



Szent István Egyetem

A betegség tünetek kialakulásában kulcsszerepet játszó gén-expressziós
változások molekuláris vizsgálata vírushatározott növényekben

Pesti Réka

Gödöllő

2019

A doktori iskola

megnevezése:

Biológia Tudományi Doktori Iskola

Tudományága:

Biológia tudomány

Vezetője:

Dr. Nagy Zoltán

intézet vezető, egyetemi tanár, DSc

SZIE, Mezőgazdaság-és Környezettudományi Kar

Növényteni és Ökofiziológiai Intézet

Témavezető:

Dr. Várallyay Éva

Csoportvezető, tudományos főmunkatárs

Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

Diagnosztikai Csoport

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

Jelölések, Rövidítések jegyzéke.....	1
1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1. Növényi vírusok	8
2.1.1. Dohány mozaik vírus, keresztesvirágúakat fertőző dohány mozaik vírus (Tobamovírusok).....	10
2.1.2. Cymbidium gyűrűs foltosság vírus, szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus (Tombusvírusok).....	11
2.1.3. Tarlórépa göndörödés vírus	13
2.1.4. Burgonya x vírus.....	14
2.1.5. Dohány zörgőlevelűség vírus.....	15
2.1.6. Szőlő Syrah-1 vírus.....	16
2.1.7. Szőlő Pinot gris vírus	17
2.2. A vírusfertőzés során bekövetkező gén-expressziós változások a gazdanövényben	18
2.2.1. A vírusfertőzés során bekövetkező gén-expressziós változások vizsgálatának módszerei	18
2.2.2. Az RNS interferencia	22
2.2.3. A vírus okozta gén-expressziós változások a növényben	29
2.2.4. A shut-off jelenség.....	35
2.2.5. A vírus indukálta géncsendesítés	38
3. Anyag és Módszer.....	38
3.1. Kísérleti anyagok.....	38
3.1.1. Vírustörzsek	38
3.1.2. Tesztnövények	38
3.1.3. Baktérium törzsek	39
3.1.4. Vegyszerek, enzimek, membránok	39
3.2. Módszerek	39

3.2.1.	cDNS készítés	39
3.2.2.	Oligonukleotidok foszforilálása	40
3.2.3.	PCR	40
3.2.4.	DNS fragmentum tisztítása gélből történő izolálással	40
3.2.5.	Ligálás	40
3.2.6.	Transzformálás	41
3.2.7.	Plazmid izolálás	41
3.2.8.	<i>In vitro</i> transzkripció	41
3.2.9.	Tesztnövények fertőzése, mintaszedés	42
3.2.10.	Totál nukleinsav kivonás	42
3.2.11.	A vírus RNS jelenlétének kimutatása	43
3.2.12.	Totál RNS pool készítés	43
3.2.13.	Endogén gének expressziójának visszaigazolása Northern blottal	43
3.2.14.	Endogén gének expressziójának visszaigazolása qRT-PCR-rel	44
3.2.15.	Klorofill fluoreszcencia mérés	45
3.2.16.	Növények hőterképezése	46
3.2.17.	RNS szekvenálás	46
3.2.18.	Bioinformatikai elemzések	46
4.	Eredmények	48
4.1.	A vírusfertőzött <i>N. benthamiana</i> növények gén-expressziós vizsgálatának eredményei ..	48
4.1.1.	A shut-off jelenlétének vizsgálata	48
4.1.2.	A shut-off jelenség nem a nekrózis következménye	50
4.1.3.	A vírusfertőzések hatása a gazdanövény gén-expressziós rendszerére	51
4.1.4.	A szignifikáns expressziót mutató gének funkcionális kategorizálása	53
4.1.5.	A stressz gének	54
4.1.6.	A sejtfal anyagcserében szerepet játszó gének	55
4.1.7.	A fotoszintézisben szerepet játszó gének	57
4.1.8.	Klorofill fluoreszcencia mérés és hőterképezés	58

4.1.9.	A gén-expressziót befolyásoló kulcsregulátorok vizsgálata	59
4.2.	A vírusfertőzött <i>S. lycopersicum</i> növények gén-expressziós vizsgálatának eredménye ...	61
4.2.1.	A kísérlet optimalizálása	61
4.2.2.	A shut-off jelenség vizsgálata	61
4.2.3.	A vírusfertőzések hatása a gazdanövény gén-expressziós rendszerére	63
4.2.4.	A szignifikáns expressziót mutató gének funkcionális kategorizálása	65
4.2.5.	A gén-expressziót befolyásoló kulcsregulátorok vizsgálata	71
4.2.6.	A shut-off jelenség meglétének vizsgálata a szőlőben.....	72
4.3.	Új tudományos eredmények	73
5.	Következtetések és javaslatok.....	74
5.1.	A shut-off jelenség nem a nekrosis következménye	74
5.2.	Detektált gén-expressziós változások funkcionális eloszlása.....	75
5.3.	Az akut és perzisztens vírusfertőzések okozta gén-expressziós változások.....	76
5.4.	A tünetek megjelenésével összefüggésben álló gén-expressziós változások	77
5.5.	Fiziológiai változások vírusfertőzött <i>N benthamiana</i> és <i>S.lycopersicum</i> növényekben.....	80
5.6.	A gén-expressziós változások hátterében álló lehetséges szabályozó faktorok	81
6.	Összefoglalás.....	83
7.	Mellékletek.....	87
M1.	Irodalomjegyzék.....	87
M2.	A klónozáshoz használt indítószekvenciák	114
M3.	A hormonális anyagcserében bekövetkező gén-expressziós változások ábrázolása.....	116
8.	Köszönetnyilvánítás	117

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABA	abszcizinsav (abscisic acid)
ABI	abszcizinsav érzéketlen faktor (ABA insensitive)
ACLSV	alma klorotikus levélfoltosság vírus (Apple chlorotic leaf spot virus)
ACMV	manióka afrikai mozaik vírus (African cassava mosaic virus)
ACS	1-aminociklopropán-1-karboxilsav szintáz (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase)
ACO	ACC oxidáz (ACC oxidase)
AGO	Argonauta fehérje (Argonaute protein)
ANAC	NAC-szerű transzkripció faktorokra (NAC family of transcription factors)
ANS	antocianidin szintáz (anthocyanidine synthase)
AOC	allén oxid cikláz (allene oxide cyclase)
AOS	allén oxid szintáz (alleneoxide synthase)
ARF	auxin válaszfaktor (auxin response factor)
ARR	CK válasz regulátor (Arabidopsis response regulator)
AtML1	<i>A.thaliana</i> merisztéma réteg 1(<i>A.thaliana</i> meristem layer 1)
ATP	adenozin-trifoszfát (adenosine triphosphate)
AUX	auxin (auxin)
BCTV	répa levélsúcs fodrosodás vírus (beet curly curtovirus)
bp	bázispár (basepair)
bHLH	alap spirál-hurok-spirál (basic helix-loop-helix)
BNYVV	répa nekrotikus sárgaerűség vírus (beet necrotic yellow vein virus)
BR	brasszinoszteroid (brassinosteroid)
BSA	marha szérum albumin (bovine serum albumin)
CA	carbonsav anhidrid (carbonic acid)
cDNS	komplementer DNS (complementer DNA)
CaMV	karfiol mozaik vírus (caulifolwer moaic virus)
CAP	7-metilguanozin sapka (7-methylguanosine cap)
CarMV	szegfű foltosság vírus (Carnation mottle virus)
CESA	sejtfal szintáz (cell wall synthase)
CGMMV	uborka zöldfoltosság mozaik vírus (cucumber green mottle mosaic virus)
CHI	kalkon izomeráz (chalcone isomerase)
CHS	kalkon szintáz (chalcone synthase)
CK	citokinin (cytokinin)

CMV	uborka mozaik vírus (cucumber mosaic virus)
CP	köpenyfehérje (coat protein)
CP29	klorofill pigment-kötő fehérje 29 (chlorophyll binding protein 29)
crTMV	Keresztesvirágúakat fertőző dohány mozaik vírus (crucifer-infecting tobamovirus)
CymRSV	Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (Cymbidium ringspot virus)
Ct	küszöbérték (threshold cycle)
CWINV	sejtfal invertáz (cell wall invertase)
DCL	Dicer-szerű enzimek (Dicer-like enzymes)
DFR	dihidroflavonol-4-reduktáz (dihydroflavonol 4-reductase)
DNS	dezoxiribonukleinsav (desoxyribonucleic acid)
dpi	a fertőzést követő napok száma (days post inoculation)
dsRBD	dsRNS-kötő domén (dsRNA-binding domain)
dsRNS	kettősszalú RNS (double stranded RNA)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (ethylene-diamine-tetraacetic acid)
EF	elongációs faktor (elongation factor)
EIN	etilén érzéketlen faktor (ethylene insensitive)
ER	endoplazmatikus retikulum (endoplasmic reticulum)
ERF	etilén válasz faktor (ethylene response factor)
Et	etilén (ethylene)
FDE	formamid-EDTA festék (formamid-EDTA dye)
FISH	fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció (fluorescens <i>in situ</i> hybridization)
F3H	flavanon-3-hidroxiláz (flavonone 3-hydroxylase)
F3'H	flavonoid-3'-hidroxiláz (flavonoid 3'-hydroxylase)
Gapdh	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GO	gén ontológia (gene ontology)
GPGV	szőlő Pinot gris vírus (grapevine pinot gris virus)
GST	glutation-S-transzferáz (glutathione-S-transferase)
GSyV1	szőlő Syrah vírus 1 (grapevine Syrah virus 1)
HEL	helikáz (helicase)
HEN1	Hua enhanszer 1 (Hua enhancer 1)
HR	hiperszenzitív reakció (hypersensitiv reaction)
HSP	hősokk fehérje (heat shock protein)
HST	Hasty fehérje (Hasty protein)

HYL1	hyponastic leaves 1 fehérje
ICTV	Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on the Taxonomy of Viruses)
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside)
IRES	belső riboszóma belépési hely (internal ribosomal entry site)
ISH	<i>in situ</i> hibridizáció (<i>in situ</i> hybridization)
JA	jazmonsav (jasmonic acid)
kb	kilobázis (kilobase)
kDa	kilodalton (kilodalton)
LB	Luria-Bertani táptalaj
LDH	laktát dehidrogenáz (lactate dehydrogenase)
Lox	lipoxigenáz (lipoxygenase)
LRR	leucin gazdag ismétlődés (leucine rich repeat)
MIR	mikro RNS gének (microRNA genes)
miRNS	mikro RNS (microRNA)
MP	mozgási fehérje (movement protein)
MRFV	kukorica finom csíkozottság vírus (Maize rayado fino marafivirus)
mRNS	hírvivő RNS (messenger RNA)
MT	metiltranszferáz (methyltransferase)
NB	nukleotid kötő (nucleotide binding)
ncRNA	nem-kódoló RNS (non-coding RNA)
nm	nanométer (nanometer)
nt	nukleotid (nucleotide)
NTPáz	nukleozid-trifoszfátáz enzim (nucleoside-triphosphatase)
NPR1	nem-expresszáló patogenezis-kapcsolt fehérje 1 (non-expresser of pathogenesis related gene 1)
OJIP	gyors klorofill fluoreszcencia tranziens (chlorophyll fluorescence transients)
ORE1	NAC-szerű transzkripció faktor 29 (NAC family of transcription factors 29)
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
ORMV	olajrepce mozaik vírus (oilseed rape mosaic virus)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PDF	protoderma faktor (protodermal factor)
PDS	fitoén deszaturáz (phytoene desaturase)
PEBV	borsó korai barnulás vírus (pea early browning tobnavirus)
PNK	polinukleotid kináz (polynucleotide kinase)

PNRSV	cseresznye és meggy nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (prunus necrotic ringspot virus)
PP2C	protein foszfatáz 2C (protein phosphatase 2C)
PPV	szilvahimlő vírus (plum pox virus)
PR	patogenezis-kapcsolt fehérje (pathogenesis-related protein)
ProDH	prolin dehidrogenáz (proline dehydrogenase)
PSbMV	borsó maggal terjedő vírussal (pea seed-borne mosaic potyvirus)
PSI	I. fotokémiai rendszer (Photosystem I)
PSII	II. fotokémiai rendszer (Photosystem II)
PTGS	poszttranszkripcionális géncsendesítés (post transcriptional gene silencing)
pub	poliubiquitin (polyubiquitin)
PVX	burgonya x vírus (potato virus x)
qRT-PCR	kvantitatív valós-idejű PCR (quantitative real-time PCR)
RBSDV	rizs fekete csíkos törpülés vírus (rice black-streaked dwarf virus)
RdRp	RNS-függő RNS polimeráz (RNA dependent RNA polymerase)
R gének	rezisztencia gének (resistance genes)
RISC	RNS-indukálta géncsendesítés végrehajtó komplex (RNA-induced silencing complex)
RMV	lándzsás utifű mozaik vírus (ribgrass mosaic virus)
PMMoV	paprika enyhe foltosság vírus (pepper mild mottle virus)
RNA-seq	RNS szekvenálás (RNA sequencing)
RNáz	ribonukleáz (ribonuclease)
RNS	ribonukleinsav (ribonucleic acid)
rRNS	riboszómális RNS (ribosomal RNA)
ROS	reaktív oxigén fajták (reactive oxygen species)
rpm	fordulat/ perc (rounds per minute)
Rubisco	ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz-oxigenáz (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)
SA	szalicilsav (salicylic acid)
SAGs	szenescenciához kapcsolt gének (senescence associated genes)
SAR	szisztémikusan szerzett rezisztencia (systemic acquired resistance)
SAM	S-adenozil metionin (S-adenosyl methionine)
SDN1	kis RNS lebontó nukleáz 1 (small RNA degrading nuclease1)
SDS	nátrium-dodecyl-szulfát (sodium-dodecyl-sulphate)
SE	Serrate gén (Serrate gene)

sgRNS	szubgenomi RNS (subgenomic RNA)
siRNS	kis interferáló RNS (short interfering RNA)
snRNS	kis sejtnai RNS (small nuclear RNA)
sRNS	kis RNS (small RNA)
ssRNS	egyszálú RNS (single stranded RNA)
tasiRNS	transz-ható kis interferáló RNS (trans-acting small interfering RNA)
TBE	tris-bórsav- EDTA (tris-borate-EDTA)
TBSV	paradicsom bokros törpülés vírus (tomato bushy stunt virus)
TCV	tarlórépa göndörödés vírus (turnip crinkle virus)
TCVC	tarlórépa érkivilágosodás vírus (turnip vein clearing virus)
TEV	dohány karcolatos vírus (tobacco etch virus)
TF	transzkripció faktor (transcription factor)
TGB	hármás gén blokk (triple gene block)
TGA3	TGA1A-kapcsolt gén 3 (TGA1A-related gene 3)
TGS	transzkripcionális géncsendesítés (transcriptional gene silencing)
TMLK1	transzmembrán kináz 1 (transmembrane kinase 1)
TMV	dohány mozaik vírus (Tobacco mosaic virus)
TNV	dohány nekrozis vírus (Tobacco necrosis virus)
ToCV	paradicsom klorózis vírus (tomato chlorosis virus)
ToRSV	paradicsom gyűrűsfoltosság vírus (tomato ringspot virus)
tRNS	transzfer RNS (transfer RNA)
TRV	dohány zörgőlevelűség vírus (Tobacco rattle virus)
TSWV	paradicsom bronzfoltosság vírus (tomato spotted wilt virus)
TuMV	tarlórépa mozaik vírus (turnip mosaic virus)
TYLCV	paradicsom sárga levélsodródás vírus (tomato yellow leaf curl virus)
TZSV	paradicsom sávós foltosság vírus (tomato zonate spot virus)
UFGT	UDP glükóz-flavonoid-3-O-glükoziltranszferáz (UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase)
VIGS	vírus indukálta géncsendesítés (virus-induced gene silencing)
VSR	virális szupresszor fehérje (viral suppressor of RNA silencing)
WCIMV	fehérhere mozaik vírus (white clover mozaik potexvirus)
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside)
ZFP	cink-ujj fehérje (zinc finger protein)

1. BEVEZETÉS

Kompatibilis vírus-növény kapcsolatban a vírus képes a növény anyagcsere folyamatainak megváltoztatásával genomját replikálni és sejtről sejtre haladva a teljes növényben elterjedni (szisztémás fertőzés). A vírusfertőzés lefolyása alapján kétféle vírusfertőzést különíthetünk el. Akut vírusfertőzés esetén, a vírus nagy mennyiségben van jelen a növényben, a vírusra jellemző tünetek néhány nappal a fertőzést követően megjelennek, súlyosak és rövid időn belül akár a növény pusztulásához vezethetnek. Perzisztens vírusfertőzés során a vírus nagy mennyiségben van jelen, viszont a gazdán jelentkező tünetek enyhébbek.

A növényekben vírusfertőzés hatására aktiválódik egy általános védekezési mechanizmus, az RNS interferencia (RNSi). Az RNSi egy olyan génszabályozási rendszer, mely védelmet nyújt a különböző eredetű, idegen RNS-ek (transzpozonok, vírusok) ellen. A védekezési mechanizmust a vírus replikációja során keletkező, kettősszálú RNS-ek (dsRNS) aktiválják. A dsRNS-eket a növényi Dicer-szerű (DCL) enzimek felismerik és 21-25 nukleotid (nt) hosszú kis interferáló RNS-ekre (siRNS) darabolják. A siRNS egyik szála beépül a végrehajtó komplexbe (RISC), melynek központi molekulája az Argonaute fehérje (AGO). Az AGO feladata a siRNS egyik szálának a megkötése, majd az ezzel komplementer vírus RNS -ek felismerése és hasítása vagy transzlációs gátlása. A vírusok elleni védekezésen kívül az RNS interferencia kulcsszerepet játszik a gének finom szabályozásában is. Az endogén gének expressziójának szabályozásán keresztül hat a növények fejlődésére és szerepe van a biotikus és az abiotikus stresszek során kialakuló válaszreakciókban. Ugyanakkor kiderült, hogy a vírusok egy része rendelkezik egy olyan speciális fehérjével (virális szupresszor fehérje, VSR), mely képes blokkolni az RNS interferenciát. A vírusok a szupresszor fehérjéken keresztül több ponton (siRNS kötés, RISC, AGO vagy DCL enzim komponensekkel kölcsönhatásba lépve) képesek gátolni az RNS interferencia folyamatát. Ismert olyan szupresszor fehérje (pl. uborka mozaik vírus (CMV) 2b), mely egyidejűleg több ponton is támadja a növény védekező rendszerét.

A növényi vírusok az állati vírusokhoz hasonlóan képesek a gazda gén-expressziós rendszerének megváltoztatására. A gazda hírvivő RNS (mRNS)-einek szabályozásán keresztül gátolják egyes gének kifejeződését (shut-off jelenség). Csoportunk, munkámat megelőző kísérletekben, kimutatta, hogy: (1) egyes vírusok (*Tombusvirus* és *Tobamovirus* nemzetségbe tartozók) képesek, míg más vírusok (*Carmovirus* és *Cucumovirus* nemzetségbe tartozók) nem képesek a gazda mRNS-ek hatékony eliminálására, (2) a shut-off jelenség a sejtmagban alakul ki és transzkripció szinten hat és (3) kapcsolat lehet a tünetek súlyossága és a shut-off jelenség mértéke között [HAVEIDA et al. 2008, VÁRALLYAY et al. 2009]. Ezt követően csoportunk a vírusfertőzés hatására bekövetkező genomszintű gén-expressziós változások nyomonkövetése

céljából vírusfertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekből microarray analízist készített, melynek kiértékelése jelentette munkám kiindulási pontját.

A kutatási téma jelentőségét az adja, hogy a vírusfertőzés során megjelenő tünetek hatalmas gazdasági kárt tudnak okozni, jelentősen csökkenthetik a termés minőségét és mennyiségét. Mindemellett az sem elhanyagolható, hogy a vírus által legyengített növények célpontjaivá válhatnak kártevőknek és más patogéneknek. Jelenleg még nem tisztázott, hogy mely változások felelősek a tünetek kialakulásáért és nem ismert a folyamatok pontos mechanizmusa sem.

Kutatásunk célja, hogy feltárjuk milyen hatást gyakorol a vírusfertőzés a gazdanövény gén-expressziós rendszerére, valamint megértsük, hogy milyen folyamatok állnak, ezen változások hátterében és ezek milyen szerepet játszanak a tünetek kialakulásában.

Phd munkám céljául tűztem ki, hogy:

1. Két nagy áteresztőképességű módszer (microarray analízis és RNS szekvenálás) segítségével vizsgáljuk a CymRSV, crTMV és TCV vírussal fertőzött *Nicotiana benthamiana* valamint a PVX és TMV vírussal fertőzött *Solanum lycopersicum* növényeket. Munkám kiindulási pontját vírusfertőzött *N. benthamiana* növényekből már elkészült microarray analízisből származó adatok kiértékelése jelentette. Ezt követően egy gazdaságilag is fontosabb növény, a *S. lycopersicum* RNS-einek újgenerációs szekvenálását terveztük. Munkánk ezáltal lehetőséget ad a két nagy áteresztőképességű módszerek összehasonlítására, a különböző növény-vírus kapcsolatok gén-expressziójának genomszintű vizsgálatára valamint az akut és a perzisztens vírusfertőzések közötti hasonlóságok és különbségek megértésére.
2. Northern blott és qRT-PCR segítségével visszaigazoljuk a két nagy áteresztőképességű módszerrel detektált gén-expressziós változásokat. Fiziológiai mérésekkel (hőterképezés, klorofill fluoreszcencia mérés) detektáljunk olyan paramétereket, melyekkel a tünetek megjelenése előtt elkülöníthetjük az akut és a perzisztens típusú fertőzéseket a vírusfertőzött növényekben.
3. A shut-off meglétét vizsgáljuk TMV, PVX és TRV vírusvektorokkal (VIGS) fertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényeken, a *Rubisco*, a *Gapdh* és a *tubulin* gének expressziójának visszaigazolásával.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Növényi vírusok

A növényi vírusok felfedezése a 19. század végére tehető, amikor kiderült, hogy a bakteriológiai szűrők használata sem jelent biztonságot a betegségek ellen. Felmerült annak lehetősége, hogy a baktériumokon kívül lehetnek más kisebb élőlények is, melyek fertőző betegségeket okozhatnak. Ezt követően dohány növényen írtak le először egy olyan betegséget (*Mosaikkrankheit*), mely mozaikos tüneteket okozott és képes volt betegséget kiváltani egy egészséges növényen, azáltal hogy a beteg növény kivonatával inokulálták azt [MAYER 1886]. Később azt is igazolták, hogy a baktérium szűrőn átszűrt beteg növényből származó nedv fertőzőképes marad [BEIJERINCK 1898, IWANOWSKI 1892].

A Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on the Taxonomy of Viruses, ICTV) adatai szerint a jelenleg ismert 144 növényi vírus nemzetség több mint 1500 vírusfajt foglal magába [HTTP1]. A növényi vírusok rendkívül változatosak, egyes vírusok csak néhány növényt képesek megfertőzni, míg más vírusok széles gazdakörrel rendelkeznek, több mint 1000 gazdájuk is lehet [HULL 2014]. A növényi vírusok biotróf paraziták, túlélésükhöz és szaporodásukhoz elengedhetetlen az élő szövet, éppen ezért a vírushozzás és a növényi védekezés egyensúlyának fenntartására törekednek [PALLAS and GRACIA, 2011]. Egyes vírusok drasztikus tüneteket okoznak a növényeken (akut vírushozzás), míg más vírusok tünetek kiváltása nélkül (perzisztens vírushozzás) vannak jelen a gazdában [ROOSSINCK 2010]. A vírusok terjedhetnek vektorokkal (levéltetvek, kabócák, fonálférgék) [HORVÁTH 1972], parazita növényekkel (*Cuscuta* spp.) [HOSFORD 1967], generatív növényi részekkel (mag, pollen) [MINK 1993] és vegetatív szaporítószervekkel (gumó, hagyma, rizóma) [HULL 2014] valamint mechanikai (sebzés, oltás) [BAWDEN 1943, FULTON 1966] átvitelével is.

A növényi vírusok általában egy nukleinsavból és az azt körülvevő fehérjeburokból (kapszid) épülnek fel. Genomjuk egyszálú (ss), kettősszálú (ds), lineáris vagy cirkuláris DNS-ből vagy RNS-ből állhat. [HULL 2014]. A növényi vírusok döntő többsége pozitív ssRNS vírus, ezért genomjuk vírushozzás során mRNS-ként képes működni [MURPHY et al. 1995, PALLAS AND GRACIA, 2011]. A vírusoknak különböző stratégiákat kellett kifejleszteniük, hogy fertőzéskor túléljék a növény védekező rendszerének támadását, ezenfelül gondoskodniuk kellett a szaporodási ciklusuk véghezviteléről is [MAULE et al. 2002]. Önálló anyagcserére képtelenek, a gazdanövény erőforrásainak és fehérjeszintetizáló rendszerének felhasználásával sokszoroztják önmagukat [BUCK 1996]. Miután a vírus bejut a növényi sejtbe (passzív folyamat) kicsomagolódik [PALLAS AND GRACIA, 2011] és a pozitív egyszálú vírus RNS közvetlenül bekapcsolódik a fehérjeszintézisbe. A vírus RNS-ről vírushfehérjék transzlátódnak, például az RNS-függő RNS

polimeráz (RdRp). Az RdRp a gazdafehérjékkel komplexet alkotva felismeri a pozitív RNS szál 3' végén lévő promóter elemet és elkezdődik a templát szállal komplementer, negatív szálnak a szintézise. A negatív szálak templátként funkcionálnak tovább, róluk rengeteg új pozitív szál szintetizálódik [BUCK 1996]. Ezután a növényi vírusok a sejtek plazmodezmáin átjutva (aktív folyamat) a szomszédos sejteket fertőzik meg. Majd a növény szállítórendszerén keresztül (passzív folyamat) a vírus elterjed a teljes növényben és kialakul a szisztémás fertőzés [LEISNER and HOWELL 1993, SEO and KIM 2006, TZFIRA et al. 2000].

A prokarióta mRNS-re jellemző, hogy egymás után több nyitott leolvasási keretet (ORF) is tartalmazhatnak (policisztronos), ellenben az eukariótáknál egy mRNS egy gén genetikai kódját tartalmazza (monocisztronos) [SZEBERÉNYI 2014]. Annak érdekében, hogy a növény transzlációs rendszerében a pozitív szálú RNS vírusok kifejezhessék génjeiket különböző stratégiákat fejlesztettek ki. A vírus RNS-en lévő gének kifejeződhetnek: szubgenomikus RNS-eken keresztül, osztott virális genommal, poliprotein által, átolvasható (leaky) stop kodonnal és olvasási keretváltással. A pozitív szálú RNS vírusok ezeket a stratégiákat egyszerre, különféle kombinációkban használják [MAIA et al. 1996].

A vírusok genomja fehérjét kódoló és nem-kódoló régiókat is tartalmaz. A kódoló régió tartalmazza a vírus fertőzési ciklusában és a vírus mozgásában szerepet játszó fehérjék genetikai kódját. Az expresszió szabályozásáért és a vírus genom replikációért a nem-kódoló régiók a felelősek, azonban szabályozó szekvenciák a kódoló régióban is találhatóak [HULL 2014]. A vírus RNS-en kódolt génekről keletkező fehérjéket funkció szerint több csoportba sorolhatjuk: (1) Strukturális fehérjék. Legáltalánosabb strukturális fehérje, a köpenyfehérje (CP), melynek elsődleges funkciója a vírus partikulum külső burkának létrehozása, a vírus RNS védelme a sejtben lévő nukleázokkal szemben, valamint szerepet játszik a vírus sejtről-sejtre való terjedésben is [CALLAWAY et al. 2001]. (2) Enzimek. Az összes növényi vírus, kivéve szatellit vírusok, kódolnak egy vagy több olyan fehérjét, melyek a nukleinsav szintézisnél játszanak kulcsszerepet, ezeket nevezik replikáznak. A replikáz komplex metiltranszferáz (MT), helikáz (HEL) és RdRp doméneket tartalmaz [LEWANDOWSKI and DAWSON 2000, NAYUDU 2008, WATANABE et al. 1999]. A MT-ok a sapka struktúrájának kialakításán keresztül növelik a vírus RNS stabilitását és a transzláció iniciációjában is kulcsszerepet játszanak [ROZANOV et al. 1992]. A HEL-ok az adenosin-trifoszfát (ATP) hidrolízisével energiát szabadítanak fel, melyet a nukleinsav-duplexek szétválasztására használnak [GORBALENYA and KOONIN 1989]. Az RdRp katalizálja a komplementer szálak szintézist egy adott templátról, a vírus esetén felelős a negatív- és a pozitív szálak valamint a szubgenomi RNS-ek szintéziséért is [O'REILLY and KAO, 1998]. (3) A vírus mozgását, terjedését segítő fehérjék. Sok vírus esetén azonosítottak mozgási fehérjéket (MP), melyek a vírus a sejtről-sejtre és vaszkuláris rendszeren keresztüli terjedését segítik elő

[WAGMANN et al. 2004]. (4) A gazda védekező rendszerét gátló fehérjék. A legtöbb növényi vírus egy vagy több VSR-t kódol, melyek a vírusfertőzés esetén akár több ponton is képesek gátolni a növény védekező rendszerét [DING and VOINNET 2007].

2.1.1. Dohány mozaik vírus, keresztesvirágúakat fertőző dohány mozaik vírus (Tobamovírusok)

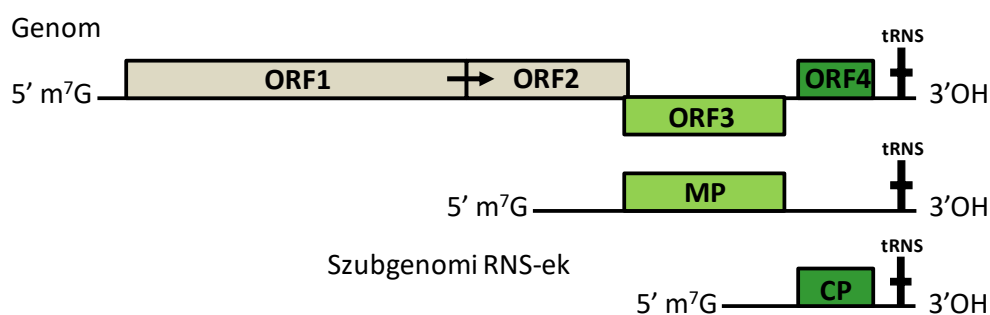
A dohány mozaik vírus (Tobacco mosaic virus, TMV) U1 törzs (TMV-U1) és a keresztesvirágúakat fertőző dohány mozaik vírus (Crucifer-infecting tobamovirus, crTMV) rendszertanilag a *Virgaviridae* család, *Tobamovirus* nemzetségbe tartozik. A nemzetség névadója az elsőként felfedezett TMV [KNAPP and LEWANDOWSKI 2001]. Az ICTV 2018-es adatai alapján a nemzetségbe jelenleg 37 faj tartozik [HTTP1]. A vírusok genomi szekvenciájának ismeretével és az ez alapján prediktált fehérje szekvenciák összehasonlításával a Tobamovírusokon belül 3 alcsoportot hoztak létre. A burgonyaféléket (1. alcsoport) fertőző, a tökfélékből és hüvelyesekből (2. alcsoport) izolált valamint a keresztesvirágúakból izolált dohány mozaik vírusokat különítették el [LARTEY et al. 1996]. A fenti csoportosítás szerint az általunk használt TMV-U1 az 1. alcsoportba, a crTMV a 3. alcsoportba tartozik.

A Tobamovírusok virionjai merev pálcika alakúak, méretük 300-310 x 18 nanométer (nm). A viroin összetételét tekintve 95%-ban köpenyfehérjéből és 5%-ban RNS-ből áll. Az összekapcsolódott köpenyfehérje alegységek az RNS-t körülvéve helikális struktúrát alkotnak [KNAPP and LEWANDOWSKI 2001]. A stabil struktúrának köszönhetően növényi kivonatokban a virionok évtizedekig megőrzik fertőzőképességüket [SILBER and BURK 1965]. A virionok 90°C-on, 10 percig tartó hőkezeléssel inaktiválhatóak. A Tobamovírusok természetes gazdaköre korlátozott, azonban mesterséges fertőzéssel számos gyomnövényt és termesztett növényt képes megfertőzni [KNAPP and LEWANDOWSKI 2001].

A Tobamovírusok genomja 6,3-6,5 kilobázis (kb) hosszú. A kísérleteinkben használt TMV-U1 genomja 6395 nt, a crTMV genomja 6312 nt hosszú. Tobamovírusok genomja pozitív szálú RNS-ből áll, mely négy ORF-et tartalmaz: az ORF1 és az ORF2 a replikázt, az ORF3 a mozgási fehérjét és az ORF4 a köpenyfehérjét kódolja [DOROKHOV et al. 1994, GOELET et al. 1982] (1. ábra). A genomi RNS 5' végét 7-metilguanozin sapka (CAP) védi [DUNIGAN and ZAITLIN, 1990]. A genomi RNS 5' végéről közvetlenül két fehérje (ORF1, ORF2) keletkezik. Az ORF1-ről keletkező fehérje átolvasható stop kodonnal rendelkezik, melyről az esetek 10%-ban továbbolvasás (read-through) során egy túlnyúló (overlapping) nagyobb méretű fehérje keletkezik (ORF2). Az ORF1-ről és az ORF2-ről TMV-U1 esetén egy 126 kilodalton (kDa) és egy 183 kDa méretű fehérje, crTMV esetén egy 122 kDa és egy 178 kDa méretű fehérje transzlálódik. Az ORF3 a 30 kDa illetve a 29 kDa (TMV-U1, crTMV) méretű mozgási fehérjét kódolja, míg ORF4-ről a

17,5 kDa illetve a 18 kDa (TMV-U1, crTMV) méretű köpenyfehérje keletkezik. Az ORF3 és az ORF4 nem közvetlenül a genomi RNS-ről, hanem a különálló szubgenomi RNS-ekről (sgRNS) transzlálódnak [DOROKHOV et al. 1994, LEWANDOWSKI and DAWSON 2000, WATANABE et al. 1999]. TMV esetén a két sgRNS-en kívül azonosítottak egy harmadikat, mely egy 54 kDa-os fehérje kódját tartalmazza. Ezt a fehérjét dohány növény levelében poliszómákhoz kapcsolódva találták meg, funkciója ezidáig ismeretlen [SULZINSKI et al. 1985], feltételezések szerint TMV replikációjában játszhat szerepet [ZAITLIN 1999]. Igazolták, hogy a TMV-U1 és a crTMV szekvenciája is tartalmaz belső riboszóma belépési helyeket (IRES). Az IRES elemek sapkától független transzlációt biztosítanak a tőlük 3' irányba (downstream) lévő ORF számára [SKULACHEV et al. 1999]. Az IRES_{MP} elemet a TMV-U1 és a crTMV genomja is tartalmazza, azonban IRES_{CP} elemet csak a crTMV genomjában azonosították [DOROKHOV et al. 1994, DOROKHOV et al. 2006, IVANOV et al. 1997, SKULACHEV et al. 1999]. Mindkét vírus esetén, a genomi RNS 3' végén egy hisztidint kötő tRNS-szerű struktúra található [DOROKHOV et al. 1994].

2.1.2. Cymbidium gyűrűs foltosság vírus, szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus



1. ábra Tobamovírusok genom szerveződése

(Tombusvírusok)

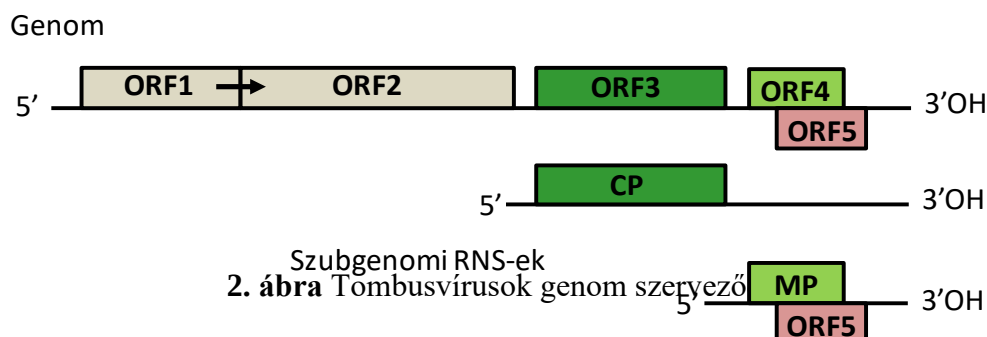
A Cymbidium gyűrűs foltosság vírus (Cymbidium ringspot virus, CymRSV) és a szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus (Carnation Italian Ringspot virus, CIRV) a *Tombusviridae* családba azon belül a *Tombusvirus* nemzetségbe tartozik. A nemzetség névadója és típusfaja a paradicsom bokros törpülés vírus (TBSV). A ICTV 2018-as adatai alapján a nemzetségbe 17 vírusfaj tartozik [HTTP1].

A Tombusvírusok virionja egy 30 nm méretű ikozahedrális részecske. A vírus genomot kívülről a 180 alegységből felépülő köpenyfehérje veszi körül. Genomja lineáris pozitív egyszálú RNS [GRIECO et al. 1989, RUSSO et al. 1994]. Természetes gazdanövényköre szűk, főként a kétszikűekre korlátozódik. Vírusfertőzött növényeken klorotikus vagy akár nekrotikus lokális léziókat is okozhat. Terjedése főként mechanikai úton valósul meg: kontaminált szerszámokkal és fertőzött talajjal érintkezve, a vírus terjesztésében szerepet játszó vektor ezidáig ismeretlen [RUSSO et al. 1994].

A Tombusvírusok genomja 4-5,4 kb hosszú, pozitív szálú ssRNS, melyek 5' végéről hiányzik a CAP és 3' vége sem poliadenilált. Kísérleteinkhez használ CymRSV genomja 4733 nt, a CIRV genomja 4760 nt hosszú. Az RNS 5' végén és 3' végén (5'-AGAAAU....GCAGCCC-3') konzervált szekvenciák találhatóak. A vírus genom öt funkcionális ORF-et tartalmaz (2. ábra). A genomi RNS 5' végéről közvetlenül egy 33 kDa illetve 36 kDa (CymRSV, CIRV) méretű fehérje (ORF1) transzlálódik. Az ORF1 átolvasható stop kodonnal rendelkezik, így read-through során egy nagyobb 92 kDa illetve 95 kDa (CymRSV, CIRV) méretű fehérje (ORF2) keletkezik [O'REILLY and KAO 1998, RUBINO et al. 1995, RUSSO et al. 1994]. Kimutatták, hogy a 33 kDa fehérje hiánya esetén protoplaszt sejtekben nem történt vírus replikáció, mert a 92 kDa fehérje önmagában nem elég a vírus replikáció elindításához [OSTER et al. 1998, PANAVIENE et al. 2003]. A 33 kDa fehérje és a 92 kDa fehérje átfedő régiójában egy arginin/prolin gazdag RNS-kötő motívum (RPR motívum) található, ezáltal a 33 kDa fehérje képest kötődni a vírus RNS-hez [RAJENDRAN and NAGY 2003]. *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy RPR motívumban okozott mutációk befolyásolják a genomi- és a szubgenomi RNS szintézist, azáltal hogy a fehérje elveszti RNS-kötő képességét és nem tud a vírus RNS-hez kötődni [PANAVIENE et al. 2003]. Az eddigi vizsgálatok azt mutatják, hogy az ORF1 és az ORF2 kódolja a vírus replikációhoz szükséges fehérjéket és a sikeres replikációhoz mindkét fehérjének jelen kell lennie [DALMAY et al. 1993, OSTER et al. 1998, SCHOLTHOF et al. 1995b]. Az ORF3 kódolja a 41 kDa méretű köpenyfehérjét [RUSSO et al. 1994]. Köpenyfehérje mutáns vírus RNS-ek felhasználásával kimutatták, hogy a CP jelenléte nem szükséges a vírus replikációhoz [DALMAY et al. 1992, SCHOLTHOF et al. 1993], továbbá DALMAY et al. (1993) bizonyították, hogy CymRSV vírus CP nélkül is képes sejtről-sejtre terjedni. Az egymással átfedő ORF4 és az ORF5 két nem strukturális fehérjét kódol. Az ORF4 kódolja a 22 kDa méretű mozgási fehérjét, mely a vírus terjedésében játszik fontos szerepet. Ezt támasztja alá ROCHON és JOHNSTON (1991) kísérlete, akik Tombusvírus 22 kDa méretű fehérje génjének start kodonjában okoztak mutációt, ennek hatására vírus nem volt képes elterjedni az inokulált levélben. Az ORF5 egy 19 kDa méretű VSR-t (p19) kódol, melyről bizonyították, hogy képes gátolni az RNS interferenciát [VARGASON et al. 2003]. Vírusfertőzött *N. benthamiana* leveleken végzett *in situ* kísérletek igazolták, hogy p19 hiánya (p19 deficiens CymRSV, Cym19stop) hatással van a vírus felhalmozódására és a vírus szövetben való terjedésére [HAVELEDA et al. 2003]. Ezenkívül kimutatták, hogy a Tombusvírusok 19 kDa méretű fehérjeje jelentős szerepet tölt be a vírus által okozott tünetek kialakulásában is [BURGYAN et al. 2000, DALMAY et al. 1993, SCHOLTHOF et al. 1995a]. Az ORF1 és ORF2 fehérjék közvetlenül a genomi RNS-ről, míg az RNS 3' végén található gének két sgRNS-ről transzlálódnak. A nagyobb sgRNS1 2,1 kb hosszúságú, tartalmazza az ORF3, ORF4 és ORF5 fehérje génjeinek kódját azonban, csak az 5'

vég felőli ORF3 transzlálódik róla. A kisebb, 0,9 kb méretű sgRNS2-ről transzlálódik a két egymással átfedő (ORF4 és ORF5) fehérje [RUSSO et al. 1994].

2.1.3. Tarlórépa göndörödés vírus

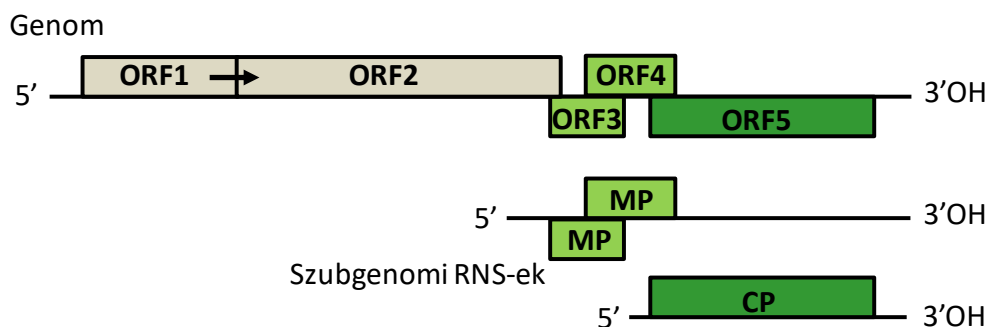


A tarlórépa göndörödés vírus (Turnip crinkle virus, TCV) a *Tombusviridae* családba azon belül a *Betacarmovirus* nemzetségbe tartozik. A nemzetség névadója és típusfaja a szegfű foltosság vírus (CarMV). Az ICTV 2018-es adatai alapján a nemzetségbe 4 vírusfaj tartozik [HTTP1].

A TCV virionja 30 nm méretű ikozahedrális részecske. A vírus partikulum egy RNS genomból és 180 alegységből álló köpenyfehérjéből épül fel. A vírus genomja pozitív egyszálú RNS [CARRINGTON et al. 1989]. Természetes gazdaköre főként a keresztesvirágúakra terjed ki a gyomnövényeket is beleértve, kísérleti modell növények közül a dohányt (*Nicotiana tabacum*) képes fertőzni. Megfigyelték, hogy a tünetek súlyossága eltér attól függően, hogy a gazdanövény keresztesvirágúak családjába tartozik-e. Keresztesvirágúak esetén a levelek torzulását, erek sárgulását és klorotikus foltokat figyeltek meg. A TCV nem-keresztesvirágú gazdanövényen súlyosabb tüneteket okozott: klorotikus vagy akár nekrotikus lokális léziók is megjelenhetnek [BROADBENT and HEATHCOTE 1958]. Terjedése főként mechanikai sérüléseken keresztül történik, terjesztésében a bogarak (*Coleoptera*) is szerepet játszanak [KING et al. 2011].

A Betacarmovírusok genomja 4 kb hosszú pozitív ssRNS, melynek 5' végéről hiányzik a CAP és 3' vége sem poliadenilált. Vizsgálatainkhoz használt TCV genomja 4053 nt hosszú. A vírus genomja öt ORF-et kódol [CARRINGTON et al. 1989] (3. ábra). A genomi RNS 5' végén helyezkedik el az ORF1 és ORF2. Az ORF1 által kódolt 28 kDa méretű fehérje továbbolvasása során keletkezik a nagyobb 88 kDa méretű fehérje (ORF2). Bizonyított, hogy mindkét fehérje esszenciális a vírus genom replikációhoz [WHITE et al. 1995]. A két egymással átfedő középső ORF (ORF3, ORF4) a vírus mozgásáért felelős fehérjéket kódolja. Az ORF3 8 kDa-, az ORF4 9 kDa méretű fehérjét kódol [HACKER et al. 1992]. A genom 3' végén található ORF5 kódolja a 38 kDa méretű köpenyfehérjét [CARRINGTON et al. 1987]. A vírus burkának kialakításán túl a TCV CP-je több folyamatban is fontos szerepet játszik. Igazolták szerepét a vírus mozgásában [HACKER

et al. 1992], szupresszorként képes az RNS interferencia folyamatát gátolni a DCL enzimek funkciójának zavarásán keresztül [QU et al. 2003]. Az ORF1 és ORF2 fehérjék közvetlenül a genomi RNS-ről transzlálódnak. Az 1,7 kb hosszú sgRNS1-ről transzlálódik a két egymással átfedő MP (ORF3 és az ORF4). A köpenyfehérje (ORF5) az 1,45 kb méretű sgRNS2-ről keletkezik [CARRINGTON et al. 1987].



3. ábra Tarlórépa göndörödés vírus genom szerveződése

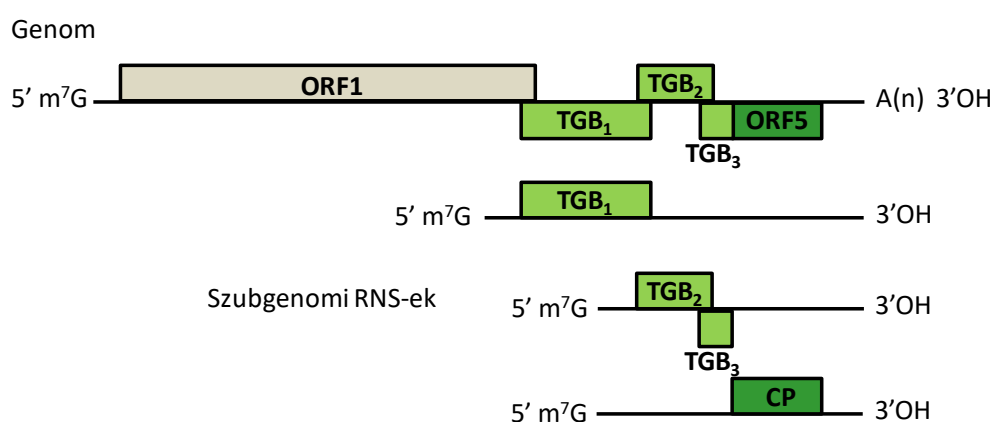
2.1.4. Burgonya x vírus

A burgonya x vírus (Potato virus x, PVX) az *Alphaflexiviridae* családba azon belül a *Potexvirus* nemzetségbe sorolható. A nemzetség névadója és egyben típusfaja a PVX vírus. Az ICTV 2018-es adatai alapján a nemzetségbe jelenleg 38 faj tartozik [HHTTP1].

PVX virionjai flexibilis, fonál alakúak, 515 x 15,5 nm méretűek. A 1350 köpenyfehérje alegység helikális struktúrát képezve körbezárja a vírus RNS-t [MILNE 1988]. Genomja lineáris pozitív ssRNS, mely mindössze 6%-a a virionnak. Szűk gazdakörrel rendelkezik, főként burgonyaféléken (*Solenaceae*) okoz gondot [KEVEI and KUCSERA 2010].

A PVX genom egy 6435 nt hosszú pozitív szálú RNS [HUISMAN et al. 1988]. A genomi RNS 5' végén CAP található [SONENBERG et al. 1978], 3' vége poliadenilált [MOROZOV et al. 1981]. A vírus RNS genom öt ORF-et tartalmaz (4. ábra). A genomi RNS 5' végéről közvetlenül egy 165kDa méretű fehérje (ORF1) transzlálódik. A részlegesen egymásba túlnyúló ORF2, ORF3 és ORF4 alkotja a hármas gén blokkot (TGB) [SKRYABIN et al. 1988]. Több vírus genomjában (*potex*-, *hordei*-, *beny*-, *peclu*-, *pomo*-, *carlavirus*) is azonosították a hármas gén blokkot, melyről olyan fehérjék (TGBp1, TGBp2, TGBp3) transzlálódnak, melyek a vírus sejtről-sejtre való mozgásában játszanak kulcsszerepet [GILMER et al. 1992, MEMELINK et al. 1990, SKRYABIN et al. 1988]. A PVX TGBp1 fehérje (26 kDa) RNS interferencia szupresszorként funkcionál, valamint a vírus RNS átjutását segíti a plazmodezmákon keresztül [HOWARD et al. 2004, MOROZOV et al. 1999, VOINNET et al. 2000]. A TGBp2 (12kDa) és TGBp3 (8kDa) fehérje transzmembrán

doménnel rendelkeznek és kapcsolatban állnak az endoplazmatikus retikulummal (ER). Mutációs analízissel kimutatták, hogy TGBp2 és TGBp3 ER-mal való kapcsolata rendkívül fontos a vírusfertőzés kialakulásához [KRISHNAMURTHY et al. 2003, MITRA et al. 2003]. A vírus RNS 3' végén található ORF5 a 25 kDa-os CP-t kódolja, mely a vírus RNS védelmében és a növényen belüli terjedésben játszik szerepet [CHAPMAN et al. 1992, FORSTER et al. 1992]. Az ORF1-ről származó fehérje közvetlenül a genomi RNS-ről transzlálódik. A PVX vírusnak három sgRNS-el rendelkezik. VERCHOT és munkatársai (1998) *in vitro* transzlációs kísérletekben bizonyította, hogy a TGB fehérjék nem egy sgRNS-ről keletkeznek: a TGBp1 fehérje sgRNS1-ről (2,1 kb), a TGBp2 és TGBp3 fehérjék sgRNS2-ről (1,4 kb) transzlálódnak. A sgRNS3-ról (0,9 kb) pedig a CP keletkezik [VERCHOT et al. 1998].



4. ábra Burgonya x vírus genom szerveződése

2.1.5. Dohány zörgőlevelűség vírus

A dohány zörgőlevelűség vírus (Tobacco rattle virus, TRV) az *Virgaviridae* családba azon belül a *Tobravirus* a nemzetségbe sorolható. A nemzetség névadója és egyben típusfaja a TRV vírus. Az ICTV 2018-as adatai szerint a nemzetségbe jelenleg 3 faj tartozik [HTTP1].

A TRV virionjai csőalakú és helikális szimmetriájú részecskék, melyek átmérője 23 nm. A TRV genomja kétsztrátú ezáltal egy hosszabb (185-196 nm) és egy rövidebb (50-115 nm) részecske különíthető el egymástól, ezek mérete függ az izolálástól. A hosszab részecske az RNS1-et, a rövidebb részecske az RNS2-t tartalmazza [HARRISON and ROBINSON 1978]. A TRV a legnagyobb gazdakörrel rendelkező vírusok egyike, kísérletes úton több mint 50 növény családban mintegy 400 növényfajt fertőztek meg. A TRV fertőzés növényeken általában nekrotikus és klorotikus tüneteket okozott, azonban ezen fertőzések többsége nem vált szisztémás fertőzéssé [SCHMELZER 1957]. Terjedése főként mechanikai átvitelrel és nematódák révén valósul meg [PLOEG et al. 1991].

A TRV genomja két pozitív ssRNS molekulából áll: RNS1 (6791 nt) és RNS2 (1905 nt). A genomi RNS 5' végén CAP, míg 3' végén tRNS-szerű struktúra található [MACFARLANE 1999]. Az RNS1 négy nem-strukturális fehérjét kódol. Az RNS1 5' végéről közvetlenül egy 134 kDa és annak továbbolvasása révén, egy 194 kDa méretű replikáz fehérje keletkezik. A sgRNS1a-ról (1,5 kb) 29 kDa-os mozgási fehérje, és sgRNS1b-ről (0,7 kb) 16 kDa méretű szupresszor fehérje transzlálódik [BOCCARA et al. 1986, MARTIN-HERNANDEZ and BAULCOMBE 2008]. Az RNS2 strukturális fehérjét és két nem-strukturális fehérjét kódol: 25 kDa-os köpenyfehérjét, egy 29,4 és egy 32,8 kDa-os fehérjét. A CP az sgRNS2a-ról transzlálódik [HERNANDEZ et al. 1996, MACFARLANE 1999], azonban a két nem-strukturális fehérje expressziójának mechanizmusa ezidáig ismeretlen. Kimutatták, hogy az RNS1 fertőzőképes és önállóan replikálódik az RNS2 jelenléte nélkül. RNS2 önálló replikációra képtelen, de tartalmazza a CP kódját, mely hiányában RNS1 fertőzés során vírus partikulumok nem keletkeznek [HARRISON and ROBINSON 1978, MACFARLANE 1999].

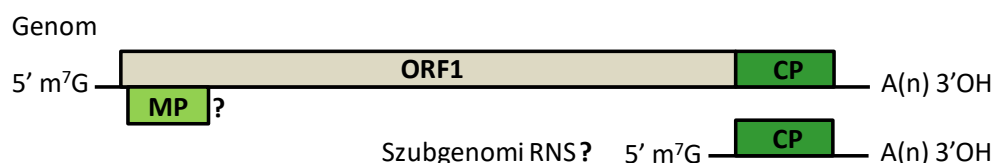
2.1.6. Szőlő Syrah-1 vírus

A szőlő Syrah-1 vírus (Grapevine Syrah virus-1, GSyV1) a *Tymoviridae* családon belül a *Marafivirus* nemzetség tagja. A nemzetség névadója és egyben típusfaja a kukorica finom csíkozottság vírus (MRFV). Az ICTV 2018-as adatai alapján a nemzetségbe jelenleg 10 faj tartozik [HTTP1]. Kaliforniában egy leromlást mutató Syrah szőlőültetvényen újgenerációs szekvenálással több vírus és viroid jelenléte mellett azonosították először [AL RWAHNIH et al. 2009]. Ezt követően GSyV1 vírus jelenlétét világszerte detektálták: Dél-Afrikában [OOSTHUIZEN et al. 2016], Kínában [AHMED et al. 2018], Chilében, Kanadában, Franciaországban, Csehországban, Szlovákiában [GLASA et al. 2015], Spanyolországban [RUIZ-GARCÍA et al. 2017] és Magyarországon [CZOTTER et al. 2015a, CZOTTER et al. 2018].

A vírus virionjáról eddig nincs információ, feltehetően 28-30 nm méretű izometrikus részecske [LEFKOWITZ et al. 2017]. Természetes gazdaköre a termesztett és vad *Vitis* nemzetségbe tartozó fajok, de vad *Rubus* mintából is azonosították már. Kísérletekkel bizonyított vektora eddig nem ismert. Ellenben GSyV1 vírussal fertőzött növényekről gyűjtött kabócából (*Erythroneura variabilis*) sikerült kimutatni a vírus jelenlétét, ami azt sugallja, hogy szerepet játszhat a terjesztésében [AL RWAHNIH et al. 2009].

A GSyV1 genomja egy 6,481 nt hosszú ssRNS. A genom 5' vége poliadenilált. A genom egy nagy nyitott leolvasási keretet (ORF1) tartalmaz (5. ábra) és feltehetően egy poliproteint kódol, melynek molekuláris tömege 229,5 kDa. Az ORF1-ben konzervált MET, HEL, RdRp, CP doméneket azonosítottak. Egy további ORF-et is detektáltak, mely teljes átfedést mutat az ORF1-

el, azonban ennek funkciója ezidáig ismeretlen. Genom szerveződése és genomjában azonosított konzervált marafibox szekvencia alapján *Marafivirus* nemzetségbe sorolták [HTTP2].

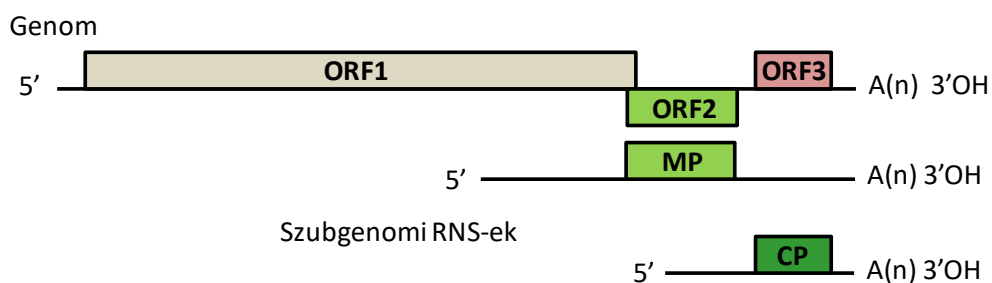


5. ábra Szőlő Syrah vírus-1 feltételezett genom szerveződése

2.1.7. Szőlő Pinot gris vírus

A szőlő Pinot gris vírus (Grapevine Pinot gris virus, GPGV) a *Betaflexiviridae* családba és azon belül a *Trichovirus* nemzetségbe tartozik. A nemzetség típusfaja az alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV). A nemzetségbe jelenleg 7 faj tartozik [HTTP1]. Olaszországban egy Pinot gris fajtájú klorotikus tüneteket mutató szőlő újgenerációs szekvenálásával azonosították először a GPGV vírust [GIAMPETRUZZI et al. 2012]. A vírus terjedésének kimutatására irányuló kísérletek ezidáig sikertelenek voltak: mechanikai úton történő átvitel nem sikerült *N. benthamiana*, *N. occidentalis* és *Chenopodium quinoa* esetén. Ezt követően a vírus jelenlétét világszerte detektálták: Kaliforniában [AL RWAHNIH et al. 2016], Kanadában [POOJARI et al. 2016], Koreában [CHO et al. 2013], Kínában [FAN et al. 2016], Törökországban [GAZEL et al. 2016], Franciaországban [BEUVE et al. 2015], Spanyolországban [RUIZ-GARCÍA and OLMOS 2017], Szlovákiában, Csehországban [GLASA et al. 2014] és Magyarországon [CZOTTER et al. 2018].

A GPGV genomja, osztatlan 7275 nt hosszúságú ssRNS, melynek 3' vége poliadenilált. GPGV RNS genomja három egymással átfedő ORF-et tartalmaz (6. ábra). Az ORF1 a 214 kDa méretű replikáz fehérjét, az ORF2 a 46 kDa-os mozgási fehérjét és az ORF3 a 22 kDa-os köpenyfehérjét kódolja [GIAMPETRUZZI et al. 2012].



6. ábra Szőlő Pinot gris vírus genom szerveződése

2.2. A vírusfertőzés során bekövetkező gén-expressziós változások a gazdanövényben

A vírusok különféle stratégiákat fejlesztettek ki a gazdanövény sikeres megfertőzése érdekében. Eddigi ismereteink alapján a vírusok a hatékonyabb fertőzés érdekében különféle változásokat képesek előidézni a növényi sejtekben: replikációs komplexek kialakítása [HILLS et al. 1987], poszttranszkripcionális géncsendesítés gátlása [VOINNET 2001], sejtek közötti forgalom megváltoztatása [CRAWFORD and ZAMBRYSKI, 1999a, CRAWFORD and ZAMBRYSKI 1999b, LAZAROWITZ and BEACHY, 1999] és beavatkozás a sejtciklus szabályozásába [GUTIERREZ 2000]. Ezek a változások a vírus replikációját, gyorsabb terjedését szolgálják, valamint a növény védekezési mechanizmusának kiiktatására irányulnak. Azonban a növények az RNS interferencia mechanizmusán túl, rendelkezhetnek rezisztencia mechanizmusokkal, mint hyperszenzitív rezisztencia (HR) és szisztémikusan szerzett rezisztencia (SAR) és hordozhatnak vírus ellen hatásos rezisztencia géneket is, melyek segítséget nyújthatnak a vírusfertőzéssel szemben [BAKER et al. 1997].

Növény-vírus kapcsolattól függően a növények különböző mechanizmusokon keresztül képesek védekezni a vírusok ellen. Az interakció végkimenetele alapján két féle: inkompatibilis és kompatibilis növény-vírus kapcsolatot különíthetünk el. Inkompatibilis kapcsolat esetén a növény rezisztencia génei felismerik a vírust és fiziológiai változásokkal képesek inokulációs ponthoz közel megállítani annak terjedését. Kompatibilis kapcsolatról abban az esetben beszélünk, ha a vírus a növényi sejtbe jutva a növény anyagcsere folyamatainak megváltoztatásán keresztül képes önmagát replikálni, kezdetben sejtről-sejtre halad, majd a növény szállítószövein keresztül elterjed a teljes növényben (szisztémás fertőzés). Kompatibilis kapcsolat során a replikálódó vírus megváltoztatja a növény transzkripció és transzláció rendszerét továbbá indukálja az RNS interferencia mechanizmusát, mely egyrészt felismeri és degradálja a virális RNS-eket, másrészt a gazda gén-expresszióját is szabályozhatja [BOLOGNA and VOINNET 2014] A felhalmozódó vírus fehérjék is hatással vannak gazdanövény gén-expressziójára és metabolizmusára, melynek következtében fejlődési és növekedési defektusok (tünetek) jelentkezhetnek a növényen [WHITHAM et al. 2006].

2.2.1. A vírusfertőzés során bekövetkező gén-expressziós változások vizsgálatának

módszerei

Az alábbiakban a gén-expressziós változások vizsgálatára leggyakrabban használt módszereket ismertetem. Az egyedi gének expressziójának vizsgálatára az *in situ* hibridizációs technika, a Northern blott és a kvantitatív valós-idejű PCR (qRT-PCR) terjedt el. A technika fejlődésével azonban elérhetővé váltak a genomszintű gén-expressziós változások

nyomonkövetésére alkalmas módszerek is: a microarray analízis és az RNS szekvenálás (RNA-seq).

Northern blott. Az RNS-alapú gén-expressziós vizsgálatok kialakulása a Northern blott analízissel kezdődött, mely specifikus RNS molekulák kimutatását teszi lehetővé egy totál RNS kivonatból [ALWINE et al.1977]. A módszer alapja, hogy egy szövetből vagy sejt típusból származó totál RNS kivonatot denaturálják, majd az RNS molekulákat méret szerint szétválasztják agaróz gélelektroforézissel. Szétválasztást követően a totál RNS-t a gélből kapilláris rendszeren keresztül nitrocellulóz vagy nylon membránra blottolják, majd az RNS-t UV fénnel rögzítik a membránra. Ezt követően hibridizálják a membránt RNS vagy DNS próbával. A próba komplementer a vizsgálni kívánt gén egy darabjával, melyet radioaktívan vagy fluoreszcensen jelölnek. A hibridizációt követően a jelölt próba lehetővé teszi, hogy az adott mintában lévő számos RNS molekula közül azonosítsuk a vizsgálni kívánt RNS-t. A módszer gyengeségei között említhető, hogy: egyidőben egyetlen gén expressziójának kimutatására alkalmas, nagy mennyiségű RNS-t igényel, számos vegyszer és egyéb eszköz szükséges hozzá és időigényes.

In situ hibridizáció. Az *in situ* hibridizációt (ISH) már 1969-ben [GALL and PARDUE 1969] kifejlesztették, azonban mRNS kimutatására a technikát egészen 1986-ig nem használták [SAN SEGUNDO-VAL and SANZ-LOZANO 2016]. A módszerrel egy biológiai anyagból, sejt szinten DNS vagy RNS szekvenciák detektálhatóak. Az *in situ* hibridizációt alkalmazzák: kromoszómák fizikai térképének elkészítésére, a kromoszómák szerkezeti változásainak vizsgálatára, a kromoszómák és a genomok evolúciójának nyomonkövetésére, a gén-expressziós vizsgálatokra, a vírusok és a baktériumok jelenlétének szövet szintű kimutatására és a transzformált szekvenciák detektálására [HOFFMANN 2011]. Először a próbákat radioaktívan jelölték [GALL and PARDUE 1969] azonban annak veszélyessége miatt, később áttértek nem-izotópos jelölésre. A próbákat ezután biotinnal és digoxigeninnel jelölték, melyeket ellenanyaggal detektáltak. Kezdetben a detektálást enzimátikus úton végezték, majd az ellenanyaghoz fluorokrómot kapcsolva lehetővé vált a hibridizációs jel fluoreszcens mikroszkópban (FISH) történő detektálása is [LANGER-SAFER et al. 1982].

qRT-PCR. HIGUCHI et al. (1993) kifejlesztett egy olyan PCR alapú technikát, mely alkalmas a gének expressziójának tanulmányozására. A PCR reakció összetétele a hagyományos PCR reakció eleggyel megegyezett és a reakcióhoz fluorokrómot adtak. A rendszer képes a PCR termék valós-idejű detektálására, azáltal hogy a fluoreszcens jelet minden ciklusban méri és a jel erőssége arányos a PCR termék mennyiségével. A jelölés alapján két típust különíthetünk el: fluofór vagy fluokróm. A fluofórt tartalmazó fluoreszcens festékek (SYBER Green) nem-specifikusan kötődnek a dsDNS-hez, ez esetben a fluoreszcencia erőssége korrelál a PCR termék kópia számával. A fluokrómmal kapcsolt próbák (TaqMan) specifikusan hibridizálódnak az amplifikált DNS szálakkal, így a jel specifikusabb és csak akkor keletkezik, ha a próba

hibridizálódik a komplementer régióval [HUGGETT and BUSTIN 2011, KOZERA and RAPACZ 2013]. A kvantifikáláshoz meg kell határoznunk a célgén kópia számát egy standard mintában. A standard mintaként ismert koncentrációjú plazmid DNS-t vagy cDNS-t használhatunk, ebből hígítási sort készítünk, majd amplifikáljuk a kívánt gént. A qRT-PCR minden egyes minta esetén regisztrál egy küszöbértéket (Ct). A standard minta hígítási sorainak görbéi és a Ct érték ismeretében számszerűsíthető a vizsgált gén kópia száma [VANGUILDER et al. 2008]. A normalizációhoz elengedhetetlen egy referencia gén és egy kontroll minta. A referencia gén egy konstitutív gén, melynek expressziója változatlan marad a vizsgálat során, ezáltal a reakcióba bemért össz nukleinsav mennyiségéhez ad viszonyítási alapot. A kontroll minta, pedig a körülmények hatására jelentkező mennyiségi eltérések detektálásához nyújt viszonyítási alapot. A legszélesebb körben alkalmazott relatív mennyiségi meghatározási módszer a deltadelta-Ct, mely a Ct értékek direkt összehasonlításán alapul. A módszer feltételezi, hogy minden egyes ciklusban a minta DNS tartalma megduplázódik és a referencia gén kifejeződése minden mintában konstans. A módszer során kiszámolják mind a kezelt (Minta ΔCt) mind a kontroll minta (kontroll ΔCt) ΔCt értékét, ezáltal megtudjuk, hogy milyen arányban van jelen a vizsgálni kívánt génünk a kezelt mintákban a kontroll mintához képest [LIVAK and SCHMITTGEN 2001, TÓTH 2013].

Microarray analízis. A microarray technika a nukleinsav szálak komplementaritásán alapul, lehetővé teszi, hogy hibridizációval specifikus szekvenciákat azonosítsunk. A microarray másnéven DNS chip vagy biochip egy szilárd felületű (üveg, műanyag, nylon) hordozó, melyre oligonukleotidokat kötnek, ezek szekvenciája egy élőlény genomjának valamennyi régióját reprezentálhatja [SOUTHERN et al. 1999]. A microarray-eknek két típusát különböztetik el: (1) oligonukleotid microarray, mely specifikus DNS szekvenciák kimutatására alkalmas és (2) cDNS microarray, mellyel specifikus RNS szekvenciákat azonosítanak. Az oligonukleotid microarray chipre jellemző, hogy kémiai szintetizált 25 bp hosszú fragmenteket tartalmaz, melyek mérete, olvadási hőmérséklete, koncentrációja ugyanaz, ezáltal csökken a kísérletek közötti eltérés valamint az oligonukleotidok fotolitográfiával végzett direkt szintézise lehetővé teszi a próbák sűrű elhelyezését. Limitáló tényezője, hogy ára igen drága. A cDNS microarray chipre akár 600-2000 bp méretű cDNS próba is köthető. Előnyeként említhető olcsósága valamint cDNS könyvtárakból is készíthetők, melyek legtöbbször publikus. Hátránya, hogy kereszthibridizáció jöhet létre, valamint a próbák mérete, olvadási hőmérséklete közötti különbség csökkenti a vizsgálat statisztikai értékét. A microarray technika lépései: RNS kivonás a vizsgálni kívánt szövetből, RNS amplifikáció, reverz-transzkripció, cDNS törése (fragmentálás) és jelölése (biotin), hibridizáció, jel detektálás [SAN SEGUNDO-VAL and SANZ-LOZANO 2016]. A microarray technika lehetővé teszi, hogy egyidejűleg több tízezer gén választát vizsgálják egy adott körülmény esetén. Növényeknél a microarray technika főként arra irányult, hogy megértsék abiotikus

(szárazság, tápanyag, fény, hőmérséklet) és biotikus (patogének) tényezők hatására milyen transzkripciós változások következnek be [CHEN et al. 2002, SCHAFFER et al. 2001, SEKI et al. 2002, THIMM et al. 2001]. Ez a technika lehetőséget nyújt arra, hogy genom szinten vizsgálhassuk a különböző növény-vírus kölcsönhatásokat és a vírusfertőzésben szerepet játszó géneket azonosíthassuk [GOLEM and CULVER 2003]. Az NCBI PubMed adatbázisa alapján elmondható, hogy microarray technikával végzett kutatások publikálása 2000-2012 között folyamatosan emelkedett, ezt követően az újgenerációs szekvenálási technikák elérhetővé válásával egyre inkább kiszorult.

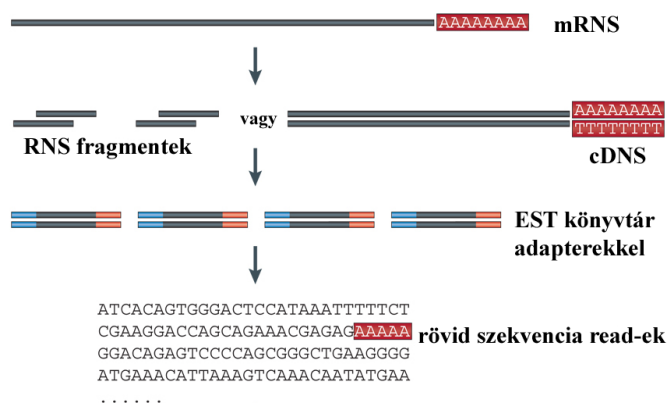
RNS szekvenálás. Az 1970-es években fejlesztették ki az első DNS szekvenálási technológiát, melynek alapja a DNS kémiai módosítását követő specifikus bázisoknál történő hasítás. Ezzel egyidőben Sanger is kifejlesztett egy lánctermináción alapuló DNS szekvenálási módszert, melyet magas hatékonyság ugyanakkor alacsony radioaktivitás jellemzett (első generációs szekvenálás). 1987-ben megjelent az első Sanger módszeren alapuló automata szekvenáló, melyet a gyorsabb és pontosabb szekvenálás érdekében kapilláris elektroforézissel egészítettek ki. A Sanger módszeren alapuló szekvenálók folyamatos fejlesztése lehetővé tette, hogy 2001-re a teljes emberi genomot szekvenálják. Majd 2005-től megjelentek az első nagy áteresztőképességű szekvenálók, melyek alapja a transzkriptum analízis [LIU et al. 2012]. A nagy áteresztőképességű szekvenáló lehetővé tette a sejben lévő különböző ribonukleinsav csoportok, mint például: hírvivő RNS (mRNS), transzfer RNS (tRNS), riboszómális RNS (rRNS), kis sejtmagi RNS (snRNS), nem-kódoló RNS (ncRNS) vizsgálatát. Ezen RNS-ek expressziója egyes szövetekben, fiziológiai állapotban és fejlődési szakaszban eltérő [SAN SEGUNDO-VAL and SANZ-LOZANO 2016]. A módszer lehetőséget ad arra, hogy a transzkriptumok komplexitásának megismerésével, azonosítsuk a genom funkcionális elemeit és feltárjuk az egyes betegségek mechanizmusát és előmenetelét. Az RNS-alapú szabályozás vizsgálatához kis RNS szekvenálást, a gén-expressziós változások nyomonkövetéséhez RNS szekvenálást végeznek.

A következőkben gén-expressziós változások vizsgálatának egyik módszerét, az RNS szekvenálást és annak lépéseit fogom ismertetni. Az szekvenálási lépéseket 7. ábra szemlélteti. A szekvenálás előtt az RNS populációból (teljes vagy frakcionált, poliadenilált véggel rendelkező) fragmentálás útján komplementer DNS (cDNA) könyvtárat készítenek. Minden egyes cDNS fragmenthez (egyik vagy mindkét végére) szekvenáló adaptereket ligálnak és nagy áteresztőképességű technikával minden molekulát (amplifikáció nélkül vagy amplifikációt követően) egyik (single-end sequencing) vagy mindkét végéről (pair-end sequencing) megszekvenálják. Az egyes leolvasott szekvenciák (read) mérete általában 30-400 bp lehet attól függően, hogy a szekvenálást milyen DNS szekvenálási technológiával végeztük. A kapott read-eket ezt követően referencia genomhoz vagy transzkriptumhoz lehet hasonlítani. Három típusú

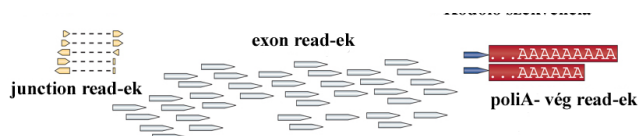
read különíthető el: exon read, szemét (junction) read, poliadenilált-vég read. Az RNS szekvenálás előnye, hogy nagy áteresztőképességű, kvantitatív módszer, mely teljes transzkriptum analízist tesz lehetővé. Egy bázisos felbontása miatt alkalmas annotációra, genomszintű gén-expresszió meghatározásra és költsége kedvezőbb, mint a többi módszeré [WANG et al. 2009].

2.2.2. Az RNS interferencia

Az RNS interferencia egy ősi eukarióta mechanizmus, mely fontos szerepet játszik egyrészt az idegen eredetű nukleinsavakkal (transzpozonok, vírusok, viroidok) szemben, másrészt



7. ábra Az RNS szekvenálás lépesei [Wang et al. 2009]



az endogén gének szabályozásában [BAULCOMBE 2004].

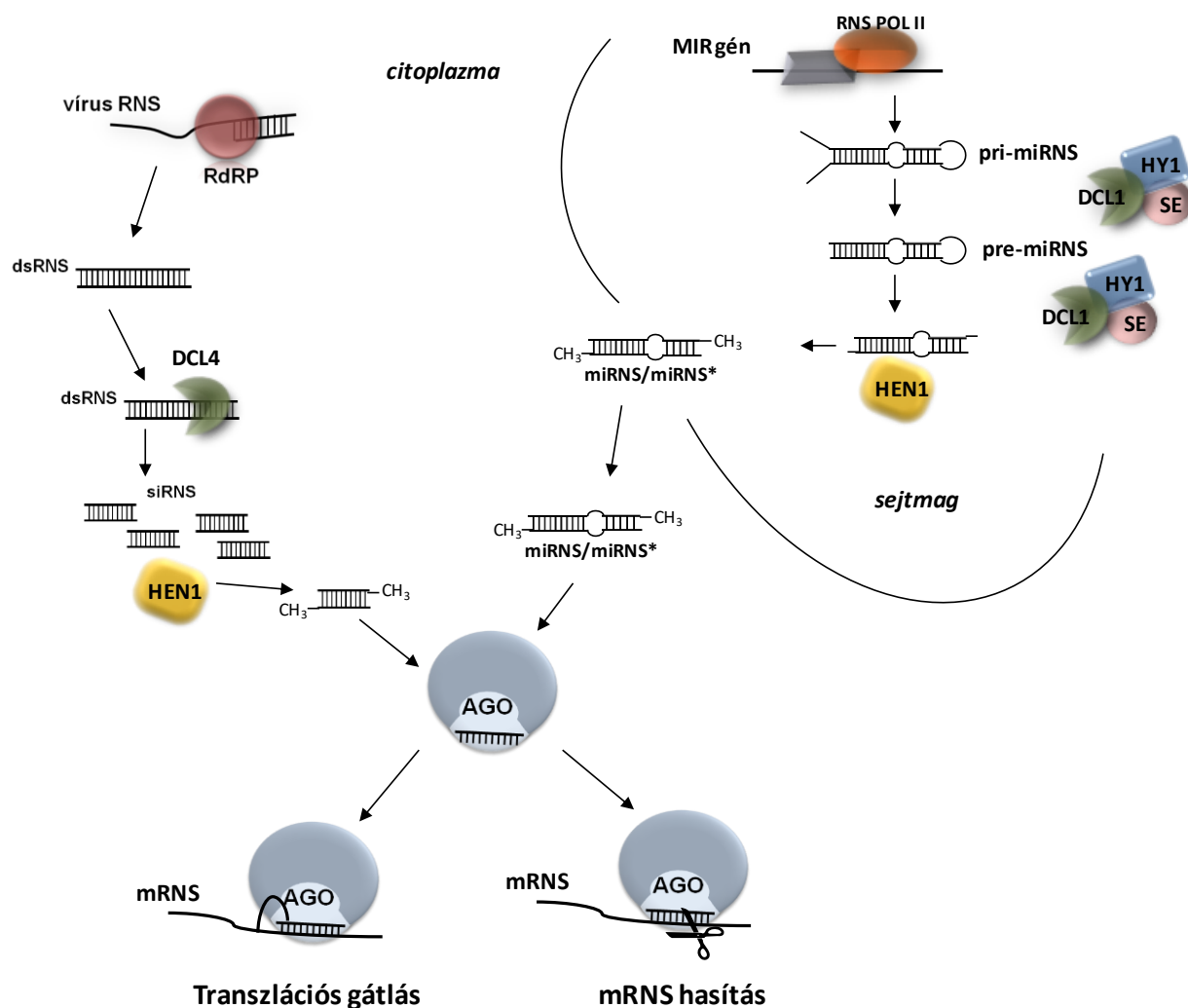
Az RNS interferenciával kapcsolatos kutatások csak az 1990-es évek végén kerültek előtérbe, annak ellenére, hogy az első RNS interferenciával kapcsolatos cikket 1928-ban publikálták [BAULCOMBE 2004]. WINGARD (1928) arról számolt be, hogy dohány gyűrűsfoltosság vírussal fertőzött dohány növényeken a nekrózis és a betegség kizárólag fertőzött leveleken jelentkezett. A felső levelek vírussal szemben immunisak voltak, tünetmentesek és másodszori fertőzéssel szemben is rezisztensnek mutatkoztak. Mára ismert, hogy a dohány gyűrűsfoltosság vírusfertőzésből történő kigyógyulás (recovery) az RNS interferenciának köszönhető, mely célzottan támadja a vírus RNS-eket [RATCLIFF et al. 1997]. Ezt követően hasonló jelenségről számoltak be gombákban (*Neurospora crassa*) [ROMANO and MACINO, 1992], nematódákban (*Caenorhabditis elegans*) [FIRE et al. 1998], protozoákban (*Trypanosoma brucei*) [NGO et al. 1998] és rovarokban (*Drosophila melanogaster*) [KENNERDELL and CARTHEW 1998]. A mechanizmus gazdaszervezettől függően eltérő elnevezést kapott: növényeknél poszttranszkripcionális géncsendesítés (PTGS), gombáknál quelling, állatoknál RNS interferencia [AGRAWAL et al. 2003].

Genetikai és molekuláris analízis alapján a növényekben az RNS interferenciának több útvonalát különítik el, azonban az alábbiakban a téma szempontjából legfontosabb 3 útvonalat ismertetjük. A három útvonal közös jellemzője, hogy a folyamat kiváltója minden esetben egy dsRNS molekula, melyet egy enzim komplex (DCL) 21-24 nt méretű kis RNS-ekre hasít. A keletkezett kis RNS-ek eredetüket tekintve két csoportba oszthatóak: a kis interferáló RNS-ekre (siRNS) és mikro RNS-ekre (miRNS) [BAULCOMBE 2004]. Az első útvonal a citoplazmás siRNS csendesítés, ide tartoznak a vírusokkal és a transzgénekkel szemben aktiválódó természetes védekezési folyamatok [HAMILTON and BAULCOMBE 1999]. A második útvonal a miRNS-eken keresztül szabályozott mRNS-ek, ez a folyamat az endogén gének finomszabályozását biztosítja [REINHART et al. 2002]. A harmadik útvonalhoz tartozik a siRNS közvetítette DNS metiláció, a transzkripcionális géncsökkentés (TGS) és a transzpozonokkal szembeni védekezés [JONES et al. 2001, METTE et al. 2000, XIE et al., 2004].

Az RNS interferencia végrehajtásában szerepet játszó fő komponensek: a DCL-szerű enzimek és a RISC központi molekulája az AGO fehérje. Az RNS interferencia mechanizmusát és fő komponenseit a 8. ábra szemlélteti. Dicer-szerű enzimek kulcsszerepet játszanak a siRNS- és miRNS biogenezisben, a hosszú dsRNS-ek feldolgozásán keresztül [CHAPMAN and CARRINGTON 2007]. Magasabbrendű növényekben a DCL-ek 2, 4 vagy 5 tagból álló kis géncsaládot alkotnak [LIU et al. 2009]. A DCL fehérjék körülbelül 200 kDa méretű, több doménnel rendelkező ribonukleázok [CHAPMAN and CARRINGTON 2007]. Növényekben a DCL fehérjék általában 6 típusú domént: DExD helikáz, helikáz-C, DUF283, RNázIII, PAZ, dsRBD (dsRNS-kötő domén) tartalmaznak [MARGIS et al. 2006]. A DExD helikáz, helikáz-C domének az N-terminális és a C-terminális régiókhoz közel helyezkednek el. Kimutatták, hogy emlősökben és rovarokban a DexD helikáz kulcsszerepet játszik a citoszolban jelenlévő virális RNS-ek felismerésében [DEDDOUCHE et al. 2008, KEMP and IMLER 2009]. Az erősen konzervált DUF283 funkciója ezidáig ismeretlen [MARGIS et al. 2006]. A PAZ, RNázIII, dsRBD domének a dsRNS megkötésében és hasításában játszanak fontos szerepet. A PAZ domén a dsRNS 3' végét ismeri fel [LINGEL and SATTLER, 2005]. A DCL fehérjékben kettő darab RNázIII domén (RNázIIIa, RNázIIIb) található, melyek a dsRNS-ek vágásáért felelősek. A dsRBD nem csak a dsRNS-ek kötésében játszik szerepet, hanem fehérje-fehérje interakciós doménként is funkcionál [MARGIS et al. 2006]. A *thaliana* növényben négy DCL fehérjét azonosítottak, melyek részt vesznek a miRNS biogenezisben (DCL1), a vírusok elleni védekezésben (DCL2, DCL4), a TGS-ben (DCL3), a PTGS-ben és transz-ható siRNS (tasiRNS) metabolizmusban (DCL4) [DUNOYER et al. 2005, HENDERSON et al. 2006, MLOTSHWA et al. 2008, MOISSIARD et al. 2007, XIE et al. 2004]. A DCL-

ek eltérő méretű dsRNS-ek gyártására specializálódtak: a DCL1 és DCL4 21 nt, DCL2 22 nt, DCL3 24 nt méretű dsRNS-ek keletkezését segíti elő [BRODERSEN and VOINNET 2006].

A RISC központi molekulája az Argonauta fehérje család egyik tagja. Az AGO fehérjék ősi eredetére utal, hogy megtalálták baktériumokban, archeákban és eukariótákban is [CERUTTI and CASAS-MOLLANO 2006]. Az eukarióták AGO fehérjéi hasonló szerkezettel és biokémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, fontos szerepet játszanak az RNS interferenciában [FANG and QI



8. ábra Az RNS interferencia mechanizmusa: siRNA és miRNA útvonal

2016]. Az AGO fehérje 90-100 kDa méretű, egy változó N-terminális domént és konzervált C-terminális PAZ, MID és PIWI doméneket tartalmaz. A MID domén a kis RNS 5' foszfátsoportját köti, míg a PAZ domén a kis RNS 3' véget ismeri fel [FRANK et al. 2010]. A PIWI domén RNázH enzimekre jellemző struktúrát vesz fel és endonukleáz aktivitása (slicer) révén a beépült kis RNS-sel komplementer target ssRNS-eket elhasítja [HUTVAGNER and SIMARD 2008, SONG et al. 2004, TOLIA and JOSHUA-TOR 2007]. Az AGO fehérjék száma különböző fajokban nagyon változatos lehet. A virágos növényekben 10 vagy több AGO fehérje is előfordulhat [FANG and QI 2016]. Szerepük nélkülözhetetlen a miRNA- és siRNA által közvetített fejlődésbiológiai folyamatok és

stressz válaszok szabályozásában, a siRNS által közvetített antivirális immunválaszban, a siRNS által közvetített kromatin átrendeződésben és transzpozonok szabályozásában [VAUCHERET 2008]. *A.thaliana* növényben 10 AGO fehérjét azonosítottak [CARMELL et al. 2002]. A növények közül az *A.thaliana* AGO fehérjéinek funkciója a leginkább jellemzett: az AGO4, AGO5, AGO6 és AGO9 a heterokromatin képzésben és DNS-metilációban vesznek részt [HAVECKER et al. 2010], az AGO1, AGO10 az antivirális RNS interferencia fő komponensei, az AGO2-nek szintén lehet antivirális funkciója [FÁTYOL et al. 2016, HARVEY et al. 2011], az AGO3, AGO8 funkciója ezidáig ismeretlen.

2.2.2.1. A siRNS alapú RNS interferencia

Az eukarióta szervezetekben leírt nem-kódoló kis RNS-ek egyik nagy csoportját a siRNS-ek alkotják [BAULCOMBE 2004]. A siRNS alapú védekezési mechanizmust a hosszú dsRNS-ek jelenléte aktiválja. A dsRNS keletkezhet a vírus replikációja során (intermediér termék), vírus genom intramolekuláris hajtű struktúráiról (hairpins), transzpozonról és transzgénről keletkező átfedő transzkriptumok is kialakíthatják [DING and VOINNET, 2007, HO et al. 2006, MOLNAR et al. 2005]. A siRNS alapú szabályozás egyik legismertebb példája NAPOLI et al. (1990) által végzett kísérlet, mely során a lila pigment termeléséért felelős chalkon szintáz gén túltermeltetésével sötétebb virágú petúniát szerettek volna létrehozni. A kísérlet eredményeként viszont mozaikos (lila-fehér) és fehér szirmú transzgénikus növényeket kaptak. Mára tudjuk, hogy ezt a jelenséget az RNS interferencia (ko-szupresszió) okozta, mely során a transzgén és az endogén gén expressziója gátolva volt. Magasabbrendű növényekben kimutatták, hogy az RNS interferencia hatása nem csak sejt szinten jelenhet meg, hanem a teljes növényre (szisztémás RNS interferencia) kiterjedhet [PALAUQUI et al. 1997, VOINNET and BAULCOMBE, 1997]. A nem-sejt-anatóm RNS interferencia leginkább növényekben és *C.elegans*-ban tanulmányozott. Lokálisan indukált RNS interferencia esetén az indukálási zónától távoli szövetben szekvencia specifikus mRNS degradációt figyeltek meg [VOINNET et al. 1998, WINSTON et al. 2002]. Növényekben közvetett bizonyítékok azt mutatják, hogy az RNS interferencia sejtről-sejtre való terjedése a plazmodezmákon, a hosszabb távú mozgása a floómen keresztül történhet [VOINNET et al, 1998]. Kísérleteik alapján HIMBER et al. (2003) azt feltételezik, hogy az RNS interferencia során keletkező 21 nt hosszú siRNS-ek mozgása révén kezdetben rövid távon, majd a plazmodezmákon keresztül szisztémásan terjed szét az RNS interferencia. MOLNÁR et al. (2010) *A. thaliana* növények *dcl2,3,4* mutáns és vad típusú oltványainak vizsgálata során megfigyelték, hogy a 24 nt hosszú kis RNS-ek mobilisak a növényekben. Eddigi vizsgálatok alapján mesterséges rendszerben a 21 és 24 nt hosszú siRNS-ek mobilisak, de végleges adatok még nincsenek arra vonatkozóan, hogy az endogén RNS-ek is mozognak [MELNYK et al. 2011].

A RNS interferencia folyamatát indukáló dsRNS-eket az RNázIII típusú DCL enzimek felismerik és rövid 21-24 nt hosszú siRNS-ekre darabolják [VOINNET 2008]. A siRNS-ekre jellemző, hogy 5' végükön foszfát csoport található, 3' végük túlnyúlik (2 nt) és hidroxil csoportot tartalmaz [ELBASHIR et al. 2001]. A siRNS-ek egyik szála beépül RISC-be, melynek központi molekulája az AGO fehérje. Az AGO fehérje siRNS egyik szálának a megkötésével, szekvencia specifikusan képes felismerni a komplementer cél mRNS-eket, majd azok hasításával vagy transzkripció és transzláció gátlásával megakadályozza, hogy fehérje keletkezzen [VOINNET 2008].

2.2.2.2. A miRNS alapú RNS interferencia

Az eukarióta szervezetekben leírt nem-kódoló kis RNS-ek másik nagy csoportját a miRNS-ek alkotják [BAULCOMBE 2004]. Az elsőként azonosított miRNS, *lin-4* RNS volt, mely szabályozza a *C. elegans* lárvák fejlődési ütemét az egyes fejlődési stádiumok között [LEE et al. 1993, WIGHTMAN et al. 1993]. Eukariótákban a miRNS-ek többsége transzkripció faktor (TF)-okon keresztül vagy más szabályozó fehérjék útján képesek befolyásolni: a különböző fejlődési folyamatokat, jelátviteli útvonalakat és fontos szerepet játszanak a stressz válaszban is [CHEN 2005, SUNKAR and ZHU 2004]. Bioinformatikai vizsgálatok során kiderült, hogy a komplex szervezetek (ember, rovar, nematóda) genomjának mintegy 1%-át teszik ki a miRNS-eket kódoló gének [LAI et al. 2003, LIM et al. 2003a, LIM et al. 2003b]. A miRNS többsége konzervatív, de vannak faj specifikusak is [SUNKAR et al. 2005]. Az újgenerációs szekvenálásoknak köszönhetően az eukarióta szervezetekben mára több mint 24500 miRNS-t azonosítottak, ezek szekvenciája a miRBase adatbázisban hozzáférhető [KOZOMARA and GRIFFITHS-JONES 2014].

A miRNS-ek 21-24 nt hosszú kis RNS-ek, melyek nem-kódoló miRNS génekről (MIR gének) keletkeznek. A MIR gének a fehérjét kódoló génekhez hasonlóan tartalmazhatnak intronokat és transzkripciójukért az RNS polimeráz II felelős. A MIR gének transzkriptumai (pri-miRNS) jellegzetes hajtűszerű másodlagos struktúrával rendelkeznek, 5' végükön sapka található és 3' végük poliadenilált [LEE et al 2004]. A növényekben a DCL1 enzim többszöri hasítását (pri-miRNS, pre-miRNS) követően alakul ki az érett miRNS [PARK et al. 2005]. A DCL1 önmagában is képes a pri- és a pre-miRNS-ek hasítására, azonban hatékonyabb és pontosabb működése érdekében a Hypostatic leaves 1 (HYL1) dsRNS-kötő fehérjével és a Serrate (SE) cink-ujj fehérjével (ZFP) együtt végzik a hasítást [DONG et al. 2008, LAUBINGER et al. 2008, YANG et al. 2006]. A kihasított miRNS-t a Hua enhancer 1 (HEN1) metilálja, ezáltal védi a kis RNS lebontó nukleáz 1 (SDN1) ellen. A HEN1 metiltranszferáz enzim sejtmagi lokalizációs szignállal rendelkezik, N-terminális végén dsRNS-kötő domén található, C-terminális régiója konzervált és S-adenosil metionin (SAM)-kötő motívumot tartalmaz [YU et al. 2005, KIDNER and MARTIENSSSEN

2005]. Az érett miRNS-ek citoplazmába juttatásában feltételezhetően a Hasty fehérje (HST) vesz részt [BARTEL 2004]. A citoplazmába kijutott miRNS/miRNS* duplex egyik szála beépül a RISC-be, ezáltal meghatározza annak szekvencia specifitását, a duplex másik szála lebomlik. Azt, hogy a miRNS/miRNS* duplex melyik szála épül be és melyik bomlik le azt a duplex termodinamikája határozza meg [KHVOROVA et al. 2003]. A miRNS-ek transzlációs gátlással és a célszekvenciák hasításával szabályozhatják a cél génjeik kifejeződését. Azonban növényekre az utóbbi szabályozás jellemző, mivel a miRNS-ek általában teljes vagy majdnem teljes komplementaritást mutatnak a cél mRNS-sel, mely a célszekvenciák hasítását indukálja [TANG et al. 2003]. Ezt követően a hasított terméket a sejtben lévő nukleázok gyorsan lebontják [SHEN and GOODMAN, 2004, SOURET et al. 2004].

2.2.2.3. Az RNS csendesítés gátló virális szupresszor fehérjék

Vírusfertőzés során a növényben indukálódó RNS interferencia ellen a vírusok többféle módszert fejlesztettek ki. Egyes vírusok gyors replikációjuk és mozgásuk révén elkerülhetik a növény védekező rendszerét, azonban ez esetben az RNS interferencia még hatással lehet a vírus felhalmozódásának mértékére. Más vírusok rendelkeznek egy speciális fehérjével (VSR), melynek köszönhetően akár több ponton is képesek aktívan gátolni az RNS interferencia mechanizmusát [DING and VOINET, 2007, KASSCHAU and CARRINGTON 1998].

A virális szupresszor fehérjék az RNS interferencia útvonalában kulcsszerepet játszó RNS-ekkel és a fehérje komponensekkel tudnak kölcsönhatásba lépni, ezáltal nem csak a sejt szintű, hanem a szisztémás RNS interferenciát is képesek gátolni. A szupresszor fehérjék legáltalánosabb stratégiája a siRNS-ek megkötése és eliminálása [LAKATOS et al. 2006, MÉRAI et al. 2006]. Egyes vírusok szupresszor fehérjéi képesek a hosszú dsRNS-ek (nincs méret preferencia) megkötésére. Azonosítottak olyan szupresszor fehérjéket, melyek az RNS interferencia útvonalában szerepet játszó DCL4 [DELERIS et al. 2006], AGO1, AGO4 [HAMERA et al. 2012, ZHANG et al. 2006] fehérje komponensekkel kölcsönhatásba lépve akadályozzák annak funkcióját.

Az alábbiakban a munkám során felhasznált vírusok (TMV-U1, crTMV, CymRSV, TCV, PVX) szupresszor fehérjéinek (p126, p122, p19, p38, p25) főbb jellegzetességeit mutatom be. A p126 fehérje a nagy mérete és több doménje miatt kitűnik az eddig ismert VSR-ek közül, ez a virális szupresszor fehérje hatalmas evolúciós előnyt jelenthet a TMV-U1 vírusnak. Bizonyított, hogy a p126 fehérje mindegyik doménje szerepet játszik az RNS interferenciában, ezáltal ha az egyik domén mutálódna, a vírus akkor is képes lenne felvenni a versenyt a növény védekező mechanizmusával szemben. A p126 fehérje pontos szerepe az RNS interferenciában máig tisztázatlan, úgy gondolják, hogy a fehérje több doménje felerősítheti a vírus védekezésének

hatékonyságát. Például, ha a különböző doméneknek eltérőek a cél komponensei vagy az RNS interferencia útvonalának különböző pontjait képesek támadni [WANG et al. 2012]. Kimutatták, hogy a szintén Tobamovírusok közé tartozó crTMV vírus p122 fehérjéje, nem csak a vírus replikációban fontos, hanem RNS interferenciát gátló aktivitással is rendelkezik. Bebizonyították, hogy a p122 fehérje a siRNS-ek megkötésével képes megakadályozni, hogy a virális eredetű kis RNS-ek beépüljenek a RISC-be. *In vivo* és *in vitro* kísérletek igazolják, hogy a p122 szupresszor fehérje a már összeszerelődött RISC hasítási aktivitását nem befolyásolja [Csorba et al. 2007]. Az egyik legjobban jellemzett virális szupresszor fehérje a Tombusvírusok p19 fehérjéje. *In vitro* és *in vivo* kísérletekben bizonyították, hogy a p19 fehérje specifikusan köti a 21-22 nt hosszú ds siRNS-eket, megakadályozva ezzel, hogy vírushordozás során a vírus specifikus siRNS-ek RISC-be épüljenek [LAKATOS et al. 2004, SILHAVY et al. 2002, VARGASON et al. 2003]. siRNS kötési vizsgálatokkal kimutatták, hogy a p19 fehérje szekvenciától függetlenül, de méret szerint ismeri fel a ds siRNS-eket. Ezeket az eredményeket a p19-siRNS komplex röntgenkristallográfiai vizsgálataik is alátámasztották. Kiderült, hogy a p19 fehérje homodimer, mely ds siRNS végeivel lép kölcsönhatásba. A fehérje N-terminális régiójában található 39-es és 42-es triptofán, a ds siRNS méret specifikus felismerésében játszik szerepet. A fehérje C-terminális vége felelős a dimerizációért [VARGASON et al. 2003]. Igazolták a p19 fehérje siRNS-kötő szerepét, azáltal hogy CymRSV fertőzött növényben a p19 fehérje által kötött siRNS-ek inaktív, míg a p19 fehérjét nem termelő mutáns (Cym19stop) vírussal fertőzött növényben a siRNS-ek szabad formában voltak jelen. Továbbá kimutatták, hogy p19 fehérje hiányában (Cym19stop) a vírusról származó siRNS-ek felhalmozódnak a növényben és aktiválják az RNS interferenciát, melynek hatására a növény kigyógyul (recovery) a vírushordozásból [SZITTYA et al. 2002]. A Tobamovírusok közé tartozó TMV-U1 vírusról már korábban megállapították, hogy képes az RNS interferencia mechanizmusát gátolni, azonban ehhez a funkcióhoz virális fehérjét nem tudtak társítani [VOINNET et al. 1998, VOINNET et al. 1999]. Agroinfiltrációs kísérletekben igazolták, hogy a p126 fehérje, a már ismert vírus replikációban betöltött szerepén túl [LEWANDOWSKI and DAWSON 2000], virális szupresszor fehérjeként is funkcionál [DING et al. 2004]. A TCV vírus köpenyfehérjéje egyben virális szupresszor fehérje (p38) is. Agroinfiltrációs kísérletekkel igazolták, hogy a p38 fehérje lokálisan és szisztémásan is gátolja az RNS interferenciát [QU et al. 2003]. A p38 mérettől független dsRNS-kötő fehérje, mely hosszú dsRNS-ek és ds kis RNS-ek kötésére is képes. A p38 fehérje képes inaktiválni az RNS interferencia mechanizmusát, azáltal hogy a virális kis RNS-ek prekursorait megköti. A hosszú dsRNS-ek megkötésével megakadályozza, ezek DCL általi feldolgozását. Ezenfelül a p38 fehérje a ds siRNS-ek kötésével megakadályozza azok beépülését az AGO1 és az AGO2 fehérjébe [DELERIS et al. 2006, IKI et al. 2017, MÉRAI et al. 2006]. A PVX vírus köpenyfehérjéje a virális szupresszor fehérje (p25). A p25 egy multifunkcionális fehérje: mely

nukleotid-kötő és RNS helikáz aktivitással rendelkezik, szerepet játszik a vírus terjedésében és az RNS interferencia gátlásában [MOROZOV et al, 1999]. BAYNE et al. (2005) kimutatták, hogy a p25 fehérje vagy a végrehajtó komplex összeszerelődését vagy annak működését gátolva akadályozza az RNS interferencia útvonalát. Ko-immunprecipitációs vizsgálatokkal és Western blott analízissel kimutatták, hogy a p25 fehérje egyik célpontja az AGO fehérje, mellyel erős kölcsönhatásba tud lépni. Kimutatták, hogy az AGO1 akkumuláció más szupresszor fehérje (HcPro) hatására változatlan maradt, míg p25 fehérje jelenlétében drasztikusan lecsökkent, azonban ez az állapot proteoszóma inhibitoros kezeléssel visszaállítható volt. Ezek alapján úgy gondolják, hogy a p25 fehérje képes előidézni az AGO fehérjék proteoszómális degradációját [CHIU et al. 2010].

2.2.3. A vírus okozta gén-expressziós változások a növényben

Vírusfertőzés során a vírus képes teljesen megváltoztatni a növény transzkripció és transzláció rendszerét. Egyrészt a vírus replikációja során a gazda erőforrásainak felhasználásával, másrészt a felhalmozódó vírus fehérjéken keresztül is hatással vannak a gazda gén-expressziójára, melynek következtében fejlődési és növekedési rendellenességet okoznak a növényen. Az irodalmak alapján összegyűjtött és főbb kategóriákba sorolt vírus okozta gén-expressziós változásokat az alábbiakban ismertetem.

2.2.3.1. A növény- vírus interakcióban résztvevő gének expresszió változása

A vírusfertőzés során a növényben számos génnek az expressziós változása figyelhető meg, mely azt jelzi, hogy a vírus kölcsönhatásba lépett a gazdasejtekkel. Általános gén-expressziós változások közé sorolhatóak a védelemmel kapcsolatos gének: patogenezis-kapcsolt fehérje (*PR*) és hősokk fehérje (*HSP*) gének indukciója [WHITHAM et al. 2003]. Igazolták, hogy a védekezésben szerepet játszó gének (*PR1*, *PR2*) expressziójának indukálásához szalicilsav (*SA*) szükséges, mely azt bizonyítja, hogy kompatibilis növény-vírus kapcsolat esetén indukálódik egy kulcsfontosságú védelmi jelátviteli útonal [HUANG et al. 2005]. Tarlórépa érkivilágosodás vírussal (*TVCV*), olajrepce mozaik vírussal (*ORMV*), *TMV* és *PVX* vírussal fertőzött *A. thaliana* növények transzkriptum analízisével több olyan géncsoportot azonosítottak, melyek a stressz- és a védekező válaszokban játszanak szerepet [GOLEM and CULVER 2003, WHITHAM et al., 2003]. Legjelentősebb változást a stressz-kapcsolt *tioredoxin*, *glutathion-S-transzferáz (GST)*, β -*glükánáz*, a *WRKY TF* és az *etilén válasz faktor (ERF)* gének mutattak [GOLEM and CULVER 2003]. Bizonyították különböző növény-vírus kapcsolatok vizsgálata során, hogy a *HSP* gének vírusfertőzés hatására indukálódnak [ARANDA et al. 1996, ESCALER et al. 2000b, HAVELDA and MAULE 2000, JOCKUSCH et al. 2001, WHITHAM et al. 2003]. Később megértették, hogy a *HSP* gének indukciója egy általános válaszreakció a virális fehérjék citoplazmában való

felhalmozódására [APARICIO et al. 2005]. A stressz válaszban (*GST*) és a védekezésben (*PR* és *HSP*) szerepet játszó gének expressziójának emelkedését más növény-vírus kapcsolatban is detektálták: szilvahimlő vírus (PPV), paradicsom gyűrűsfoltosság vírus (ToRSV), cseresznye és meggy nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (PNRSV) [DARDICK 2007], dohány karcolatos vírus (TEV), CMV-Y szatellit vírussal fertőzött *N.benthamiana* [AGUDELO-ROMERO et al. 2008, MARATHE et al. 2004], geminivirussal fertőzött *N.benthamiana* [ALLIE and REY 2013] és *S.lycopersicum* [KAUR et al. 2015], CMV-M törzsével fertőzött *S.tuberosum* [STARE et al. 2017] valamint dsRNS vírussal fertőzött *Zea mays* [JIA et al. 2012]. Vírusfertőzött *N.benthamiana* és *A.thaliana* növények gén-expressziós vizsgálata során a *WRKY6* gén expressziójának indukcióját figyelték meg. Kimutatták, hogy *WRKY6* szabályozza más védekezésben szerepet játszó gének az expresszióját is, mint például a *PR1* gén kifejeződését [ROBATZEK and SOMSSICH 2001, 2002]. Répa nekrotikus sargaerűség vírus (BNYVV)-sal fertőzött *B.macrocarpa* növényben több mint 260 génnek az expresszió változását detektálták újgenerációs szekvenálással, melyeknek több mint 50%-a biotikus stressz- és védekező válaszokban játszott szerepet. Vizsgálatuk során a *PR1*, *PR2* (β -1,3 glükánáz), *PR3* (kitináz), *PR4*, *PR5* (thaumatin-szerű fehérje) gének expressziójának növekedéséről számoltak be [FAN et al. 2015]. Egy korábbi munkájuk során, BNYVV vírussal fertőzött *N.benthamiana* növényekben az RNS interferenciában szerepet játszó *AGO4*, *AGO10* expressziójának csökkenését és az *AGO5* expressziójának emelkedését figyelték meg [FAN et al. 2014], míg *B.macrocarpa* esetén ezeknek a géneknek az expressziója nem változott. A különbséget a gazdanövények védekező rendszerének sokféleségével magyarázták [FAN et al. 2015].

2.2.3.2. Az elsődleges anyagcserét érintő változások

Biotikus stressz során az elsődleges anyagcsere termékek kulcsszerepet játszanak a növény védekező mechanizmusának kialakításában egyrészt azért, hogy energia pótlást biztosítsanak, másrészt a jelátviteli molekulák forrásaiként közvetlenül vagy közvetve indukálják a növény védekező válaszait, ezáltal visszaszoríthatják a kórokozó terjedését [BOLTON, 2009].

BNYVV vírussal fertőzött *B.macrocarpa* növényben az ATP-függő proteolízishez, az aminosav anyagcseréhez és a szénhidrát anyagcseréhez kapcsolódó gének expressziójának csökkenéséről számoltak be, ami arra utal, hogy a vírusfertőzött növényekben gátolva volt a fehérjeszintézis, az aminosav- és a szénhidrát anyagcsere is [FAN et al. 2015]. Uborka zöldfoltosság mozaik vírus (CGMMV)-sal fertőzött *Citrullus lantus* növényekben a szénhidrát anyagcsere három kulcs enzimét: szacharóz szintázt, szacharóz-foszfát szintázt, szacharóz invertázt kódoló gének az indukcióját figyelték meg [LI et al. 2017]. Paradicsom bronzfoltosság vírus (TSWV)-sal szisztémásan fertőzött paradicsom növények szerv-specifikus transzkriptum

analízise is kimutatta, hogy a növények hajtásrendszerében az aminosavak szintézisében és anyagcseréjében résztvevő gének expressziója lecsökkent. A hajtásrendszerben 82 darab gén, köztük: az elágazó szénláncú aminosavak bioszintézisében, az aszpartát családba tartozó aminosavak-, a kéntartalmú aminosavak-, az L-szerin- és a glicin anyagcserében résztvevő gének expresszió csökkenését detektálták. Ehhez képest a növények gyökerében 18 génnek az indukciójáról számoltak be, melyek mindegyike a másodlagos vegyületek szintézisében résztvevő aminosavak (β -alanin- és a nem-fehérje felépítő aminosavak) anyagcseréjében vesz részt [CATONI et al. 2009]. CMV-M törzsével fertőzött *N.tabacum* [LU et al. 2012] és PPV vírussal fertőzött *A.thaliana* növények [BABU et al. 2008] transzkriptum analízise során igazolták, hogy a vírusfertőzés hatással van az aminosav-, a szénhidrát és a lipid anyagcserére. Mindkét esetben megfigyelték, hogy az elsődleges anyagcserét érintő gének jellemzően indukálódnak vírusfertőzött növényekben [BABU et al. 2008, LU et al. 2012].

A fenti irodalmi adatok alapján is látható, hogy vannak olyan növény-vírus kapcsolatok, melyekben a vírus képes megzavarni ezeket az alapvető funkciókat és lecsökkenti az elsődleges anyagcsere folyamatokban résztvevő gének expresszióját [CATONI et al. 2009, FAN et al. 2015], míg más esetekben az elsődleges anyagcserében résztvevő gének expressziója indukálódik [BABU et al. 2008, LU et al. 2012]. A növény-vírus kapcsolat során az elsődleges anyagcsere folyamatok szabályozásának alakulása kulcsfontosságúnak bizonyult a tünetek kialakulásában. Ha a vírus képes az elsődleges anyagcsere termékek szabályozását gátolni, az ellehetetleníti a gazdanövény védekező rendszerét, így a vírus képes elterjedni a növényben és megjelennek a vírusra jellemző tünetegyüttesek [CATONI et al. 2009, FAN et al. 2015]. Viszont ha az elsődleges anyagcserében résztvevő gének indukálódnak, akkor a növény képes felvenni a versenyt a vírussal szemben és a növények tünetmentesek vagy csak enyhe tüneteket mutatnak, később akár teljesen kigyógyulhatnak a fertőzésből [BABU et al. 2008, LU et al. 2012].

2.2.3.3. A másodlagos anyagcserét érintő változások

SEO et al. (2018) paradicsom sárga levélsodródás vírussal (TYLCV) és paradicsom klorózis vírussal (ToCV) fertőzött paradicsomok RNS szekvenálási eredményei alapján arra következtettek, hogy a pigment metabolizmusban (pl.: flavonoid bioszintézis, flavon- és flavonol bioszintézis) szerepet játszó gének expressziós változásai összefüggésben állnak a vírusfertőzésre jellemző tünetek kialakulásával. Ezeknek az útvonalaknak az aktiválódása kapcsolatban állhat az antocianin felhalmozódással, mely a ToCV fertőzött levelek lila elszíneződését okozza. Az antocián bioszintézisben szerepet játszó *kalkon szintáz* (*CHS*), *kalkon izomeráz* (*CHI*), *flavanon-3-hidroxiláz* (*F3H*), *flavonoid-3'-hidroxiláz* (*F3'H*), *dihydroflavonol-4-reduktáz* (*DFR*), *antocianidin szintáz* (*ANS*) és *UDP glükóz-flavonoid-3-O-glükoziltranszferáz* (*UFGT*) gének

indukcióját detektálták ToCV fertőzött növényekben. Az antocián felhalmozódását a fitohormonok, a cukor szint, az öregedés és különféle környezeti stresszek is szabályozzák. Az antocián bioszintézis génjeinek transzkripcióját számos transzkripciós faktorok befolyásolhatja (*MYB*, *MADS-box*, *WRKY* stb.), melyek expressziója ugyancsak változott a ToCV vírusfertőzés során [SEO et al. 2018]. CMV-M törzsével fertőzött *N.tabacum* növényekben a pigment anyagcserében (porfirin és klorofill anyagcsere, karotinoid és antocián bioszintézis) résztvevő gének expressziójának csökkenését figyelték meg a vírusfertőzés korai és késői szakaszában is [LU et al. 2012].

2.2.3.4. A hormon metabolizmusban és a jelátviteli folyamatokban résztvevő gének expresszió változása

Biotikus vagy abiotikus stressz érzékelése során a növények kisméretű molekulák (hormonok) felszabadításával képesek reagálni az őket ért stresszre. A vírusfertőzött gazdanövényen jelentkező morfológiai változások hátterében a hormon metabolizmus megváltozása is állhat [PAUDEL and SANFAÇON 2018]. Régóta ismert, hogy a biotikus stresszekre adott válaszokban a SA, a jazmonsav (JA) és az etilén (Et) vesz részt [ALAZEM and LIN 2015]. Míg más hormonok, mint az auxin (Aux)-ok, a brasszinoszteroid (BR)-ok, a citokinin (CK)-ek és az abszcizinsav (ABA) a növények fejlődésében és növekedésében betöltött szerepükről ismertek, azonban az utóbbi időben több bizonyítékot találtak arra, hogy szerepük lehet a növény-patogén kölcsönhatásokban is [DENANCE et al. 2013, PIETERSE et al. 2009, SANTNER et al. 2009]. A hormonok szinergista vagy antagonisták kölcsönhatásban állnak egymással, ezáltal egyes hormonok egy adott körülmény esetén jobban érvényesülhetnek más hormonokkal szemben. A szalicilsav, a citokinin és a brasszinoszteroidok pozitív, az etilén és az auxin negatív, míg a jazmonsav és az abszcizinsav pozitív és negatív hatással is lehet a vírusok elleni védelemre [ALAZEM and LIN 2015].

Az egyik legfőbb védelmi útvonal a vírusokkal szemben a SA jelátvitel, mely szoros kapcsolatban áll a nukleotid-kötő (NB) és leucin gazdag ismétlődéseket (LRR) tartalmazó doménból álló *rezisztencia* (*R*) génekkel. Az *R* gének felismerik a vírusok effektorait és ezáltal indítják el a védekező útvonalakat: aktiválják a SA és a siRNS útvonalat, indukálják a *reaktív oxigén fajták* (*ROS*)-at és a hyperszenzitív reakciót [BAEBLER et al. 2014]. A védekező válasz hatására nekrotikus léziók keletkeznek a növényen, melyek korlátozzák a vírus terjedését és aktiválják a siRNS közvetített antivirális mechanizmust. A SA indukálja a SAR géneket, a *PR* géneket és a disztális részekben a siRNS közvetítette RNS interferenciát [ALAMILLO et al. 2006, LOAKE and GRANT 2007, VLOT et al. 2009]. ToCV és TYLCV vírussal fertőzött paradicsomban a *WRKY* és a *nem-expresszálo patogenezis-kapcsolt fehérje 1* (*NPR1*) gének expressziójának

indukciójáról számoltak be [SEO et al. 2018]. A CK-ek a SA-val együtt képesek stimulálni a növény védekező rendszerét a patogénekkal szemben. A CK és a SA útvonal közötti kommunikációt a citokininek válasz regulátorai (*ARR*) *ARR3*, *ARR4*, *ARR5*, *ARR6*, *ARR8*, *ARR9* biztosítják [ARGUESO et al. 2012]. A CK-ek aktiválják *ARR2* transzkripciós faktort, mely közvetlenül a *PR1* és a *PR2* promóteréhez kötődik és aktiválja azok transzkripcióját, ezáltal aktiválva a növény védekező rendszerét a patogénekkal szemben. Kiderült, hogy az *ARR2* és a *TGA1A-kapcsolt gén 3 (TGA3)* SA válasz faktor képes egymással kölcsönhatásba lépni, melynek hatására fokozódik az *ARR2* kötődése a *PR1* promóterhez [CHOI et al. 2010, 2011]. TYLCV vírusfertőzés hatására a citokinin degradációjában szerepet játszó *citokinin oxidáz* expressziójának indukcióját figyelték meg paradicsomban, mely a citokinin szint szignifikáns csökkenését eredményezte [SEO et al. 2018]. A brasszinoszteroidok indukálta védelem a patogénekkal szemben a SA útvonaltól függetlennek bizonyult. BR kezelt növényekben kimutatták, hogy a *PR* gének expressziója nem változott, ami arra utalhat, hogy a BR által indukált rezisztencia különbözik a szisztémikusan szerzett rezisztenciától [NAKASHITA et al. 2003]. BR-al kezelt dohány növényben fokozott ellenállást mutattak ki TMV vírussal szemben [HAYAT et al. 2011, NAKASHITA et al. 2003].

Az auxinok kulcsszerepet játszanak a növények fejlődésében és növekedésében az apikális dominancia fenntartása révén. Ismert, hogy az auxinok antagonisták hatásúak a SA útvonalra és az *auxin válasz faktor (ARF)*-ok egy része fontos néhány vírus (TMV) replikációjában és mozgásában [PADMANABHAN et al. 2005, 2008]. Kimutatták, hogy egyes vírusok az *ARF*-okon keresztül képesek az apikális dominancia zavarát okozni, mely abnormális növekedési fenotípust eredményez [BENJAMINS and SCHERES 2008]. Az etilén szintén antagonisták hatású a SA útvonalra és néhány tanulmányban igazolták szerepét a tünetek kialakulásában is. Kimutatták, hogy az etilén szerepet játszik a karfiol mozaik vírus (CaMV) tüneteinek kialakulásában [GERI et al. 2004]. Igazolták, hogy a *WRKY8 TF* részt vesz crTMV elleni védekezési reakcióban az *abszizinsav érzéketlen faktor (ABI)-4*, *1-aminociklopropán-1-karboxilsav szintáz (ACS)-6* és *ERF104* gének expressziójának közvetlen szabályozásán keresztül [CHEN et al. 2013]. SEO et al. (2018) az etilén bioszintézisben szerepet játszó *ACS* és *ACO* (*ACC oxidáz*) gének valamint az *ERF*-ok, és a *WRKY transzkripciós faktorok* expressziójának szignifikáns változását detektálták ToCV és TYLCV fertőzés esetén.

A jasmonsav kezelés PVX és PVY kettős fertőzött növényekben a vírusfertőzés korai szakaszában fokozott rezisztenciát okozott, de későbbi alkalmazás során növelte a növények fogékonyságát, melyet a JA SA-val szembeni antagonisták hatása okozhatott [GARCIA-MARCOS et al. 2013]. TYLCV vírusfertőzött növényekben a JA bioszintézisben szerepet játszó gének: *lipoxigenáz (Lox)*, *allén oxid szintáz (AOS)*, *allén oxid cikláz (AOC)* expressziója megemelkedett.

A *MYC2* gén expressziójának emelkedését is kimutatták, mely erős korrelációt mutatott a JA bioszintézisben szerepet játszó gén expressziójának indukciójával [SEO et al. 2018]. Az abszcizinsav többféleképpen képes a növény védekezését segíteni vírusfertőzés során. Egyrészt a kallóz lerakódás növelésével elzárja a plazmodezmákat, ezáltal akadályozza a vírus sejtről-sejtre való terjedését, melyet kimutattak TMV fertőzött dohány és paradicsom növényekben [WHENHAM et al. 1986] és dohány nekrosis vírus (TNV)-sal fertőzött veteménybabban [IRITI and FAORO 2008]. Másrészt az SA útvonalra kifejtett antagonist hatása révén: elnyomja a HR-t, csökkenti a ROS és a SA termelődését, gyengíti a szisztémikusan szerzett rezisztenciát és a siRNS közvetítette RNS interferenciát a disztális részekben [ALAZEM et al. 2014]. Több kutató csoport különböző növény-vírus kapcsolat vizsgálata során kimutatta, hogy a jelátviteli útvonalakban szerepet játszó NB vagy LRR domént tartalmazó *transzkripciós faktorok* (*MYB*, *AP-2*, *ERF*, *NAC*, *MAD-box*, *WRKY*, *MYC*, *LFY*) expressziója megváltozott [AGUDELO-ROMERO et al. 2008, JIA et al. 2012, KAUR et al. 2015, LI et al. 2017].

2.2.3.5. A fotoszintézissel kapcsolatos gén expressziója

KAUR et al. (2015) geminivírusal fertőzött paradicsom transzkriptum analízisével detektálta, hogy a fotoszintézisben kulcsszerepet játszó fehérjéket (fényreakciócentrumok, ATP-szintáz és fénygyűjtő komplex: LHCII) kódoló gén expressziója drasztikusan lecsökken. POSTNIKOVA és NEMCHINOV (2012) 12 különböző vírussal fertőzött *A. thaliana* microarray adatainak összehasonlításával kimutatta, hogy a késői gazda válaszképzés egyik fő jellemzője a fotoszintézis és az energia útvonalak elnyomása: I. és II. fotokémiai rendszer, pentóz-foszfát ciklus. SEO et al. (2018) TYLCV és ToCV vírussal fertőzött paradicsomok transzkriptum analízise során megfigyelte, hogy a széndioxid megkötés és a klorofill metabolismus csökken, mely arra utal, hogy a fotoszintézis is csökken. Kimutatták, hogy számos a fotoszintézisben szerepet játszó génnek, mint például: a *karbon-anhidráz 1*, az *I. fotokémiai rendszer O₂-H₂O-*K* alegységei*, a *klorofill a/b-kötő fehérje 1* az expressziója lecsökkent a vírusfertőzött növényekben [SEO et al. 2018]. *A. thaliana* tarlórépa mozaik vírus (TuMV)-sal történő fertőzése során kimutatták a kloroplasztisz funkciók ellátásáért (fotoszintézis, kén asszimiláció, keményítő anyagcsere) felelős gén expressziójának drasztikus csökkenését [YANG et al. 2007]. CMV-M törzsével fertőzött *N.tabacum* növényekben a fotoszintézishez kapcsolódó gén expressziójának csökkenéséről számoltak be a vírusfertőzés korai és késői szakaszában egyaránt [LU et al. 2012].

2.2.3.6. A tünetek kialakulásában szerepet játszó gén

A tünetek kialakulásának pontos molekuláris háttere ezidáig ismeretlen, azonban számos olyan folyamatot azonosítottak, mely felelős lehet a megjelenő tünetekért. A (1) kloroplasztisz szerkezetének és funkciójának zavara és a klorofill mennyiségének csökkenése, mely a zöld

szöveteken megjelenő klorózist okozhatja [POSTNIKOVA and NEMCHINOV 2012], (2) a morfológiai változások hátterében a hormon metabolizmus megváltozása is állhat [PAUDEL and SANFAÇON 2018] és (3) a másodlagos anyagcserét pl.: antocián bioszintézist érintő változások, melyek antociános tünetek megjelenését okozzák [SEO et al. 2018].

A fent említett folyamatokon túl azonosítottak néhány kulcsfontosságú gént, mely ugyancsak szerepet játszhat a tünetek kialakulásában. A *protoderma faktor (PDF)*-1 gén, mely a *PDF2* és *A.thaliana merisztéma réteg 1 (AtML1)* gének szabályozása alatt áll és az embriogenezis során kizárólag a merisztéma L1 rétegében expresszál és protoderma specifikus. L1 specifikus dupla gén mutáns (*pdf2-1*, *atml1-1*) növényeken az embriogenezis során dezorganizált hajtáscsúcsot figyeltek meg, valamint a levél iniciációjában és fejlődésében is zavarok léptek fel [ABE et al. 1999, 2003]. *N.benthamiana* növényekben a sejtfal szintáz (*CESA*) gén csendesítésével kimutatták, hogy a sejtfal szintézis folyamatának sérülése a levél méretének csökkenését, levél deformitását valamint a teljes növény növekedésének csökkenését is okozhatja [BURTON et al. 2000]. Ezzel ellentétben kimutatták, hogy a sejtfal invertáz (*CWINV*), mely a szacharóz fruktózzá átalakításában játszik kulcsszerepet, a védekezés korai szakaszában indukálódik [ESSMANN et al. 2008]. A közel múltban SEO et al. (2018) is megerősítették, hogy TYLCV fertőzött paradicsom gén-expressziós vizsgálat során, hogy a *CESA8* expressziója lecsökken és a *CWINV2* indukálódik. Kimutatták, hogy a sejtfal kialakításban kulcsszerepet játszó cellulóz molekula bioszintézise gátolt és feltehetően ez okozza a TYLCV fertőzésre jellemző deformál növekedést és levélfodrosodást [SEO et al. 2018]. Azonban TuMV fertőzött *A.thaliana* növényekben a sejtfal rugalmasságában és megnyúlásában szerepet játszó enzimeket (*xiloglikán endotransz-glikoziláz/hidroláz*, *expanzin pektin-metilészteráz*) kódoló gének expressziójában drasztikus csökkenését figyelték meg [YANG et al. 2007]. Az egyik legsúlyosabb cukorrépa betegséget okozó vírus a BNYVV vírussal fertőztek *B.vulgaris* és *B.macrocarpa* növényeket, majd transzkriptum anaízist követően az *expanzin* gén indukcióját mutatták ki a vírusfertőzött növényekben [FAN et al. 2015, SCHMIDLIN et al. 2008]. Korábban már igazolták, hogy *expanzin* gén expressziója befolyásolja a gyökér elongációt és iniciációt, ezáltal fontos szerepet játszik a gyökér fenotípusának meghatározásában [CHO and COSGROVE 2002]. Ezek alapján feltételezik, hogy az *expanzin* indukciója okozza a BNYVV vírus jellegzetes tünetét, a gyökéren jelentkező abnormális sejtburjánzást [FAN et al. 2015].

2.2.4. A shut-off jelenség

A vírusfertőzésekre jellemző, hogy képesek drasztikusan megváltoztatni a gazdasejtek expresszióját. A vírus képes (1) a gyorsan és a nagy mennyiségben szintetizálódó virális nukleinsavak és fehérjék előállításának érdekében elvonni a gazdasejt folyamataihoz szükséges erőforrásokat, továbbá (2) módosíthatja a növény anyagcsere folyamatait, például egyes

gazdagének expressziójának kikapcsolása (shut-off) révén [ARANDA and MAULE 1998]. Számos tanulmány irányult ebből kifolyólag a gazda genomszintű mRNS transzkriptum változásainak vizsgálatára, mely rengeteg információt szolgáltat a vírusfertőzés hatásairól [GOLEM and CULVER, 2003, MARATHE et al. 2004, SENTHIL et al. 2005, WHITHAM et al. 2003]. Azonban ez a technika nem alkalmas arra, hogy elkülönítsük egymástól a gazdanövény általános stressz válasza és a vírusreplikáció következtében megjelenő változásokat. Növények esetén az *in situ* hibridizáció az egyik leghatékonyabb eszköz: a vírus jelenléte és a kiválasztott gazdagén expressziója közötti kapcsolat feltárására [ARANDA et al. 1996, WANG and MAULE 1995].

A shut-off jelenséget állati és növény szervezetekben is azonosították. Az állati sejtvonalak egyidejű fertőzése kimutatta, hogy az állati vírusok számos módon befolyásolhatják a gazdasejt gén-expresszióját [ARANDA és MAULE 1998]. A legtöbb esetben a gazdagének expressziójának csökkenéséről (shut-off) és néhány gén expressziójának indukciójáról számoltak be. Az állati vírusok esetén azonosítottak olyan virális fehérjéket, melyek indukálják a shut-off jelenséget. A tanulmányok során fény derült arra, hogy néhány vírus (pl.: *Poliovirus*) több olyan virális fehérjével (p220, 3C- és 2A proteázok) is rendelkezik, mely képes befolyásolni a gazda gén-expresszióját. Ezek a fehérjék több ponton képesek gátolni a gazdagének expresszióját, mint például a transzkripcó gátlása a TATA-kötő fehérje degradációja révén vagy az mRNS transláció gátlása az eIF4G translációs faktor hasításával, mindkét esetben a gazda fehérjék mennyisége csökken [CLARK et al. 1993, WYCKOFF, 1993]. Borsó maggal terjedő vírus (PSbMV)-sal fertőzött borsó embrió szövetek *in situ* hibridizációs vizsgálata során kimutatták, hogy a vírus jelenlétében néhány gén expressziója lecsökken az aktív vírus replikációt mutató sejtekben. A vizsgált gének többsége esetén csupán időleges (tranzien) gén-expressziós változás jelentkezett, majd a vírusfertőzés frontjának előrehaladtával visszaállt a gének expressziója az eredeti állapotba mely arra utal, hogy az aktív vírusreplikáció okozza a gazdaszervezet gén-expressziójának csökkenését [WANG and MAULE 1995]. PSbMV és borsó korai barnulás vírus (PEBV)-sal, fehérhere mozaik vírus (WCIMV)-sal, répa levélcúcs fodrosodás vírus (BCTV)-sal fertőzött borsó embrió szövetek vizsgálata kimutatta, hogy a *Lox1* gén expressziója minden esetben lecsökkent [ESCALER et al. 2000a,b]. CMV fertőzött *Cucurbita pepo* szikleveél szövetének *in situ* vizsgálata során a *glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz* (*Gapdh*) mindkét alegysége (*GapA*, *GapB*) és *kataláz* gének expressziója is lecsökkent. A kísérletek során vizsgálták a gazdasejt gén-expressziójának és a vírus felhalmozódásának térbeli átfedését, azonban ebben a rendszerben a shut-off átmeneti jellege nem volt egyértelmű, melyet a vizsgált klorotikus lézió kisméretének tulajdonítottak [HAVELDA and MAULE, 2000]. Northern blottal igazolták, hogy *N.benthamiana* növényekben CymRSV fertőzés hatására több fontos háztartási génnek: *GapA*, α -*tubulin*, *klorofill pigment-kötő*

fehérje 29 (CP29), hiszton, elongációs faktor (EF)-2 expressziója is lecsökkent [HAVELDA et al. 2008].

Látható, hogy különböző vírusfertőzött metszetek vizsgálata során több gén expressziójának csökkenését igazolták, azonban azonosítottak néhány olyan gént is, melyek expressziója a vírusfertőzés frontjában indukálódik vagy változatlan marad. Kimutatták, hogy a vírus replikációjának kezdetén a *poliubiquitin (pub)*, a *HSP70* [ARANDA et al. 1996, HAVELDA and MAULE, 2000] és a *glutathion reduktáz 2* [MAULE et al. 2000] gének expressziója indukálódik. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a gének indukciója és a shut-off jelenség együtt jelentkezik, de az indukciós zóna sokkal szűkebb (2-4 sejt széles) volt [ARANDA et al. 1996]. Ezenfelül azonosítottak olyan géneket: *aktin*, *β -tubulin* [ESCALER et al. 2000a, MAULE et al. 2000], *citokróm oxidáz 1 alegység*, *ciklofilin*, melyek expressziója változatlan maradt a vírusfertőzéskor.

A vírusfertőzött növényekben jelentkező shut-off jelenséget már több évtizeddel ezelőtt leírták, azonban molekuláris hatásmechanizmusa és szerepe a fertőzési folyamatban máig alig ismert. HAVELDA et al. (2008) Lándzsás utifű mozaik vírus (RMV)-sal, CymRSV, TCV, CMV-FNY törzsével fertőzött *N.benthamiana* növények és PVX, TMV, TSWV vírussal fertőzött *S.lycopersicum* növények szisztémikus leveleiben vizsgálta a shut-off jelenlétét *in situ* hibridizációval és Northern blottal. Kimutatták, hogy nem minden vírus esetén jelentkezik ugyanolyan hatékonysággal a shut-off jelenség. CymRSV és RMV fertőzés hatására a *GapA* és az *α -tubulin* gének expressziója lecsökkent, azonban CMV és TCV vírus hatására változatlan maradt ezen gének expressziója. A *GapA* gén expressziójának csökkenését figyelték meg PVX fertőzött dohányban és paradicsomban, azonban TMV fertőzés esetén csak a dohány növényeknél jelentkezett a shut-off. CymRSV fertőzött dohányban *in situ* hibridizációval igazolták, hogy a shut-off jelenség nem egy általános védekezési reakció része, mivel azokban a sejtekben jelenik meg ahol a vírus is jelen, így feltehetően a vírus terjedésével van összefüggésben. Megfigyelték, hogy nem az aktív vírusreplikáció váltja ki a shut-off jelenséget, mivel a vírusfertőzés frontjában találtak olyan sejteket, melyekben a vírus már nagy mennyiségben jelen volt, de a gazdgén expressziója még nem csökkent le [HAVELDA et al. 2008]. Ismert, hogy 21°C-on a CymRSV fertőzött növények nekrózist követően rövid időn belül elpusztulnak, míg a Cym19stop (p19 deficiens CymRSV vírus) vírussal fertőzött növények a p19 hiánya miatt a víusról keletkező siRNS-ek felhalmozódnak és indukálják az RNS interferencia mechanizmusát, melynek hatására a növények kigyógyulnak [SZITTYA et al. 2002]. Azonban 15°C-on siRNS alapú RNS interferencia gátolt, a Cym19stop vírussal fertőzött növényekben a vírus el tud terjedni [SZITTYA et al. 2003]. A fent leírt módszert használva bizonyították, hogy nem az RNS interferencia mechanizmusához köthető a shut-off jelenség, mivel 15°C-on a Cym19stop vírussal fertőzött dohányban is lecsökkent a *GapA* expressziója. Igazolták, hogy a shut-off jelenség, tartós több héten keresztül is fenn állhat és ez

súlyos mRNS hiányt okozhat a növényben. Ezenfelül sejtmagi run-on transzkripciós kísérletekkel bizonyították, hogy a shut-off a sejtmagban alakul ki és az érintett gének transzkripcióját gátolja. Megfigyeléseik alapján a shut-off jelenléte összefüggést mutat a tünetek megjelenésének súlyosságával. Dohányon a CymRSV, RMV, TSWV, TMV, PVX vírus és paradicsom PVX vírus okozott súlyosabb tüneteket és mindegyik növény-vírus kapcsolatban kimutatták a shut-off jelenlétét is. Ezzel szemben shut-off hiányában a tünetek is jóval enyhébben jelentkeztek: TCV, CMV fertőzött dohányon és TMV fertőzött paradicsomon [HAVELDA et al. 2008].

2.2.5. A vírus indukálta géncsendesítés

Az RNS interferencia folyamatok felderítésével, ezekre alapozva az endogén gének funkciójának megállapítására elterjedt a vírus indukálta géncsendesítés (VIGS) [van Kammen 1997]. A módszer során egy növényi vírusvektorba építjük a vizsgálni kívánt gén egy darabját, majd ezzel a rekombináns vírussal fertőzzük meg a növényt. A módszer alapja az RNS interferencia mechanizmusa, mely a vírus elterjedését követően aktiválódik és ennek következtében a beépített génszakasszal komplementer endogén gén mRNS-ei lebomlanak, ezáltal vizsgálható az adott gén funkciója [GUPTA et al. 2013]. Azonban e módszer eredménye erősen vitathatóvá válik amiatt, hogy egyes vírusfertőzések nagymértékben képesek megváltoztatni a gazdanövény gén-expressziós rendszerét és több növény-vírus kapcsolat esetén számoltak be a shut-off jelenség kialakulásáról is [HAVELDA et al. 2008], ezáltal nem tudjuk, hogy a vírusfertőzés vagy a funkcióvesztés hatása és/vagy fenotípusa figyelhető meg a vizsgált növényeken.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti anyagok

3.1.1. Vírustörzsek

Nicotiana benthamiana növényeket keresztesvirágúakat fertőző dohány mozaik vírussal (crTMV), Cymbidium gyűrűsfoltosság vírussal (CymRSV, Cym19stop), tarlórépa göndörödés vírussal (TCV), szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírussal (CIRV, CIRV19stop) fertőztük. *Solanum lycopersicum* növények fertőzéséhez dohány mozaik vírus U1 törzset (TMV-U1) és burgonya x vírust (PVX) használtunk. A növények fertőzését a vírusról készült *in vitro* transzkriptummal (CIRV, CIRV19stop, crTMV, PVX, TMV-U1) vagy tisztított virionnal (CymRSV, Cym19stop, TCV) végeztük.

3.1.2. Tesztnövények

Kísérleteink egyik gazdanövényeként, a laboratóriumi vizsgálatokhoz előszeretettel használt dohány (*Nicotiana benthamiana*) növényt választottuk. Vizsgálataink másik modell

növényeként a gazdaságilag jelentősebb és ismert genomú paradicsomot (*Solanum lyopersicum*: Kecskeméti jubileum, M82 és MoneyMaker fajták) használtuk.

A dohány magokat Agro CS tőzeges talajjal megtöltött cserépbe vetettük. A magok egy időben történő csírázásához rövid ideig (3 nap) tartó hidegkezelést végeztünk. Ezt követően a csíráztatás és a növénynevelés 21°C-on, hosszú nappalos (16/8 h nappal/éjszaka) körülmények között zajlott. A növényeket 2 hét elteltével tőzegkorongba tűzdeltük, majd felhasználásuk előtt 3-4 nappal tápsóval kiegészített földkeverékbe ültettük át. A paradicsom magokat szobahőmérsékleten petri-csészébe helyezett nedves szűrőpapíron csíráztattuk. A növényeket 5-7 nappal ezután cserépbe tűzdeltük, felhasználásig 21°C-on, hosszú nappalos körülmények mellett tartottuk. A növények öntözése csapvízzel történt és szükség szerint kártevők elleni növényvédelmi beavatkozásokat végeztünk.

3.1.3. Baktérium törzsek

Escherchia coli DH5- α törzsben tartottuk fenn és szaporítottuk fel a további munkánkhoz szükséges cDNS klónokat.

3.1.4. Vegyszerek, enzimek, membránok

Munkánk során kereskedelmi forgalomban kapható vegyszereket használtunk fel (Dushefa, Sigma, Reanal). A munkához szükséges legtöbb enzimet (polimerázok, restrikciós endonukleázok, ligázok) és a ribo- és dezoxiribonukleotidokat a ThermoFisher Scientific cégtől szereztük be. A qRT-PCR-hez használt SYBER Green Master Mix-et Applied Biosystems® cégtől rendeltük. A Northern hibridizációhoz Hybond-NX membránt (GE Healthcare, Amersham) használtuk és az izotópos munkákat az Izotóp Intézettől rendelt P^{32} izotóppal jelölt dCTP-vel végeztük.

3.2. Módszerek

3.2.1. cDNS készítés

Nicotiana benthamiana és *Solanum lycopersicum* totál nukleinsav kivonatából RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) segítségével cDNS-t készítettünk. A reakcióhoz 3 μ g totál nukleinsav kivonattól (RNazol-lal tisztított) indultunk ki, melyhez 1 μ l oligodT primert adtunk és 12,5 μ l végtérfogatig kiegészítettük Milli-Q vízzel, ezután 65°C-on 5 percig inkubáltuk, majd 5 percig jégre raktuk. A reakcióhoz szükséges továbbiösszetevőket: 4 μ l reverz transzkriptáz puffer, 2 μ l 10 mM dNTP, 0,5 μ l RNáz inhibitor, 1 μ l reverz traszkriptáz enzim, hozzáadtuk az elegyhez, mely végtérfogata 20 μ l. Majd PCR készülékben 25°C-on 10

percig, 42°C-on 50 percig, 45°C-on 10 percig inkubáltuk a mintát és végül 4°C-ra visszahűtöttük. Az elkészült cDNS-t felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.2.2. Oligonukleotidok foszforilálása

A ligálás sikerességének érdekében az oligonukleotidok 5' végét foszforilálnunk kellett. Az oligonukleotidok foszforilálásához a következő elegyet mértük össze: 4 µl 100 pmól/µl koncentrációjú oligonukleotid, 2 µl 10x PNK A puffer, 2 µl 10 mM ATP, 2 µl T4 PNK enzim, végtérfogata 10 µl. A reakcióelegyet 37°C-on 30 percig inkubáltuk, majd a reakció leállításához a mintát 70°C-ra tettük 15 percre. A foszforilált oligonukleotidot, 90 µl Milli-Q hozzáadásával, 10 pmól/µl-es koncentrációra hígítottuk. Felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.2.3. PCR

A gazdanövények endogén génjeinek expresszió vizsgálatához, dohány és paradicsom cDNS-ről megfelelő oligonukleotidok felhasználásával, felszaporítottunk az endogén gének egyes darabjait. A vizsgálni kívánt endogén gének szekvenciáját az NCBI és a Sol Genomics Network adatbázisból kerestük ki, majd az interneten hozzáférhető Primer3 (HTTP4) program segítségével a PCR reakcióhoz indítószekvenciákat terveztünk. Az általunk használt oligonukleotidokat M2. melléklet tartalmazza.

A PCR reakcióelegy összetétele a következő volt: 5 µl 10x Taq puffer ((NH₄)₂SO₄-MgCl₂), 3 µl 20mM MgCl₂, 1 µl 10mM dNTP mix, 2,5 µl foszforilált forward primer, 2,5µl foszforilált reverz primer, 0,2 µl Taq polimeráz, 1 µl templát, 34,8 µl Milli-Q, végtérfogata 50 µl. A PCR reakció körülményeit az alábbiak szerint állítottuk be: előmelegítés 94°C 3 perc; denaturálás 94°C 30 másodperc (sec), anellálás 55°C 30 sec, elongáció 72°C 1 kilóbázis/1perc az utóbbi 3 fázist 40 cikluson keresztül ismételtük; majd 72°C 10 perc; tárolás 4°C. Az optimális anellálási hőmérséklet primer páronként eltérő, ennek meghatározásához gradiens PCR-t végeztünk vagy T_m kalkulátort (HTTP3) használtunk. A PCR reakció sikerességét a reakcióelegy egy részének EtBr-t tartalmazó 1,2% agaróz gélen való elválasztása után UV fényben ellenőriztük és a terméket további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.2.4. DNS fragmentum tisztítása gélből történő izolálással

A PCR termékek elválasztásához 1,2% agaróz gél készítettünk. A megfelelő méretű DNS fragmentet kivágtuk és gélből való tisztítását GeneJet Gel Extraction kit (ThermoFisher Scientific) segítségével végeztük, a használati utasítás alapján. A tisztított terméket felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.2.5. Ligálás

A tisztított PCR terméket EcoRV endonukleázzal hasított, defoszforilált pBlueScript II KS (+) klónozó vektorba ligáltuk. A ligálási elegyet az alábbiak szerint mértük össze: 1 µl 10xT4 ligáz puffer, 1 µl T4 ligáz enzim, 5 µl tisztított PCR termék, 3 µl Milli-Q, végtérfogata 10 µl. A ligálást 15°C-on egy éjszakán át inkubáltuk.

3.2.6. Transzformálás

200 µl kompetens sejtet (DH5-α) jégen felolvasztottunk, majd 5 µl ligátumot adtunk hozzá, amit jégen 20 percig inkubáltunk. Ezután 42°C-ra előmelegített vízfürdőben 30 másodpercig hősokkoltuk, jégre helyeztük. Lamináris boxban 500 µl SOC tápoldat (0, 5% élesztőkivonat, 2% tripton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glükóz) hozzáadása után 37°C-on 40 percen keresztül rázattuk. 250 µl baktériumtenyészetet szélesztettünk ki antibiotikum tartalmú (100 µg/ml ampicillin) szilárd LB táptalajra (1% NaCl, 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1,5% agar). A hatékonyabb szelekció érdekében IPTG-t (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid) és X-Gal-t (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) adtunk a táptalajhoz. Majd 37°C-os termosztátba helyeztük egy éjszakára.

3.2.7. Plazmid izolálás

A baktériumtelepeket folyadékkultúrában, ampicillin tartalmú LB tápoldatban (1% NaCl, 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat), szaporítottuk fel 37°C-on egy éjszakán keresztül rázatva. A baktérium sejteket 3 percig 8000 rpm-en történő centrifugálással leüleptítettük. A plazmid izoláláshoz a NucleoSpin® Plasmid kit-et (Macherey-Nagel) és az ahhoz tartozó protokollt használtuk. A DNS kinyerés hatékonyságának növelése érdekében, a protokolltól eltérően, az eluálást két ismétlésben végeztük. A plazmid izolálást követően, a plazmidot HindIII és EcoRI enzimmal emésztettük, hogy meggyőződjünk arról, valóban tartalmazza a megfelelő méretű inszertet. Felhasználásig a mintákat -20°C-on tároltuk.

Ezután szekvenálással ellenőriztük a klónt. A szekvenálást a BIOMI Kft. végezte. A szekvenciák kiértékeléséhez az ingyenesen hozzáférhető a Chromas Lite és az ApE (A plasmid Editor) programot használtuk, a szekvenciák ellenőrzését az online elérhető NCBI illetve a Sol Genomics Network adatbázis felhasználásával végeztük.

3.2.8. *In vitro* transzkripció

In vitro transzkripció során a vírus szekvenciáját tartalmazó linearizált plazmidról T7 RNS-polimeráz segítségével, egy 7-metil-guanozin sapkával ellátott fertőzőképes transzkriptumot szintetizálunk. Az *in vitro* transzkripció reakcióelegye 3 µl linearizált templátot, 10 µl 5x transzkripciós puffert, 1 µl Ribolock-ot (RNáz inhibitor), 1,5 µl T7 RNS-polimerázt, 5 µl 10mM rNTP mixet (20mM rATP, 20mM rTTP, 20mM rCTP, 2mM rGTP), 10 µl 5mM CAP analógot és

9,5 µl Milli-Q vizet tartalmazott, végtérfogata 50 µl. A reakcióelegyet 37°C-on 30 percen keresztül inkubáltuk, majd 1 µl 20 mM rGTP adtunk hozzá és tovább inkubáltuk 37°C-on 1 órán át. Az RNS transzkriptumok minőségét 1,2%-os agaróz gélen ellenőriztük. A mintákat felhasználásig -70°C-on tároltuk.

3.2.9. Tesztnövények fertőzése, mintaszedés

A fertőzést mindkét gazdanövény esetében mechanikai átvitelrel végeztük. A fertőzéshez vírusról készült *in vitro* transzkriptumot vagy tisztított viriont használtunk, melyhez cellit tartalmú inokuláló puffert és vizet adtunk (1:10 arányban). A fertőzés mechanikai úton történt, az inokulumot üveg spatulával segítségével elkentük a levél felszínén, melynek hatására a cellit a levélfelületén mikrosérüléseket okozott és ezeken keresztül a vírus be tudott jutni a növény epidermisz sejtjeibe.

A microarray hibridizálás eredményeinek visszaigazolásához *Nicotiana benthamiana* növényeket használtunk. A dohányt 4-5 leveles állapotban (15-20 napos) fertőztük meg crTMV, CymRSV és TCV vírussal és vírust nem tartalmazó inokuláló pufferrel (mock). A crTMV és CymRSV vírussal fertőzött növényekről a fertőzés után (dpi) 5 nappal szedtünk mintát. A TCV vírussal fertőzött dohány növényekről 11 dpi gyűjtöttünk mintát. A mintaszedéskor az adott napon a mock fertőzött növényekről is gyűjtöttünk mintát.

Az RNS szekvenáláson alapuló vizsgálatainkat *Solanum lycopersicum* növényekkel végeztük. A paradicsomot első lomblevél kifejlődése után (19-20 napos) fertőztük TMV és PVX vírussal és vírust nem tartalmazó inokuláló pufferrel (mock). A TMV és PVX vírussal fertőzött paradicsom növényekről 14 nappal a fertőzés után szedtünk mintát. A mintát minden esetben alulról a második levélemeletről gyűjtöttük be. A mintaszedéskor az adott napon a mock fertőzött növényekről is gyűjtöttünk mintát.

A kísérleteinket mindkét növény esetében 3 biológiai ismétlésben végeztük el.

3.2.10. Totál nukleinsav kivonás

A totál nukleinsav kivonást WHITE és KAPER (1989) által leírt módon végeztük, néhány módosítással. A növények szisztemikus leveleiből készítettünk totál nukleinsav kivonatot. Jégbehűtött steril dörzscsészében 100 mg levélszövetet homogenizáltunk és 650 µl RNS kivonó puffer (100 mM glicin, pH 9,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% SDS és 1% nátrium-lauril-szarkozinát) hozzáadásával feltártuk. A homogenizált anyagot 600 µl fenolt tartalmazó eppendorf csőbe töltöttük, vortex-eltük és szobahőmérsékleten 5 percig centrifugáltuk. Ezt követően a vizes fázist 600 µl fenol-kloroformmal, majd 600 µl kloroformmal extraháltuk. A kicsapást 20 µl 4M nátrium-acetáttal és 1000 µl abszolút etanollal végeztük. A mintákat 20 percig jégen hagytuk, majd 4°C-ra előhűtött centrifugában 30 percig centrifugáltuk. A keletkezett csapadékot 1000 µl 70%-os

etanollal mostuk. A csapadékot vákuumcentrifugában (Thermo Scientific Savant DNA SpeedVac®) beszárítottuk és 30 µl steril desztillált vízben visszaoldottuk. A minták felviteléhez FDE festéket (10 ml formamid, 10 mg xilén-cianol FF, 10 mg brómfenolkék, 200 µl 0,5M EDTA (pH 8,0)) használtunk. 2 µl totál nukleinsavhoz 5 µl FDE festéket és 3 µl Milli-Q vizet adtunk, a mintákat 65°C-on 5 percig denaturáltuk. A totál nukleinsav elválasztást 1xTBE (90 mM Tris, 90 mM bórsav és 3mM EDTA) pufferben, etídium-bromiddal festett, 1,2%-os agaróz gélen 120 V-os feszültség mellett végeztük. A gélelektroforézis eredményét Bio-Rad ChemiDoc™ XRS+ System készülékkel fotóztuk le. A totál nukleinsav koncentrációt NanoDrop®-al (Spectrophotometer ND-1000) mértük meg. A totál nukleinsav kivonatokat felhasználásig -70°C-on tároltuk.

3.2.11. A vírus RNS jelenlétének kimutatása

A vírus RNS-ek jelenlétét Northern blottal mutattuk ki. A vírusfertőzött mintákat TBE pufferben 1,2%-os agaróz gélen gélelektroforézissel elválasztottuk. A totál nukleinsavat kapilláris rendszerben Hybond-NX membránra (GE Healthcare, Amersham) blottoltuk, 20xSSC (3 M NaCl, 0,3 M Nátrium-citrát (pH 7,0)) puffer rendszerben egy éjszakán át. A totál nukleinsavat UV fénnel (Amersham crosslinker) kötöttük a membránra.

3.2.12. Totál RNS pool készítés

Vírusfertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényekből egyedenként kivont RNS-eket vírusfertőzés jelenlétének igazolását követően egyesítettük (pool). Az RNS pool létrehozásának célja, hogy a vizsgálatok során egy átfogóbb képet kapjunk. *S. lycopersicum* és *N. benthamiana* növények 4-4 egyedének totál RNS kivonatát mértük össze fertőzésenként. A pool-ozott RNS-eket felhasználásig -70°C-on tároltuk. A Northern blott analízist, a qRT-PCR-t és az RNS szekvenálást az RNS pool-okból készítettük. Az RNS szekvenáláshoz használt totál nukleinsav pool-okat RNazol-al tovább tisztítottuk.

3.2.13. Endogén gének expressziójának visszaigazolása Northern blottal

Az endogén gének expressziójának vizsgálatához MAE (0,1 M MOPS (pH 7,0), 40 mM Na-acetát, 5 mM EDTA) pufferben, formaldehid tartalmú 1,5%-os agaróz gélen gélelektroforézissel elválasztottuk a mintákat. A mintákat kapilláris blottoló használatával Hybond-NX membránra (GE Healthcare, Amersham) rögzítettük, 20xSSC puffer rendszerben egy éjszakán át. A mintákat UV fénnel a membránra kötöttük.

3.2.13.1. Northern hibridizáció

A hibridizálás előtt a szükséges oldatokat előmelegítettük a hibridizálás hőmérsékletére. A membránt először a hibridizálás hőmérsékletén 2xSSC-vel 20 percig mostuk, majd 1 órán keresztül prehibridizáltuk. A hibridizálást 15 ml hibridizáló pufferben (radioaktív próbát tartalmazza) végeztük egy éjszakán át. Hibridizáláshoz a legtöbb esetben Church puffert (1% BSA, 1 mM EDTA, 0,25 M Na₂HPO₄, 7% SDS, pH 7,2), néhány esetben PerfectHyb™ Plus Hybridization buffer (Sigma-Aldrich) vagy DIG Easy Hyb™ (Roche) puffert használtunk. A hibridizálási hőmérsékletet a hibridizáláshoz használt puffer határozza meg, ennek megfelelően Church puffer esetén 65°C-on, DIG Easy Hyb™ puffer esetén 50°C-on és PerfectHyb™ puffer esetén 68°C-on végeztük a hibridizálást.

A hibridizálást követően a membránt csökkenő só koncentráció mellett mostuk. A mosást a hibridizálás hőmérsékletén végeztük előmelegített oldatokkal, először 10 percig 2xSSC 0,1% SDS oldattal, majd további 10 percig 0,5xSSC 0,1% SDS oldattal. A megmosott membránt becsomagoltuk, Hyperscreent tartalmazó kazettába helyeztük, filmet (FUJI Super RX) raktunk rá és előhívásig -70°C-ra tettük. A jel erősségétől függően néhány óráig vagy akár két hétig is exponáltuk, majd előhívtuk a filmet.

3.2.13.2. Radioaktív próba készítése

A klónozott vírus és endogén gének darabjairól Decalabel DNA Labeling Kit (ThermoFisher Scientific) segítségével P³² izotóppal jelölt, radioaktív DNS próbát készítettünk. A radioaktív próba elkészítéséhez a következő elegyet mértük össze: 5 µl 5x Decalabel puffer, 1 µl templát (tisztított PCR termék), 24 µl Milli-Q víz. A mintákat 8 percig forraltuk, majd jégre raktuk. Az elegyhez hozzáadtunk 1,5 µl MixC-t, 0,5 µl Klenow DNS polimeráz enzimet és 3 µl radioaktívan jelölt [α-P32]-dCTP-t. Majd a mintát 1 óráig 37°C-on inkubáltuk, ezután hozzáadtunk 2 µl dNTP mixet és újabb 5 percig 37°C-on inkubáltuk. A minta denaturálását 5 percig 96°C-on végeztük, majd jégre raktuk. A radioaktívan jelölt próbát 15 ml hibridizáló pufferbe mértük bele.

3.2.14. Endogén gének expressziójának visszaigazolása qRT-PCR-rel

Vírusfertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényekből készített cDNS-ről az M2. és M3. mellékletben felsorolt primerek segítségével 3 biológiai és 3 technikai ismétlésben kvantitatív real-time PCR-t végeztünk. *N. benthamiana* esetén a *cellulóz szintáz* (ACS), a *sejtfal invertáz* (CWINV) és a *carbonsav anhidrid* (CA) gének expresszióját vizsgáltuk. *S. lycopersicum* növény esetén a *sejtfal invertáz* (CWINV), a *carbonsav anhidrid* (CA), az *I. fotokémiai rendszer* (PSI) *O* alagység, *elongációs faktor* (EF), *hiszton*, *patogenezis-kapcsolt fehérje 1* (PR1) és a

szisztemikus rezisztencia (SAR) gének expresszióját vizsgáltuk a vírusfertőzésekben. Mindkét gazda esetén az ubiquitint használtuk belső referenciaként. A qRT-PCR-hez használt poolozott RNS kivonatokat először DNáz (ThermoFisher Scientific) kezelésnek vetettük alá, majd RNazolal (Sigma-Aldrich) tovább tisztítottuk. 3 µg RNS-ről reverz tranzkriptázzal és random oligonukleotidokkal cDNS-t szintetizáltunk (RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit, Thermo Scientific). Az elkészült cDNS-ről specifikus primerek felhasználásával qRT-PCR-t végeztünk. A qRT-PCR reakcióhoz összemértünk: 6 µl 2x SYBER Green Master Mix-et (Applied Biosystems®), 0,6 µl forward primert, 0,6 µl reverz primert, 1,8 µl Milli-Q-t és 3 µl 16x-osan hígított cDNS-t. A qRT-PCR-t Rotor Gene 3000 (Qiagen) készülékkel végeztük, az alábbi körülmények mellett: 95°C 10 perc; 40 cikluson keresztül ismételve: 95°C 15 sec, 60°C 1 perc, végül olvadáspont meghatározáshoz 72°C 45 sec-ig tartottuk a mintákat, majd 5 másodpercenként 1°C-kal növeltük a hőmérsékletet 95°C-ig. A mintákat -20°C-on tároltuk. A qRT-PCR eredményeit Rotor Gene 6 (Qiagen) szoftverrel értékeltük ki. A kontroll és a vírusfertőzött minták összehasonlításával valamint az ubiquitin (belső kontroll) használatával relatív gén-expressziós különbségeket számoltunk a deltadelta Ct módszer segítségével. A relatív normalizált gén-expressziós különbségeket R statisztikai program segítségével készített bajusz diagramon ábrázoltuk. A bajusz diagramm vízszintes tengelyén az egyes vírusfertőzéseket, függőleges tengelyén az adott gén relatív normalizált expresszióját tüntettük fel. A különböző vírusfertőzések esetén gének expresszióját minden esetben a kontrollhoz viszonyítottuk, melynek relatív normalizált expressziója 1.

3.2.15. Klorofill fluoreszcencia mérés

A fotoszintetikus aktivitás nyomonkövetése céljából vírusfertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényeken klorofill fluoreszcencia mérést végeztünk. A klorofill fluoreszcencia méréseket és a mérési eredmények kiértékelését a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai Intézet, Molekuláris Stressz- és Fotobiológiai Csoportjának segítségével végeztük el. A növények fertőzése az 3.2.9 fejezetben leírtaknak megfelelően zajlott. Mindkét gazdanövény esetén fertőzésenként három növényrel dolgoztunk és minden növényen három levélnek a klorofill fluoreszcencia paramétereit határoztuk meg. A méréseket *N. benthamiana* növényeken 7 dpi (CymRSV és crTMV) illetve 11 dpi (TCV) és *S. lycopersicum* növényeken 8 dpi (TMV, PVX) végeztük el, kontroll jelenléte mellett. A gyors klorofill fluoreszcencia tranziens (OJIP) méréseket üvegházi körülmények között tartott 20 percen át sötét-adaptált leveleken HandyPEA fotoszintetikus hatékonyságmérő készülékkel (Hansatech Instruments, UK) végeztük el. A klorofill fluoreszcencia indukciós paramétereket DUAL-PAM-100 készülékkel (Walz, Németország) határoztuk meg. Az eredmények kiértékelését Dr. Kenny Paul végezte.

3.2.16. Növények hőterképezése

A hőterképezést vírusfertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növények transpirációjának megfigyelése miatt végeztük el. A hőterképezést illetve a hőterképezés eredményének kiértékelését a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai Intézet, Molekuláris Stressz- és Fotobiológiai Csoportja segítette. Mindkét gazdanövény esetén fertőzésenként három növénnyel dolgoztunk és minden növényen három levélnek végeztük el a hőterképezését. A méréseket *N. benthamiana* növényeken 4 dpi (CymRSV and crTMV) illetve 8 dpi (TCV) és *S. lycopersicum* növényeken 13 dpi (TMV, PVX) végeztük el, kontroll jelenléte mellett. A növények hőterképezéséhez Varioscan 3021-ST (Jenoptik Laser, Optik Systeme GmbH, Jena, Németország) kamerát használtunk. Az eredmények kiértékelését Dr. Kenny Paul az IRBIS Plus (Jenoptik) szoftver segítségével végezte.

3.2.17. RNS szekvenálás

A gén-expressziós változások pontosabb nyomonkövetésének céljából RNS-t szekvenáltattunk. A vírusfertőzött *S. lycopersicum* növényekből fenol-kloroformos módszer segítségével totál RNS kivonatot készítettünk, ezeket pooloztuk, majd a mintákat RNazol-lal tisztítottuk. A tisztított RNS-eket az UD-GenoMed Kft.-vel Illumina HiScanSQ NGS platformon szekvenáltattuk. Három biológiai ismétlésből származó minták RNS szekvenálását végeztettük el. Technikai ismétlésként 3. biológiai ismétlést készler szekvenálták, ezért tárgyaljuk a későbbiekben négy RNS szekvenálásnak az eredményét.

3.2.18. Bioinformatikai elemzések

A microarray és az RNS szekvenálási adatok minőség ellenőrzését, normalizálását, a varianciaanalízist, a p-érték meghatározást, valamint a gén ontológiai (GO) analízist Dr. Kontra Levente, a NAIK-Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet munkatársa végezte.

3.2.18.1. Microarray adatok elemzése

Mind három biológiai ismétlés, minden egyes próbájára elvégeztük az expressziós értékek normalizálását. Kétmintás T próba varianciaanalízissel meghatároztuk a korrigált p-értéket ($<0,05$). Ezt követően olyan géneket azonosítottunk, melyek statisztikailag szignifikáns változást mutattak CymRSV, crTMV vagy TCV vírusfertőzésre. Relevánsnak csak a kontrollhoz képest legalább kétszeres expressziós változást mutató géneket tekintettük.

A MapMan honlapján (HTTP5) elérhető a microarray chip-hez tartozó Bin kód lista, ezáltal funkció szerint csoportosítottuk az egyes próbákat. A számunkra fontos kategóriákat (fotoszintézis, hormon szabályozás) részletesebben is elemeztük. Az eredményekben bemutatott

hőterképek, diagrammok elkészítéséhez a Microsoft Office programcsomag, táblázatkezelő Excel programját használtuk.

3.2.18.2.RNS szekvenálás adatainak elemzése

A read-ek minőségi kontrolljához *fastqc*, a riboszóma kontamináció eltávolításához *sortmerna* [KOPYLOVA et al. 2012], az adapterek levágásához (trimmelés) és a minőségi szűréshez *trimmomatic* [BLOGER et al. 2014] programot használtunk. A read-eket minőségi ellenőrzését követően felillesztette a *S.lycopersicum* genomjára (Sly2.5 genom, ITAG2.4 annotációval), majd *tuxado* protokollját [TARPNELL et al. 2012] alkalmazva számszerűsítettük és meghatároztuk a szignifikáns expressziós különbséget. Későbbi vizsgálatok szempontjából csak azokat a géneket vettük figyelembe, melyek szignifikáns differenciál expressziót (FDR-hez igazított p-érték <0,05) és legalább kétszeres változást mutattak a kontrollhoz képest.

A MapMan honlapján [HTTP5] megtaláltuk a *S. lycopersicum* annotált génjeihez tartozó Bin kódokat is, így ez esetben is elvégeztük a funkció alapján történő csoportosítást a későbbi elemzésekhez. Az eredményekben bemutatott hőterképek, diagrammok elkészítéséhez a korábbiakkal megegyezően a Microsoft Office programcsomag, táblázatkezelőjét használtuk.

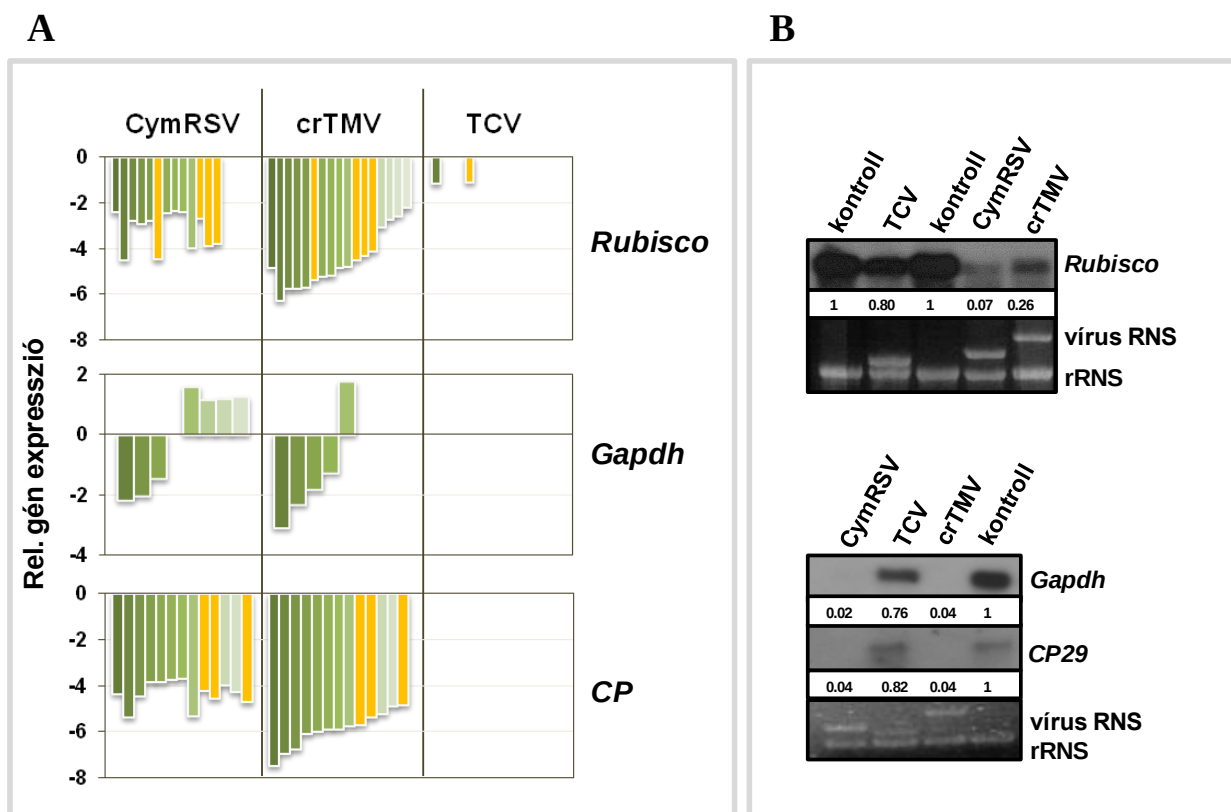
4. EREDMÉNYEK

4.1. A vírusfertőzött *N. benthamiana* növények gén-expressziós vizsgálatának eredményei

Kísérleteink során microarray hibridizációval CymRSV, crTMV, TCV vírussal fertőzött *Nicotiana benthamiana* növények genomszintű gén-expressziós változásait vizsgáltuk azért, hogy megértsük, milyen folyamatok állhatnak a gén-expressziós változások hátterében. Vizsgáltuk, hogy egyes vírusfertőzések során bekövetkezik-e a háztartási géneket érintő shut-off jelenség. Vizsgáltuk, hogy ugyanazon gazdanövényen az egyes vírusfertőzések okoznak-e további különbséget génexpresszós szinten.

4.1.1. A shut-off jelenlétének vizsgálata

Az endogén gének közül a shut-off jelenlétét leginkább tükröző *ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz-oxigenáz* (*Rubisco*), *glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz* (*Gapdh*), és *klorofill pigment-kötő fehérje 29* (*CP29*) gének expressziós szintjét vizsgáltuk.



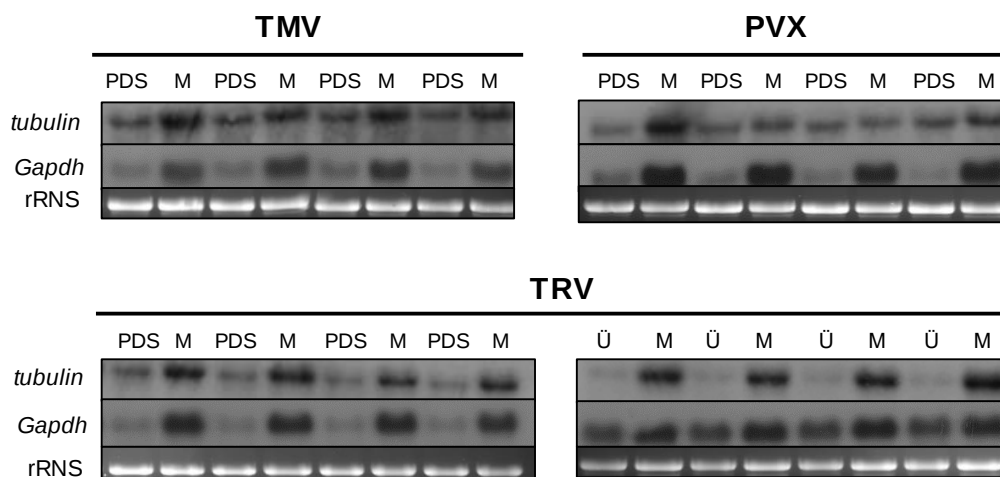
9. ábra Shut-off jelenség vizsgálata vírusfertőzött *N. benthamiana* növényben. **A/** Fontosabb háztartási gének microarray analízissel detektált expressziós változása és **B/** Northern blottal történő visszaigazolása

A microarray kísérleteink adatainak elemzése alapján CymRSV és crTMV fertőzés esetén a fontos háztartási gének expressziója lecsökkent, míg TCV vírusfertőzésnél nem jelentkezett a shut-off. A vírusfertőzésekben Northern blott segítségével vizsgáltuk a *Rubisco*, a *Gapdh*, a *CP29*

gén expressziós szintjének változását és a shut-off jelenlétét. A 9. ábra A részén a microarrayel, B részén a Northern blottal detektált gén-expressziós változásokat szemléltettük.

Az 9. ábra A részén sárga színnel jelöltük azokat a microarray próbákat, melyeket a radioaktívan jelölt próba detektál. Kimutattuk, hogy a CymRSV és crTMV fertőzött növények esetén a *Rubisco*, a *Gapdh* és a *CP29* gén expressziója a kontrollhoz képest lecsökkent, shut-off jelenséget mutatott. TCV vírusfertőzés esetén shut-off nem jelentkezett, a *Rubisco*, a *Gapdh* és a *CP29* gén expressziója változatlan maradt a kontrollhoz képest. A visszaigazolt endogén gének normalizált gén expressziós változását a 9. ábra B részén látható értékek jellemzik.

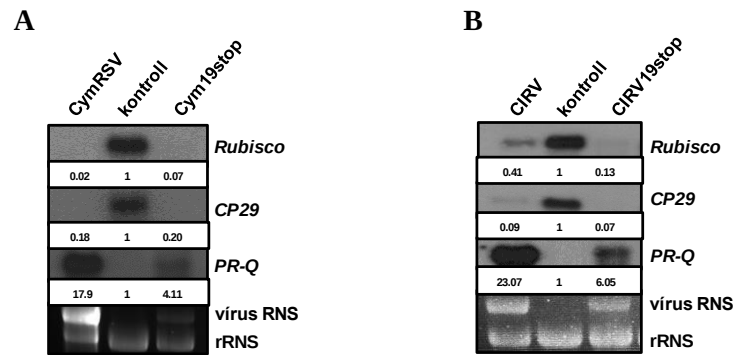
Phd munkámhoz szorosan kapcsolódik a kutatócsoportunk egy másik vizsgálata is, mely során a VIGS vektorok alkalmazásának korlátait vizsgáltuk. Ezen eredmények közül csak az általam elvégzett kísérleteket ismerettem, a kísérletek részletes leírata és további eredményei Oláh Enikő Phd munkájában valamint a közös munkából készült publikációban érhető el [OLÁH et al. 2016]. Kísérleteink során vizsgáltuk az üres és a *fitoén deszaturáz* (*PDS*) gént tartalmazó TMV, PVX, és TRV VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növények fontosabb háztartási génjeinek expresszióját, melyet 10. ábra szemléltet. Northern blottal kimutattuk, négy biológiai ismételtsben, hogy a *tubulin*, a *Gapdh* gének expressziója lecsökken a *PDS* gént tartalmazó TMV, PVX VIGS valamint az üres és a *PDS* gént tartalmazó TRV VIGS vektor alkalmazása esetén is.



10. ábra TMV, PVX és TRV VIGS vektorral fertőzött *N. benthamiana* növények gén-expressziós változása

4.1.2. A shut-off jelenség nem a nekrózis következménye

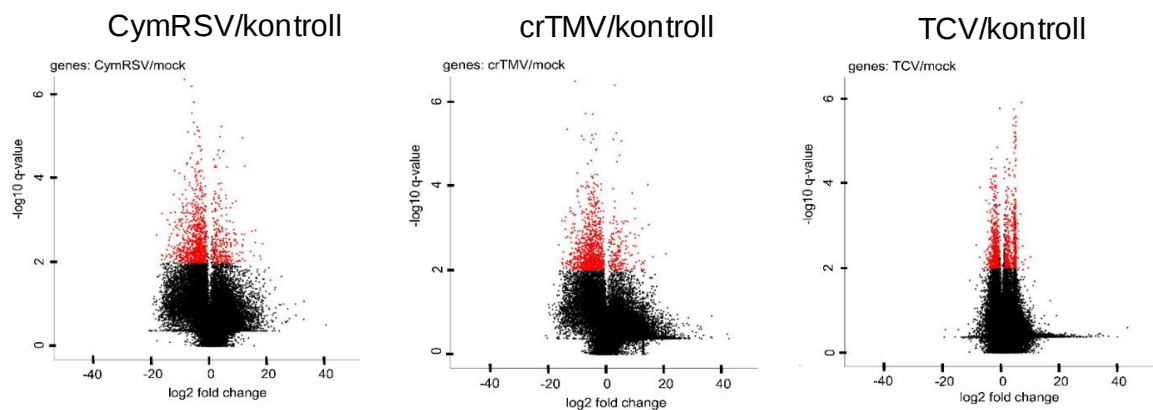
Vizsgálataink során ki akartuk zárni annak lehetőségét, hogy a shut-off jelenséget a nekrózis okozza. Ennek igazolásához *N. benthamiana* növényeket fertőztünk vad típusú CymRSV és mutáns CymRSV (Cym19stop) vírussal. A p19 deficiens Cym19stop vírussal való fertőzés esetén kimutatták, hogy a szupresszor hiánya hatással van a vírus felhalmozódására és terjedésére [HAVELDA et al. 2003]. Ezen kívül a p19 hiánya miatt a víusról keletkező siRNS-ek szabad formában maradnak jelen, felhalmozódnak és indukálják az RNS interferencia mechanizmusát, melynek hatására a növények kigyógyulnak [SZITTYA et al. 2002]. Továbbá bizonyított, hogy 15°C-on siRNS-alapú RNS interferencia gátolt [SZITTYA et al. 2003]. Ezek alapján, ha a fertőzött növényeket 21°C-on nevelnénk azt figyelhetnénk meg, hogy a CymRSV fertőzött növények nekrózist követően rövid időn belül elpusztulnának, míg a Cym19stop fertőzött növények kigyógyulnának. A fertőzött növényeket 15°C-on neveltük, ezáltal alacsony hőmérsékleten a CymRSV vírussal fertőzött növényekben a vírus lassabban terjedt el, a Cym19stop vírussal fertőzött növényekben pedig több vírus akkumulálódott, azonban nekrózis nem jelentkezett. A vírusfertőzött növényekről 12 nappal a fertőzést követően gyűjtöttünk mintát. Northern blott segítségével vizsgáltuk a *Rubisco*, *CP29* háztartási gének expressziós szintjét és a shut-off jelenség meglétét, továbbá a *PR-Q* stressz gén expressziós színjének változását követtük nyomon (11. ábra A része). Kimutattuk, hogy 15°C-on nevelt CymRSV és Cym19stop fertőzött növényekben is lecsökkent a *Rubisco* és *Gapdh* gén expressziója a kontrollhoz képest, a *PR-Q* expressziója pedig mindkét vírusfertőzés esetén indukálódott. A kísérletet megismételtük egy a CymRSV vírussal közeli rokonságban álló CIRV vírussal, melynek ugyan csak van egy p19 deficiens változata, a CIRV19stop. A vírusfertőzött növényeket 15°C-on neveltük, majd a fertőzést követő 12. napon mintát gyűjtöttünk. Northern blott segítségével ez esetben is megvizsgáltuk a *Rubisco*, *CP29* háztartási gének expressziós szintjét és a shut-off jelenség meglétét, valamint a *PR-Q* stressz gén expressziós színjének változását is nyomonkövettük (11. ábra B része). Kimutattuk, hogy 15°C-on nevelt CIRV és CIRV19stop fertőzött növényekben is lecsökkent a *Rubisco* és *Gapdh* gén expressziója a kontrollhoz képest, a *PR-Q* expressziója pedig mindkét vírusfertőzés esetén indukálódott.



11. ábra Vad típusú és p19 deficiens mutáns vírussal fertőzött *N. benthamiana* növényekben bekövetkező gén-expressziós változások

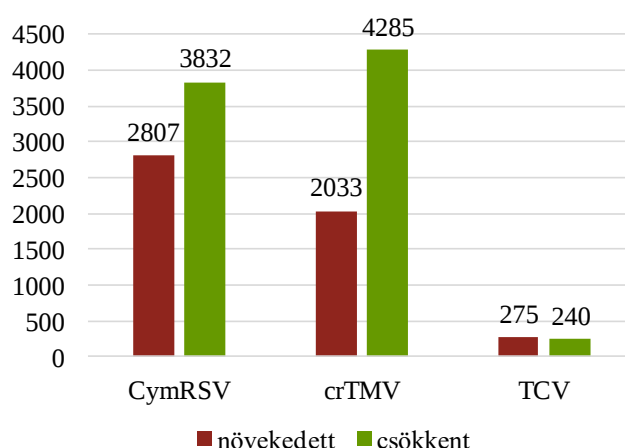
4.1.3. A vírusfertőzések hatása a gazdanövény gén-expressziós rendszerére

A vírusfertőzött *N. benthamiana* mintákból 3 biológiai ismételtesben készült microarray analízis. A vírusfertőzött *N. benthamiana* microarray analízis eredményeinek további elemzése azt mutatta, hogy a CymRSV és crTMV vírussal fertőzött növényekben drasztikusabb gén-expressziós változások következtek be a kontrollhoz képest, mint TCV vírusfertőzés esetében, mely a vulkán diagrammon (12. ábra) is jól látható. A vulkán diagrammokon az egyes pontok a kontrollhoz viszonyított gén-expressziós eltéréseket mutatják a különböző vírusfertőzésekben. A vízszintes tengelyen látható, hogy a gének expressziója milyen irányban változik (csökken vagy nő), míg a függőleges tengelyen a változás mértékét ábrázoltuk. Piros színnel jelöltük azokat a géneket melyek expressziója szignifikáns változást mutatott a kontrollhoz képest. A vulkán diagrammon látható, hogy több génnek az expressziója változott meg a CymRSV és crTMV fertőzött növényekben, mint a TCV esetén. Ezenfelül a vulkán diagramm azt is mutatja, hogy CymRSV és crTMV fertőzés esetén sokkal több génnek az expressziója csökken le, mint amennyinek az expressziója indukálódik.



12. ábra CymRSV, crTMV, TCV vírussal fertőzött *N. benthamiana* mintákban detektált gén-expressziós változások nagyságrendje a kontrollhoz képest

A további elemzéseinknél csak azokat a gén-expressziós változásokat tekintettük szignifikánsnak, melyek a kontrollhoz képest legalább kétszeres változást mutattak és p-értékük 0,05-nél kisebb volt. Ezeket a változásokat oszlop diagramok segítségével szemléltettük (13. ábra). A CymRSV vírusfertőzés esetén 6639 génnek az expressziója változott szignifikánsan, melyből 2807 génnek megnőtt és 3832 génnek lecsökkent expressziója. crTMV vírusfertőzésnél 6318 génnek az expressziója mutatott jelentős változást, 2033 génnek megnőtt és 4285 génnek lecsökkent az expressziója. Ehhez képest TCV vírusfertőzés esetén összesen csak 515 génnek változott számottevően az expressziója, melyek közül 275 génnek megnőtt és 240 génnek lecsökkent az expressziója.

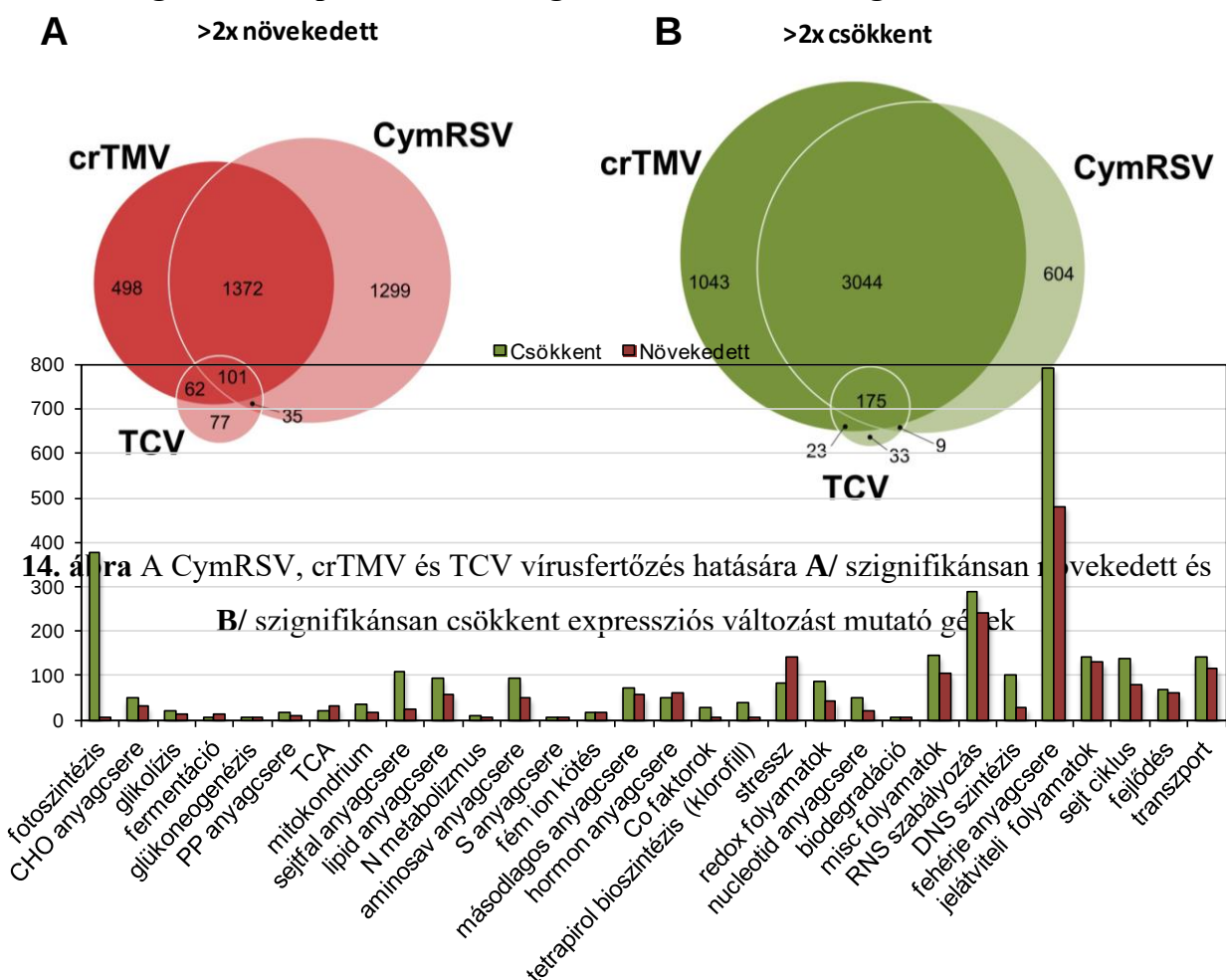


13. ábra Vírusfertőzött *N.benthamiana* növények gén-expressziós profilja

Ezt követően megvizsgáltuk az expressziós változást mutató gének eloszlását a különböző vírusfertőzésekben és ennek eredményét venn diagrammon ábrázoltuk (14. ábra). A 14. ábra A része tartalmazza azon gének számát, melyek expressziója a kontrollhoz képest legalább kétszeres mértékben megnövekedett CymRSV, crTMV, TCV vírusfertőzés hatására. A 14. ábra B része mutatja azon gének számát, melyek expressziója a kontrollhoz képest legalább kétszeres mértékben lecsökkent CymRSV, crTMV, TCV vírusfertőzés hatására. A 14. ábra A részén látható, hogy CymRSV fertőzés esetén 1299, crTMV fertőzésnél 498 génnek az expressziója nőtt meg és 1372 olyan gén volt melynek expressziója mindkét fertőzés esetén legalább kétszeres mértékben indukálódott. TCV vírusfertőzés esetén összesen 77 génnek az expressziója nőtt meg. 62 olyan gént azonosítottunk, melynek az expressziója TCV és crTMV fertőzés esetén és 35 mely TCV és CymRSV fertőzés esetén is indukálódott. Az elemzés szerint 101 gén indukálódott mindhárom vírusfertőzés esetén. A 14. ábra B része azt mutatja, hogy CymRSV fertőzés esetén 604, crTMV fertőzésnél 1043 génnek az expressziója csökkent le és 3044 olyan gén van melynek expressziója mindkét fertőzés esetén legalább kétszeres mértékben lecsökkent. TCV vírusfertőzés esetén 33 génnek az expressziója csökkent le. Ezenfelül 23 génnek az expressziója csökkent le TCV és

crTMV fertőzés hatására és 9 génnek az expressziója csökkent le TCV és CymRSV fertőzésre is. Az elemzés alapján 175 génnek az expressziója csökkent le mindhárom vírusfertőzés esetén.

4.1.4. A szignifikáns expressziót mutató gének funkcionális kategorizálása



A kontrollhoz képest szignifikánsan változó expressziót mutató géneket bin kategóriák alapján funkcionálisan csoportosítottuk, összesen 30 kategóriába (15. ábra). A sávdiaagrammon a vízszintes tengelyen a gének száma, a függőleges tengelyen a funkcionális kategóriák láthatóak. A kategóriákon belül zöld színű sáv jelzi azokat a géneket, melyek expressziója lecsökkent és piros sáv jelöli az indukálódott géneket.

A 15. ábra mutatja, hogy gén-expressziós változások főként a fotoszintézisben, a sejtfal anyagcserében, a stresszben, az RNS szabályozásban, a fehérje anyagcserében, a jelátviteli folyamatokban, a sejtciklusban, a transzport folyamatokban szerepet játszó géneket érintette. Ezen csoportok közül a fotoszintézisben, a sejtfal anyagcserében, a fehérje anyagcserében és a sejtciklusban érintett gének többségének lecsökken az expressziója. Ezzel szemben az is jól látszik, hogy a stressz válaszában szerepet játszó gének főként indukálódnak vírusfertőzés hatására. Ezt

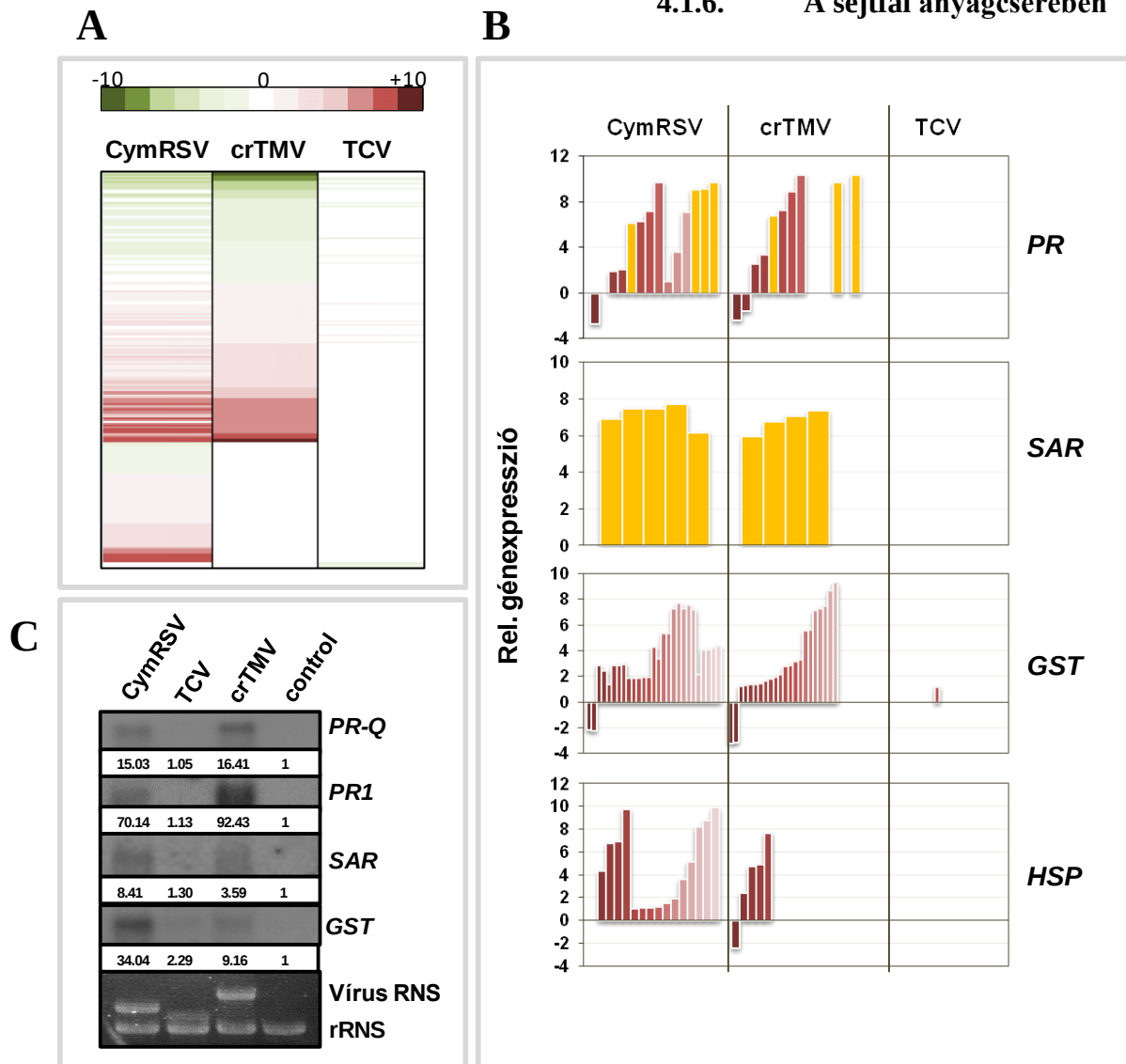
követően ezek közül a csoportok közül kiválasztottunk néhányat, melyeket a különböző vírusfertőzések esetén részletesen is megvizsgáltunk.

4.1.5. A stressz gének

A stressz gének csoporton belül 224 gént detektáltunk, melyek expressziója szignifikáns változást mutatott a kontrollhoz képest, ezek közül 84 génnek az expressziója lecsökkent és 140 génnek az expressziója indukálódott. Hőtérképen ábrázoltuk a vírusfertőzések okozta stressz gének expressziójában bekövetkező változást a kontrollhoz képest, melyet a 16. ábra A része szemléltet. A hőtérkép alapján elmondható, hogy CymRSV és crTMV fertőzés hatására a stressz gének expressziója drasztikusan megváltozott, a gének többsége indukálódott. TCV vírusfertőzés esetén a stressz gének expressziója változatlan marad.

Elemzéseink alapján a stressz gének közül a legnagyobb mértékű indukciót a hősokk fehérje gének és a patogén kapcsolt gének mutatták, ezek microarray technikával detektált változásai a 16. ábra B részén láthatóak. Ezt követően kiválasztottunk néhány markáns gén expressziós változást mutató stressz gént, melynek expresszióját molekuláris biológiai módszerrel is visszaigazoltuk. Az 16. ábra B részén sárga színnel jelöltük azokat a microarray próbákat, melyeket a radioaktívan jelölt próba detektál. Northern blottal megvizsgáltuk a patogén kapcsolt fehérje gének (*PR1*, *PR-Q*), a szisztémikusan szerzett rezisztencia gének (*SAR*) és a glutation S transzferáz (*GST*) gének expressziós szintjének változását a különböző vírusfertőzésekben (16. ábra C része). Kísérletünkkel igazoltuk, hogy a *PR1*, *PR-Q*, *SAR* és a *GST* gén expressziója indukálódik CymRSV és crTMV vírusfertőzés esetén a kontrollhoz képest. Ezzel ellentétben TCV vírussal fertőzött növényekben a *PR1*, *PR-Q*, *SAR* gén expressziója változatlan maradt, a *GST* gén expressziója enyhén emelkedett meg a kontrollhoz képest. A visszaigazolt stressz gének normalizált gén expressziós változását 16. ábra B részén látható értékek jellemzik.

4.1.6. A sejtfal anyagcserében

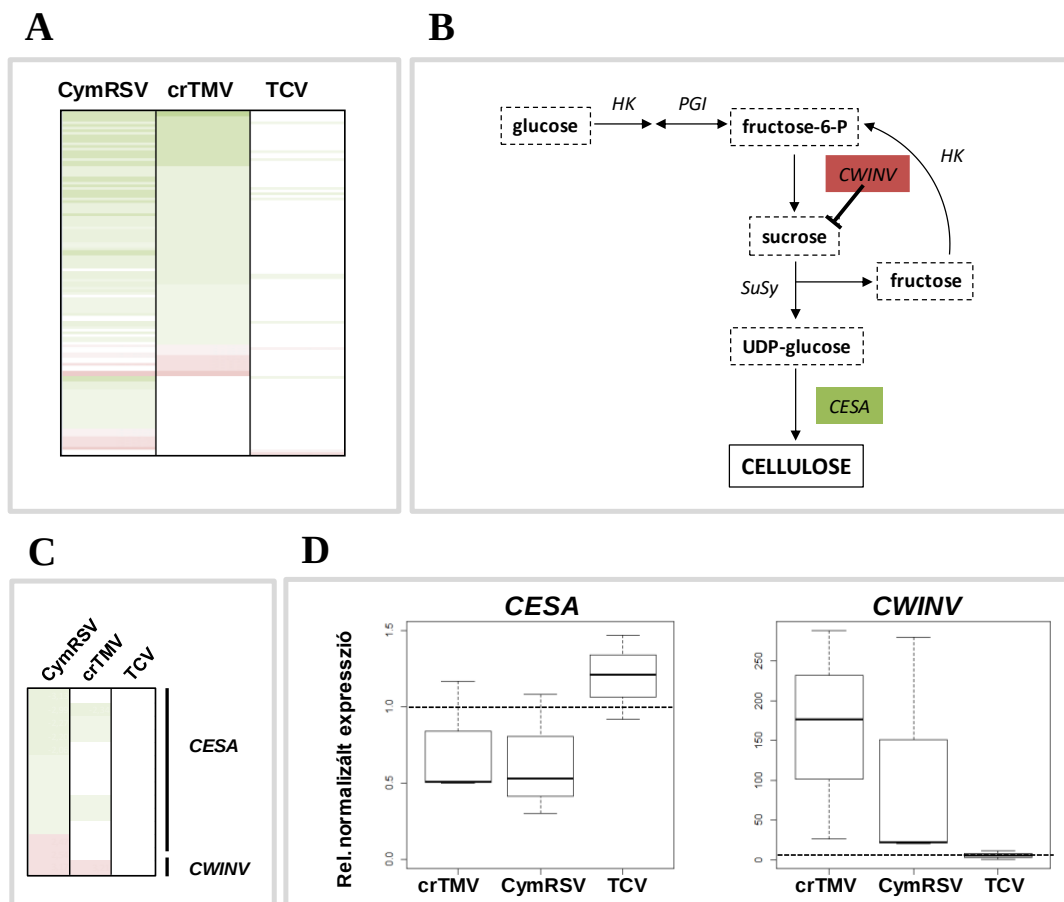


16. ábra Vírusfertőzött *N.benthamiana* növényekben **A/** microarray elemzés alapján a stressz gének expressziós változása **B/** a markáns gén-expressziós változást mutató stressz gének és **C/** azok expressziójának visszaigazolása Northern blottal

szerepet játszó gének

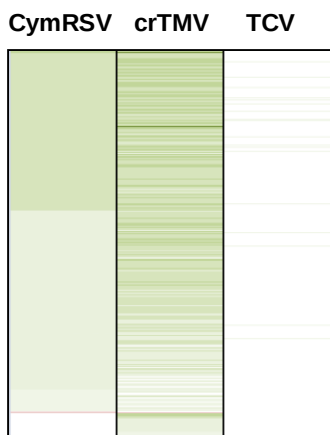
A sejtfal anyagcserében szerepet játszó gének közül 131 génnek az expressziója mutatott szignifikáns különbséget vírusfertőzés hatására a kontrollhoz képest, ebből 109 génnek az expressziója csökkent le és 22 génnek az expressziója emelkedett meg. A sejtfal anyagcserében résztvevő gének expresszió változását a 17. ábra mutatja be az egyes vírusfertőzésekben. A hőtérképen (17. ábra A része) látható, hogy a sejtfal anyagcserében résztvevő gének expressziója CymRSV és crTMV fertőzésekben megváltozott, míg TCV vírusfertőzés hatására nem változtak a sejtfal anyagcsere gének. Ezen gének közül a sejtfalat felépítő, cellulóz szintézisben szerepet játszó *CESA8* és a *CWINV2* gének expresszióját qRT-PCR-el is megvizsgáltuk. A 17. ábra B részén a vizsgált gének cellulóz bioszintézisben betöltött szerepét szemléltettük. A 17. ábra C részén a microarray analízissel, a D részében qRT-PCR-el detektált gén-expressziós változásokat

szemléltettük. Az ábrán látható, hogy a microarray analízissel megegyezően CymRSV és crTMV vírusfertőzés hatására *N. benthamiana* növényben a *CESA8* gén expressziója lecsökkent, míg a *CWINV2* gén expressziója indukálódott. TCV fertőzés hatására sem a *CESA8*, sem a *CWINV2* génnek az expressziója nem változott.



17. ábra **A/** Microarray analízissel kimutatott sejtfal felépítésben szerepet játszó gének expresszió változása. **B/** A *CESA* és a *CWINV* cellulóz bioszintézisben betöltött szerepe. **C/** A sejtfal felépítésében kulcszerepet játszó *CESA* és *CWINV* gének expresszió változása microarray adatok alapján, valamint ezek **D/** qRT-PCR-rel történő visszaigazolása *N.benthamiana* növényben.

4.1.7. A fotoszintézisben szerepet játszó gének

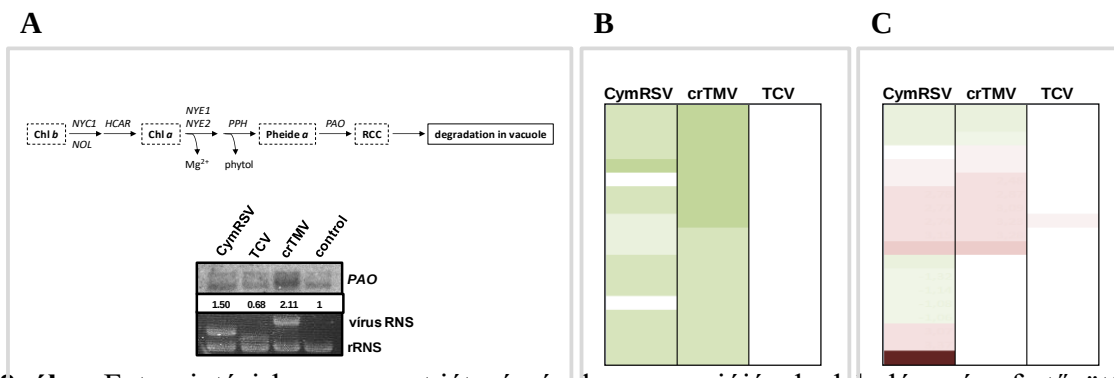


A fotoszintézisben szerepet játszó gének közül 379 génnek az expressziója mutatott szignifikáns különbséget vírusfertőzés hatására a kontrollhoz képest, ebből 377 génnek az expressziója csökkent le, és 2 génnek az expressziója emelkedett meg. A fotoszintézisben résztvevő gének expresszió változását a 18. ábra mutatja be a különböző vírusfertőzésekben. A hőtérképen látható, hogy a fotoszintézisben résztvevő gének expressziója szinte minden esetben lecsökkent és ezek a változások a CymRSV és a crTMV

18. ábra Fotoszintézisben szerepet játszó gének expressziós változása vírusfertőzött dohányban

fertőzésekben drasztikusabbak voltak. TCV vírusfertőzés hatására csak enyhe mértékben tapasztaltunk a fotoszintézisben résztvevő gének expressziójában változást.

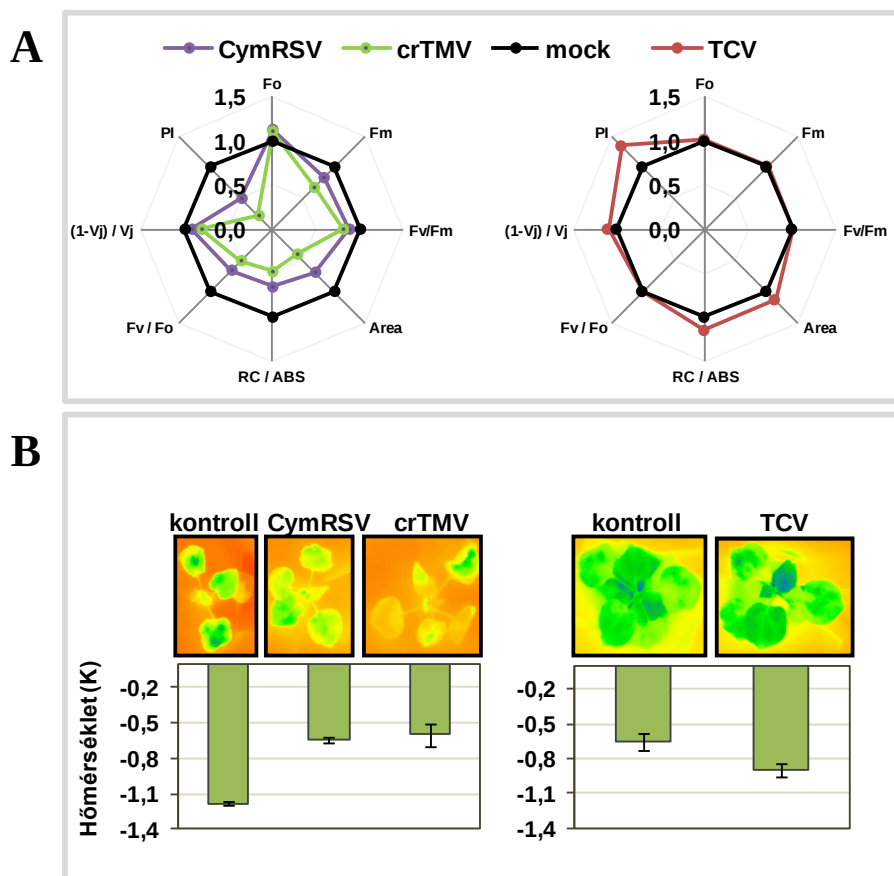
Ezt követően kiválasztottunk néhány olyan gént (*feoforbid a oxigenáz*, *klorofill kötő proteinek*, *citokróm P450*) melyek expressziója közvetlenül vagy közvetve a fotoszintézisre hat. A klorofill degaradációban és levélöregedésben kulcsszerepet játszó *feoforbid a oxigenáz* (PAO, pheophorbide a oxigenase) génre specifikus próbát a microarray chip nem tartalmazott, ezért Northern blottal vizsgáltuk a PAO gén expresszióját, melynek eredménye a 19. ábra A részén látható. Northern blottal kimutattuk, hogy CymRSV és crTMV fertőzés hatására a PAO expressziója indukálódik, míg TCV fertőzés esetén az expressziója nem változik a kontrollhoz képest. A 19. ábra B részén illetve C részén a microarray analízissel detektált *klorofill a/b kötő fehérje* illetve *citokróm P450* gének expressziós változása figyelhető meg. A *klorofill a/b kötő fehérje* és a *citokróm P450* gének expressziója CymRSV és crTMV fertőzés hatására drasztikus változást mutatott, ezzel ellentétben TCV fertőzés hatására expressziójuk változatlan maradt. CymRSV és crTMV fertőzéskor a *klorofill a/b kötő fehérje* gének expressziója lecsökkent, míg a *citokróm P450* gének többségének expressziója megnőtt.



19. ábra Fotoszintézisben szerepet játszó gének expressziójának alakulása vírusfertőzött *N. benthamiana* növényben. A/ A PAO gén expresszió változásának igazolása Northern blottal és microarray analízissel kimutatott B/ *klorofill a/b kötő fehérje* és C/ *citokróm P450* gének expresszió változása vírusfertőzött dohányban.

4.1.8. Klorofill fluoreszcencia mérés és hőtésképezés

A microarray analízis eredményei azt mutatták, hogy a fotoszintézisben fontos szerepet játszó gének expressziója drasztikusan lecsökkent a CymRSV és a crTMV vírusfertőzésekben, azonban TCV vírusfertőzés esetén nem tapasztaltuk ezt. Annak vizsgálatára, hogy a microarray elemzéssel azonosított gén-expressziós változásoknak milyen fiziológiai hatása van két fiziológiai mérést végeztünk. (1) A fotoszintetikus apparátus megfelelő működésének ellenőrzésére és a fotoszintetikus aktivitás nyomonkövetésére klorofill fluoreszcencia mérést végeztünk (20. ábra A része). A klorofill fluoreszcencia méréssel kimutattuk, hogy a klorofill fluoreszcencia paraméterek jelentősen lecsökkentek CymRSV és crTMV vírusfertőzés esetén a kontrollhoz képest. TCV vírusfertőzött növényeknél kontrollhoz hasonló vagy egy kicsit magasabb klorofill fluoreszcencia paramétereket mértünk. (2) A növények transpirációjának monitorozásához hőtésképezéssel vizsgáltuk a növények hőmérsékletét (20. ábra B része). A hőtésképezés eredményei azt mutatták, hogy a CymRSV és a crTMV vírussal fertőzött növények hőmérséklete szignifikánsan magasabb mint a kontroll növényeké, a környezeti hőmérsékletéhez közelített. Ezzel szemben TCV vírusfertőzés esetén a növények hőmérséklete hasonló, illetve kicsit alacsonyabb volt a kontroll növények hőmérsékleténél.



20. ábra Vírusfertőzött *N.benthamiana* növények A/ klorofill fluoreszcencia mérése és B/ hőtésképezése

4.1.9. A gén-expressziót befolyásoló kulcsregulátorok vizsgálata

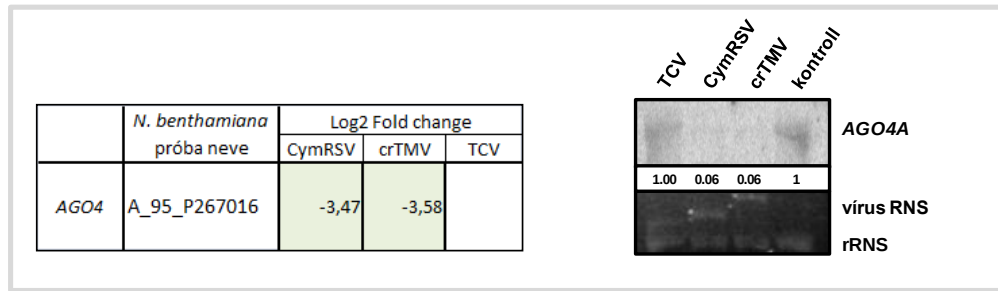
Csoportunkban korábban végzett *in vitro* run on transzkripciós kísérletekkel is megállapították, hogy a shut-off jelenség transzkripciós szinten hat és a sejtmagban alakul ki [HAVELEDA et al. 2008], ahol a TF-ok végzik a cél mRNS-eik szabályozását. Ezért fontosnak tartottuk, hogy mindkét gazdanövény esetén megvizsgáljuk a fontosabb transzkripciós faktorok expressziójának változását. *N.benthamiana* növények microarray vizsgálatakor több olyan transzkripciós faktort is azonosítottunk, melyek expresszióját az akut vírusfertőzések erősen befolyásolták, azonban perzisztens vírusfertőzésben expressziójuk változatlan marad (1. táblázat). Az 1. táblázatban bemutatott microarray elemzések alapján elmondható, hogy CymRSV és crTMV fertőzött *N. benthamiana* növényekben a *BZL4* típusú *leucin cipzár TF* (*BZL4*)-ok, a *NAP* (*NAC-like*), *ZFP19 fehérje* és a *WRKY70 TF*-ok expressziója jelentős mértékben indukálódott, míg a *LRR-t tartalmazó transzmembrán kináz* és a *transzmembrán kináz 1* (*TMKL1*) expressziója lecsökkent.

1. táblázat Microarray analízis alapján kigyűjtött fontosabb transzkripciós faktorok gén-expressziós változásai vírusfertőzött *N.benthamiana* növényekben

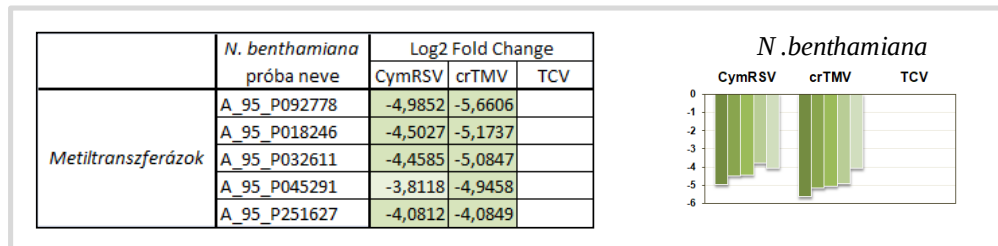
Transzkripciós faktor neve	Próba neve	Log2 Fold change		
		CymRSV	crTMV	TCV
BZL4	A_95_P006856	3,70	3,65	
NAP	A_95_P126537	4,11	6,28	
ZFP19	A_95_P305473	6,47	7,75	
WRKY70	A_95_P258031	3,49	3,34	
LRR transmembrane kinase	A_95_P084700	-5,27	-5,83	
TMKL1	A_95_P122827	-5,11	-5,57	

Ezenfelül munkánk során megvizsgáltuk a gén-expresszió szabályozásában kulcsszerepet játszó *AGO4* és *metiltranszferázok* expressziójának változását is, melyet a 21. ábra szemléltet. A 21. ábra A részén látható a microarray elemzések szerinti *AGO4* expressziójában bekövetkező változás és a microarray adatok Northern blottal történő visszaigazolásnak az eredménye. A microarray és a Northern blott egyhangúan azt mutatja, hogy CymRSV és crTMV vírusfertőzés esetén az *AGO4* expressziója lecsökkent a dohány növényekben, míg TCV vírusfertőzésnél expressziója változatlan maradt. A 21. ábra B részén a microarray módszerrel detektált *metiltranszferáz* gének expressziójában bekövetkezett változásokat ábrázoltuk. Látható, hogy a *metiltranszferáz* gének expressziója az akut vírusfertőzésekben lecsökkent, míg a perzisztens vírusfertőzésekben változatlan maradt.

A



B



21. ábra A/ A microarray elemzés és Northern blottal visszaigazolt AGO4 expressziója dohányban. **B/** Microarray analízissel kimutatott *metiltransferázok* expressziós változásai vírusfertőzött *N.benthamian* növényekben.

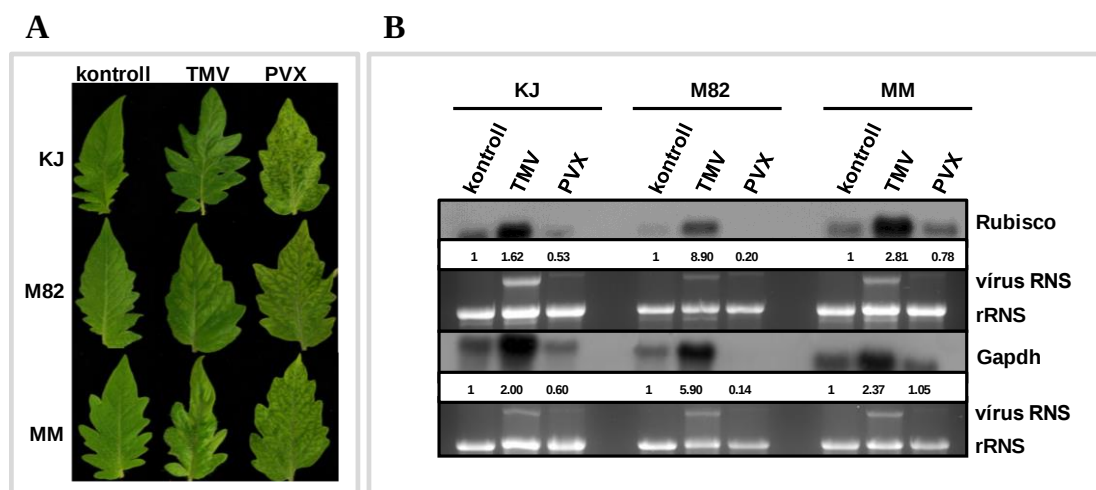
4.2. A vírusfertőzött *S. lycopersicum* növények gén-expressziós vizsgálatának eredménye

Kísérleteink során TMV és PVX vírussal fertőzött *Solanum lycopersicum* növények genomszintű gén-expressziós változásait szeretnénk volna nyomonkövetni. Vizsgáltuk, hogy a dohányon végzett vizsgálatainkhoz hasonlóan, a különböző vírusfertőzések között találunk-e különbséget és másik gazda-vírus kapcsolat esetén is jelentkezik-e a shut-off jelenség? Mindehhez azonban ki kellett választanunk egy paradicsom fajtát és optimalizálnunk kellett a vírusfertőzött növények mintaszedését.

4.2.1. A kísérlet optimalizálása

Előkísérleteink során a shut-off jelenlétének megfigyelésére három különböző paradicsom fajtáról (Kecskeméti jubileum, M82, Moneymaker) gyűjtöttünk mintát (22. ábra A része) különböző időpontokban. A shut-off jelenlétét leginkább tükröző *Rubisco*, *Gapdh* endogén gének mRNS szintjét vizsgáltuk (22. ábra B része).

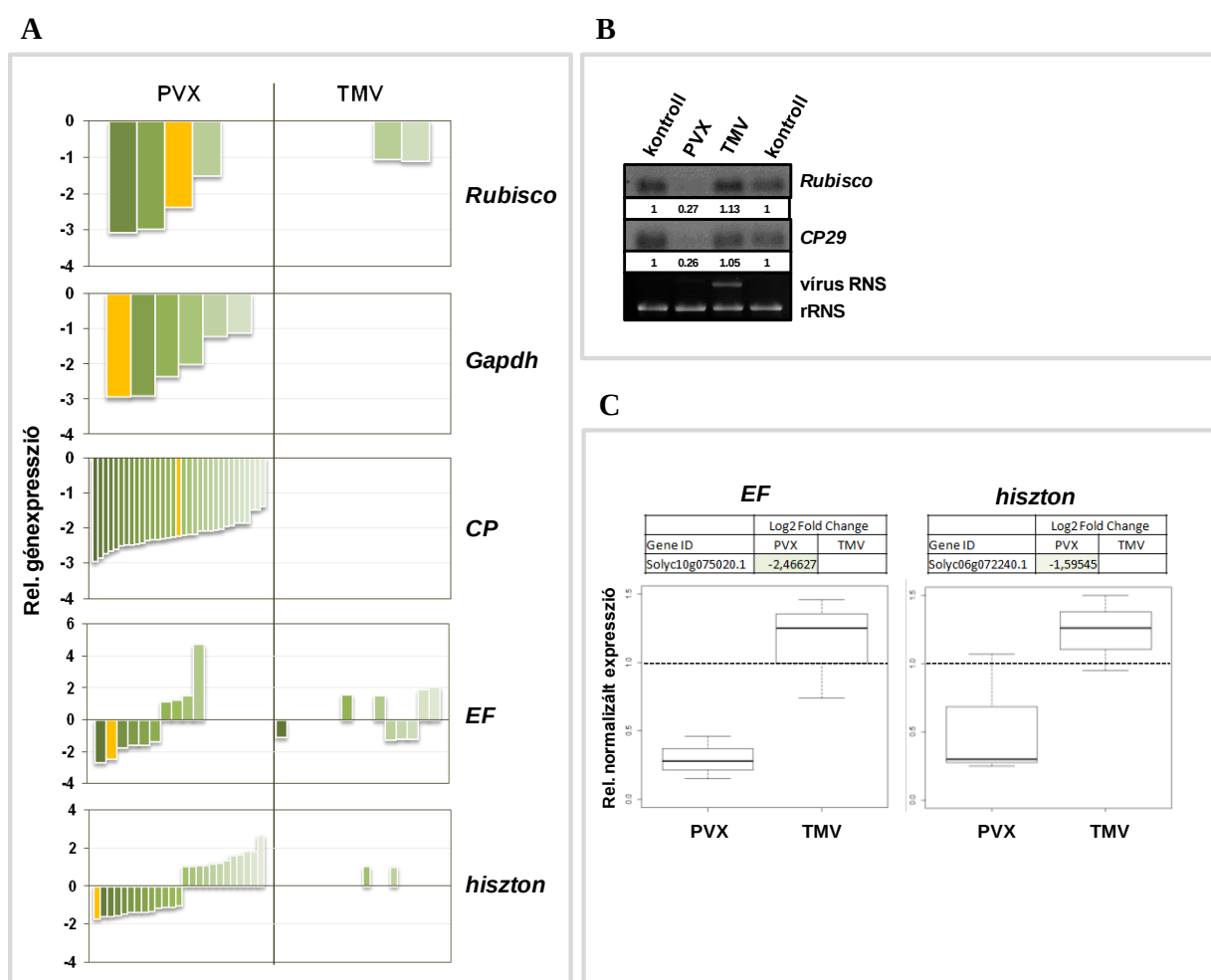
Előkísérleteink azt mutatták, hogy a Kecskeméti jubileum, az M82 és a Moneymaker fajta PVX vírussal történő fertőzése esetén mind a *Rubisco*, mind a *Gapdh* gén expressziója jelentősen lecsökkent a kontrollhoz képest, míg TMV fertőzés esetén a vizsgált endogén gének expressziója változatlan maradt vagy kismértékben indukálódott. Ezek alapján a későbbi vizsgálatainkhoz már csak a Kecskeméti jubileum fajtát használtuk és a mintákat a vírusfertőzést követő 14. napon gyűjtöttük be. A mintákból 3.2.10 fejezet szerint totál RNS kivonást végeztünk, majd az 3.2.17 fejezetben leírtaknak megfelelően RNS-t szekvenáltattunk.



22. ábra Mintaszedés optimalizálása. **A/** Három különböző paradicsom fajtáról begyűjtött vírus és kontroll minták. **B/** A shut-off jelenlétének vizsgálata vírusfertőzött *S. lycopersicum* mintákon.

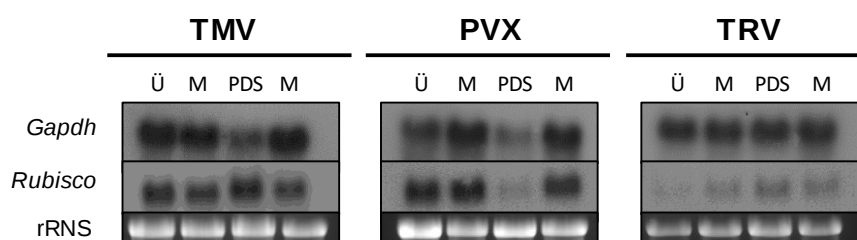
4.2.2. A shut-off jelenség vizsgálata

Az RNS szekvenálás eredményei alapján, a PVX fertőzés esetén a fontos háztartási gének expressziója lecsökkent, míg TMV vírusfertőzésnél nem jelentkezett a shut-off (23. ábra A része). A vírusfertőzésekben Northern blottal (23. ábra B része) és qRT-PCR-rel (23. ábra C része) igazoltuk vissza a *Rubisco*, a *Gapdh*, a *CP29*, az *EF* és a *hiszton* gének expressziós szintjének változását és a shut-off jelenség meglétét. Kimutattuk, hogy PVX fertőzött növények esetén a *Rubisco*, a *Gapdh*, a *CP29*, az *EF* és a *hiszton* gének expressziója a kontrollhoz képest lecsökkent, shut-off jelenséget mutatott. TMV vírusfertőzés esetén a shut-off nem jelentkezett, a *Rubisco*, a *Gapdh*, az *EF* és a *hiszton* gének expressziója enyhén megemelkedett, míg a *CP29* gén expressziója változatlan maradt a kontrollhoz képest.



23. ábra Fontosabb háztartási gének expressziójának vizsgálata vírusfertőzött *S. lycopersicum* növényekben: **A/** microarray analízissel, melyet **B/** Northern blottal és **C/** qRT-PCR-rel validáltunk.

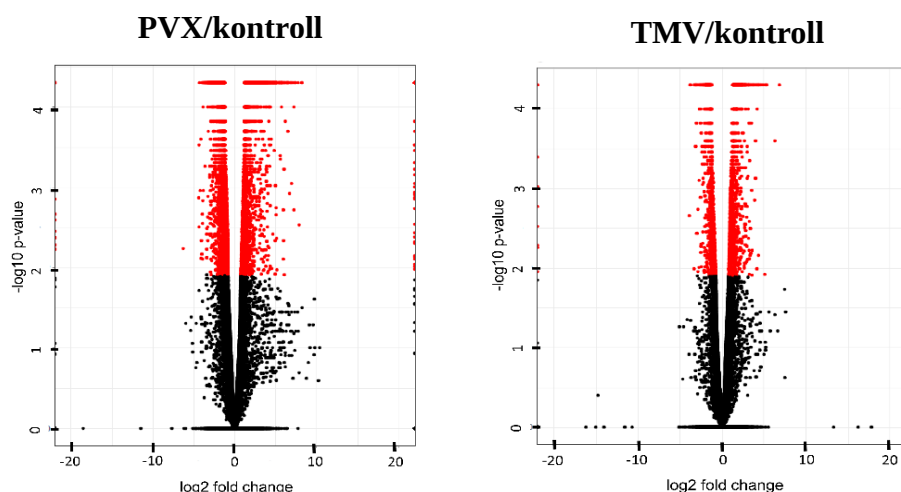
Ezenkívül megvizsgáltuk az üres vagy PDS gént tartalmazó TMV, PVX, és TRV VIGS vektorral fertőzött *Solanum lycopersicum* növények esetén, hogy hogyan változik a háztartási gének expressziója, melyet 24. ábra szemléltet. Northern blottal kimutattuk hogy a *Gapdh* és a *Rubisco* gének expressziója változatlan maradt üres TMV, PVX VIGS fertőzés esetén, míg üres TRV VIGS vektor alkalmazás hatására enyhén lecsökkent a kontrollhoz képest. A PDS gént tartalmazó TMV VIGS hatására a *Gapdh* gén expressziója shut-off-ot mutatott, míg a *Rubisco* expressziójában indukciót figyeltünk meg, míg PVX VIGS fertőzéskor mind a két vizsgált háztartási génnek az expressziója jelentős mértékben lecsökkent. PDS gént tartalmazó TRV VIGS vektor alkalmazása esetén a két gén expressziója nem változott.



24. ábra TMV, PVX és TRV VIGS vektorral fertőzött *S. lycopersicum* növények gén-expressziós változása

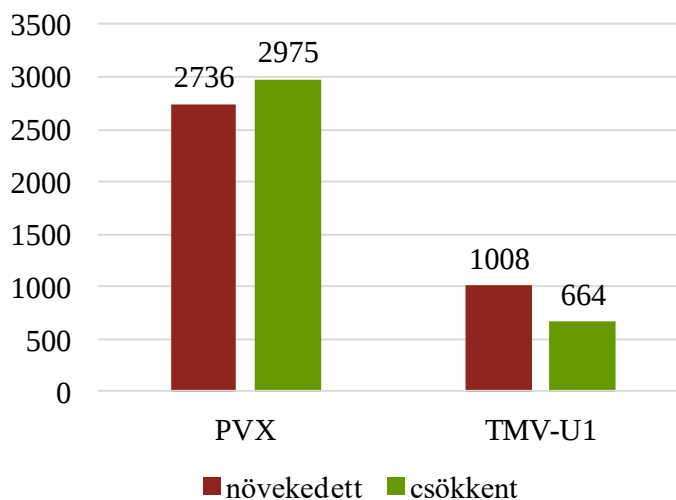
4.2.3. A vírusfertőzések hatása a gazdanövény gén-expressziós rendszerére

A vírusfertőzött *S. lycopersicum* mintákból 3 biológiai és 1 technikai ismétlésben készült RNS szekvenálás. Vírusfertőzött *S. lycopersicum* RNS szekvenálásának további elemzése azt mutatták, hogy a PVX vírussal fertőzött növényekben drasztikusabb gén-expressziós változások következtek be a kontrollhoz képest, mint TMV vírusfertőzés esetében, ezt a 25. ábra is tükrözi. A vulkán diagramokon az egyes pontok a kontrollhoz viszonyított gén-expressziós eltéréseket mutatják a különböző vírusfertőzésekben. A vízszintes tengelyen látható, hogy a gének expressziója milyen irányban változik (csökken vagy nő), míg a függőleges tengelyen a változás mértékét ábrázoltuk. Piros színnel jelöltük azokat a géneket melyek expressziója szignifikáns változást mutatott a kontrollhoz képest. A vulkán diagrammon látható, hogy több génnek az expressziója változott meg a PVX, mint a TMV fertőzés hatására. Az is látható, hogy PVX fertőzés esetén több génnek az expressziója csökkent le, mint amennyinek az expressziója indukálódott.



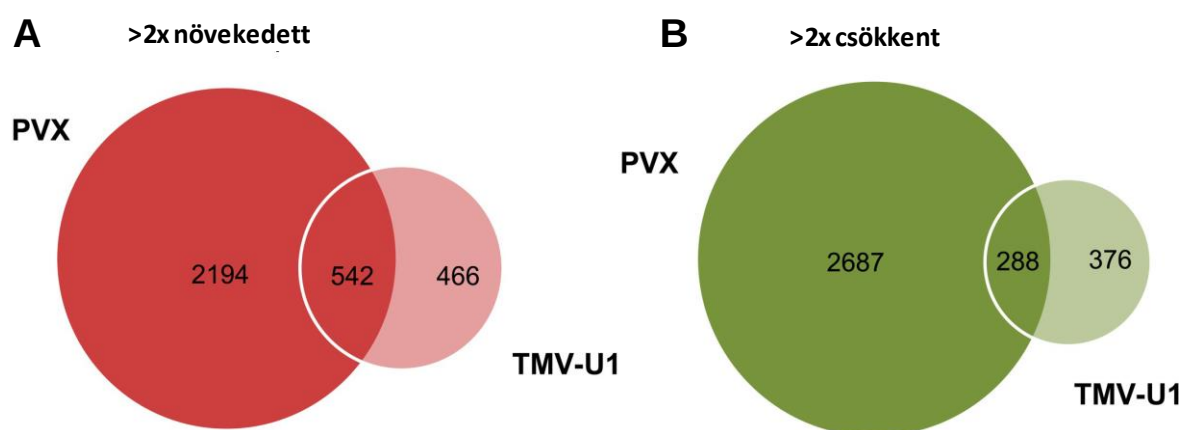
25. ábra PVX és TMV vírussal fertőzött *S. lycopersicum* mintákban detektált gén-expressziós változások nagyságrendje a kontrollhoz képest

A további elemzéseinknél csak azokat a gén-expressziós változásokat tekintettük szignifikánsnak, melyek a kontrollhoz képest legalább kétszeres változást mutattak és p-értékük 0,05-nél kisebb volt. Ezeket a változásokat oszlop diagrammok segítségével szemléltettük (26. ábra). PVX vírusfertőzött paradicsom növényben egyidejűleg 5711 génnek az expressziója változott meg, melyből 2736 génnek megnőtt és 2975 génnek lecsökkent expressziója. TMV vírusfertőzés összesen 1672 gén expresszójában okozott szignifikáns változást, melyek közül 1008 génnek megnőtt és 664 génnek lecsökkent expressziója.



26. ábra Vírusfertőzött *S. lycopersicum* növények gén-expressziós profilja oszlopdiagrammon ábrázolva.

Majd az expressziós változást mutató gének eloszlását vizsgáltuk meg a különböző vírusfertőzésekben aminek az eredményét az alábbi venn diagramon ábrázoltuk (27. ábra) A 27. ábra A része tartalmazza azon gének számát, melyek expressziója a kontrollhoz képest szignifikánsan megnövekedett PVX és TMV vírusfertőzés hatására. Az 27. ábra B része mutatja azon gének számát, melyek expressziója a kontrollhoz képest szignifikánsan lecsökkent PVX és TMV vírusfertőzés hatására. A 27. ábra A részén látható, hogy PVX fertőzés esetén 2194, TMV fertőzésnél 466 génnek az expressziója nőtt meg és 542 olyan gén volt, melynek expressziója mindkét fertőzés esetén szignifikánsan indukálódott. A 27. ábra B része azt mutatja, hogy PVX fertőzés esetén 2687, TMV fertőzésnél 376 génnek az expressziója csökkent le és 288 olyan gén volt, melynek expressziója mindkét fertőzés esetén szignifikánsan lecsökkent.

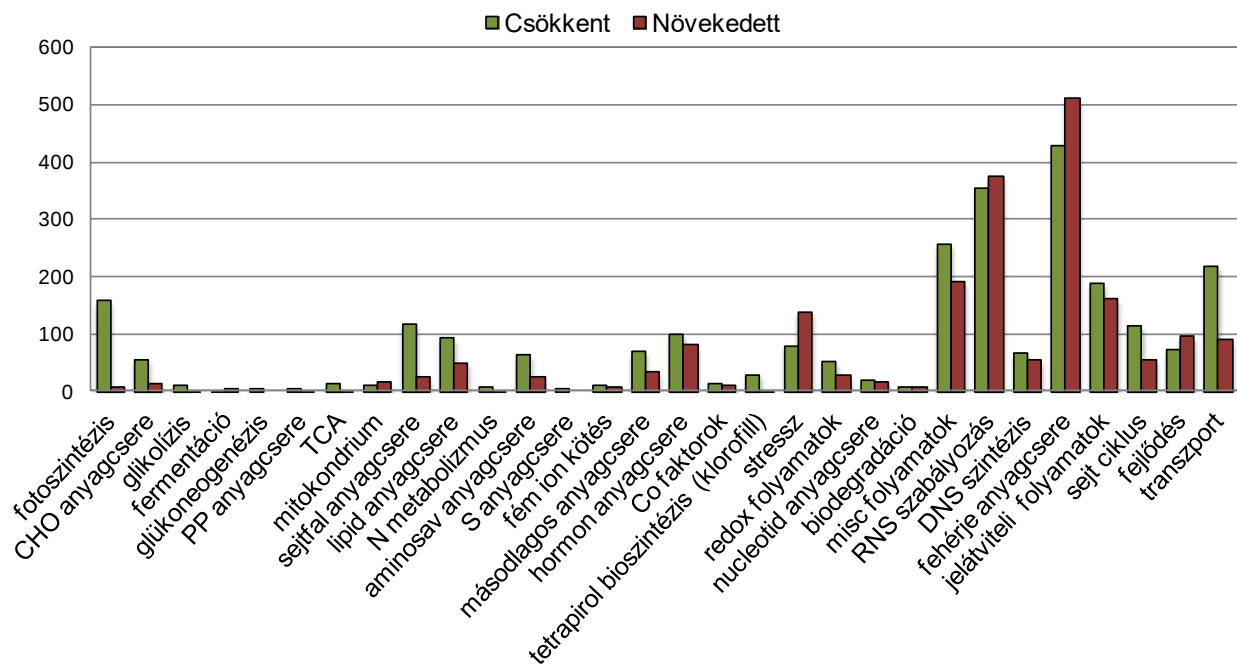


27. ábra PVX és TMV fertőzés hatására **A/** szignifikánsan növekedett és **B/** szignifikánsan csökkent expressziót mutató gének száma paradicsomban.

4.2.4. A szignifikáns expressziót mutató gének funkcionális kategorizálása

A kontrollhoz képest szignifikánsan változó expressziót mutató géneket a bin kategóriák alapján funkcionálisan csoportosítottuk, összesen 30 kategóriába (28. ábra). A sávdigramon a vízszintes tengelyen a gének száma, a függőleges tengelyen a funkcionális kategóriák láthatóak. A kategóriákon belül zöld színű sáv jelzi azokat a géneket, melyek expressziója lecsökkent és piros sáv jelöli az indukálódott géneket.

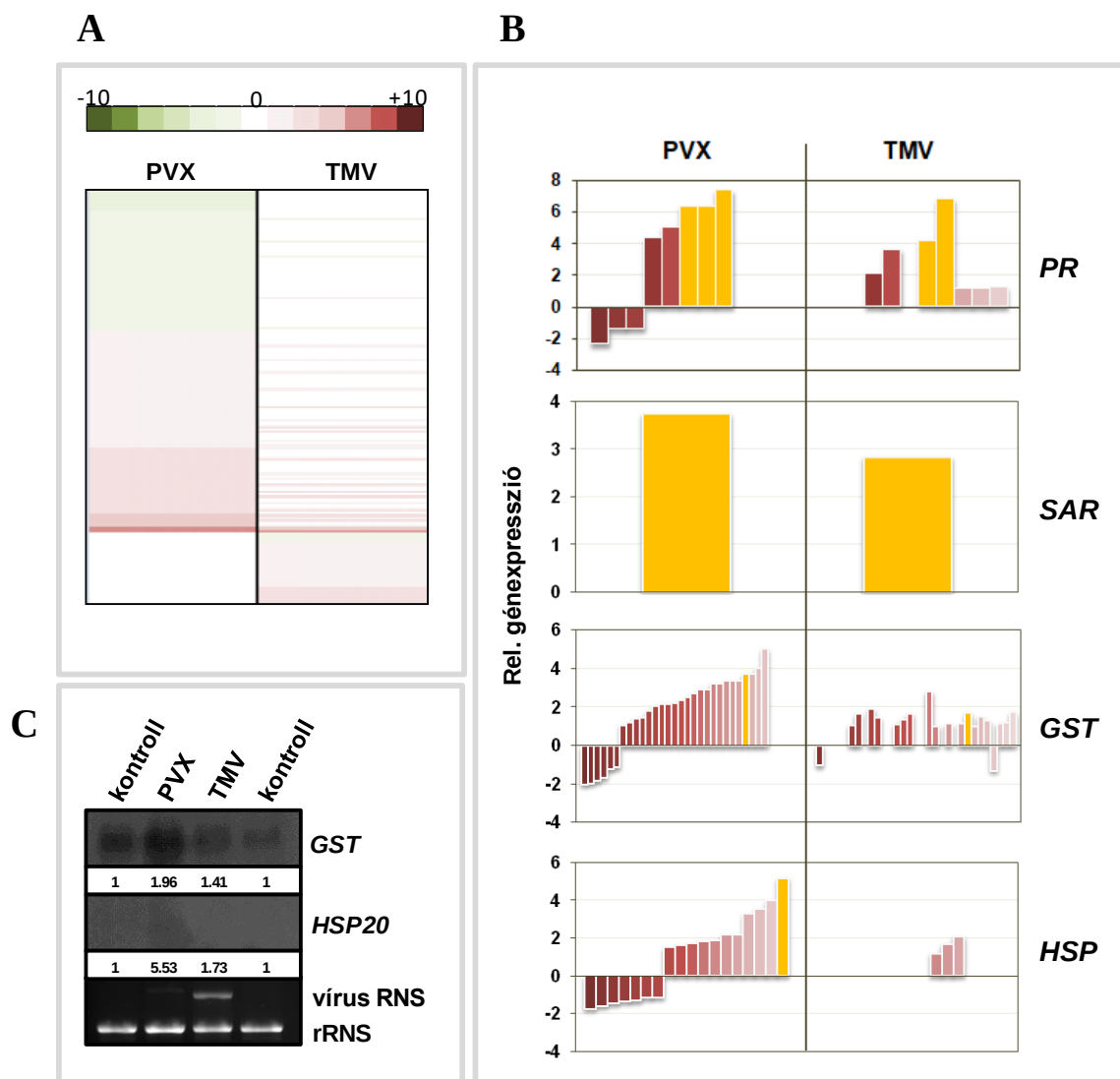
A 28. ábra mutatja, hogy gén-expressziós változások főként a fotoszintézisben, a sejtfal anyagcserében, a stresszben, az RNS szabályozásban, a fehérje anyagcserében, a jelátviteli folyamatokban, a sejtciklusban és a transzport folyamatokban szerepet játszó géneket érintette. Ezen csoportok közül a fotoszintézisben, a sejtfal anyagcserében, a fehérje anyagcserében és a sejtciklusban érintett gének többségének lecsökkent az expressziója. Ezzel szemben az is jól látszik, hogy a stressz válaszban szerepet játszó gének főként indukálódtak a vírusfertőzés hatására. Ezt követően ezek közül a csoportok közül kiválasztottunk néhányat, melyet a különböző vírusfertőzések esetén részletesen is megvizsgáltunk.



28. ábra Vírusfertőzött *S. lycopersicum* növényekben szignifikáns expressziót mutató gének funkcionális kategorizálása

4.2.4.1. A stressz gének

A stressz gének csoporton belül 220 gént detektáltunk, melyek expressziója szignifikáns változást mutatott a kontrollhoz képest, ezek közül 80 génnek az expressziója lecsökkent és 140 génnek az expressziója indukálódott. Hőtérképen ábrázoltuk, hogy hogyan változnak a stressz gének a kontrollhoz képest a különböző vírusfertőzésekben, melyet a 29. ábra A része szemléltet. A hőtérkép alapján elmondható, PVX fertőzés hatására a stressz gének expressziója drasztikusan megváltozott, a gének többsége indukálódott. TMV vírusfertőzés esetén a stressz gének expressziója enyhébb változást mutatott.



29. ábra Vírusfertőzött *S. lycopersicum* növényekben néhány **A/** RNS szekvenálással kimutatott stresszgenek expressziójának változása **B/** a markáns gén-expressziós változást mutató stressz gének expresszióját ábrázoltuk, melyeket **C/** Northern blottal is visszaigazoltunk.

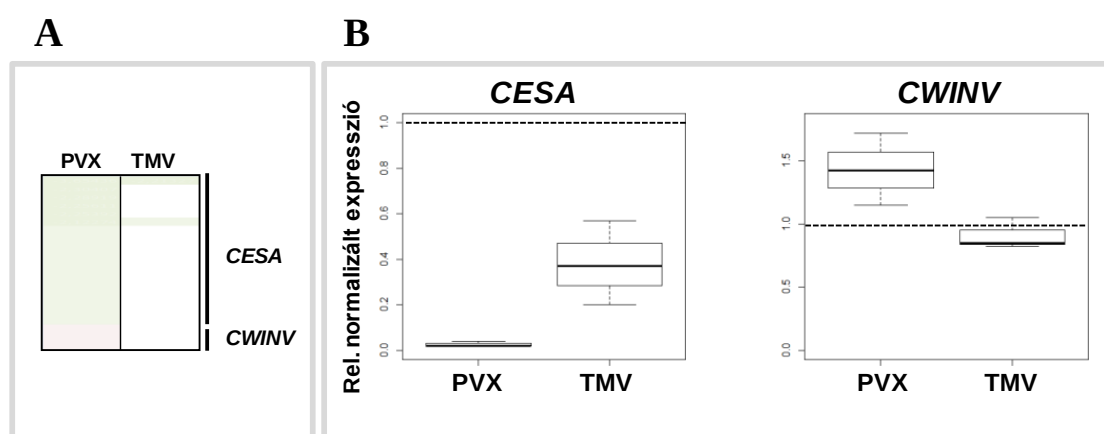
Kiválasztottunk néhány markáns expressziós változást mutató gént, melyek expresszióját molekuláris biológiai módszerrel is validáltuk. Northern blottal a *GST* és a *HSP20* gének expressziós szintjét vizsgáltuk meg a különböző vírusfertőzésekben (29. ábra C része). A 29. ábra B részén az RNS szekvenálással és C részén a Northern blottal detektált gén-expressziós

változásokat szemléltettük. Az 29. ábra B részén sárga színnel jelöltük azokat a microarray próbákat, melyeket a radioaktívan jelölt próba detektál. Northern blottal visszaigazoltuk, hogy a *GST* és a *HSP20* gének expressziója indukálódik PVX vírusfertőzés esetén. Ezzel szemben a TMV vírussal fertőzött növényekben a *GST* és a *HSP20* gén expressziója változatlan maradt a kontrollhoz képest. A visszaigazolt stressz gének normalizált gén expressziós változását 29. ábra C részén látható értékek jellemzik.

4.2.4.2. A sejtfal anyagcserében szerepet játszó gének

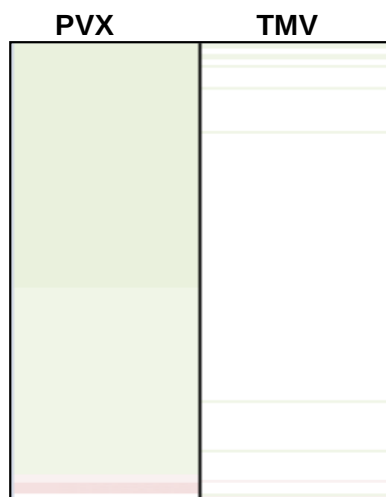
A sejtfal anyagcserében szerepet játszó gének közül 143 génnek az expressziója változott meg szignifikánsan paradicsomban vírusfertőzés hatására a kontrollhoz képest, melyből 118 génnek az expressziója csökkent le és 25 génnek az expressziója nőtt meg. A sejtfal anyagcserében résztvevő gének expressziója PVX vírusfertőzés esetén drasztikusan lecsökkent, ezzel ellentétben TMV vírusfertőzés esetén a gének expressziója kisebb mértékben változott.

A sejtfalat felépítő, cellulóz szintézisben szerepet játszó *sejtfal szintáz* és a *sejtfal invertáz* gének expresszióját qRT-PCR-el is megvizsgáltuk. A 30. ábra A részén a RNS szekvenálással, a B részén qRT-PCR-el detektált gén-expressziós változásokat szemléltettük. Az ábrán látható, hogy a RNS szekvenálással megegyezően PVX vírusfertőzés hatására *S. lycopersicum* növényben a *CESA* gén expressziója lecsökkent, míg a *CWINV* gén expressziója indukálódott. TMV vírusfertőzés hatására a *CESA* gén expressziója enyhén lecsökkent, a *CWINV* gén expressziója nem változott sem az RNS szekvenálási, sem a qRT-PCR eredmények szerint.



30. ábra A/ A *CESA* és *CWINV* gének expresszió változása RNS szekvenálási adatok alapján, valamint ezek B/ qRT-PCR-rel történő visszaigazolása *S.lycopersicum* növényben.

4.2.4.3. A fotoszintézisben szerepet játszó gének

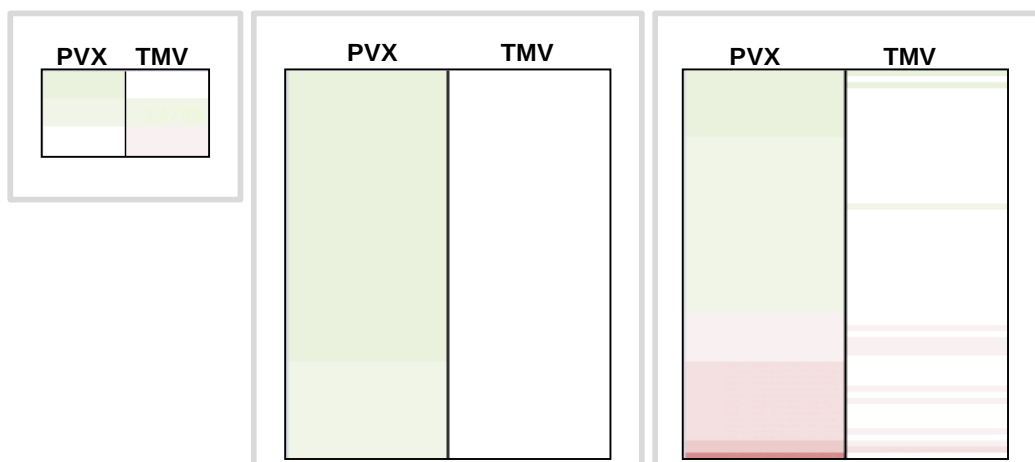


31. ábra Fotoszintézisben szerepet játszó gének expressziós változása vírusfertőzött paradicsomban

gének expressziója PVX és TMV vírusfertőzés hatására. A 32. ábra ezen gének RNS szekvenálással detektált gén-expressziós változásait mutatja. A 32. ábra A részén a *PAO* expressziós változását szemléltettük, melynek PVX vírusfertőzés hatására csökkent az expressziója és TMV vírusfertőzés hatására is változást tapasztaltunk a *PAO* expressziójában. A 32. ábra B illetve C részén a RNS szekvenálással detektált *klorofill a/b* kötő fehérje illetve *citokróm P450* gének expressziós változása figyelhető meg. A *klorofill a/b* kötő fehérje és a *citokróm P450* gének expressziója PVX vírusfertőzés hatására drasztikus változást mutatott, ezzel ellentétben TMV vírusfertőzés hatására expressziójuk egyáltalán nem vagy csak minimális mértékben változott. PVX fertőzéskor a *klorofill a/b* kötő fehérje gének expressziója lecsökkent. A *citokróm P450* gének expressziójában főként csökkenés volt látható, de megfigyelhetőek olyan *citokróm P450* gének is melyek expressziója indukálódott PVX vírusfertőzés hatására.

A fotoszintézisben szerepet játszó gének közül 167 génnek az expressziója mutatott szignifikáns különbséget vírusfertőzés hatására a kontrollhoz képest, ebből 158 génnek az expressziója lecsökkent és 9 génnek az expressziója megnőtt. A fotoszintézisben érintett gének expressziós változását hő térképen ábrázoltuk (31. ábra). A hő térképen látható, hogy a fotoszintézisben résztvevő gének többségének az expressziója lecsökkent PVX vírusfertőzéskor, míg TMV vírusfertőzés esetén elhanyagolható gén-expressziós változás jelentkezett.

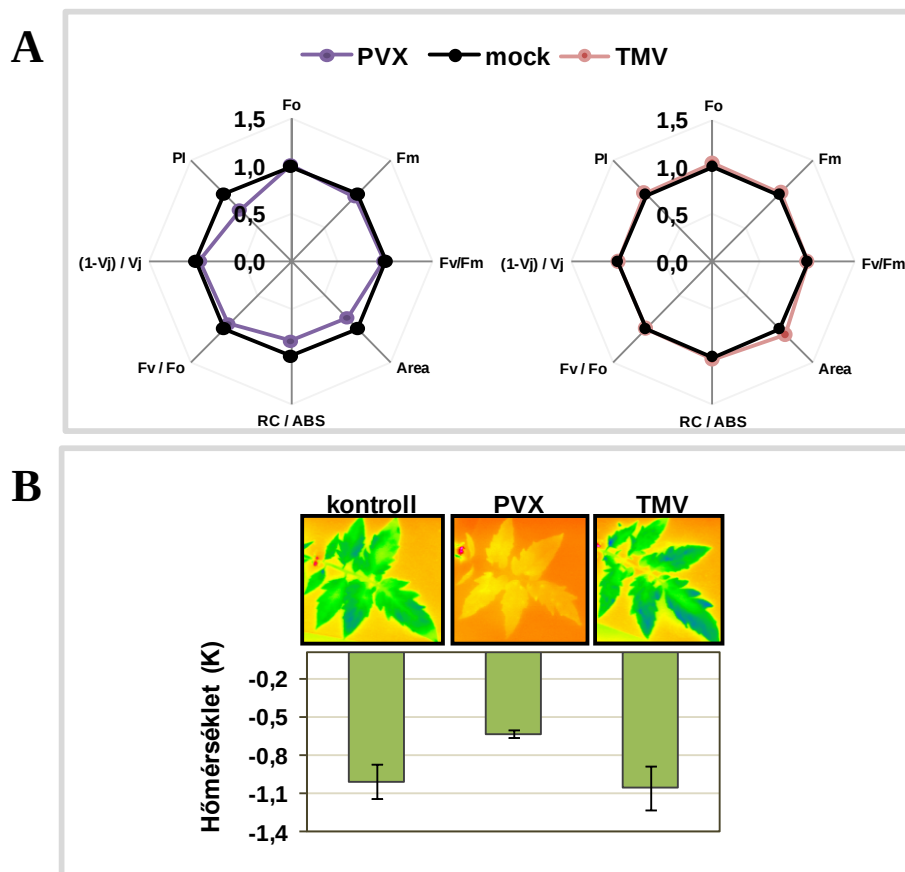
A *N. benthamiana* növényeken végzett kísérleteinkhez hasonlóan, *S. lycopersicum* esetén is megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a *PAO*, a *klorofill a/b* kötő fehérje és a *citokróm P450* gének expressziója PVX és TMV vírusfertőzés hatására. A 32. ábra ezen gének RNS szekvenálással detektált gén-expressziós változásait mutatja. A 32. ábra A részén a *PAO* expressziós változását szemléltettük, melynek PVX vírusfertőzés hatására csökkent az expressziója és TMV vírusfertőzés hatására is változást tapasztaltunk a *PAO* expressziójában. A 32. ábra B illetve C részén a RNS szekvenálással detektált *klorofill a/b* kötő fehérje illetve *citokróm P450* gének expressziós változása figyelhető meg. A *klorofill a/b* kötő fehérje és a *citokróm P450* gének expressziója PVX vírusfertőzés hatására drasztikus változást mutatott, ezzel ellentétben TMV vírusfertőzés hatására expressziójuk egyáltalán nem vagy csak minimális mértékben változott. PVX fertőzéskor a *klorofill a/b* kötő fehérje gének expressziója lecsökkent. A *citokróm P450* gének expressziójában főként csökkenés volt látható, de megfigyelhetőek olyan *citokróm P450* gének is melyek expressziója indukálódott PVX vírusfertőzés hatására.



32. ábra Fotoszintézisben szerepet játszó gének expressziójának alakulása vírusfertőzött *S. lycopersicum* növényekben. RNS szekvenálási adatok alapján hő térképen ábrázoltuk **A/** *PAO* **B/** *klorofill a/b* kötő fehérje és **C/** *citokróm P450* gének expresszió változását.

4.2.4.4. Klorofill fluoreszcencia mérés és hőterképezés

Az RNS szekvenálás eredménye azt mutatta, hogy a fotoszintézisben fontos szerepet játszó gének expressziója drasztikusan lecsökkent a PVX vírusfertőzésekben, azonban TMV vírusfertőzés esetén nem tapasztaltuk ilyen mértékű változást. Az RNS szekvenálási adatok validálásához két fiziológiai mérést végeztünk. (1) A fotoszintetikus apparátus megfelelő működésének ellenőrzésére és a fotoszintetikus aktivitás nyomonkövetésére klorofill fluoreszcencia mérést végeztünk (33. ábra A része) és kimutattuk, hogy a klorofill fluoreszcencia paraméterek PVX vírusfertőzés esetében csökkentek a kontrollhoz képest. TMV vírusfertőzött növényeknél kontrollhoz hasonló klorofill fluoreszcencia paramétereket mértünk. (2) A növények transpirációjának monitorozásához hőterképezést végeztünk (33. ábra B része). A hőterképezés eredményei azt mutatták, hogy a PVX vírussal fertőzött növények hőmérséklete szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll növényeké. Ezzel szemben TMV vírusfertőzésnél a növények hőmérséklete hasonló vagy kicsit alacsonyabb volt a kontroll növények hőmérsékleténél.



33. ábra Vírusfertőzött *S. lycopersicum* növények A/ klorofill fluoreszcencia mérése és B/ hőterképezése

4.2.5. A gén-expressziót befolyásoló kulcsregulátorok vizsgálata

A *N. benthamiana* növényben vizsgált *transzkripció faktorok* paradicsom homológjait azonosítottuk. *S.lycopersicum* növények RNS szekvenálásakor több olyan *TF*-t is azonosítottunk, melyek expresszióját az akut vírusfertőzések befolyásolták, azonban perzisztens vírusfertőzésben expressziójuk nem vagy csak kis mértékben változott (2. táblázat). A 2. táblázatban látható RNS szekvenálási eredmények szerint PVX fertőzött *S. lycopersicum* növényekben a *BZL4*, a *NAC-like*, a *ZFP19* expressziója indukálódott, míg az *LRR transzmembrán kináz* expressziója lecsökkent. TMV fertőzött paradicsomban a *BZL4* és az *LRR transzmembrán kináz* expressziója nem változott, de a *NAC-like* és a *ZFP19* gének expressziója kis mértékben indukálódott. A *WRKY70* és a *TMKL1* gének *S.lycopersicum* homológjait is sikeresen azonosítottuk azonban expressziójuk nem mutatott változást sem PVX, sem TMV vírusfertőzés hatására.

2. táblázat RNS szekvenálás alapján kigyűjtött fontosabb transzkripció faktorok gén-expressziós változásai vírusfertőzött *S.lycopersicum* növényekben

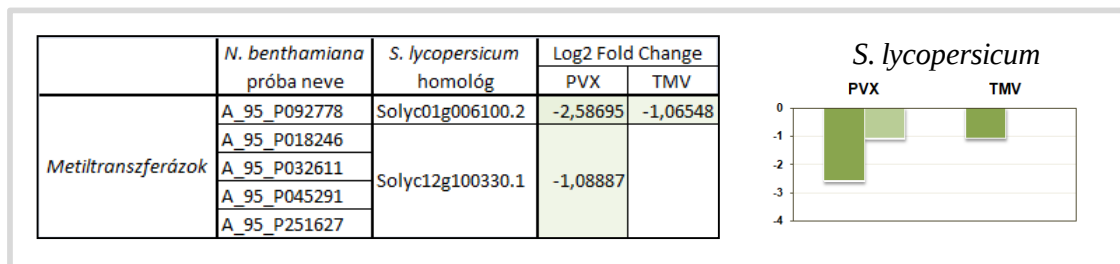
Transzkripció faktor neve	S. lycopersicum homolog	Log2 Fold change	
		PVX	TMV
BZL4	Solyc01g100460.3	1,31	
NAP	Solyc04g005610.3	2,65	1,27
	Solyc05g007770.3	1,19	
ZFP19	Solyc05g054660.1		
	Solyc05g054650.1	3,67	
	Solyc05g054655.1		
	Solyc11g066400.1	1,58	1,23
WRKY70	Solyc05g014040.1		
LRR transmembrane kinase	Solyc08g081940.3	-1,52	
TMLK1	Solyc09g061930.3		

Megvizsgáltuk a gén-expresszió szabályozásában kulcsszerepet játszó *AGO4* és *metiltranszferázok* expressziójának változását is, melyet a 34. ábra szemléltet. Az 34. ábra A részén az *AGO4*, B részén a *metiltranszferázok* RNS szekvenálással detektált gén-expressziós változásait ábrázoltuk. Az RNS szekvenálási eredményeink szerint az *AGO4* és *metiltranszferáz* gének expressziója drasztikusan lecsökkent PVX vírusfertőzés hatására, azonban minimális expresszió csökkenés TMV vírusfertőzés esetén is megfigyelhető volt.

A

	<i>N. benthamiana</i> próba neve	<i>S. lycopersicum</i> homológ	Log2 Fold change	
			PVX	TMV
AGO4	A_95_P267016	Solyc06g073540.3	-1,02895	
		Solyc06g073530.2		
		Solyc01g008960.3		

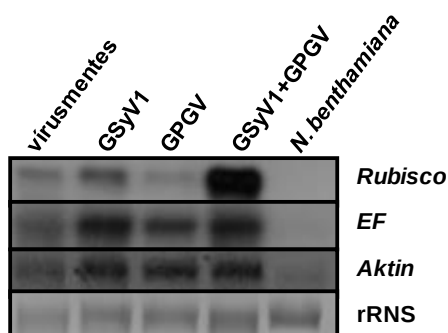
B



34. ábra A/ Az RNS szekvenálás elemzése alapján azonosítottuk az *AGO4* expressziós változása *S.lycopersicum* növényekben. **B/** RNS szekvenálással kimutattuk a *metiltranszferázok* gén-expressziós változásai vírusfertőzött *S. lycopersicum* növényekben.

4.2.6. A shut-off jelenség meglétének vizsgálata a szőlőben

Szerettük volna megvizsgálni, hogy vírusfertőzött szőlőben is jelen van-e a shut-off jelenség. Vizsgálatainkhoz vírusmentes kontrollt, Szőlő Syrah-1 vírussal (GSyV1), Szőlő Pinot gris (GPGV) vírussal és mindkét vírussal (GSyV1+GPGV) fertőzött szőlő mintákat használtunk. A vírusfertőzött szőlő mintákkal Northern blot analízist végeztünk (35. ábra), negatív kontrollként *N. benthamiana* totál nukleinsav kivonatot használtunk. A Northern hibridizációt három endogén gén: *Rubisco*, *EF* és *aktin* esetében végeztük el. A 35. ábra mutatja, hogy a *Rubisco* expressziója GPGV vírusfertőzött növényekben enyhén lecsökkent a kontrollhoz képest. Ezzel szemben GSyV1 fertőzés esetén a *Rubisco* expressziója megnövekedett és ez a hatás még erőteljesebb volt a mindkét vírussal együttesen fertőzött mintában. Az *EF* expressziója GSyV1, GPGV esetén megnőtt és a két vírus együttes jelenlétében is indukálódott. Az *Aktin* expressziója GSyV1, GPGV valamint a két vírus együttes jelenlétében is változatlan maradt.



35. ábra Shut-off jelenlétének vizsgálata vírusfertőzött szőlőben.

4.3. Új tudományos eredmények

1. Vírusfertőzött *Nicotiana benthamiana* növények microarray analízis eredményének kiértékelésével megállapítottam, hogy a CymRSV és a crTMV fertőzés genom szinten drasztikusabb gén-expressziós (stresszben-, fotoszintézisben-, a sejtfal anyagcserében résztvevő gének, *AGO* és *metiltranszferáz* gének) változásokat okozott, mint a TCV fertőzés.
2. Northern hibridizációval igazoltam, hogy CymRSV és crTMV vírusfertőzés esetén *PR1*, *PR-Q*, *SAR*, *GST* expressziója drasztikusan indukálódott és a *Rubisco*, *Gapdh*, *CP29*, *AGO4*, *PAO* expressziója lecsökkent, szemben a TCV fertőzéssel ahol ezen gének expressziója változatlan maradt. qRT-PCR-rel igazoltam, hogy CymRSV és crTMV vírusfertőzéskor a *CWINV2* gén expressziója indukálódott és a *CESA8* gén expressziója lecsökkent, de TCV vírusfertőzés esetén egyik génnek az expressziója sem változott.
3. 15°C-on nevelt Cym19stop vírussal fertőzött *N. benthamiana* növények Northern analízisével igazoltam, hogy nem a nekrosis következményeként alakult ki az endogén gének (*Rubisco*, *CP29*, *PR-Q*) expressziójának csökkenése (shut-off).
4. Vírusfertőzött *Solanum lycopersicum* növények RNS szekvenálásának kiértékelésével megállapítottam, hogy a PVX fertőzés erőteljes gén-expressziós (stresszben-, fotoszintézisben-, a sejtfal anyagcserében résztvevő gének) változásokat okozott szemben a TMV vírussal.
5. Northern hibridizációval igazoltam, hogy a PVX vírussal fertőzött *S. lycopersicum* növényben a *HSP20*, *GST* gén expressziója drasztikusan indukálódott, és a *Rubisco*, *Gapdh*, *CP29*, *EF*, *hiszton* gén expressziója lecsökkent, szemben a TMV vírusfertőzéssel. qRT-PCR-el igazoltam, hogy PVX fertőzésekor *CWINV* gén expressziója indukálódott, míg a *CESA* expressziója lecsökkent paradicsomban. TMV fertőzés hatására a *CESA* gén expressziója enyhén lecsökkent, a *CWINV* gén expressziója változatlan maradt.
6. Klorofill fluoreszcencia méréssel és hőterképezéssel igazoltam a fotoszintézist érintő drasztikus változások fiziológiai jelenlétét is CymRSV és crTMV fertőzött dohányban és PVX fertőzött paradicsomban.
7. GSyV1 és GPGV fertőzött szőlő vizsgálatával megállapítottam, hogy a háztartási gének expresszióját érintő shut-off nem jelentkezett.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Általános esetben a növényi vírusok biotróf parazitaként a fertőzés-védekezés egyensúlyának fenntartására törekednek, hogy a gazda élő szöveteiben az anyagcsere folyamatok megváltoztatásával életben maradhassanak és szaporodhassanak, azonban mégis előfordul, hogy a gazda pusztulását okozzák. Ezek alapján akut és perzisztens vírusfertőzést különböztethetünk meg. Akut vírusfertőzéskor a vírus nagy mennyiségben akkumulálódik a növényben, a vírusra jellemző tünetek a fertőzést követően rövid időn belül megjelennek és a növény pusztulását is okozhatják. Perzisztens vírusfertőzés során a vírus nagy mennyiségben jelen van, viszont a gazdán nem vagy csak enyhe tünetek jelentkeznek. A gazda erőforrás ellátottságának zavara és/vagy az erőforrásokért folyó versennyel egyidejűleg a növény teljes gén-expressziós rendszere megváltozhat, melynek következtében kialakulnak a vírusra jellemző tünetek. A vírusfertőzött növények gén-expressziós változásainak nyomonkövetésére leggyakrabban használt módszerek a microarray analízis [GOLEM and CULVER 2003, WHITHAM et al. 2003], az RNS szekvenálás [FAN et al. 2014, FAN et al. 2015, LI et al. 2017, LU et al. 2012, SEO et al. 2018] és a növényi metszeteken alkalmazott hagyományos és a fluoreszcens *in situ* hibridizáció [ARANDA et al.1996, ESCALER et al. 2000a, ESCALER et al. 2000b, HAVELDA and MAULE 2000, WANG and MAULE 1995, WHITHAM et al. 2006]. Ezen módszerek validálására Northern blottot és kvantitatív RT-PCR-t használnak.

PhD munkám során CymRSV, crTMV, TCV vírussal fertőzött *Nicotiana benthamiana* és PVX, TMV vírussal fertőzött *Solanum lycopersicum* növények gén-expressziós változását vizsgáltuk két különböző módszerrel: microarray analízissel és RNS szekvenálással. A nagy áteresztőképességű módszerek validálásához Northern blottot és qRT-PCR-t használtunk. A vírusfertőzés hatására megjelentő tünetek és a fiziológias változások vizsgálatához klorofill fluoreszcencia mérést és hőterképezést végeztünk.

5.1. A shut-off jelenség nem a nekrosis következménye

HAVELDA et al. (2008) CymRSV fertőzött *Nicotiana benthamiana* szisztemikus leveleinek vizsgálatakor kimutatták, hogy fontos háztartási gének (*Gapdh*, *tubulin*, *Rubisco*, *CP29*, *hiszton*, *EF2*) expressziója tartósan lecsökken (shut-off). Korábbi *in vitro* run-on transzkripciós kísérletekkel igazolták, hogy a shut-off a sejtmagban alakul ki és transzkripciós szinten hat [HAVELDA et. al., 2008]. Azonban azt még nem tudtuk, hogy shut-off jelenség a nekrotikus tünetek kialakulásában játszik szerepet vagy annak következményeként jelenik meg. Ennek kiderítéséhez CymRSV és CIRV vírussal illetve ezek VSR mutánsaival (Cym19stop, CIRV19stop) fertőzött *N.benthamiana* növényeket neveltünk 15°C-on. Korábbi eredmények alapján tudtuk, hogy 15°C-on a siRNS-alapú RNS interferencia gátolt [SZITTYA et al. 2003], továbbá a p19 hiánya miatt a vírusról keletkező siRNS-ek szabad formában felhalmozódnak és indukálják az RNS interferencia

mechanizmusát, melynek hatására a növények kigyógyulnak [SZITTYA et al. 2002]. Vizsgálataink során az alacsony hőmérséklet hatására a VSR mutáns vírusok el tudtak terjedni a növényekben, anélkül hogy nekrózis okoztak volna és a vad típusú vírusok is lassabban terjedtek el. A vad típusú és a mutáns vírussal fertőzött mintákban Northern blott segítségével megvizsgáltuk két háztartási gén (*Rubisco*, *CP29*) és egy stressz gén (*PR-Q*) expresszióját. Kimutattuk, hogy a vad típusú vírusfertőzésekkel megegyezően a mutáns vírussal fertőzött növényekben, a nekrózis jelenléte nélkül is lecsökkent a *Rubisco* és *CP29* expressziója és a *PR-Q* expressziója indukálódott. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a shut-off jelenség nem a nekrózis következménye.

5.2. Detektált gén-expressziós változások funkcionális eloszlása

Eredményeink alapján elmondható, hogy a microarray és az RNS szekvenálás alkalmas vírusfertőzött növények gén-expressziós változásainak nyomonkövetésére. A gén-expressziós változásokat komplexen tükröző vulkán diagramok összehasonlítása alapján elmondható, hogy vírusfertőzött *N.benthamiana* növényekben jóval több génnek az expressziója csökkent, mint amennyinek az expressziója indukálódott, míg *S.lycopersicum* növényekben a gének expressziója 1:1 arányban változott. Feltételezzük, hogy ez az eltérés azzal állhat kapcsolatban, hogy a microarray chip nem a teljes genom gén-expressziós változását reprezentálja, mivel egyes transzkriptek akár többször is jelen vannak, míg mások hiányoznak a chipről. Korábbi megfigyelésekkel megegyezően a mi eredményeink is azt mutatják, hogy a vírusfertőzések főként a fotoszintézisben [KAUR et al. 2015, LU et al. 2012, YANG et al. 2007, POSTNIKOVA and NEMCHINOV 2012, SEO et al. 2018], a sejtfal anyagcserében [YANG et al. 2007, SEO et al. 2018], a stresszben [AGUDELO-ROMERO et al. 2008, ALLIE and REY 2013, DARDICK 2007, JIA et al. 2012, KAUR et al. 2015, MARATHE et al. 2004, STARE et al. 2017, WHITHAM et al. 2003], az RNS szabályozásban [FAN et al. 2014], a fehérje anyagcserében [FAN et al. 2015], a jelátviteli folyamatokban [AGUDELO-ROMERO et al. 2008, HAUNG et al. 2005, JIA et al. 2012, KAUR et al. 2015, LI et al. 2017, SEO et al. 2018], a sejtciklusban és a transzport folyamatokban szerepet játszó géneket érintette. Legdrasztikusabb gén-expressziós változást mindkét gazdanövény esetén a fehérje metabolizmusban résztvevő gének mutatták, majd az RNS szabályozásban, a jelátviteli és a transzport folyamatokban szerepet játszó gének. Az előbb említett folyamatokban mind lecsökkent, mind megnövekedett expressziót mutató gének is előfordultak, azonban észrevettük, hogy a fotoszintézis- és stressz folyamatokban résztvevő gének expressziója egyöntetűen változott. A fotoszintézisben szerepet játszó gének jellemzően lecsökkentek, míg a stresszben résztvevő gének indukálódtak. Megállapítottuk, hogy a fotoszintézis- és a stressz folyamatában szerepet játszó gének expressziója mindkét gazdanövény esetén jellemzően akut vírusfertőzés

(CymRSV, crTMV, PVX) hatására változott, míg perzisztens vírusfertőzés (TCV, TMV) esetén elmaradt ezen gének expresszió változása.

5.3. Az akut és perzisztens vírusfertőzések okozta gén-expressziós változások

Az alábbiakban az akut és a perzisztens vírusfertőzések közötti gén-expressziós változásban megfigyelt különbségeket ismertetjük. HAVELDA et al. (2008) eredményeihez hasonlóan a microarray analízis és RNS szekvenálási elemzéseink azt mutatták, hogy dohány és paradicsom növények szisztemikus leveleiben CymRSV, crTMV és PVX fertőzés hatására fontos háztartási gének expressziója lecsökken, shut-off jelenséget mutat. Northern blottal kimutattuk, hogy dohányban és paradicsomban is lecsökken a *Rubisco*, a *Gapdh*, a *CP29* expressziója akut vírusfertőzés hatására, míg perzisztens vírusfertőzésnél ezen gének expressziója változatlan marad. Microarray analízis és az RNS szekvenálási eredmények azt mutatták, hogy a *tubulin*, *EF* és a *hiszton* gének expressziója is lecsökken akut vírusfertőzésben mindkét gazdanövény esetén. qRT-PCR-el bizonyítottuk, hogy PVX vírusfertőzés hatására a paradicsomban az *EF* és a *hiszton* gének expressziója lecsökken. Csoportunk ezen felül vizsgálta, *Vitis vinifera* GSyV1 és GPGV fertőzésekor végbemenő gén-expressziós változásokat. Northern blottal kimutattuk, hogy a *Rubisco* expressziója GPGV vírusfertőzött növényekben enyhén lecsökkent, míg GSyV1 fertőzés esetén *Rubisco* expressziója megnövekedett és ez a hatás fokozódott mindkét vírussal együttesen fertőzött mintában; az *EF* expressziója GSyV1, GPGV esetén megnőtt és két vírus együttes jelenlétében is indukálódott; az *aktin* expressziója GSyV1, GPGV valamint a két vírus együttes jelenlétében is változatlan maradt. Szőlő háztartási génjeinek expressziós vizsgálata alapján elmondható, hogy sem a GSyV1, sem a GPGV fertőzés hatására nem jelentkezett, olyan drasztikus gén-expressziós változás, mint *N.benthamiana* vagy *S.lycopersicum* esetén. Ennek oka az lehet, hogy fás szárú növények esetében a fertőzési folyamat hosszabb idő alatt zajlik le és a vírusok is alacsonyabb szinten vannak jelen, mint lágyszárú növényekben [CZOTTER et al. 2015b]. Ezenfelül Northern blott analíssal kimutattuk, hogy TMV, PVX és TRV VIGS vektorral fertőzött *N.benthamiana* és *S.lycopersicum* növényekben a qRT-PCR-hez leggyakrabban használt háztartási gének (*tubulin*, *Gapdh*, *Rubisco*) expressziója megváltozik. Csoportunkban ezenkívül számos olyan szakirodalomban vizsgált háztartási génnek az expresszióját vizsgálták még melyeket qRT-PCR-ben kontrollként használnak VIGS vektorok alkalmazása során *N.benthamiana*, *S.lycopersicum* és *T. aestivum* esetében. Megállapítottuk, hogy a VIGS vektor alkalmazása előtt: a vírus vektorok gén-expresszióra gyakorolt hatását ellenőrizni kell és körültekintően kell megválasztani a referencia értéként használt háztartási géneket is [OLÁH et al. 2016].

Microarray és az RNS szekvenálási eredmények a stressz gének (*PR*, *SAR*, *GST*, *HSP*) indukcióját mutatta dohányban és paradicsomban egyaránt akut vírusfertőzés esetén, míg perzisztens vírusfertőzésnél ezen gének expressziója változatlan maradt. Eredményeinkkel egyhangúan HAVELDA et al. (2008) is megfigyelték korábban, hogy CymRSV fertőzött *N.benthamiana* növényben a *GST* és *HSP90* gének expressziója indukálódott. Nagy áteresztőképességű módszerekkel kapott eredményeinket Northern blottal és qRT-PCR-el validáltuk. Northern blottal igazoltuk, hogy dohányban CymRSV és crTMV vírusfertőzés hatására *PR1*, *PR-Q*, *SAR*, *GST* expressziója indukálódott, paradicsomban PVX vírusfertőzésnél a *GST* és a *HSP20* gének expressziója megnőtt.

Csoportunk vizsgálta a stressz körülményekben fontos szerepet játszó prolin metabolizmusához elengedhetetlen *laktát dehidrogenáz* (*LDH*) génnek expresszióját is [SCHERTL et al. 2014]. Microarray és RNS szekvenálási elemzéseink alapján akut vírusfertőzés hatására *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényekben drasztikusan megnőtt az *LDH* gén expressziója. Dohányban TCV vírusfertőzés hatására az *LDH* expressziója a kontrollhoz képest nem változott, de paradicsomban TMV vírusfertőzés esetén az *LDH* gén kismértékben indukálódott. Kimutatták, hogy gyors stressz válasz során az *LDH* gén expressziójának indukciója a *prolin dehidrogenáz* (*ProDH*) gén expressziójának gyors növekedését vonja maga [SCHERTL et al. 2014]. Csoportunk Northern blottal sikeresen visszaigazolta *N.benthamiana* növényben az *LDH* gén expressziójának növekedését CymRSV és crTMV vírusfertőzött mintákban és kimutatta, hogy TCV vírusfertőzés hatására *LDH* gén expressziója változatlan maradt [PESTI et al. 2018].

5.4. A tünetek megjelenésével összefüggésben álló gén-expressziós változások

A vírusfertőzött növényekben zajló különböző molekuláris és fiziológiai változások eredményeként a növényen kialakulnak tünetek és elindul levélöregedés [ROJAS et al. 2014]. Megfigyelték, hogy a súlyos tünetek kialakulása gyakran a gazda fotoszintetikus aktivitásának és a kloroplaszt molekuláris szerkezetének megváltozásával is együtt jár [ZHAO et al. 2016], azonban a tünetek kialakulásának hátterében álló molekuláris folyamatok ezidáig tisztázatlanok.

Kimutattuk, hogy akut vírusfertőzés során dohányban és paradicsomban is a fotoszintetikus folyamatokban résztvevő gének expressziója lecsökken és ezzel egyidejűleg a növényeken is súlyosabb tünetek jelentkeznek. Ezzel ellentétben perzisztens vírusfertőzés során nem változott a fotoszintézisben szerepet játszó gének expressziója és a növényeken is enyhébb tünetek jelentkeztek. Eredményeinkkel azonos következtetést vontak le ToCV és TYLCV vírussal fertőzött paradicsom [SEO et al. 2018], manióka afrikai mozaik vírus (ACMV)-sal fertőzött manióka [LIU et al. 2014a], rizs fekete csíkos törpülés vírus (RBSDV)-sal fertőzött rizs [AHMED et al. 2017], paradicsom sávosságot okozó vírus (TZSV)-sal fertőzött dohány [HUANG et al. 2017],

PPV, ToRSV és PNRSV vírussal fertőzött *N. benthamiana* [DARDICK 2007] nagy áteresztőképességű technikával végzett gén-expressziós vizsgálatának eredményei alapján.

Feltételezik, hogy a levélöregedés korai szakaszában megjelenő klorotikus és sárgulások tünetek a klorofill lebomlás következménye, mely folyamatnak egyik kulcsregulátora a PAO lehet. Ezzel egyidejűleg kimutatták, hogy a PAO gén expressziója biotikus stressz hatására indukálódik [ZHU et al. 2017] és fitoftóra fertőzött paprikában is hasonló eredményről számoltak be [XIAO et al. 2015]. *N.benthamiana* PAO génjére specifikus próbát a microarray chip nem tartalmazott, ezért Northern blottal igazoltuk, hogy akut vírusfertőzés esetén indukálódik míg perzisztens vírusfertőzésnél változatlan marad a PAO expressziója dohányban. Paradicsomból származó RNS szekvenálási eredményeink alapján három PAO gént különítettünk el, melyek expressziója meglepő módon csökkenést mutatott PVX és enyhe indukciót mutatott TMV vírusfertőzés hatására. Feltételezzük, hogy a PAO meglepő expressziós változását paradicsomban vagy a mintaszedés időpontja (túl korai: a levélöregedés kezdete előtt vagy túl késői: mikora levelek már teljesen kisárgultak) magyarázhatja vagy ez a két vírus a levélöregedés folyamatát más útvonalon keresztül szabályozza. Akut vírusfertőzés során mindkét gazdanövény esetén a klorózis és sárgulás tünetei mellett enyhe satnyulás is megfigyelhető volt a növényeken. Az általunk megfigyelt tünetek hátterében a *PDF1*, *CESA* és *CWINV* gének expresszió változása állhat. Elsőként az epidermális szövetek fejlődésének korai szakaszában kulcsszerepet játszó *PDF1* gén expresszióját vizsgáltuk meg, mivel az epidermisz sértetlensége alapvető fontosságú a növényfejlődés, a hajtásnövekedés valamint a növény védelmének fenntartása miatt [JAVELLE et al. 2011]. Korábbi tanulmányok során kimutatták, hogy a *PDF1* gén a *PDF2* és *AtML1* gének szabályozása alatt áll és az embriogenezis során kizárólag a merisztéma L1 rétegében expresszál és protoderma specifikus. L1 specifikus dupla gén mutáns (*pdf2-1*, *atml1-1*) növényeken az embriogenezis során dezorganizált hajtáscsúcsot figyeltek meg valamint a levél iniciációjában és fejlődésében is zavarok léptek fel [ABE et al. 1999, 2003]. Microarray és RNS szekvenálási eredményeink szerint a *PDF1* expressziója az akut vírusfertőzésekben drasztikusan lecsökkent mindkét gazdanövény esetén. Dohányban TCV vírusfertőzés hatására nem változott, de paradicsomban TMV fertőzés hatására mérsékelten megemelkedett a *PDF1* gén expressziója. Csoportunk Northern blott segítségével sikeresen visszaigazolta a *PDF1* gén expressziójának csökkenését CymRSV és crTMV vírusfertőzés esetén és kimutatta, hogy TCV vírusfertőzés hatására *PDF1* gén expressziója változatlan maradt *N.benthamiana* növényben [PESTI et al. 2018]. Korábbi megfigyelésekkel [ABE et al. 1999, ABE et al. 2003, JAVELLE et al. 2011] összevetve a *N.benthamiana* növényeken akut vírusfertőzés során megjelenő tünetek (hajtásnövekedés megáll, levelek deformitása) összefüggésben lehetnek a *PDF1* expressziójának csökkenével is. Ezenfelül, igazolták *N.benthamiana* növényekben a *CESA* gén csendesítésével, hogy a sejtfal szintézis folyamatának a

sérülése a levél méretének csökkenését, levél deformitását valamint a teljes növény növekedésének csökkenését is okozhatja [BURTON et al. 2000]. Ezzel ellentétben kimutatták, hogy a *CWINV* (a szacharóz fruktózzá átalakításában játszik kulcs szerepet) a védekezés korai szakaszában indukálódik [ESSMANN et al. 2008]. A közel múltban SEO et al. (2018) is megerősítették vírusfertőzött paradicsom gén-expressziós vizsgálat során, hogy a *CESA8* expressziója lecsökken és a *CWINV2* indukálódik. Microarray és RNS szekvenálási eredményeink a korábbi megfigyelésekhez hasonló trendet mutatott: a *CESA8* expressziójának csökkenését és a *CWINV2* indukcióját figyeltük meg, ezeket qRT-PCR-el is visszaigazoltuk. Ezek a változások akut vírusfertőzött növényeken drasztikusabban jelentkeztek mindkét gazdanövény esetén, feltételezzük, hogy ezzel magyarázható a növényeken is jelentkező növekedési zavar.

Az akut vírusfertőzéseknel jelentkező különböző morfológiai eltérések összefüggésben állhatnak a hormon anyagcsere megváltozásával is. Bizonyított, hogy a hormonok olyan szignálmolekulák, melyek az egész növényt bejárják, hogy serkentsék a különböző környezeti stresszre adott válaszokat. Régóta ismert, hogy az Et, a JA és a SA kulcsszerepet játszik a biotikus stresszre adott válaszokban. Nemrég kiderült, hogy az auxinek, a citokininek, a brassinoszteroidok és az abszcizin sav a növény növekedésben és fejlődésben betöltött szerepükön túl, fontosak a növény-patogén interakciókban is [DENANCE et al. 2013, PIETERSE et al. 2009, SANTNER et al. 2009]. Eredményeink alapján a hormon metabolizmusban szerepet játszó gének nem mutatnak nagymértékű expressziós változást, azonban egyes kulcsregulátorok (transzkripciós faktorok) enyhe változása is komoly hatással lehet a megjelenő tünetekre. A gazdanövények hiányos annotációja miatt nem volt lehetőségünk arra, hogy feltérképezzük konkrétan milyen gének expressziója változott az hormonális útvonalakban, azonban az egyértelműen látszott, hogy az akut vírusfertőzés hatással volt mindkét gazdanövény esetén az útvonalak szabályozására, míg a perzisztens vírusfertőzés nem. Ismert, hogy az etilén, az abszcizin sav, a jázmonsav és a salicilsav képes a *TF*-on keresztül szabályozni a szeneszcenciához kapcsolt géneket (*SAGs*), melyek végül a klorofill degradációt és a levélöregedést idéznek elő [ROBATZEK and SOMSSICH 2002, WOO et al. 2013]. Megfigyeltük, hogy akut vírusfertőzés hatására a hormon bioszintézisben szerepet játszó enzimek gén-expressziós mintázata erőteljesebben változott, ami arra utal, hogy ezek az útvonalak eltérően szabályozódnak az akut és a perzisztens vírusfertőzésekben. A hormonok szintjében bekövetkező változások eltérő hatást fejthetnek ki a hormon válaszban érintett transzkripciós faktora is. Megfigyeltük, hogy hatnak az Et és az ABA válaszban résztvevő transzkripciós faktorokra (*ERF*, *ABF*), az ABA és a JA által regulált NAC-szerű transzkripciós faktorokra (*ANAC*), a JA által szabályozott bHLH (basic helix-loop-helix) motívumot tartalmazó-, a *MYC* - és *WRKY* transzkripciós faktorokra, ezen belül a *WRKY6* és *WRKY70* transzkripciós faktorokra, melyek központi szerepet töltenek be a SA útvonalban is. A

fent említett kulcs regulátorok expresszió változása megváltoztatja az általuk szabályozott enzimek expresszióját is, úgy mint: *etilén érzéketlen faktor (EIN)-3*, *NAC-szerű transzkripció faktor ANAC029 (ORE1)*, *protein foszfatáz 2C (PP2C)*, *NPR1*, a *PR1*, a *SAGs* és a *PAO* útvonalához kötődő enzimek. Mindezek hatása végül a levélöregedés folyamatát idézik elő. A hormonális anyagcserében bekövetkező gén-expressziós változásokat a M3. mellékletben egy összefoglaló ábrán szemléltetjük. Megfigyeltük, hogy a hormonális anyagcserében bekövetkező gén-expressziós változások akut vírusfertőzött növényekben az egyes szinteket súlyosabban érintették, mint a perzisztens vírusfertőzésekben és ez összefüggést mutat az akut vírusfertőzésre jellemző drasztikusabb tünetek megjelenésével is.

5.5. Fiziológiai változások vírusfertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényekben

Az akut vírusfertőzésnél megfigyelhető gén-expresszió csökkenés fontos funkciókat érintett, mint például a fotoszintetikus folyamatokban résztvevő géneket. Vizsgálataink során kétféle térképezési módszereket használtunk annak kiderítésére, hogy a nagymértékű gén-expressziós változás kimutatható-e a vírusfertőzött növények fiziológiai viselkedésének tanulmányozásával. Klorofill fluoreszcencia méréssel és hőtérképezéssel jellemeztük a gazdaszervezetek fiziológiai reakcióját az akut és a perzisztens vírusfertőzésekre. Méréseinkkel igazoltuk, hogy az akut és a perzisztens vírusfertőzött növények hőmérséklete és klorofill fluoreszcencia paraméterei között jelentős különbség van.

A hőtérképes megközelítési technika alkalmas arra, hogy az egészséges és a vírusfertőzött növények között különbséget mutassunk ki. Ennek oka lehet, hogy az egészséges növények a gázcsereenyíások megfelelő szabályozásával a transzpiráció során sokkal több vizet párologtatnak el, ezáltal levél felszínük is hűvösebb lesz, mint a fertőzött növényeké. *Nicotiana benthamiana* növények paprika enyhe foltosság vírussal (PMMoV) történő fertőzése esetén és búza fajták szárazságstressz vizsgálata során a növények hőmérséklete megemelkedett, melyet szintén a gázcsereenyíások záródásához kötöttek [CHAERLE et al. 2006, PAUL et al. 2016]. Akut és a perzisztens vírusfertőzött növények hőtérképezésének számszerűsítése során a párologtatással lehűtött területet viszonyítjuk a környezeti hőmérsékletéhez. Vizsgálataink során TCV és TMV fertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növények hőmérséklete alacsonyabb volt a kontroll növényeknél, mely jelentős transzpirációra utal. Ezzel szemben a CymRSV, a crTMV és a PVX vírussal fertőzött növények levél hőmérséklete megemelkedett és közel azonos volt a környezeti hőmérséklettel. Mindez arra utal, hogy az akut vírusfertőzések drasztikus hatással vannak a növény transzpirációjára.

Korábban PAUL et al. (2011) igazolták, hogy klorofill fluoreszcencia mérés alkalmas a fiziológiai válaszok előrejelzésére. Az gyors klorofill fluoreszcencia tranziensek (OJIP) méréssel

kapott klorofill fluoreszcencia értékekből kiszámoltuk a fotoszintézis hatékonyságát jellemző paramétereket. *N.benthamiana* növények CymRSV és crTMV vírusfertőzése drasztikus hatást gyakorolt a lineáris elektrontranszportra és II. fotokémiai rendszerre (PSII). PVX fertőzött *S.lycopresicum* növényekben szignifikánsan lecsökkent a PI, a PSII primér fotokémiájának maximális hatásfoka és az elektrontranszport hatásfoka. Eredményeinkhez hasonló megfigyeléseket tettek Szíriai árpa tájfajták sóstressz és búza fajták szárazságstressz vizsgálata során is [KALAJI et al. 2011, PAUL et al. 2016]. Mindkét gazda estén a perzisztens vírusfertőzéseknél (TCV, TMV) mért klorofill fluoreszcencia paraméterek megegyeztek vagy csak kisebb eltérést mutattak a kontrollhoz képest.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy mindkét gazdanövényen az akut vírusfertőzés során jelentkező drasztikus gén-expressziós változások már a fertőzés korai szakaszában súlyos fiziológiai változásokat okoztak a leveleken, míg a perzisztens vírusfertőzéseknél detektált minimális gén-expressziós változások nem okoztak változásokat a leveleken.

5.6. A gén-expressziós változások háttérében álló lehetséges szabályozó faktorok

Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy vírusfertőzött *N.benthamiana* és *S.lycopersicum* növényekben hasonló molekuláris és fiziológiai változások jelentkeztek akut vírusfertőzések során. Azt is megfigyeltük, hogy ezek a súlyos változások a perzisztens vírusfertőzött gazdanövényeknél hiányoztak vagy csak kis mértékben jelentkeztek. Eredményeink egy általános szabályozási útvonat meglétét sugallják, mely különbséget képes tenni a két típusú (akut és perzisztens) vírusfertőzés között. Csoportunkban korábban végzett *in vitro* run-on transzkripciók kísérletekkel is megállapították, hogy a shut-off jelenség transzkripciók szinten hat és a sejtmagban alakul ki [HAVELEDA et al. 2008] ahol a transzkripciók faktorok végzik a cél mRNS-eik szabályozását. Csoportunk vírusfertőzött *N.benthamiana* növények vizsgálatakor több olyan transzkripciók faktort is azonosított, melyek expresszióját az akut vírusfertőzés erősen befolyásolta. Hat darab transzkripciók faktor drasztikus gén-expressziós változását sikerült Northern blottal visszaigazolni. Csoportunk igazolta, hogy a *BZL4*, a *NAC-like*, *ZFP19* és a *WRKY70* TF-ok expressziója jelentős mértékben indukálódott, míg a *LRR* tartalmazó *transzmembrán kináz* és *TMKL1* expressziója lecsökken [PESTI et al. 2018]. A *BZL4* a *bZIP* TF család egy tagja, dohányban való túltermeltetésekkel a növények fejlődése leállt, rövidebb internóduszt, kisebb méretű virágokat és kevesebb pollent figyeltek meg [IVEN et al. 2010], azonban biotikus stresszben játszott szerepe ezidáig nem ismert. A *BZL4* oroszlánszájából (*Antirrhinum majus*) származó lehetséges ortológjainak ektópikus túltermeltetésével a *klorofill a/b kötő fehérjék* expressziójának csökkenését tapasztalták [STRATHMANN et al. 2001]. Korábbi tanulmányokkal megegyezően csoportunkban is kimutatták, hogy az akut vírusfertőzésekben a *BZL4* expresszió növekedése

mindkét gazdanövény esetén csökkent növekedést okozott és a *klorofill a/b kötő fehérjék* expressziója is lecsökkent [PESTI et al. 2018]. A jellemzett NAC-like transzkripció faktorokról tudjuk, hogy fontos szerepet töltenek be a levélöregedésben, melyet *EIN2* génen keresztül szabályoznak [KIM et al. 2014]. Csoportunk által használt microarray chip próba szekvenciái között annotálva volt a *NAC-like* gén egy homológja, *AtNAP* (ANAC019-like), mely a virág primordiumokban fejeződik ki és expresszióját az *APETALA3* illetve a *PISTILLATA* gének szabályozzák [SABLOWSKI and MEYEROWITZ 1998]. Vizsgálatok során kimutatták, hogy mind az *AtNAP* overexpressziója mind az *AtNAP* expressziójának emelkedése korai öregedést eredményez [GUO és GAN 2006, VOGELMANN et al. 2012]. A korábbi tanulmányokkal megegyezően csoportunk is kimutatta az akut vírusfertőzött *N. benthamiana* és *S. lycopersicum* növényben a *NAP* gén indukcióját, mely a növényeken is látható korai öregedés eredményezte [PESTI et al. 2018]. A ZFP TF-okat 5 csoportba sorolják a ciszteinek és hisztidinek száma és helyzete alapján, melyek közül az eukariótákban C2H2-típusú ZFP TF-ok a legabundánsabb [LAITY et al. 2001]. Tanulmányok kimutatták, hogy a ZFP TF-ok kulcsszerepet játszanak a növény növekedésében és fejlődésében és számos ZFP TF vesz részt a biotikus és abiotikus stressz válaszokban [WU et al. 2008, LIU et al. 2013]. Például paprikában *CaZFP1* gén indukcióját figyelték meg bakteriális inokulációt követően, Et és ABA kezelés hatására. *A. thaliana* növényekben a *CaZFP1* túltermeltetés fokozta a *Pseudomonas syringae* fertőzéssel szembeni rezisztenciát és növelte szárazságstresszel szemben a növények toleranciáját [KIM et al. 2004]. Csoportunk által vizsgált *ZFP19* gén expressziója mindkét gazdanövényben csak akut vírusfertőzés hatására indukálódott, ezért feltételezzük, hogy az akut vírusfertőzés során ezek a TF-ok szerepet játszhatnak a szabályozásban [PESTI et al. 2018]. Korábbi tanulmányokból annyit tudunk a *ZFP19* génről, hogy: *A.thaliana*-ban szabályozza a paraquat-indukálta programozott sejthalált [MUHAMMAD et al. 2013], *ZFP19* túltermeltetésével kimutatták, hogy fokozódik a főgyökér növekedés, de a növények nikkellal szembeni toleranciája csökken [LIU et al. 2014b], a biotikus stresszben játszott szerepe ezidáig ismeretlen. A *WRKY* TF-ok a gének komplex hálózatán keresztül sokféle válaszreakciót képesek szabályozni, úgymint a növények fejlődését, abiotikus és biotikus stressz válaszokat [PHUKAN et al. 2016]. A *WRKY70* gén expresszióját SA indukálja, de a JA gátolja, mindez azt sugallja, hogy a növény védekezési válasza során a *WRKY70* egy közös csomópontja a SA és JA jelátviteli útvonalnak. A *WRKY70* képes kölcsönhatásba lépni az *NPR1*-el és azon keresztül gátolja biotikus stressz során a JA válaszban szerepet játszó géneket [LI et al. 2006]. Legújabb tanulmányok szerint a *WRKY70* részt vesz a BR-szabályozott növény növekedésben is [CHEN et al. 2017]. Csoportunk kimutatta, hogy CymRSV és crTMV fertőzött *N.benthamiana* és PVX fertőzött *S.lycopersicum* növényekben a *WRKY70* expressziója indukálódik, ami arra utal, hogy nem csak a baktérium és a gomba [LI et al. 2006] hanem a vírusfertőzésre adott

válaszreakcióban is kulcsszerepet játszik. A növényekben transzmembrán receptor-szerű kinázok legnagyobb alcsaládját az LRR receptor-szerű fehérje kinázok képviselik [TORII 2004]. LRR receptor-szerű fehérje kinázok szerepet játszanak a fejlődésben [TORII and CLARK 2000], a szteroid hormonválaszban [BISHOP and KONCZ 2002], stressz válaszbán [JONES and JONES 1997], a betegségekkel szembeni rezisztenciában [GÓMEZ-GÓMEZ and BOLLER 2002] és a szimbiózisban [KISTNER and PARNISKE 2002]. Csoportunk által használt *N.tabacum* microarray chipen található LRR transzmembrán kináz szekvenciája *N.tabacum* inaktív receptor kinázként volt annotálva, mely homológ az *A.thaliana* izolált LRR receptor kinázzal (At4g23740). Munkánk során csoportunk kimutatta, hogy akut vírusfertőzés hatására mind két gazdanövényben lecsökken az LRR transzmembrán kináz expressziója, ami arra utal, hogy aktív formában van jelen és szerepet játszik a vírusfertőzés korai jelzésében. Microarray elemzések során azonosítottunk egy másik kinázt is a *TMKL1* gént, melynek expressziója lecsökkent az akut vírusfertőzés hatására dohányban [PESTI et al. 2018]. A microarray chip-en található próba szekvencia *A.thaliana* transzmembrán kináz, mely a dohány *TMKL1* gén homológja és egy szokatlan kináz-szerű domént tartalmaz [VALON et al. 1993, WALKER 1994], de funkciója ezidáig ismeretlen. Paradicsom RNS szekvenálási adataink elemzése során a *TMLK1* gén expressziója nem mutatott változást, ezért elmondható, hogy a vírusfertőzés során betöltött szerepe eddig nem bizonyítható.

Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a vírusfertőzött növények sejtmagjában nem csak a transzkripció faktorok képesek a cél mRNS-eik szabályozásán keresztül gén-expressziós változásokat előidézni. A TF-ok az RNS inerferencia szabályozása alatt állnak, melyek végrehajtását a miRNS-ek és siRNS-ek végzik [ZVEREVA and POOGGIN 2012, SEO et al. 2013]. Ezek a 21-22 nt hosszú kis RNS-eket az AGO 1/2/7 megköti és hasítással vagy translációs gátlással szabályozza azok cél mRNS-eit. Ismert, hogy ezeket a poszttranszkripcionális gén csendesítési útvonalak (miRNS, transz-ható siRNS, phased siRNS) vírusfertőzés hatására is indukálódnak [DU et al. 2011]. Ezenfelül vírusfertőzéskor a transzkripcionális géncsökkentésen keresztül: a 24 nt hosszú kis RNS-eket az AGO4 megköti és közvetlenül DNS metilációs változást és hiszton átrendeződést idézhet elő, mely szintén gén-expressziós változásokhoz vezet [DOWEN et al. 2012]. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy mindkét gazdanövényben akut vírusfertőzés során lecsökken az *AGO4* és a *metiltranszferázok* expressziója. Továbbá dohány növényen végzett Northern blott vizsgálatunkkal visszaigazoltuk, hogy az *AGO4* expressziója CymRSV és crTMV vírusfertőzés hatására lecsökken, ami azt mutatja, hogy ez az útvonal is érintett akut vírusfertőzéskor.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A növényekben vírusfertőzés hatására aktiválódik egy általános védekezési mechanizmus (RNS interferencia). Az RNS interferencia egy olyan génszabályozási rendszer, mely többek

között védelmet nyújt a vírusok ellen. Azonban a vírusok egy része rendelkezik egy olyan speciális fehérjével (virális szupresszor fehérje), mely képes blokkolni az RNS interferencia folyamatát. Ennek a növény-vírus fegyverkezési versenynek a hatására a növény teljes metabolizmusa megváltozhat, melynek következtében kialakulnak az adott vírusra jellemző tünetegyüttesek. A gazda gén-expressziós változásainak nyomonkövetésére alkalmas módszer többek között a Northern blott, qRT-PCR, a microarray analízis, az RNS szekvenáláson alapuló gén-expressziós vizsgálatok, a növényi metszeteken alkalmazott hagyományos és a fluoreszcens *in situ* hibridizációs technika.

Kutatásunk irányvonala, hogy feltárjuk milyen hatást gyakorol a vírusfertőzés a gazdanövény gén-expressziós rendszerére, valamint megértsük milyen folyamatok állnak ezen változások hátterében és milyen szerepet játszanak a tünetek kialakulásában. Ezek felderítéséhez Phd munkám céljából tűztük ki, hogy: feltárjuk a különböző növény-vírus kapcsolatokban bekövetkező gén-expressziós változásokat, ezeket különböző módszerekkel (molekuláris biológiai vizsgálatok, fiziológiai mérések) visszaigazoljuk és fényt derítünk arra, milyen folyamatok állhatnak a gén-expressziós változások hátterében és ezek milyen szerepet játszanak a tünetek kialakulásában. Munkám során két nagy áteresztőképességű módszer (microarray és RNS szekvenálás) segítségével vizsgáltuk CymRSV, crTMV és TCV vírussal fertőzött *Nicotiana benthamiana* valamint PVX és TMV vírussal fertőzött *Solanum lycopersicum* növényeket. Munkám kiindulási pontját vírusfertőzött *N.benthamiana* növényekből már elkészült microarray analízisből származó adatok kiértékelése és eredményeinek visszaigazolása jelentette. Ezt követően vontuk be kísérleteinkbe a gazdaságilag is fontosabb paradicsomot, mely lehetőséget adott arra, hogy újgenerációs szekvenálással egy másik növény-vírus kapcsolatot is megvizsgáljunk. Eredményeinket ezt követően több különböző módszerrel (fiziológiai mérések, molekuláris biológiai vizsgálatok) is visszaigazoltuk.

Eredményeink azt mutatják, hogy mindkét nagy áteresztőképességű módszer (microarray és az RNS szekvenálás) alkalmas arra, hogy kompatibilis növény-vírus kapcsolatokban nyomonkövessük a gén-expressziós változásokat. Microarray analízissel kimutatott gén-expressziós változások nagyobb mértékűek voltak, mint amit RNS szekvenálással azonosítottunk, melynek oka a két technika eltérő detektálási módja lehet. A csökkent expressziót mutató gének aránya az indukálódott génekhez képest magasabb volt, amit ezen próbák nagyobb mértékű előfordulása okozhatott. Ez az eltérés figyelmeztető jel arra, hogy a microarray elemzés nem alkalmas arra, hogy meghatározzuk a legnagyobb változást mutató GO kategóriákat.

Két különböző gazdanövény esetén vizsgáltuk az akut és perzisztens vírusfertőzések gén-expresszióra gyakorolt hatását, mely során jelentős különbségeket figyeltünk meg. Kimutattuk, hogy az akut vírusfertőzések drasztikus, míg a perzisztens vírusfertőzések minimális gén-

expressziós változásokat okoznak dohányon és paradicsomon. Akut vírusfertőzések esetén igazoltuk, hogy a stressz gének indukálódnak, azonban perzisztens vírusfertőzéseknel elmarad ezen gének indukciója. Csoportunk bizonyította, hogy az RNS interferencia kulcsregulátorainak változása csak akut vírusfertőzésekben figyelhető meg. Ez magyarázatot adhat az akut vírusfertőzéskor jelentkező számos gént érintő gén-expressziós csökkenésre, valamint arra, hogy az RNS interferencia kulcsregulátor változásainak hiányában, a perzisztens vírusfertőzéseknel a gazda anyagcseréje érintetlen marad. A felvetés metilációs vizsgálattal és/vagy vírusfertőzött gazdaszervezetek kis RNS mintázatának vizsgálatával tisztázható lenne.

Az akut vírusfertőzések esetén jelentkező súlyos tünetek, a termés mennyiségének és minőségének csökkenésével, jelentős gazdasági károkat okozhat, ezért fontos lenne megértenünk milyen molekuláris és fiziológiai változások állnak a tünetek hátterében. Kimutattuk a levélöregedésben (PAO) a satnyulásban, a klorózisban és a sárgulás hátterében álló lehetséges (*PDF1*, *CESA* és *CWINV*) gének expresszió változását az akut vírusfertőzésekben. Megfigyeltük, hogy a hormonális anyagcserében bekövetkező gén-expressziós változások akut vírusfertőzött növényeket súlyosabban érintette, mint a perzisztens vírusfertőzötteket és ez összefüggést mutat az akut vírusfertőzésre jellemző drasztikusabb tünetek megjelenésével is. Korábbi tanulmányokból ismert, hogy fotoszintetikus folyamatokban résztvevő gének expresszió csökkenése hatással van a növény fiziológiájára. Ezen hatások nyomonkövetésére alkalmas a hőterképezés, mellyel a növények levélhőmérséklete mérhető és a gyors klorofill fluoreszcencia tranziensek mérése, mellyel a növények fotoszintetikus aktivitása határozható meg. Eredményeink szerint a módszerek alkalmasak arra, hogy elkülönítsük egymástól az akut és a perzisztens vírusfertőzéseket, még a látható tünetek megjelenése előtt. A későbbiekben a távérzékelési módszerek alkalmasak lehetnek ezen változások nyomonkövetésére, azonban ehhez a vírusfertőzött növények gén-expressziós és fiziológiai változásainak részletes jellemzése szükséges. Ezen ismeretek birtokában a precíziós gazdálkodás során használt távérzékelési technikákkal előrejelzhetőek lennének a fertőzési kockázatok.

A nagy áteresztőképességű szekvenálás elterjedésével napjainkban egyre több új vírust fedeznek fel, de nagyon nehéz meghatározni ezeknek a vírusoknak a jelentőségét, azonban néhány gazdagn expressziójának vizsgálata segíthetne eldönteni, hogy ezek a vírusok gazdasági szempontból mennyire veszélyesek.

Az akut vírusfertőzés gazdasági jelentőségén túl fontos megemlíteni, hogy perzisztens vírusfertőzés egy nagyon érdekes életforma. Perzisztens vírusfertőzéskor a vírus és a gazda együtt, hosszú távon egy egyensúlyi helyzetben fennmarad anélkül, hogy a növényen látható tünetek jelennének meg, feltehetően ez az együttélés mind a vírus mind a növény szempontjából egy evolúciósan hasznos életforma. Annak ellenére, hogy vizsgálatainkkal betekintést nyertünk a

különböző vírusokkal fertőzött növények gén-expressziós rendszerébe azt még máig nem sikerült megfejtenünk, hogy a perzisztens vírus milyen módon képes elkerülni a növény védekező rendszerét és elérni gazdájával a békés együttélést.

M1. Irodalomjegyzék

- Abe M., Katsumata H., Komeda Y., Takahashi T. (2003): Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development*, 130:635–643 p.
- Abe M., Takahashi T., Komeda Y. (1999): Cloning and characterization of an L1 layer-specific gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 40: 571–580 p.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., Mukherjee, S. K. (2003): RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology, reviews*, 67(4):657–685 p. doi:10.1128/mmbr.67.4.657-685.2003
- Agudelo-Romero P., Carbonell P., de la Iglesia F., Carrera J., Rodrigo G., Jaramillo A., Pérez-Amador M. A., Elena S. F. (2008): Changes in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana* after infection with Tobacco etch virus. *Virology Journal*, 5:92. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-5-92>
- Ahmed I., Fan X. D., Zhang Z. P., Ren F., Hu G. J., Li Z. N., Khaskheli M. I., Dong Y. F. (2018): First Report of Grapevine Syrah virus-1 in Grapevines in China. *Plant Disease*, 102(2):466-466 p.
- Ahmed M.M.S., Ji W., Wang M., Bian S., Xu M., Wang W., Zhang J., Xu Z., Yu M., Liu Q., Zhang C., Zhang H., Tang S., Gu M., Yu, H. (2017): Transcriptional changes of rice in response to rice black-streaked dwarf virus. *Gene*, 628, 38-47 p.
- Alamillo J. M., Saénz P., García J. A. (2006): Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J.*, 48(2):217-227 p., PubMed PMID: 17018032.
- Alazem M., Lin K.Y., Lin, N.S. (2014): The abscisic acid pathway has multifaceted effects on the accumulation of bamboo mosaic virus. *Mol. Plant–Microbe Interact.*, 27:177–189 p.
- Alazem M., Lin N.S. (2015): Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Mol Plant Path.*, 16(5):529-40 p. doi: 10.1111/mpp.12204.
- Allie F., Rey M. E. C. (2013): Transcriptional alterations in model host, *Nicotiana benthamiana*, in response to infection by South African cassava mosaic virus. *Eur J of Plant Path.* 137(4):765–785 p. doi: 10.1007/s10658-013-0286-4.
- Al Rwahnih M., Daubert S., Golino D., Rowhani A. (2009): Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus, *Virology* 387(2):395–401 p. ISSN 0042-6822

- Al Rwahnih M., Golino D., Rowhani A. (2016): First Report of Grapevine Pinot gris virus Infecting Grapevine in the United States. *Plant Disease*, 100(5):1030 p.
- Alwine J.C., Kemp D.J., Stark, G.R. (1977): Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5350–5354 p. doi:10.1073/pnas.74.12.5350
- Aparicio F., Thomas C.L., Lederer C., Niu Y., Wang D., Maule, A.J. (2005): Virus induction of heat shock protein 70 reflects a general response to protein accumulation in the plant cytosol. *Plant Physiol.* 138:529-536 p.
- Aranda M.A., Escaler M., Wang D., Maule A.J. (1996): Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *PNAS*, 93(26):15289–15293 p.
- Aranda M., Maule A. (1998): Virus-induced host gene shutoff in animals and plants. *Virology*, 243(2):261-267 p. Review. PubMed PMID: 9568025.
- Argueso C.T., Ferreira F.J., Epple P., To J.P., Hutchison C.E., Schaller G.E., Dangl J.L., Kieber J.J. (2012): Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS Genet.*, 8(1):e1002448. doi:10.1371/journal.pgen.1002448.
- Babu M, Griffiths J.S, Huang T.S, Wang A. (2008): Altered gene expression changes in *Arabidopsis* leaf tissues and protoplasts in response to Plum pox virus infection. *BMC Genomics*, 9:325. doi: 10.1186/1471-2164-9-325.
- Baebler Š., Witek K., Petek M., Stare K., Tušek-Žnidarič M., Pompe-Novak M., Renaut J., Szajko K., Strzelczyk-Żyta D., Marczewski W., Morgiewicz K., Gruden K., Hennig J. (2014): Salicylic acid is an indispensable component of the Ny-1 resistance-gene-mediated response against Potato virus Y infection in potato. *J Exp Bot.*, 65(4):1095-1109 p. doi: 10.1093/jxb/ert447.
- Baker B., Zambryski P., Staskawicz B., Dinesh-Kumar S.P. (1997): Signaling in plant–microbe interactions. *Science*, 276:726–733 p.
- Bartel D.P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281-297 p. Review. PubMed PMID: 14744438.
- Baulcombe D. (2004): RNA silencing in plants. *Nature*, 431:356-363 p.
- Bäurle I., Smith L., Baulcombe D.C., Dean C. (2007): Widespread role for the flowering-time regulators FCA and FPA in RNA-mediated chromatin silencing. *Science* 318:109–112 p.
- Bawden F. C. (1943): Plant viruses and virus diseases. A New Series of Plant Science Books, Vol. 13. Second entirely revised edition. 294 p.

- Bayne E.H., Rakitina D.V., Morozov S.Y., Baulcombe, D.C. (2005): Cell-to-cell movement of Potato Potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal*, 44:471–482 p. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02539.x
- Benamins R., Scheres B. (2008): Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59:443–465 p.
- Beijerinck M. W. (1898): Over een Contagium vivum fluidum als oorzaak van de vlekziekte der tabaksbladen. *Versl. Gewone Vergad Wis. Natuurkd. Afd., K. Akad. Wetensch. Amsterdam* 7:229-235 p.
- Beuve M., Candresse T., Tannières M., Lemaire O. (2015): First Report of Grapevine Pinot gris virus (GPGV) in France. *Plant Disease*, 99(2):293 p.
- Bishop G. J., Koncz C. (2002): Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell*, 14(Suppl.), S97–S110
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. (2014): Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15):2114-2120 p.
- Boccardo M., Hamilton W.D., Baulcombe D.C. (1986): The organisation and inter-viral homologies of genes at the 3' end of tobacco rattle virus RNA1. *The EMBO journal*, 5(2):223–229 p.
- Bologna N.G., Voinnet O. (2014): The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology*, 65:473–503 p.
- Bolton M.D. (2009): Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Mol Plant Microbe Interact.*, 22(5):487-497 p. doi: 10.1094/MPMI-22-5-0487.
- Buck K.W.(1996): Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Adv Virus Res.*,47:159-251 p. Review. PubMed PMID: 8895833.
- Burgan J., Hornyik C., Szittya G., Silhavy D., Bicztray G. (2000): The ORF1 products of tombusviruses play a crucial role in lethal necrosis of virus-infected plants. *J Virol* 74:10873-10881 p.
- Burton R.A., Gibeaut D.M., Bacic A., Findlay K., Roberts K., Hamilton A., Baulcombe D.C., Fincher, G.B. (2000): Virus-Induced Silencing of a Plant Cellulose Synthase Gene. *Plant Cell*, 12:691-706 p.
- Broadbent L., Heathcote G. D. (1958): Properties and host range of turnip crinkle, rosette and yellow mosaic viruses. *Annals of Applied Biology*, 46:585–592 p. doi:10.1111/j.1744-7348.1958.tb02242.x
- Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Bruun-Rasmussen M., Dunoyer P., Yamamoto Y.Y., Sieburth L., Voinnet O. (2008): Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320(5880):1185-1190 p. doi: 10.1126/science.1159151.

- Brodersen P., Voinnet O. (2006): The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.*, 22(5):268-280 p. Review. PubMed PMID:16567016.
- Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillock E.T., Sit T.L., Lommel S.A. (2001): The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1):419-460 p.
- Carmell M.A., Xuan Z., Zhang M.Q., Hannon G.J. (2002): The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.*, 16:2733–2742 p.
- Carrington J.C., Heaton L.A., Zuidema D., Hillman B.I., Morris T.J. (1989): The genome structure of turnip crinkle virus. *Virology*, 170:219–226 p.
- Carrington J.C., Morris T.J., Stockley P.G., Harrison S.C. (1987): Structure and assembly of turnip crinkle virus. IV. Analysis of the coat protein gene and implications of the subunit primary structure. *J. Mol. Biol.*, 194:265–276 p.
- Catoni M., Miozzi L., Fiorilli V., Lanfranco L., Accotto G.P. (2009): Comparative analysis of expression profiles in shoots and roots of tomato systemically infected by Tomato spotted wilt virus reveals organ-specific transcriptional responses. *Mol Plant Microbe Interact.*, 22(12):1504-1513 p. doi: 10.1094/MPMI-22-12-1504.
- Cerutti H., Casas-Mollano J.A. (2006): On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr. Genet.*, 50:81–99 p.
- Chaerle L., Pineda M., Romero-Aranda R., Van Der Straeten D., Barón M. (2006): Robotized thermal and chlorophyll fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol.*, 47(9):1323-1336 p.
- Chapman E.J., Carrington J.C. (2007): Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet.*, 8(11):884-896 p. Review. PubMed PMID:17943195
- Chapman S., Hills G., Watts J., Baulcombe D.C. (1992): Mutational analysis of the coat protein gene of *Potato virus X*: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology*, 191:223–230 p.
- Chen J., Nolan T.M., Ye H., Zhang M., Tong H., Xin P., Chu J., Chu C., Li Z., Yin Y. (2017): Arabidopsis WRKY46, WRKY54, and WRKY70 Transcription Factors Are Involved in Brassinosteroid-Regulated Plant Growth and Drought Responses. *Plant Cell*, 29(6):1425-1439 p. doi: 10.1105/tpc.17.00364.
- Chen L., Zhang L., Li D., Wang F., Yu D. (2013): WRKY8 transcription factor functions in the TMV-cg defense response by mediating both abscisic acid and ethylene signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(21):E1963-71. doi: 10.1073/pnas.1221347110.

- Chen X. (2005): microRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters*, 579(26), 5923–5931 p. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.071>
- Chen, W., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H. S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S. A., Budworth, P. R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J. A., Harper, J. F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J. L., Wang, X., and Zhu, T. (2002): Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14:559-574 p.
- Chiu, M. H., Chen, I. H., Baulcombe, D. C., Tsai, C. H. (2010): The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology*, 11: 641–649 p. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00634.x
- Cho H.T., Cosgrove D.J. (2002): Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, 14(12):3237-3253 p.
- Cho IS, Jung SM, Cho JD, Choi GS, Lim HS (2013): First report of Grapevine pinot gris virus infecting grapevine in Korea. *New Disease Reports* 27, 10 p.
- Choi, J., Choi, D., Lee, S., Ryu, C.M. and Hwang, I. (2011): Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends Plant Sci.* 16, 388–394 p.
- Choi J., Huh S.U., Kojima M., Sakakibara H., Paek K.H., Hwang I. (2010): The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis. *Dev Cell.*, 19(2):284-95. doi: 10.1016/j.devcel.2010.07.011.
- Clark M.E., Lieberman P.M., Berk A.J., Dasgupta A. (1993): Direct cleavage of human TATA-binding protein by poliovirus protease 3C in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol.*, 13(2):1232-1237 p. PubMed PMID: 8380894
- Crawford, K.M. and Zambryski, P.C. (1999a): Phloem transport: are you chaperoned? *Curr. Biol.* 9, 281–285 p.
- Crawford, K.M. and Zambryski, P.C. (1999b): Plasmodesmata signaling: many roles, sophisticated statutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 382–387 p.
- Csorba T., Bovi A., Dalmay T., Burgyán J. (2007): The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J Virol.*, 81(21):11768-11780 p. PubMed PMID: 17715232
- Czotter, N., Molnar, J., Szabó, E., Demian, E., Kontra, L., Baksa, I., Gyorgy Szittya, Laszlo Kocsis, Tamas Deak, Gyorgy Bisztray, Gabor E. Tusnady, Jozsef Burgyan, Varallyay, E. (2018): NGS of Virus-Derived Small RNAs as a Diagnostic Method Used to Determine Viromes of Hungarian Vineyards. *Frontiers in Microbiology*, 9(122): 1-12 p.

- Czotter N., Szabó E., Molnar J., Kocsis L., Deák T., Bisztray Gy., Tusnády G.E., Burgyán J., Várallyay É. (2015): First description of Grapevine Syrah Virus 1 in vineyards of Hungary. *Journal of Plant Pathology* 97 (Supplement): S67-S77, S74
- Czotter N., Szabó E., Molnár J., Pesti R., Oláh E., Deák T., Bisztray Gy., Tusnády E. G., Kocsis L., Burgyán J., Várallyay É. (2015): Szőlőültetvényeink metagenomikai diagnosztikája új, hazánkban eddig nem leírt vírusok jelenlétét mutatta ki. *Növényvédelem* 51(12):550-558 p.
- Dalmay T, Rubino L, Burgyan J, Kollar A, Russo M (1993) Functional analysis of cymbidium ringspot virus genome. *Virology* 194: 697-704 p.
- Dalmay T, Rubino L, Burgyan J, Russo M (1992) Replication and movement of a coat protein mutant of cymbidium ringspot tombusvirus. *Mol Plant Microbe Interact* 5:379-383 p.
- Dardick C. (2007): Comparative expression profiling of *Nicotiana benthamiana* leaves systemically infected with three fruit tree viruses. *Mol Plant Microbe Interact.* 20(8):1004-1017 p.
- Deddouche S., Matt N., Budd A., Mueller S., Kemp C., Galiana-Arnoux D., Dostert C., Antoniewski C., Hoffmann J.A., Imler J.L. (2008): The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *Drosophila*. *Nat Immunol.*, 9(12):1425-32. doi: 10.1038/ni.1664.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O. (2006): Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*, 313, 68–71 p.
- Denance, N., Sanchez-Vallet, A., Goffner, D. and Molina, A. (2013): Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front. Plant Sci.* 4, 155.
- Ding XS, Liu JZ, Cheng NH, Folimonov A, Hou YM, Bao YM, Katagi C, Carter SA, Nelson RS (2004): The Tobacco mosaic virus 126 kD protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Mol Plant Microbe Interact*, 17:583–592 p.
- Ding, S.W. and Voinnet O. (2007): Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426 p.
- Dong, Z., Han, M.-H., Fedoroff, N. (2008): The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29): 9970–9975 p. <http://doi.org/10.1073/pnas.0803356105>
- Dorokhov Y.L., Ivanov P.A., Komarova T.V., Skulachev M.V., Atabekov J.G. (2006): An internal ribosome entry site located upstream of the crucifer-infecting tobamovirus coat protein (CP)

- gene can be used for CP synthesis in vivo. *J Gen Virol.*, 87(9): 2693-2697 p. PubMed PMID: 16894210.
- Dorokhov Yu.L, Ivanov P.A., Novikov V.K., Agranovsky A.A., Morozov S.Yu., Efimov V.A., Casper R., Atabekov J.G. (1994): Complete nucleotide sequence and genome organization of a tobamovirus infecting cruciferae plants. *FEBS Lett.*, 350(1): 5-8 p. PubMed PMID: 7545946.
- Dowen R.H., Pelizzola M., Schmitz R.J., Lister R., Dowen J.M., Nery J.R., Dixon J.E., Ecker J.R.(2012): Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 109(32): E2183-91 p. doi: 10.1073/pnas.1209329109. Epub 2012 Jun 25. PubMed PMID: 22733782, PubMed Central PMCID: PMC3420206.
- Dunigan, D. D., and Zaitlin, M. (1990): Capping of tobacco mosaic virus RNA. Analysis of viral-encoded ganylyltransferase-like activity. *J. Biol. Chem.* 265, 7779-7786 p.
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O (2005): DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet* 37:1356–1360 p.
- Du P, Wu J, Zhang J, Zhao S, Zheng H, Gao, G., Wei, L., Li, Y. (2011): Viral Infection Induces Expression of Novel Phased MicroRNAs from Conserved Cellular MicroRNA Precursors. *PLOS Pathogens* 7(8): e1002176. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002176>
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development* 15, 188-200 p.
- Escaler, M., Aranda, M. A., Roberts, I. M., Thomas, C. L. and Maule, A. J. (2000a): A comparison between virus replication and abiotic stress (heat) as modifiers of host gene expression in pea. *Molecular Plant Pathology*, 1: 159–167 p. doi:10.1046/j.1364-3703.2000.00020.x
- Escaler, M., Aranda, M. A., Thomas, C. L., and Maule, A. J. (2000b): Peaembryonic tissues show common responses to the replication of a wide range of viruses. *Virology* 267(2):318-325 p.
- Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schön, H., Sonnewald, S., Weis, E. and Scharte, J. (2008): RNA Interference-Mediated Repression of Cell Wall Invertase Impairs Defense in Source Leaves of Tobacco. *Plant Physiology*, 147, 1288-1299 p.
- Fan H, Sun H, Wang Y, Zhang Y, Wang X, Li D, Yu J., Han C. (2014): Deep sequencing–based transcriptome profiling reveals comprehensive insights into the responses of *Nicotiana benthamiana* to Beet necrotic yellow vein virus infections containing or lacking RNA4. *PloS One* 9:e85284. doi: 10.1371/journal.pone.0085284
- Fan H, Zhang Y, Sun H, Liu J, Wang Y, Wang X, Li D., Yu J., Han C. (2015): Transcriptome Analysis of Beta macrocarpa and Identification of Differentially Expressed Transcripts in

- Response to Beet Necrotic Yellow Vein Virus Infection. PLoS ONE 10 (7):e0132277. doi:10.1371/journal.pone.0132277
- Fan X. D., Dong Y. F. , Zhang Z. P., Ren F., Hu G. J., Li Z.N., Zhou J. (2016): First Report of Grapevine Pinot gris virus in Grapevines in China. Plant Disease, 100 (2):540 p.
- Fang, X., and Qi, Y. (2016): RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. The Plant Cell, 28(2), 272–285 p. <http://doi.org/10.1105/tpc.15.00920>
- Fátyol K., Ludman M., Burgyán J. (2016): Functional dissection of a plant Argonaute. Nucleic Acids Res., 44(3):1384-1397. doi: 10.1093/nar/gkv1371.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 391(6669):806-811 p. PubMed PMID: 9486653.
- Forster, R. L. S., Beck, D. L., Guilford, P. J., Voot, D. M., Van Dolleweerd, C. J., Andersen, M. T. (1992): The coat protein of *White clover mosaic potexvirus* has a role in facilitating cell-to-cell transport in plants. Virology 191, 480–484 p.
- Frank F, Sonenberg N, Nagar B. (2010): Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. Nature, 465:818–822 p.
- Fulton, R W (1966): Mechanical Transmission of Viruses of Woody Plants. Annual Review of Phytopathology, 4(1):79-98 p.
- Gall, J. G., and Pardue, M. L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 63 (2): 378-83 p.
- García-Marcos A., Pacheco R., Manzano A., Aguilar E., Tenllado F. (2013): Oxylin biosynthesis genes positively regulate programmed cell death during compatible infections with the synergistic pair potato virus X-potato virus Y and Tomato spotted wilt virus. J Virol., 87(10):5769-83. doi: 10.1128/JVI.03573-12.
- Gazel M., Caglayan K., Elçi E., Öztürk L. (2016): First Report of Grapevine Pinot gris virus in Grapevine in Turkey. Plant Disease, 100 (3):657 p.
- Geri, C., Love, A.J., Cecchini, E., Barrett, S.J., Laird, J., Covey, S.N. *et al.* (2004): Arabidopsis mutants that suppress the phenotype induced by transgene-mediated expression of cauliflower mosaic virus (CaMV) gene VI are less susceptible to CaMV infection and show reduced ethylene sensitivity. Plant Mol. Biol. 56, 111–124 p.
- Giampetruzzi A., Roumi V., Roberto R., Malossini U., Yoshikawa N., La Notte P., Terlizzi F., Credi R., Saldarelli P. (2012): A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. Virus Res. 163(1):262-268 p. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.010.

- Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. (1992): Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology* 189 (1): 40–47 p.
- Glasa M., Predajňa L., Komínek P., Nagyová A., Candresse T., Olmos A. (2014): Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Arch Virol* (2014) 159:2103–2107 p.
- Glasa M., Predajna L., Soltys K., Sabanadzovic S., Olmos A. (2015): Detection and molecular characterisation of Grapevine Syrah virus-1 isolates from Central Europe. *Virus Genes* 51: 112-121 p.
- Goelet P., Lomonossoff G.P., Butler P.J., Akam M.E., Gait M.J., Karn J.(1982): Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc Natl Acad Sci.*, 79(19):5818-5822 p. PubMed PMID: 6964389
- Golem, S. and Culver J. N. (2003): Tobacco mosaic virus Induced Alterations in the Gene Expression Profile of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions (MPMI)*. 16(8): 681–688 p.
- Gómez-Gómez L, Boller T. (2002): Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7(6):251-6. Review. PubMed PMID: 12049921.
- Gorbalenya A. E., Koonin E. V. (1989): Virus proteins containing the purine nucleotide-binding proteins. *Nucleic Acids Research*. 17: 8413-8440 p.
- Grieco F., Burgyan J., Russo M. (1989): The nucleotide sequence of cymbidium ringspot virus RNA. *Nucleic Acids Res.* 17(15):6383 p.
- Gupta B., Saha J., Sengupta A., Gupta K. (2013): Recent Advances on Virus Induced Gene Silencing (VIGS): Plant Functional Genomics. *J Plant Biochem Physiol* 1:e116. doi: 10.4172/2329-9029.1000e116
- Guo, Y. and Gan, S. (2006): AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, 46: 601-612 p. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02723.x
- Gutierrez, C. (2000): DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* 19, 792–799 p.
- Hacker D.L., Petty I.T., Wei N., Morris T.J. (1992): Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement. *Virology*, 186(1):1-8 p. PubMed PMID:1727594
- Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X., Fang, R. (2012): Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J* 36:104–115 p.
- Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C. (1999): A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950–952 p.

- Harrison B.D., Robinson D.J. (1978): The Tobraviruses. *Advances in Virus Research*. 23: 25-77 p.
- Harvey JJ, Lewsey MG, Patel K, Westwood J, Heimstadt S, Carr JP, Baulcombe DC (2011): An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* 6(1): e14639 p.
- Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, Bush MS, Kelly KA, Dunn RM, Schwach F, Doonan JH, Baulcombe DC (2010): The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* 22(2): 321-334 p.
- Havelda Z, Hornyik C, Crescenzi A, Burgyan J (2003): In situ characterization of Cymbidium Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol* 77: 6082-6086 p.
- Havelda, Z., Maule, A. J. (2000): Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *Plant Cell* 12:1975-1985 p.
- Havelda, Z., Varallyay, E., Valoczi, A., Burgyan, J., (2008): Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 55, 278-288 p.
- Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A. (2011): Brassinosteroids: under biotic stress. In: *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone* (Hayat, S. and Ahmad, A., eds),. Netherlands: Springer Netherlands, 345–360 p., 462 p.
- Henderson IR, Zhang X, Lu C, Johnson L, Meyers BC, Green PJ, Jacobsen SE (2006): Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat Genet* 38:721–725 p.
- Hernandez C., Carette J.E., Brown D.J., Bol J.F. (1996): Serial passage of tobacco rattle virus under different selection conditions results in deletion of structural and nonstructural genes in RNA 2. *J Virol.*, 70(8):4933-4940 p. PubMed PMID:8763997
- Higuchi, R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026-1030 p.
- Hills, G.J., Plaskitt, K.A., Young, N.D., Dunigan, D.D., Watts, J.W., Wilson, T.M.A., Zaitlin, M. (1987): Immunogold localization of the intracellular sites of structural and nonstructural tobacco mosaic virus proteins. *Virology*, 161, 488–496 p.
- Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O. (2003): Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.*, 22(17):4523-4533 p. PubMed PMID: 12941703.

- Ho T, Pallett D, Rusholme R, Dalmay T, Wang H. (2006): A simplified method for cloning of short interfering RNAs from *Brassica juncea* infected with Turnip mosaic potyvirus and Turnip crinkle carmovirus. *J. Virol. Methods* 136:217–223 p.
- Hoffman B. (2011): *Növénygenetika*. Debreceni Egyetem, Nyugat-Magyarországi Egyetem, Pannon Egyetem, 76 p.
- Horváth, J. (1972): *Növényvírusok, vektorok, vírusátvitel*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 515 p.
- Hosford, R.M. (1967): Transmission of plant viruses by dodder. *Bot. Rev* 33(4):387-406 p.
<https://doi.org/10.1007/BF02858742>
- Howard A. R., Heppler M. L., Ju H. J., Krishnamurthy K., Payton M. E., Verchot-Lubicz J. (2004): *Potato virus XTGBp1* induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. *Virology* 328: 185–197 p.
- Huang, C., Cun, Y., Yu, H., Tong, Z., Xiao, B., Song, Z., Wang, B., Li, Y. and Liu, Y. (2017): Transcriptomic profile of tobacco in response to Tomato zongate spot orthotospovirus infection. *Virology Journal*, 14, 153 p.
- Huang, Z., Yeakley, J. M., Garcia, E. W., Holdridge, J. D., Fan, J. B., and Whitham, S. A. (2005): Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible *Arabidopsis*-virus interactions. *Plant Physiol.* 137:1147-1159 p.
- Huggett J, Bustin S (2011) Standardization and reporting for nucleic acid quantification. *Accred Qual Assur* 16:399–405 p.
- Huisman M. J., Linthorst H. J. M., Bol J. F., Cornelissen B. J. C. (1988): The Complete Nucleotide Sequence of Potato Virus X and Its Homologies at the Amino Acid Level with Various Plus-stranded RNA Viruses. *Gen. Virol.* 69(8):1789-1798 p. doi:10.1099/0022-1317-69-8-1789
- Hull, R. (2014): *Plant Virology*. Fifth Edition. Academic Press, 1104 p.
- Hutvagner, G. and Simard, M.J. (2008): Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 22–32 p.
- Iki, T., Tschopp, M.-A., Voinnet, O. (2017): Biochemical and genetic functional dissection of the P38 viral suppressor of RNA silencing. *RNA*, 23(5):639–654 p.
<http://doi.org/10.1261/rna.060434.116>
- Iriti, M. and Faoro, F. (2008): Abscissic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiol. Biochem.* 46, 1106–1111 p.
- Ivanov, P. A., Karpova, O. V., Skulachev, M. V., Tomashevskaya, O. L., Rodionova, N. P., Dorokhov, Yu. L. Atabekov, J. G. (1997): A tobamovirus genome that contains an internal ribosome entry site functional in vitro. *Virology* 232, 32–43 p.
- Iven T., Strathmann A., Böttner S., Zwafink T., Heinekamp T., Guivarc'h A., Roitsch T., Dröge-Laser W. (2010): Homo- and heterodimers of tobacco bZIP proteins counteract as positive or

- negative regulators of transcription during pollen development. *Plant J.*, 63(1):155-166 p. doi:10.1111/j.1365-313x.2010.04230.x. PMID: 20409000.
- Iwanowski, D. (1892): Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Bull. Acad. Imp. Sci. St.-Petersbourg*, [N.W.] 35, 67-70 p.
- Javelle M., Vernoud V., Rogowsky P. M., Ingram G. C. (2011): Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol* 189: 17–39 p.
- Jia M.A., Li Y., Lei L., Di D., Miao H., Fan Z.(2012): Alteration of gene expression profile in maize infected with a double-stranded RNA fijivirus associated with symptom development. *Mol Plant Pathol.* 13(3):251-262 p. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00743.x.
- Jockusch H, Wiegand C, Mersch B, Rajes D (2001): Mutants of tobacco mosaic virus with temperature-sensitive coat proteins induce heat shock response in tobacco leaves. *Mol Plant Microbe Interact* 14:914–917 p.
- Jones, D. A., and Jones, J. D. G. (1997): The role of leucine-rich repeats in plant defences. *Adv. Bot. Res.* 24, 90–167 p.
- Jones, L., Ratcliff, F., Baulcombe, D. C. (2001): RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr. Biol.* 11, 747–757 p.
- Kalaji, H.M., Govindjee, Bosa, K., Kościelniak, J., Żuk-Gołaszewska, K. (2011): Effects of Salt Stress on Photosystem II Efficiency and CO₂ Assimilation in Two Syrian Barley Landraces. *Environmental and Experimental Botany.* 73. 64-72 p. 10.1016/j.envexpbot.2010.10.009.
- Kasschau K.D., Carrington J.C. (1998): A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*,95(4):461-470 p. PubMed PMID: 9827799.
- Kaur, H., Yadav, C., Alatar, A., Faisal, M., Jyothsna, P., Malathi, V. G., Praveen, S. (2015): Gene expression changes in tomato during symptom development in response to leaf curl virus infection. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology.* 24(3):347–354 p. DOI 10.1007/s13562-014-0280-8
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D. (2003): Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115(2): 209-16 p.
- Kidner CA, Martienssen RA (2005): The developmental role of microRNA in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8: 38-44 p.
- Kim H.J., Hong S.H., Kim Y.W., Lee I.H., Jun J.H., Phee B.K., Rupak T., Jeong H., Lee Y., Hong B.S., Nam H.G., Woo H.R., Lim P.O. (2014): Gene regulatory cascade of senescence-associated NAC transcription factors activated by ETHYLENE-INSENSITIVE2-mediated leaf senescence signalling in Arabidopsis. *J Exp Bot.*, 65(14):4023-4036 p. doi:

- 10.1093/jxb/eru112. Epub 2014 Mar 22. PubMed PMID: 24659488, PubMed Central PMCID: PMC4106440.
- Kim S.H., Hong J.K., Lee S.C., Sohn K.H., Jung H.W., Hwang B.K. (2004): CAZFP1, Cys2/His2-type zinc-finger transcription factor gene functions as a pathogen-induced early-defense gene in *Capsicum annuum*. *Plant Molecular Biology* 55, 883–904 p.
- King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J.(2011): Virus Taxonomy: Online 9th Report of International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/>
- Kistner, C., and Parniske, M. (2002): Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends in Plant Science*, 7(11), 511–518. doi:10.1016/s1360-1385(02)02356-7
- Kemp, C., Imler, J.L. (2009): Antiviral immunity in drosophila. *Current opinion in immunology*, 21(1): 3–9 p. doi:10.1016/j.coi.2009.01.007
- Kennerdell J. R. and Carthew R. W. (1998): Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that frizzled and frizzled 2 Act in the Wingless Pathway. *Cell* 95, 1017-1026 p.
- Kevei F., Kucsera J. (2010): *Mikrobiológia 1*. JATEPress Kiadó, 301 p.
- Knapp E. and Lewandowski, D. J. (2001): Tobacco mosaic virus, not just a single component virus anymore. *Molecular Plant Pathology* 2 (3), 117–123 p.
- Kopylova E., Noé L., Touzet H. (2012): SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*,28(24):3211-3217 p.
- Kozera B, Rapacz M (2013) Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54:391–406 p.
- Kozomara A., Griffiths-Jones S.(2014): miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42(Database issue):D68-73. doi: 10.1093/nar/gkt1181.
- Krishnamurthy K., Heppler M., Mitra R., Blancaflor E., Payton M., Nelson R. S., Verchot Lubicz J. (2003): The potato virus X TGBp3 protein associates with the ER network for virus cell-to-cell movement. *Virology* 309:135–151 p.
- Lai, E. C., Tomancak, P., Williams, R. W., & Rubin, G. M. (2003): Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biology*, 4(7), R42. <http://doi.org/10.1186/gb-2003-4-7-r42>
- Laity J.H., Lee B.M., Wright P.E. (2001): Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 11, 39–46 p.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., Lopez-Moya, J.J., Burgyan, J. (2006): Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* 25, 2768–2780 p.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyan, J., (2004): Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *The EMBO journal* 23, 876-884 p.

- Langer-Safer, P.R., Levine, M., Ward, D.C. (1982): Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79, 4381-4385 p.
- Lartey R.T., Voss T.C., Melcher U. (1996): Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Mol Biol Evol.*, 13(10):1327-1338 p. PubMed PMID: 8952077.
- Laubinger, S., Sachsenberg, T., Zeller, G., Busch, W., Lohmann, J. U., Ratsch, G., & Weigel, D. (2008): Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(25): 8795–8800 p. <http://doi.org/10.1073/pnas.0802493105>
- Lazarowitz, S.G. and Beachy, R.N. (1999): Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell*, 11, 535–548 p.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854 p.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., Kim, V. N. (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20):4051–4060 p. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
- Lefkowitz, E.J., Adams, M.J., Davison, A.J., Siddell, S.G., Simmonds, P. (2017): *Virus Taxonomy: Online 10th Report of International Committee on Taxonomy of Viruses*. <https://talk.ictvonline.org/>
- Leisner, S.M., and Howell S.H. (1993): Long-distance movement of viruses in plants. *Trends in Microbiology* 1(8):314-317 p.
- Lewandowski D.J., Dawson W.O. (2000): Functions of the 126- and 183-kDa proteins of tobacco mosaic virus. *Virology*, 271(1):90-98 p. PubMed PMID: 10814574.
- Li, J., Brader, G. , Kariola, T. and Tapio Palva, E. (2006): WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant Journal*, 46: 477-491 p. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02712.x
- Li, X., An, M., Xia, Z., Bai, X., Wu, Y. (2017). Transcriptome analysis of watermelon (*Citrullus lanatus*) fruits in response to Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) infection. *Scientific Reports*. 7:16747, DOI: 10.1038/s41598-017-17140-4.
- Lim L.P., Glasner M.E., Yekta S., Burge C.B., Bartel D.P. (2003a): Vertebrate microRNA genes *Science*, 299, 1540 p.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Weinstein, E. G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M. W., Bartel, D. P. (2003b): The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development*, 17(8), 991–1008 p. <http://doi.org/10.1101/gad.1074403>

- Lingel A., Sattler M. (2005): Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Curr Opin Struct Biol.* 15(1):107-115 p. Review. PubMed PMID:15718141.
- Liu, J., Yang, J., Bi, H. and Zhang, P. (2014a): Why mosaic? Gene expression profiling of African cassava mosaic virus-infected cassava reveals the effect of chlorophyll degradation on symptom development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56, 122-132 p.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. (2012): Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012: 251364. doi: 10.1155/2012/251364.
- Liu Q., Feng Y., Zhu Z. (2009): Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct Integr Genomics.*, 9(3):277-286 p. doi: 10.1007/s10142-009-0111-5.
- Liu X.M., An J., Han H.J., Kim S.H., Lim C.O., Yun D.J., Chung W.S. (2014b): ZAT11, a zinc finger transcription factor, is a negative regulator of nickel ion tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* 33, 2015–2021 p.
- Liu X.M., Nguyen X.C., Kim K.E., Han H.J., Yoo J., Lee K., Kim M.C., Yun D.J., Chung W.S. (2013) Phosphorylation of the zinc finger transcriptional regulator ZAT6 by MPK6 regulates Arabidopsis seed germination under salt and osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430, 1054–1059 p.
- 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*, 25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609.
- Loake G., Grant M. (2007): Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol.*, 10(5):466-472 p. PubMed PMID: 17904410.
- Lu J, Du ZX, Kong J, Chen LN, Qiu YH, Li GF, Meng XH, Zhu SF. (2012): Transcriptome analysis of *Nicotiana tabacum* infected by Cucumber mosaic virus during systemic symptom development. *PLoS One*, 7(8):e43447. doi:10.1371/journal.pone.0043447.
- Maia I.G., Séron K., Haenni A.L., Bernardi F. (1996): Gene expression from viral RNA genomes. *Plant Mol Biol.*, 32(1-2):367-391 p. Review. PubMed PMID: 8980488.
- MacFarlane S.A. (1999): Molecular biology of the tobnaviruses. *J Gen Virol.*, 80(11):2799-2807 p. Review. PubMed PMID: 10580040.
- Marathe R, Guan Z, Anandalakshmi R, Zhao H, Dinesh-Kumar SP. (2004): Study of Arabidopsis thaliana resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray. *Plant Mol Biol.* 55(4):501-520 p. PubMed PMID: 15604696.
- Margis R, Fusaro AF, Smith NA, Curtin SJ, Watson JM, Finnegan EJ, Waterhouse PM (2006): The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett* 580:2442–2450 p.

- Martín-Hernández A.M., Baulcombe D.C.(2008): Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. *J Virol.*, 82(8):4064-4071. doi: 10.1128/JVI.02438-07.
- Maule A.J., Escaler M., Aranda M.A. (2000): Programmed responses to virus replication in plants. *Mol Plant Pathol.*, 1(1):9-15 p. doi: 10.1046/j.1364-3703.2000.00002.x.
- Maule A., Leh V., Lederer C.(2002): The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr Opin Plant Biol.*, 5(4):279-284 p. Review. PubMed PMID: 12179959.
- Mayer, A.(1886): Über der Mosaikkrankheit des Tabaks. *Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen.* 32, 45–467 p.
- Memelink J., van der Vlugt C.I., Linthorst H.J., Derks A.F., Asjes C.J., Bol J.F. (1990): Homologies between the genomes of a carlavirus (lily symptomless virus) and a potexvirus (lily virus X) from lily plants. *J Gen Virol.*, 71 (4):917-924 p. PubMed PMID: 2129538.
- Melnyk C.W., Molnar A., Bassett A., Baulcombe D.C. (2011): Mobile 24 nt small RNAs direct transcriptional gene silencing in the root meristems of *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol.* 21(19):1678-1683 p. doi: 10.1016/j.cub.2011.08.065.
- Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A., Matzke, A. J. (2000): Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19, 5194–5201 p.
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., Lakatos, L., Silhavy, D. (2006): Double-Stranded RNA Binding May Be a General Plant RNA Viral Strategy To Suppress RNA Silencing. *Journal of Virology*, 80 (12):5747–5756 p. <http://doi.org/10.1128/JVI.01963-05>
- Milne R.G. (1988) Taxonomy of rod-shaped filamentous viruses. 3–50 p. In: Milne R.G. (Szerk.) *The plant viruses: the filamentous plant viruses*, vol 4. New York: Plenum Press, 423 p.
- Mitra R., Krishnamurthy K., Blancaflor E., Payton M., Nelson R. S., Verchot-Lubicz J. (2003): The Potato virus XTGBp2 protein association with the endoplasmic reticulum plays a role in but is not sufficient for viral cell-to-cell movement. *Virology* 312: 35–48 p.
- Mlotshwa S, Pruss GJ, Peragine A, Endres MW, Li J, Chen X, Poethig RS, Bowman LH, Vance V (2008): DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in *Arabidopsis*. *PLOS One* 3:e1755.
- Moissiard G, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O (2007): Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA* 13:1268–1278 p.
- Molnar A, Csorba T, Lakatos L, Varallyay E, Lacomme C, Burgyan J. (2005): Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol* 79:7812–7818 p.

- Molnar A., Melnyk C.W., Bassett A., Hardcastle T.J., Dunn R., Baulcombe D.C. (2010): Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 328(5980):872-875. doi: 10.1126/science.1187959.
- Morozov, S. Yu., Gorbulev, V. G., Novikov, V. K., Agranovsky, A. A., Kozlov, Yu. V., Atabekov, J. G., Baev, A. A. (1981): The primary structure of the 5'- and 3'-terminal regions of the RNA of potato virus X. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 259, 723-725 p.
- Morozov S.Yu., Solovyev A.G., Kalinina N.O., Fedorkin O.N., Samuilova O.V., Schiemann J., Atabekov J.G. (1999): Evidence for Two Nonoverlapping Functional Domains in the Potato Virus X 25K Movement Protein. *Virology*, 260(1):55-63 p., ISSN 0042-6822
- Muhammad K.Q., Tsanko S.G., Neerakkal S., Jacques H. (2013): The zinc finger protein ZAT11 modulates paraquat-induced programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Physiologiae Plantarum* 35, 1863–1871 p.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., and Summers, M. D. (eds.) (1995): *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Springer Verlag, Vienna: Arch. Virol. Suppl. 10, 1-586 p.
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S. (2003): Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.*, 33(5):887-898 p. PubMed PMID: 12609030.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R.(1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell*. 2(4):279-289 p.
- Nayudu MV (2008): *Plant viruses*. Tata Mc Graw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi, 1249 p.
- Ngo H., Tschudi C., Gull K., Ullu E. (1998): Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 14687-14692 p.
- Oláh E., Pesti R., Taller D., Havelda Z., Várallyay É. (2016): Non-targeted effects of virus-induced gene silencing vectors on host endogenous gene expression. *Archives of virology* 161(9): 2387-93 p. DOI: 10.1007/s00705-016-2921-9
- Oosthuizen K., Coetzee B., Maree H. J., Burger J. T. (2016): First Report of Grapevine Syrah virus 1 in South African Grapevines. *Plant disease*, 100 (6):1252 p.
- O'Reilly E. K., Kao C. C. (1998): Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology*. 252(2): 287-303 p.

- Oster S.K., Wu B., White K.A. (1998): Uncoupled expression of p33 and p92 permits amplification of tomato bushy stunt virus RNAs. *J Virol.*, 72(7):5845-5851. PubMed PMID: 9621045
- Padmanabhan, M.S., Goregaoker, S.P., Golem, S., Shiferaw, H. and Culver, J.N. (2005): Interaction of the tobacco mosaic virus replicase protein with the Aux/IAA protein PAP1/IAA26 is associated with disease development. *J. Virol.* 79, 2549–2558 p.
- Padmanabhan, M.S., Kramer, S.R., Wang, X. and Culver, J.N. (2008): Tobacco mosaic virus replicase–auxin/indole acetic acid protein interactions: reprogramming the auxin response pathway to enhance virus infection. *J. Virol.* 82, 2477–2485 p.
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M., Vaucheret, H. (1997): Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *The EMBO journal*, 16(15):4738–4745 p. doi:10.1093/emboj/16.15.4738
- Pallas V, García JA. (2011): How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J Gen Virol.*, 92(12):2691-2705p. doi:10.1099/vir.0.034603-0
- Panaviene Z., Baker J.M., Nagy P.D. (2003). The overlapping RNA-binding domains of p33 and p92 replicase proteins are essential for tombusvirus replication. *Virology* 308, 191–205 p.
- Park M.Y., Wu G., Gonzalez-Sulser A., Vaucheret H., Poethig R.S. (2005): Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci.*, 102(10):3691-3696 p. PubMed PMID: 15738428
- Paudel D.B., Sanfaçon H. (2018): Exploring the Diversity of Mechanisms Associated With Plant Tolerance to Virus Infection. *Front Plant Sci.*, 9:1575. doi:10.3389/fpls.2018.01575.
- Paul K., Deák Z., Csösz M., Purnhauser L. and Vass I. (2011): Characterization and Early detection of Tan Spot Disease in Wheat in vivo with Chlorophyll Fluorescence Imaging. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(1): 87-90 p.
- Paul, K., Pauk, J., Deák, Z., Sass, L., Vass, I. (2016): Contrasting response of biomass and grain yield to severe drought in cappelle desprez and plainsman v wheat cultivars. *PeerJ* 4, e1708. <http://doi.org/10.7717/peerj.1708>
- Pesti R., Kontra L., Paul K., Vass I., Csorba T., Havelda Z., Várallyay É. (2019): Differential gene expression and physiological changes during acute or persistent plant virus interactions may contribute to viral symptom differences. *PLOS ONE* 14(5): e0216618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216618>
- Phukan, U. J., Jeena, G. S., & Shukla, R. K. (2016): WRKY Transcription Factors: Molecular Regulation and Stress Responses in Plants. *Frontiers in plant science*, 7:760. doi:10.3389/fpls.2016.00760

- Pieterse C.M., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Van Wees S.C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol.* 5 (5):308-316 p. doi: 10.1038/nchembio.164. Review. PubMed PMID: 19377457.
- Ploeg, A.T., Asjes, C.J. Brown, D.J.F. (1991): Tobacco rattle virus serotypes and associated nematode vector species of Trichodoridae in the bulb-growing areas in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology* (1991) 97(5):311-319 p. <https://doi.org/10.1007/BF01974226>
- Poojari S., Lowery T., Rott M., Schmidt A-M., Úrbez-Torres J. R. (2016): First Report of Grapevine Pinot gris virus in British Columbia, Canada. *Plant Disease*, 100 (7): 1513 p.
- Postnikova O.A., Nemchinov L.G. (2012): Comparative analysis of microarray data in *Arabidopsis* transcriptome during compatible interactions with plant viruses. *Viol J.*, 9:101. doi: 10.1186/1743-422X-9-101.
- Qu, F., Ren, T., Morris, T.J. (2003): The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J Virol* 77(1):511-22 p.
- Rajendran K.S., Nagy P.D. (2003): Characterization of the RNA-binding domains in the replicase proteins of tomato bushy stunt virus. *J Virol.*, 77(17): 9244-9258 p. PubMed PMID: 12915540
- Ratcliff, F., Harrison, B. D., Baulcombe, D. C. (1997): A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276, 1558–1560 p.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., Bartel, D.P. (2002): MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 16, 1616–1626 p.
- Robatzek, S. and Somssich, I.E. (2001): A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defense-related processes. *Plant J.*, 28(2):123–133 p.
- Robatzek, S. and Somssich, I.E. (2002): Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes & development*, 16, 1139-1149 p.
- Rochon D.M., Johnston J.C. (1991) Infectious transcripts from cloned cucumber necrosis virus cDNA: evidence for a bifunctional subgenomic mRNA. *Virology* 181: 656-665 p.
- Rojas, C.M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V. and Mysore, K.S. (2014): Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science*, 5:17, doi: 10.3389/fpls.2014.00017.
- Romano N, Macino G. (1992): Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol.*, 6(22):3343-3353 p. PubMed PMID: 1484489.

- Roossinck M. J. (2010): Lifestyles of plant viruses. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1548):1899–1905 p. doi:10.1098/rstb.2010.0057
- Rozanov M. N., Koonin E.V., Gorbalenya A. E. (1992): Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*. 73: 2129-3214 p.
- Rubino, L., Burgyan, J., Russo, M. (1995): Molecular cloning and complete nucleotide sequence of carnation Italian ringspot tobravirus genomic and defective interfering RNAs. *Arch. Virol.* 140:2027–2039 p.
- Ruiz-García A. B., Sabaté J., Lloria O., Laviña A., Batlle A., and Olmos A. (2017): First Report of Grapevine Syrah virus-1 in Grapevine in Spain. *Plant Disease*, 101(10):1830-1830 p.
- Ruiz-García A. B. and Olmos A. (2017): First Report of Grapevine Pinot gris virus in Grapevine in Spain. *Plant Disease* 101 (6):1070 p.
- Russo M., Burgyan J., Martelli G. P. (1994): *Molecular Biology of Tombusviridae*, Editor(s): Maramorosch K., Murphy F. A., Shatkin A. J., In *Advances in Virus Research*, Academic Press, 44: 381-428 p., ISSN 0065-3527
- Sablowski R.W., Meyerowitz E.M. (1998): A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell.*, 92(1):93-103 p. PubMed PMID:9489703.
- San Segundo-Val I., Sanz-Lozano C.S. (2016): Introduction to the Gene Expression Analysis. In: Isidoro García M. (eds) *Molecular Genetics of Asthma. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 1434:29-43 p. doi:10.1007/978-1-4939-3652-6_3
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I. and Estelle, M. (2009): Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* 5, 301–307 p.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M., and Wisman, E. (2001): Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 13:113-123 p.
- Schertl, P., Cabassa, C., Saadallah, K., Bordenave, M., Saviouré, A. and Braun, H. (2014), Biochemical characterization of proline dehydrogenase in Arabidopsis mitochondria. *FEBS J*, 281: 2794-2804 p. doi:10.1111/febs.12821
- Schmelzer, K. (1957): Untersuchungen über den Wirtspflanzenkreis des Tabakmauche-Virus. *Phytopathol. Z.*, 30:281—314 p.
- Schmidlin L., DE Bruyne E., Weyens G., Lefebvre M., Gilmer D. (2008): Identification of differentially expressed root genes upon rhizomania disease. *Mol Plant Pathol.*, 9(6):741-751 p. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00498.x.

- Scholthof H.B, Scholthof K. B., Jackson A. O. (1995a): Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. *Plant Cell* 7: 1157-1172 p.
- Scholthof, K. B., Scholthof, H. B., Jackson, A. O. (1995b): The tomato bushy stunt virus replicase proteins are coordinately expressed and membrane associated. *Virology* 208, 365–369 p.
- Scholthof K, Scholthof HB, Jackson AO (1993): Control of Plant Virus Diseases by Pathogen-Derived Resistance in Transgenic Plants. *Plant Physiol* 102: 7-12 p.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. (2002): Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal*, 31: 279–292 p. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01359.x
- Skulachev M.V., Ivanov P.A., Karpova O.V., Korpela T., Rodionova N.P., Dorokhov Y.L., Atabekov J.G. (1999): Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the tobamovirus subgenomic RNA I(2). *Virology*, 263(1):139-154 p. PubMed PMID: 10544089.
- Senthil G., Liu H., Puram V.G., Clark A., Stromberg A., Goodin M.M. (2005): Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses. *J Gen Virol.* 86(9):2615-2625 p. PubMed PMID: 16099921.
- Seo, J.K., Kim, M.K., Kwak, H.R., Choi, H.S., Nam, M., Choe, J., Choi, B., Han, S.J., Kang, J.H., Jung, C. (2018): Molecular dissection of distinct symptoms induced by tomato chlorosis virus and tomato yellow leaf curl virus based on comparative transcriptome analysis. *Virology*, 516:1-20. doi: 10.1016/j.virol.2018.01.001.
- Seo, J.K., Kim, K.H. (2016): Long-Distance Movement of Viruses in Plants. 153-172 p. In: Wang A., Zhou X. (Szerk.): *Current Research Topics in Plant Virology*. Switzerland: Springer International Publishing, 335 p. DOI 10.1007/978-3-319-32919-2_6
- Seo J.K., Wu J., Lii Y., Li Y., Jin H. (2013): Contribution of small RNA pathway components in plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact*, 26(6):617-25. doi: 10.1094/MPMI-10-12-0255-1A. Review. PubMed PMID: 23489060, PubMed Central PMCID: PMC3752434.
- Shen, Binzhang & Goodman, Howard. (2004): Uridine Addition After MicroRNA-Directed Cleavage. *Science* (New York, N.Y.). 306. 997 p. 10.1126/science.1103521.
- Silber, G., and Burk, L. G. (1965): Infectivity of Tobacco Mosaic Virus stored for Fifty Years in Extracted, 'Unpreserved' Plant Juice. *Nature* 206, 740-741 p.

- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M., Burgyan, J. (2002): A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *The EMBO journal* 21, 3070-3080 p.
- Skryabin K.G., Morozov S.Yu., Kraev A.S., Rozanov M.N., Chernov B.K., Lukasheva L.I., Atabekov J.G. (1988): Conserved and variable elements in RNA genomes of potexviruses. *FEBS Lett.*,240(1-2): 33-40 p. PubMed PMID: 3191997
- Sonenberg N., Shatkin A.J., Ricciardi R.P., Rubin M., Goodman R.M. (1978): Analysis of terminal structures of RNA from potato virus X. *Nucleic Acids Res.*, 5(7): 2501-2512 p. PubMed PMID: 673859
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L. (2004): Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437 p.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P. and Green, P.J. (2004): AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* 15(2):173-183 p.
- Southern E, Mir K, Shchepinov M. (1999): Molecular interactions on microarrays. *Nat.Genet.Suppl*, 21:5-9 p. PubMed PMID: 9915493.
- Sulzinski, M.A., Gabard, K., Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1985): Replication of tobacco mosaic. VIII. Characterization of a third subgenomic TMV RNA. *Virology*, 145, 132–140 p.
- Sunkar, R., Girke, T., Jain, P.K., Zhu, J.K. (2005): Cloning and characterization of microRNAs from rice. *The Plant cell* 17, 1397-1411 p.
- Sunkar, R., Zhu, J.-K. (2004): Novel and Stress-Regulated MicroRNAs and Other Small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(8), 2001–2019 p.
- Szeberényi József (2014): *Molekuláris sejtbológia. Dialóg Campus Kiadó - Nordex Kft.* 355 p. ISBN 978-615-5376-44-3
- Szittya, G., Molnár, A., Silhavy, D., Hornyik, C., Burgyán, J. (2002): Short Defective Interfering RNAs of Tombusviruses Are Not Targeted but Trigger Post-Transcriptional Gene Silencing against Their Helper Virus. *The Plant Cell*, 14(2):359–372 p. <http://doi.org/10.1105/tpc.010366>
- Szittya, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z. and Burgyan, J. (2003): Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J.* 22, 633–640 p.
- Stare T, Stare K, Weckwerth W, Wienkoop S, Gruden K. (2017): Comparison between Proteome and Transcriptome Response in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Leaves Following Potato Virus Y (PVY) Infection. *Proteomes*. 5(3):E14. doi: 10.3390/proteomes5030014.
- Strathmann A., Kuhlmann M., Heinekamp T., Dröge-Laser W. (2001): BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4,

- and is functionally involved in flower development. *Plant J.*, 28(4):397-408. PubMed PMID: 11737777
- Tang G., Reinhart B.J., Bartel D.P., Zamore P.D. (2003): A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.*, 17(1):49-63 p. PubMed PMID: 12514099
- Trapnell C., Roberts A., Goff L., Pertea G., Kim D., Kelley D.R., Pimentel H., Salzberg S.L., Rinn J.L., Pachter L. (2012): Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7:562.
- Thimm, O., Essigmann, B., Kloska, S., Altmann, T., and Buckhout, T. J. (2001): Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol.* 127:1030-1043 p.
- Tolia, N.H. and Joshua-Tor, L. (2007): Slicer and the argonautes. *Nat.Chem. Biol.* 3, 36–43 p.
- Torii, K. U. (2004): Leucine-Rich Repeat Receptor Kinases in Plants: Structure, Function, and Signal Transduction Pathways. *International Review of Cytology Volume 234*, 1–46 p. doi:10.1016/s0074-7696(04)34001-5
- Torii, K. U., and Clark, S. E. (2000): Receptor-like kinases in plant development. *Adv. Bot. Res.* 32, 225–267 p.
- Tóth G. (2013): Kvantitatív Real-Time PCR, 120-144. p. In: Tamás L., Fodor F., Nyitrai P., Oszvald M., Rudnóy Sz., Sárvári É., Solti Á., Szigeti Z., Tóth G. (Szerk.): *Növényélettani vizsgáló módszerek*. Budapest: Eötvös Loránd Tudományegyetem, 165 p.
- Tzfira, T., Rhee, Y., Chen, M.H., Kunik, T., Citovsky, V., 2000. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annual review of microbiology* 54, 187-219 p.
- Valon C., Smalle J., Goodman H.M., Giraudat J. (1993): Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene (TMKL1) encoding a putative transmembrane protein with an unusual kinase-like domain. *Plant Mol Biol.*, 23(2):415-21 p. PubMed PMID: 8219075.
- van Kammen A. (1997): Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. *Trends Plant Sci* 2: 409-411 p.
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. (2008): Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5):619-626 p. doi:10.2144/000112776. Review. PubMed PMID: 18474036.
- Varallyay E, Valoczi A., Burgyan, J., Havelda Z. (2009) Vírusos fertőzés indukálta génexpressziós változások vizsgálata növényekben. *Növényvédelem*, 45(3):109-114 p.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyan, J., Hall, T.M. (2003): Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115, 799-811 p.

- Vaucheret H. (2008): Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.*, 13(7):350-358 p. doi: 10.1016/j.tplants.2008.04.007.
- Verchot J., Angell S.M., Baulcombe D.C. (1998): In vivo translation of the triple gene block of potato virus X requires two subgenomic mRNAs. *J Virol.*, 72(10):8316-8320 p. PubMed PMID: 9733876
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A. and Klessig, D.F. (2009): Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 47: 177–206 p.
- Vogelmann, K., Drechsel, G., Bergler, J., Subert, C., Philippar, K., Soll, J., Engelmann J.C., Engelsdorf T., Voll L.M., Hoth, S. (2012): Early senescence and cell death in *Arabidopsis* *saul1* mutants involves the PAD4-dependent salicylic acid pathway. *Plant physiology*, 159(4):1477–1487 p. doi:10.1104/pp.112.196220
- Voinnet, O. (2001): RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17, 449–459 p.
- Voinnet O. (2008): Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr Opin Plant Biol* 11: 464-470 p.
- Voinnet O., Baulcombe D.C. (1997): Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, 389(6651):553 p. PubMed PMID: 9335491.
- Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D.C. (2000): A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103 (1), 157–167 p.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., Baulcombe, D. C. (1999): Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24):14147–14152 p. doi:10.1073/pnas.96.24.14147
- Voinnet O., Vain P., Angell S., Baulcombe D.C. (1998): Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, 95(2):177-187 p. PubMed PMID: 9790525.
- Wagmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K., Citovsky, V. (2004): The Ins and Outs of Nondestructive Cell-to-Cell and Systemic Movement of Plant Viruses. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(3):195–250 p.
- Walker, J. C. (1994): Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 26(5):1599–1609 p. doi:10.1007/bf00016492
- Wang, D., and Maule, A. J. (1995): Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. *Science* 267, 229–231 p.
- Wang, L.Y., Lin, S. S., Hung, T. H., Li, T. K., Lin, N. C., Shen, T. L. (2012): Multiple Domains of the Tobacco mosaic virus p126 Protein Can Independently Suppress Local and Systemic

- RNA Silencing. *Molecular plant-microbe interactions (MPMI)* 25(5):648-657 p.
<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0155>.
- Wang, Z., Gerstein M. and Snyder M. (2009): RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10:57–63 p.
- Watanabe, T., Honda, A., Iwata, A., Ueda, S., Hibi, T., Ishihama, A. (1999): Isolation from tobacco mosaic-infected tobacco of a solubilized template-specific RNA-dependent RNA polymerase containing a 126K/183K protein heterodimer. *J. Virol.* 73, 2633-3640 p.
- Whenham, R.J., Fraser, R.S.S., Brown, L.P. and Payne, J.A. (1986): Tobacco-Mosaic-Virus-induced increase in abscisic-acid concentration in Tobacco-leaves intracellular location in light and dark-green areas, and relationship to symptom development. *Planta*, 168:592–598 p.
- White K.A., Skuzeski J.M., Li W., Wei N., Morris T.J. (1995): Immunodetection, expression strategy and complementation of turnip crinkle virus p28 and p88 replication components. *Virology*, 211(2):525-534 p. PubMed PMID: 7645256
- Whitham SA, Yang C, Goodin MM. (2006): Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact.* 19(11):1207-1215 p.
- Whitham, S. A., Quan, S., Chang, H.-S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X., and Hou, Y. M. (2003): Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* 33:271-283 p.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855–862 p.
- Wingard S.A. (1928): Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *J Agric Res.*, 37:127–153 p.
- Winston W.M., Molodowitch C., Hunter C.P. (2002): Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295(5564):2456-2459. PubMed PMID: 11834782.
- Woo, H.R., Kim, H.J., Nam, H.G. and Lim, P.O. (2013): Plant leaf senescence and death – regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of Cell Science*, 126, 4823-4833 p.
- Wu C., You C., Li C., Long T., Chen G., Byrne M.E., Zhang Q. (2008): RID1, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 105, 12915–12920 p.
- Wyckoff, E. E. (1993): Inhibition of host cell protein synthesis in poliovirus-infected cells. *Semin. Virol*, 4, 209–215 p.

- Xiao, H.J., Liu, K.K., Li, D.W., Arisha, M.H., Chai, W.G. and Gong, Z.H. (2015): Cloning and characterization of the pepper CaPAO gene for defense responses to salt-induced leaf senescence. *BMC Biotechnology*, 15, 100.
- Xie Z, Johansen L.K, Gustafson A.M., Kasschau K.D., Lellis A.D., Zilberman D., Jacobsen S.E., Carrington J.C. (2004): Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLOS Biol* 2:e104.
- Yang C., Guo R., Jie F., Nettleton D., Peng J., Carr T., Yeakley J.M., Fan J.B., Whitham S.A. (2007): Spatial analysis of arabidopsis thaliana gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact.* 20(4):358-370 p.
- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A. and Huang, H. (2006): SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *Plant J* 47(6), 841-50 p.
- Yu B., Yang Z., Li J., Minakhina S., Yang M., Padgett R.W., Steward R., Chen X. (2005): Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307(5711):932-935 p. PubMed PMID: 15705854
- Zaitlin M. (1999): Elucidation of the genome organization of tobacco mosaic virus. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B* 354, 587-591 p.
- Zhang, X.R., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J., Chua, N. H. (2006): Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 20:3255–3268 p.
- Zhao, J., Zhang, X., Hong, Y., Liu, Y. (2016): Chloroplast in Plant-Virus Interaction. *Frontiers in microbiology*, 7:1565. doi:10.3389/fmicb.2016.01565
- Zhu, X., Chen, J., Qiu, K. and Kuai, B. (2017): Phytohormone and Light Regulation of Chlorophyll Degradation. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Zimmern, D. (1975): The 5' end group of tobacco mosaic virus RNA is m⁷G5' ppp5' Gp. *Nucleic Acids Res.* 2 (7):1189-201 p.
- Zvereva A.S., Pooggin M.M. (2012): Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses*, 4(11):2578-97. doi:10.3390/v4112578. Review. PubMed PMID: 23202495, PubMed Central PMCID:PMC3509663.

HTTP1: <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/>

HTTP2: <https://viralzone.expasy.org/>

HTTP3:<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html#>

HTTP4: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

HTTP5: <https://mapman.gabipd.org/mapmanstore>

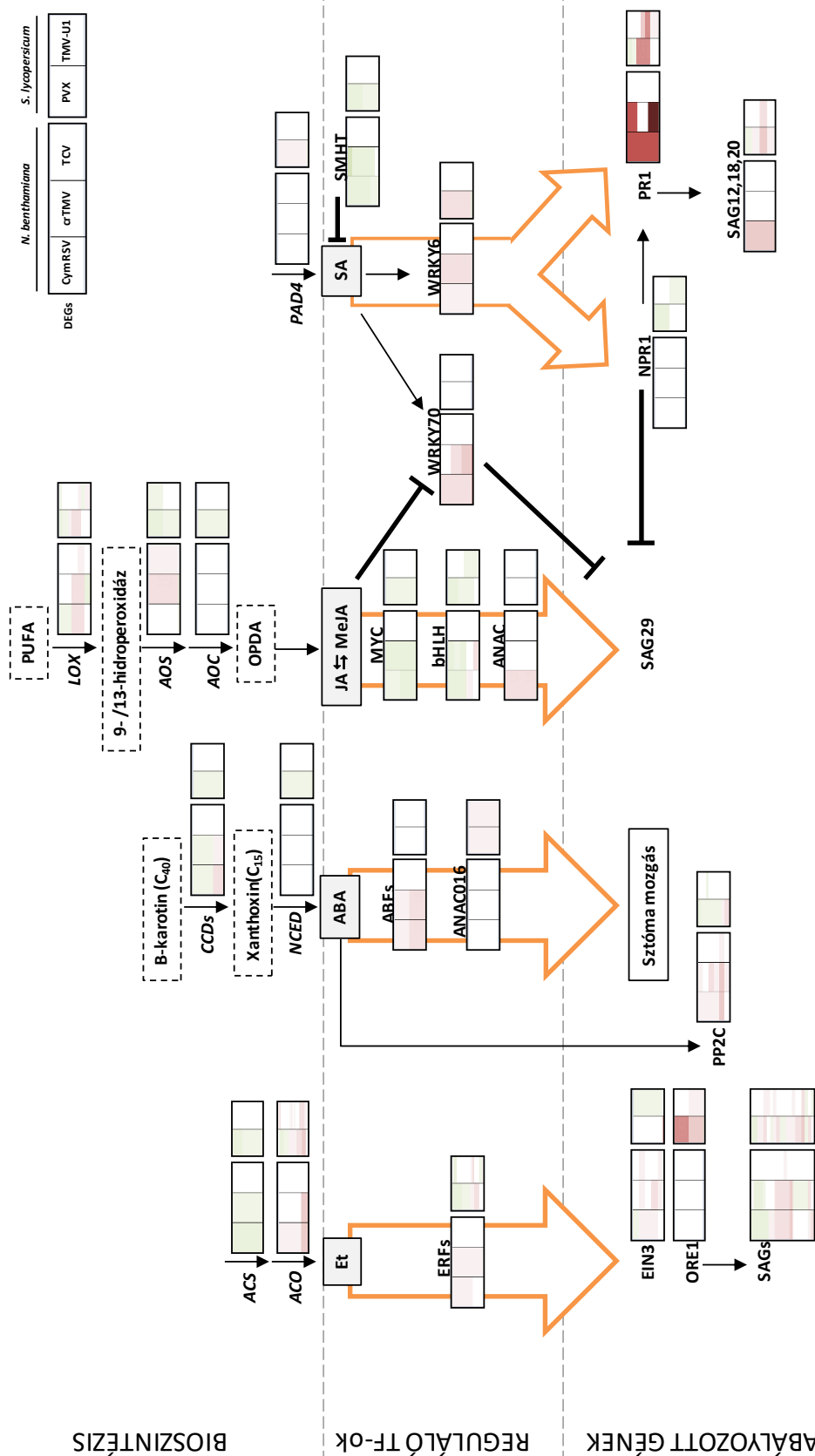
M2. A klónozáshoz használt indítószekvenciák

Vírus szekvenciák		
Vírus	Indító szekvencia (5'-3')	Szekvencia NCBI azonosítója
		régió, méret (bp)
crTMV	F:GATGAATTCTAATGGCACAATTTCAACAAAC	JQ319720.1
	R:GCTAGGCCTATTGGATCCCCGCTTCAAC	68-3391, 3323 bp
CymRSV	F:ATGGCAATGACAACACTACCAAC	X15511.1
	R:CTACAGAAGTGTTGCAGCATTTG	2629-3771, 1142 bp
CIRV	F:ACCGGTTATCGGACTGTCTAGTGC	X85215.3
	R:ACCCCGGGCTGCATTTCTGCAATGTTCC	3608-4763, 1155 bp
TCV	F:AATCTAGAATGGAAAATGATCCTAGAG	M22445.3
	R:CCGTACTAAATTCTGAGTGC	2743-3804, 1061 bp
PVX	F:GGACATGAAGGTGCCCAC	KJ534604.1
	R:GAAACTGGGGTAGGCGTC	5850-6397, 547bp

<i>N.benhamiana</i> endogén gének				
Gének	Indítószekvencia (5'-3')	Szekvencia NCBI azonosítója	Indító szekvensziák származása	Módszer
		régió, méret (b)		
Rubisco	F:CTTTCCTCTGCAGCAGTTGCC	X02353.1	Havelda et al. 2008	northern
	R:GCACTTGACGCACGTTGTCG	1063-1943, 881 bp		
Gapdh	F:TCTCAAATATGACTCCACCC	AB937979.1	Havelda et al. 2008	northern
	R:ACCCCATTCATTGTCATACC	330-1152, 823 bp		
CP29	F:CTGGACGGGAGTCTCGTCGGCG	NM_001325178.1	Havelda et al. 2008	northern
	R:GCAAAGCCCAAGAAGGCAACC	181-753, 572 bp		
PR1	F:TTCCTGTCTCTACACTTCTC	X06361.1	Ez a munka	northern
	R:TCAGATCATACATCAAGCTG	474-1156, 680bp		
PR-Q	F:GACAACTACGATTGCAGAAG	M29868.1	Ez a munka	northern
	R:GCAATAGCTTCATCACTCAA	1-959, 959 bp		
SAR	F:CTACAATAACCCAAGCAATG	XM_016646007.1	Ez a munka	northern
	R:GTAGTAGAATCTATGCAATG	116-533, 404 bp		
GST	F:GGCAGAAGTGAAGTTGCTTGG	AY206006.1	Havelda et al. 2008	northern
	R:CCAATTGTAGTTATGCACTTAACATC	3-326, 324 bp		
PAO	F:GTGAGAAGCGCATCAATAAG	XM_016628974.1	Ez a munka	northern
	R:TGACCATCCATGATATGAAC	1-600, 600 bp		
CESA	F:TGGAGAAGCAGAGAATGAGC	XM_016660141.1	Ez a munka	qRT-PCR
	R:GCACTCCAAGCCACAAATCC	3592-3718, 127 bp		
CWINV	F:CTCTGTAGTGGAAAGTTTTGG	XM_016656491.1	Ez a munka	qRT-PCR
	R:GCTTCTTTGCCATTGTTGAAG	1666-1782, 117 bp		
AGO4A	F:TCCTCCTTGGTGGAGAAGTCTAG	DQ321490.1	Fátyol et al, 2016	northern
	R:TTAACAGAAGACATGGAAGTAGAAACAT	1228-2736, 1509bp		

<i>S.lycopersicum</i> endogén gének				
Gének	Indítószekvencia (5'-3')	Szekvencia NCBI azonosítója	Indító szekvensziák származása	Módszer
		régió, méret (b)		
Rubisco	F: GCCCTTCATCTAAGATGAGGC	X05982.1	Oláh et al. 2016	northern
	R: TCGCTAAGCAATTGCTCATCG	158-690, 532bp		
Gapdh	F: TCTCAAATATGACTCCACCC	XM_004236801.2	Oláh et al. 2016	northern
	R: ACCCCATTCAATTGTCATACC	443-1265, 822bp		
CP29	F: GATTTCGGATTCGGACAGAAA	XM_004246277.3	Oláh et al. 2016	northern
	R: GCAAAGCCCAAGAAGGCAACC	151-819, 669 bp		
EF	F: TGCTTTTCTGGAACGGGAAGG	XM_004248991.3	Ez a munka	qRT-PCR
	R: TGGCTTTGATCCACCTTGGG	544-659, 116 bp		
hiszton	F: GAGGCAAGGGTTTGGGAAAGG	XM_004241430.3	Ez a munka	qRT-PCR
	R: TCTTCACTCCACCTCTTCTCG	85-201, 117 bp		
GST	F: GGCAGAAGTGAAGTTGCTTGG	XM_004246333.3	Ez a munka	northern
	R: GCGTATTAAGCTCGCTGTCTC	55-838, 785 bp		
HSP20	F: GACTTAATGTTCCCACAAG	XM_004230361.3	Ez a munka	northern
	R: TSRTCAGAAATACTAATCAC	203-624, 422 bp		
PR1	F: ATTATGCCAACTCAAGAGC	NM_001247385.2	Ez a munka	qRT-PCR
	R: CGATACCCACAATTGCACGGC	223-338, 116 bp		
SAR	F: CAAGAGAGATGAATTCTGAGG	XR_743362.2	Ez a munka	qRT-PCR
	R: CCAAGATTCCTCAGTAAATGG	102-216, 115 bp		
CESA	F: AGAGGGAGTGCAGAGAGAAA	XM_004243592.3	Seo et al. 2018	qRT-PCR
	R: AGTCGGTATACGGTGGTGATAG	20-111,92 bp		
CWINV	F: GAGTATTGGTTGGGAGTGTGAG	NM_001246913.2	Seo et al. 2018	qRT-PCR
	R: CTGAGTGGAGTGGGTGTTTAG	639-743,105 bp		

M3. A hormonális anyagcserében bekövetkező gén-expressziós változások ábrázolása



8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

PhD munkám elkészüléséhez számos személy hozzájárult, akiknek köszönettel tartozom. Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Várallyay Évának, aki PhD éveim alatt folyamatosan nyomonkövette és segítette munkámat, valamint lehetőséget adott arra, hogy elsajátíthassam a legkorszerűbb molekuláris biológiai módszereket. Tovább köszönettel tartozom Dr. Vass Imrének és Dr. Kenny Paulnak a klorofill fluoreszcencia és a levél hőmérséklet mérésekben nyújtott segítségéért, valamint Dr. Kontra Leventének az RNS szekvenálások bioinformatikai elemzéséért. Köszönöm a mindennapos közös munkát és a jó hangulatot a volt és a jelenlegi Diagnosztika és Növény Fejlődésbiológia csoport összes munkatársának. Végül, nem lehetek elég hálás családomnak és barátaimnak a támogatásáért és szeretetéért.