ. (2007) A cluster of disease resistance genes in Arabidopsis is coordinately regulated by transcriptional activation and RNA silencing. *Plant Cell*. 19(9):2929-2939.
- Yan Z, Reddy MS, Yyu CM, McInroy JA, Wilson M, Kloepper JW (2002) Induced systemic protection against tomato late blight by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 92:1329–1333.
- Yuan, JS, Reed A, Chen F, Stewart CN (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7:85.
- Zhou N, Tootle TL, Tsui F, Klessig DL, Glazebrook J (1998) PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 10:1021-1030.
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247-273.
- Zhu S, Jeong RD, Venugopal SC, Lapchyk L, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P (2011) SAG101 forms a ternary complex with EDS1 and PAD4 and is required for resistance signaling against turnip crinkle virus. *PLoS Pathog* 7(11):e1002318
- Zimmerli, L, Jakab G, Mètraux, JP, Mauch-Mani B (2000) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by β -aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12920-12925.
- Zimmerli L, Hou BH, Tsai CH, Jakab G, Mauch-Mani B, Somerville S (2008) The xenobiotic beta-aminobutyric acid enhances Arabidopsis thermotolerance. *Plant J* 53(1):144-156.

Zimmermann G, Bäumlein H, Mock HP, Himmelbach A, Schweizer P (2006) The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in Basal host resistance. *Plant Physiol* 142(1):181-192.

11. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények

Szalontai B, Jakab G (2010) Differential expression of *PRLIPs*, a pathogenesis-related gene family encoding class 3 lipase-like proteins in Arabidopsis. *Acta Biol Hung* 61(suppl):176-191 (IF: 0,793).

Szalontai B, Stranczinger Sz, Palvalfi G, Mauch-Mani B, Jakab G (2012) The taxon specific paralogs of grapevine *PRLIP* genes are highly induced upon powdery mildew infection. *J Plant Phys in press* (doi.: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.07.010>) (2011. IF: 2,791)

A disszertáció alapjául szolgáló konferencia előadások és poszterek

Kovacs S, Szalontai B, Jakab G (2008) Functional characterisation of the *PRLIP* gene family in Arabidopsis. A Magyar Növénybiológiai Társaság IX. Kongresszusa, Szeged. Poszter absztrakt.

Szalontai B, Kis-Bicskei N, Nagy A, Jakab G (2009) Comparative genetic analysis reveals an expansive evolution of the *PRLIP* gene family in *Brassicaceae*. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, Nyíregyháza. Poszter absztrakt.

Szalontai B (2009) A *PRLIP* (patogenezishez köthető lipáz) géncsalád adaptív evolúciója a növényvilágban. Genetikai Műhelyek Magyarországon VIII. Minikonferencia, Szeged. Előadás.

Szalontai B (2009) A *PRLIP* géncsalád evolúciója a növényvilágban. Biológus Doktoranduszok Konferenciája, Pécs. Előadás.

Jakab G, Szalontai B, Kovacs S (2009) Szignálutak a növényi stresszválaszok primingjában. 80 éves a Debreceni Egyetem Növénytan Tanszéke – Botanikai minikonferencia, Debrecen. Előadás.

Jakab G, Szalontai B, Kovacs S, Nagy A (2011) A növény-specifikus *PRLIP* gének összehasonlító funkcionális jellemzése. IX. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok. Előadás.

Szalontai B, Jakab G (2011) A *PRLIP* gének összehasonlító jellemzése és molekuláris evolúciója a növényvilágban. IX. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok. Poszter absztrakt.

Szalontai B, Jakab G (2011) Adaptive evolution of the *PRLIP* gene family resulted taxon-specific defense-related paralog groups in different plant species. PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects, Joint meeting of the "PR-proteins Workshop" and the "Working Group Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases" of the International Organisation of Biological Control (IOBC/wprs), Neuchâtel, Svájc. Előadás.

Szalontai B, Stranczinger Sz, Palfalvi G, Mauch-Mani B, Jakab G (2012) Grapevine *PRLIP* genes that are highly inducible by powdery mildew infection form a taxon-specific paralog group. Plant Biology Congress (jointly organized by FESPB and EPSO), Freiburg, Németország. Poszter absztrakt.

Egyéb tudományos közlemények

Pal R, Pinke Gy, Szalontai B (2006) Belvizes szántók növényzete Belső-Somogyban. Somogyi Múzeumok Közleményei 17:41-56.

Kocsis M, Szalontai B, Farkas A, Stranczinger Sz (2008) Molecular study of energy grass cultivar 'Szarvasi-1' and its genetic relationship to Hungarian *Elymus* species and populations based on RAPD analysis. Acta Bot Hung 50(1-2):115-124.

Csiky J, Mesterhazy A, Szalontai B, Potone OE (2010) A morphological study of *Ceratophyllum tanaiticum*, a species new to the flora of Hungary. Preslia 82(2):247-259 (IF: 2,792).

Czegledi L, Tamas A, Borzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horvath G, Brubel R, Nemeth J, Szalontai B, Szabadfi K, Javor A, Reglodi D, Helyes Zs (2011) Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. Gen Comp Endocrinol 172(1):115-119 (IF: 3,267).

Csete S, Stranczinger Sz, Szalontai B, Farkas A, Pal RW, Salamon-Albert E, Kocsis M, Tovari P, Vojtela T, Dezso J, Walcz I, Janowszky Zs, Janowszky J, Borhidi A (2011) Tall wheatgrass cultivar Szarvasi-1 (*Elymus elongatus* subsp. *ponticus* cv. Szarvasi-1) as a potential energy crop for semi arid lands of Eastern Europe. In: Majid Nayeripour, Mostafa Keshti (editor) Sustainable Growth and Applications in Renewable Energy Sources. (pp:269-294) Rijeka – InTech. Book chapter.

Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglodi D, Szabo A, Kovacs K, Szalontai B, Setalo Gy Jr, Banki E, Csanaky K, Tamas A, Gabriel R (2012) Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. Cell Tissue Res 348(1):37-46 (2011. IF: 3,114).

Egyéb konferencia előadások és poszterek

Szalontai B, Kocsis M, Stranczinger Sz (2007) A 'Szarvasi-1' energiafű taxonómiai és összehasonlító genetikai jellemzése RAPD markerekkel. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, Balatonfüred. Poszter absztrakt.

Szalontai B (2007) Hazai *Agropyron* és *Elymus* taxonok jellemzése molekuláris markerekkel. XVIII. OTDK Biológia Szekció, Debrecen, Hungary. Előadás.

Nagy A, Kovacs S, Szalontai B, Jakab G (2009) Regulation of ABA1 gene expression in *Arabidopsis thaliana*. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, Nyíregyháza. Poszter absztrakt.

Reglodi D, Tamas A, Czeglédi L, Szalontai B, Borzsei R, Bagoly T, Csanaky K, Banki E, Kiss P, Horvath G, Szauer E, Nemeth J, Mark L, Brubel R, Helyes Zs (2010) Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the milk of domestic animals and humans. 25th Conference of European Comparative Endocrinologists, Pécs. Poszter absztrakt.

Mesterhazy A, Potone Olah E, Szalontai B, Csiky J (2010) Morphology and habitat preference of *Ceratophyllum tanaiticum* Sapjegin in Hungary. I(VII) International Conference on Aquatic Macrophytes „Hydrobotany 2010”, Borok, Oroszország. Poszter absztrakt.

Szivak I, Bengerno-Vadkerti E, Szalontai B, Kučinić M, Vučković I, Pauls US, Balint M (2011) Climate change and evolution in springs: radiation, speciation and hybridization of autumn caddisflies on the western Balkan. 7th Symposium for European Freshwater Sciences, Girona, Spanyolország. Poszter absztrakt.

Szivak I, Pauls US, Kučinić M, Vučković I, Szalontai B, Vadkerti E, Mikes T, Balint M (2012) Adaptive radiation of *Chaetopteryx rugulosa* group (Trichoptera) induced by climate and geology in the Western Balkans. International Symposium "Evolution of Balkan Biodiversity", Zagreb, Horvátország. Előadás.

Szivak I, Pauls US, Kučinić M, Vučković I, Szalontai B, Vadkerti E, Mikes T, Balint (2012) Klímaváltozás és evolúció forrásokban: őszi tegzesek (*Chaetopteryx rugulosa* fajcsoport) radiációja, specializációja és hibridizációja. 29. Magyar Ökológus Kongresszus, Keszthely. Poszter absztrakt.

Az összes publikáció kumulatív impaktfaktora (2011): 12,757

Összes citációk száma: 6

Összes független citációk száma: 3

H-index: 2

12. MELLÉKLETEK

1. Melléklet. Az ismert genom szekvenciájú növényfajok PRLIP fehérjéinek hasonlósági viszonyait bemutató részletes kladogramm. Vastag vonalak jelölik a genom specifikus PRLIP szekvenciákat tartalmazó kládokat, melyeknél a vonatkozó növény nevét is feltüntettük. Az a és b betűkkel jelölt csoportok részletes magyarázata a szövegben található. Az egyes kládok bootstrap támogatottságát jelöltük. A hozzáférési számok a Phytozome adatbázisból származnak (<http://www.phytozome.net/>).

2. Melléklet. A manuálisan korrigált szőlő PRLIP szekvenciák. A gDNS szekvenciákon sötéten jelöltük az exonokat. Feltüntettük a korrigált/annotált gének pontos lokalitását a 16. kromoszómán. A *VvPRLIPG* régió csonka gén, amelyhez nem tudunk pontos kódoló régiót rendelni, így egy hipotetikus fehérje szekvenciát tüntettünk fel.