

## A ZSÍRSAV-DESZATURÁZ GÉNEK AKTIVÁLÓDÁSA PAPRIKA LEVELEKBEN TOBAMOVÍRUS FERTŐZÉSEK HATÁSÁRA

Balogh Eszter, Juhász Csilla, Dankó Tamás, Fodor József, Tóbiás István és Gullner Gábor

ATK Növényvédelmi Intézet, 1022 Budapest, Herman Ottó út 15.

A Tobamovírus nemzetségbe számos gazdaságilag jelentős kórokozó vírus tartozik, amelyek a paprikát is károsítják. A tobamovírusok pozitív szálú RNS vírusok, amelyek replikációja a gazdasejt membránjaihoz kötött replikációs komplexekben zajlik. A növényi membránok szerkezetét nagymértékben befolyásolja a membránt alkotó zsírsavak telítetlensége, melyet a membránba beépült zsírsav-deszaturáz (FAD) enzimek aktivitása határoz meg. A vírus RNS replikációja érzékeny a membrán szerkezetére, ezért a FAD enzimek működése hozzájárulhat a kórokozó elleni védekezéshez azáltal, hogy a vírus replikáció számára kedvezőtlen változást idéznek elő a zsírsav-összetételben. Munkánk során hat paprika (*Capsicum annuum* L.) FAD gén expresszióját vizsgáltuk meg Óbuda paprika vírussal (*Obuda pepper virus*, ObPV) (inkompatibilis kölcsönhatás) és Paprika enyhe foltosság vírussal (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) (kompatibilis kölcsönhatás) fertőzött, az  $L^3$  rezisztenciagént kifejező paprikalevelekben. Az ObPV fertőzés hatására több omega-6-FAD gén expressziója erőteljesen indukálódott, míg a PMMoV fertőzés hatására kevésbé jelentős változásokat figyeltünk meg. Megvizsgáltuk a paprika levelek zsírsav-összetételének a változásait is a tobamovírus fertőzések után, és kimutattuk a linolsav (C18:2) mennyiségének megemelkedését az ObPV-fertőzött levelekben. Feltételezzük, hogy az erőteljesen és gyorsan aktiválódó paprika FAD gének olyan omega-6-FAD enzimek kódolnak, amelyek az ObPV replikáció számára kedvezőtlen körülményeket teremtenek a membrán lipidek szerkezetében.

**Kulcsszavak:** linolsav, membrán lipid, paprika, tobamovírus, zsírsav-deszaturáz enzim, zsírsav-összetétel

A paprikának (*Capsicum annum* L.) 45 vírusos betegsége ismert (Horváth és Beczner 1983, Edwardson és Christie 1997), ezek közül Magyarországon eddig tizenháromat írtak le (Horváth és mtsai 2000, Salamon 2006), melyek közül hét kórokozó a *Tobamovirus* nemzetségbe tartozik (Salamon 2006). A legnagyobb gazdasági jelentőséggel a dohány mozaikvírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV), a paradicsom mozaikvírus (*Tomato mosaic virus*, ToMV), a paprika enyhe foltosság vírus (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) valamint az eredetileg a ToMV egyik törzseként azonosított Óbuda paprika vírus (*Obuda pepper virus*, ObPV) rendelkeznek (Csilléry és mtsai 1983, Horváth és mtsai 2000, Salamon 2006). A tobamovírus fertőzésekkel szemben a leghatékonyabb védekezési mód a rezisztens fajták termesztésbe

vonása. Az ellenállóság hátterét a gazdanövényben található rezisztencia (*R*) gének jelenléte adja (Culver és mtsai 1991). Paprika esetében a tobamovírusokkal szembeni rezisztencia forrását az ún. *L*-lókusz különböző alléljai ( $L^1 - L^4$ ) adják. Az egyes allélok dominánsan öröklődnek és különböző vírusfajok (izolátumok) hatására váltanak ki hiperszenzitív reakciót (Horváth és mtsai 2004).

A tobamovírusok genomja egy kb. 6400 nukleotidból álló, pozitív szálú RNS, mely négy fehérjét kódol. A fertőzést követően egyes növényi membránok (leggyakrabban az endoplazmatikus retikulum membrán) szerkezete megváltozik, zsebszerű membrán-befüzdések vagy a membránból leváló vezikulumok alakulnak ki. Ezekben a védett, membránokhoz kötött replikációs komplexekben történik

a tobamovírusok replikációja. A replikáció így elszigetelődik a növényi sejt posztranzkripcióis géncsendesítő rendszerétől (Ishibasi és mtsai 2010). A vírus RNS szintézise ezért igen érzékeny a membrán szerkezetére, melyet a lipid-összetétel, ezen belül is a telítetlen zsírsavak aránya határoz meg. A telítetlen zsírsavak kialakulását a membránba beépült zsírsav-deszaturáz (fatty acid desaturase, FAD) enzimek katalizálják. A FAD enzimek alakítják ki a zsírsav oldalláncokban található kettős-kötéseket. A zsírsavakban a telítetlen kötések kialakítása több lépésben zajlik és az egyes lépéseket más-más FAD enzimek katalizálják (Los és Murata 1998).

A növényi FAD enzimek fontos szerepet játszanak a növények biotikus stresszre adott válaszaiban (Yaeno és mtsai 2004; Upchurch 2008). A FAD enzimek szerepét a vírusok elleni védekezésben élesztő modellben bizonyították, amelyben egy endoplazmatikus retikulumban található delta-9-FAD enzimet kódoló gén módosítása gátolta a *Rozsnok mozaikvírus* RNS replikációját (Lee és mtsai 2001). Kimutatták továbbá, hogy az *Arabidopsis* ssi2 mutánsai egy olyan FAD enzimet kódolnak, mely aktiválja a szalicilsav-függő védekezési útvonalat és egyben elnyomja a jázmonsav által szabályozott utat. A mutáns növényekben megemelkedett az olajsav (C18:1) mennyisége, melynek hatására aktiválódnak a patogén elleni védelmi mechanizmusok, pl. a programozott sejthalál (Kachroo és mtsai 2001, Kachroo és mtsai 2003). Paprikában eddig egy zsírsav-deszaturázt kódoló génről (*Ca-FAD1*) bizonyították, hogy inkompatibilis kölcsönhatás esetén nagymértékben aktiválódik. Amennyiben ezt a gént transzgenikus úton (géncsendesítéssel) inaktívvá tették, akkor a vírusfertőzés hatására fellépő hiperszenzitív reakció intenzitása csökkent, a vírus replikáció mértéke pedig nőtt a növényekben. Ezek alapján a *Ca-FAD1* gén jelentős mértékben hozzájárul a vírusellenes védekezési folyamatokhoz (Kim és mtsai 2007).

Saját vizsgálataink során egy *L*<sup>3</sup>-rezisztenciagént hordozó paprikafajta leveleit fertőztük kétféle tobamovírral, ObPV-vel és PMMoV-vel. Korábbi vizsgálataink során kimutattuk,

hogy az ObPV fertőzés erőteljesen indukálta több lipoxigenáz gén kifejeződését paprika levelekben, míg a PMMoV csak gyenge hatást mutatott (Gullner és mtsai 2010, Juhász és mtsai 2015). A lipoxigenáz enzimek a telítetlen zsírsavak oxidációját képesek katalizálni, így részt vesznek a vírusfertőzést követő lipid peroxidációban illetve a növények jelátviteli folyamataiban. Mivel a lipoxigenázok szubsztrátjait, a telítetlen zsírsavakat a FAD enzimek termelik, ezért megvizsgáltuk a FAD enzimeket kódoló gének expresszióját ObPV- és PMMoV-fertőzött paprika levelekben, hogy össze tudjuk hasonlítani a kompatibilis és inkompatibilis paprika-vírus kölcsönhatást. Párhuzamos kísérletekben megvizsgáltuk a linolsav (C18:2) mennyiségét is a vírusfertőzött levelekben.

## Anyag és módszer

Tesztnövényként az *L*<sup>3</sup> rezisztenciagént hordozó TL 1791 paprikafajtát használtuk. A növényeket normál üvegházi körülmények között neveltük és két hónappal a vetés után használtuk föl a kísérletekhez. A paprika leveleket kétféle tobamovírral (ObPV és PMMoV) fertőztük 3 középső levélen a Rys és mtsai (2014) által közölt módszer szerint. A vírusfertőzésekkel párhuzamosan desztillált vizes ál-fertőzéseket (mock-inokulációkat) is végeztünk. Az ObPV izolátum Magyarországról, a PMMoV izolátum pedig az USA-ból (Louisiana) származott (Tóbiás és mtsai 1989, Rys és mtsai 2014). A fertőzött növényeket nevelőkamrákban 22 °C-os hőmérsékleten tartottuk 16/8 órás nappal/éjszaka ciklusban. A fertőzéseket követően különböző időpontokban mintákat vettünk RNS izoláláshoz, illetve lipid-kivonáshoz.

A mesterséges fertőzéseken kívül kémiai kezeléseket is végeztünk, melyek során 15 mm átmérőjű paprika levélkorongokat úsztattunk 10, 20 és 50 mM koncentrációjú hidrogénperoxid oldatok felszínén, Petri-csészékben. A korongokat nevelőkamrákban 22 °C-os hőmérsékleten inkubáltuk. A kezeléseket követően különböző időpontokban mintát vettünk a levelekből RNS-izoláláshoz.

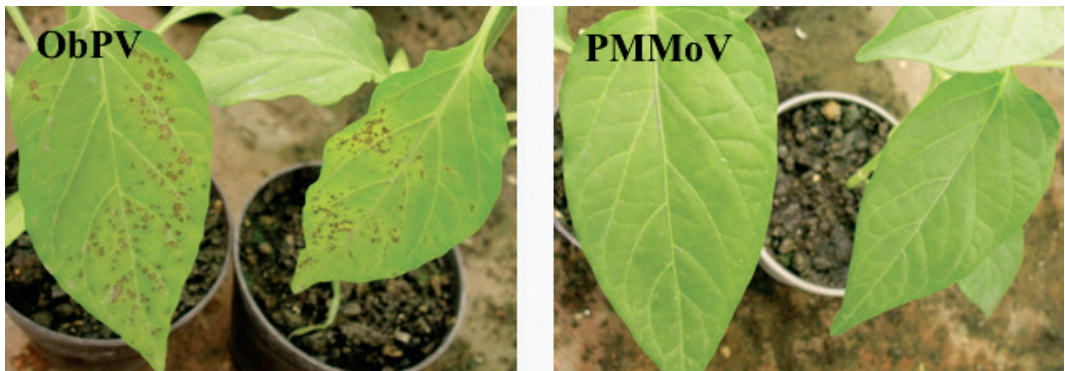
Az össz-RNS kivonást paprika levelekből (100 mg) az RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) használatával végeztünk el. Az RNS minták minőségét és mennyiségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) ellenőriztük. A reverz transzkripcióhoz (RT) mintaként 1,5 µg össz-RNS-t használtunk fel, és a cDNS minták előállítását a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével végeztük el oligo(dT)18 primert alkalmazva, a gyártó utasításait követve. A *FAD* gének expressziójának mértékét kvantitatív, valós idejű PCR-rel (qPCR) vizsgáltuk. A reakcióhoz a qPCRBIO SyGreen Blue Mix Separate-Rox (PCR Biosystems, London, UK) kítet használtuk. Egy reakcióelegy 10 µl SyGreen Blue Mixet, 0,2 µM forward és reverse primert és 1 µl 10-szeresen hígított cDNS templátot tartalmazott 20 µl végtérfogóban. Az amplifikációhoz a CFX 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System műszert használtuk (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A PCR reakció hőmérsékleti profilja a következő volt: 95 °C, 3 min; 95 °C; 5 sec, a tapadási hőmérsékleten (1. táblázat) 30 sec, 72 °C 45 sec, 40 ciklusban. A cDNS olvadási görbék meghatározásához a 65 °C → 95 °C tartományt vizsgáltuk, 0,5 °C-onként emelkedve.

Referencia génnek egy ubiquitin-konjugáló fehérjét kódoló gént (UBI-3) választottunk. Minden reakciót három technikai ismétlésben végeztünk el. A génextpressziókat a kontrollhoz viszonyított relatív változásait a  $\Delta\Delta Ct$  módszerrel számítottuk ki (Bookout és Mangelsdorf 2003). A *FAD* és UBI-3 primerek szekvenciáit az 1. táblázatban mutatjuk be.

A lipid-kivonás 0,2 g levélanyagból kiindulva Weichert és mtsai (1999) módszere alapján történt. A zsírsavak metilészter származékait Christie (1993) szerint készítettük el. A minták zsírsav-elemzését gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) módszerrel, Hewlett Packard GC 6890 gázkromatográfon, VF-WAXms oszlopon (60 m hosszú, 0,25 mm belső átmérőjű, Agilent Technologies), 1ml/perc hélium vivógáz árammal és HP MSD 5973 (Hewlett Packard) tömegspektrometriás detekálással végeztük el.

## Eredmények és megvitatásuk

A paprikalevelek ObPV fertőzését követően 2–3 nappal nekrotikus léziók jelentek meg a leveleken, amelyek hiperszenzitív reakcióra (HR) utalnak (inkompatibilis paprika–vírus kölcsönhatás). Ezzel szemben a PMMoV fertőzés hatására csak igen gyenge klorotikus tünetek léptek fel, és a vírus erőteljesen replikálódott



1. ábra. A tobamovírus fertőzések tünetei paprika leveleken 5 nappal a fertőzés után. Az inkompatibilis kölcsönhatás esetén (ObPV fertőzés) a HR következtében nekrotikus léziók alakultak ki, míg a kompatibilis kölcsönhatás (PMMoV fertőzés) esetén igen gyenge klorózis volt megfigyelhető.

Figure 1. Visible symptoms of tobamovirus inoculations on pepper leaves 5 days post-inoculation. In the incompatible interaction (ObPV inoculation) HR causes necrotic lesions, whereas in the compatible interaction (PMMoV inoculation) very weak chlorotic symptoms appeared.

(kompatibilis kölcsönhatás). A vírusfertőzések látható tüneteit az *I. ábrán* mutatjuk be. Ezek a tüneti képek megerősítik a korábbi eredményeket (Csilléry és mtsai 1983, Tóbiás és mtsai 1989, Rys és mtsai 2004).

A teljes paprika genomnak már 3 független kutatócsoport is meghatározta a teljes nukleotid sorrendjét (Hulse-Kemp és mtsai 2018), a gének annotációja (azonosítása) is megtörtént és a gén-szekvenciák elérhetőek a National Center for Biotechnology Information (NCBI) honlapján a GenBank és RefSeq adatbázisokban (az annotáció kódszáma: GCF\_000710875). Az NCBI honlapján 33 paprika *FAD* gént sikerült azonosítanunk. A *FAD* gének az alapján csoportosíthatóak, hogy a telítetlen zsírsavak kialakulása során melyik kettős kötést alakítják ki a szénláncon, illetve hogy a sejten belül melyik membránrendszerben helyezkednek el. Több fontos csoportból kiválasztottunk reprezentatív *FAD* géneket, amelyekre gén-specifikus PCR primereket terveztünk. RT-qPCR technikával megvizsgáltuk számos paprika *FAD* gén ObPV vagy PMMoV fertőzések hatására történt expresszió változását. Hat paprika *FAD* gén expressziójának esetében (*FAD1* – *FAD6*) mértünk jelentős változásokat, amelyek NCBI kódszámait az *1. táblázatban* mutatjuk be. Érdekes módon valamennyi gén

olyan *FAD* enzimet kódol, amelyek számítógépes predikció szerint az endoplazmatikus retikulum membránjában helyezkednek el, mint integrális membránfehérjék. A hat *FAD* fehérje közül öt omega-6-*FAD* típusú (*FAD2* – *FAD5*), tehát az olajsavból (C18:1) linolsavvá (C18:2) történő átalakulást katalizálják. Ezzel szemben egy *FAD* fehérje omega-3-*FAD* típusú (*FAD1*), amely a linolsavból (C18:2) linolénsavvá (C18:3) történő átalakítást katalizálja.

A vírusfertőzések után 8 órával vizsgáltuk meg először a paprika *FAD* gének expressziójának a változásait qPCR technikával. A PMMoV fertőzés hatására több *FAD* gén expressziója is megemelkedett ebben a korai időpontban, de a növekedés csak a *FAD1* gén esetében volt szignifikáns. A *FAD1* génexpresszió mintegy 4,8-szor volt nagyobb a PMMoV-inokulált levélben, mint a mock-inokuláció esetében (*2. ábra*). Az ObPV fertőzések után 8 órával nem találtunk szignifikáns változásokat. Ezzel szemben az ObPV inokuláció hatására négy omega-6-*FAD* gén (*FAD2*, *FAD3*, *FAD4*, *FAD5*) expressziója igen erőteljesen indukálódott 24 órával a fertőzést követően. Az átlagos indukció mértéke sorrendben 385-, 109-, 201- és 5,8-szoros volt a mock-inokuláció esetén mért értékhez képest (*2. ábra*). A *FAD6*

1. táblázat

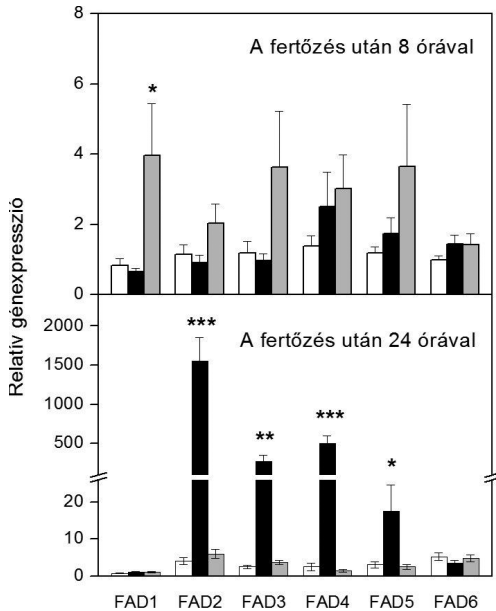
**A vizsgált paprika zsírsav-deszaturáz (*FAD*) génekre és az *UBI-3* referenciagéntre tervezett specifikus primer párok szekvenciái 5' – 3' irányban. A *FAD1*-*FAD6* és az *UBI-3* gének NCBI kódszámai sorrendben: XM\_016720263, XM\_016696154, XM\_016696508, XM\_016696442, XM\_016696421, XM\_016696828 és AY486137.**

Gén	Forward primer	Reverse primer	Termék hossza (bp)	Tapadási hőmérséklet (°C)
<i>FAD1</i>	tcitttccctcagataccaca	atttgtaagcgactactcat	249	60
<i>FAD2</i>	gagggatacgaaggagtg	gatggacataacgatac	196	55
<i>FAD3</i>	aggcaactatagcaatcaagc	cggaagaattcgacacgtacc	248	60
<i>FAD4</i>	caatggaggcaactaaagcta	aaaacatttgccaattccta	215	60
<i>FAD5</i>	actaggagaataactaccaat	tctaaacaagggtgtaatcaac	235	55
<i>FAD6</i>	aggaggcaaccaagctat	tttaggtgaacatttaccca	220	60
<i>UBI-3</i>	tgtccatctgctctgttg	cacccaagcacaataagac	204	60

Table 1. Sequences of gene specific primer pairs in 5' – 3' direction that were used for the detection of pepper fatty acid desaturase (*FAD*) genes and the *UBI-3* reference gene. The NCBI accession numbers of *FAD1*-*FAD6* and *UBI-3* genes are XM\_016720263, XM\_016696154, XM\_016696508, XM\_016696442, XM\_016696421, XM\_016696828 and AY486137, respectively.



gén transzkriptum szintje pedig csak 48 órával az ObPV-inokuláció után indukálódott szignifikáns mértékben (nem közölt adat). A PMMoV fertőzés a 8 óránál későbbi időpontokban már nem befolyásolta a *FAD* gének expresszióját.



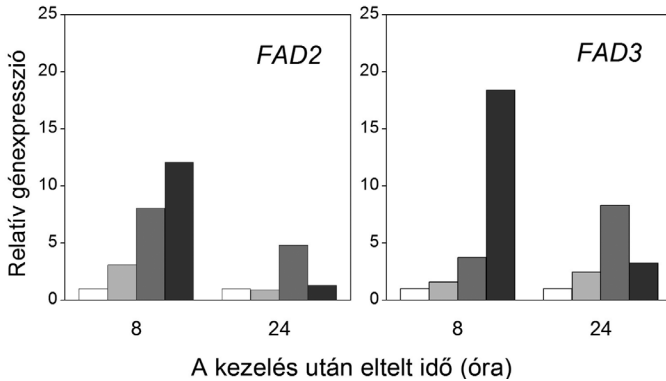
2. ábra. ObPV és PMMoV fertőzések hatásai hat paprika zsírsav-deszaturáz (FAD1 – FAD6) gén expressziójára 8 és 24 órával a fertőzést követően. Referenciagénként egy ubiquitin-konjugáló fehérjét kódoló gént (UBI-3) használtunk. Fehér oszlopok: mock-inokulált levelek; fekete oszlopok: ObPV-fertőzött levelek; szürke oszlopok: PMMoV-fertőzött levelek. A kísérleteket három ismétlésben végeztük el, az ábrán a középértéket és a szórást mutatjuk be. Jelmagyarázat: \*szignifikáns különbség a mock és vírus-inokulációk között  $p < 0,05$  valószínűséggel; \*\*szignifikáns különbség  $p < 0,01$  valószínűséggel; \*\*\*szignifikáns különbség  $p < 0,001$  valószínűséggel. A statisztikai értékeléseket Student-féle t-tesztel végeztük el.

Figure 2. Effects of ObPV and PMMoV inoculations on the expression of six pepper fatty acid desaturase (FAD1 – FAD6) genes 8 and 24 hours post-inoculation. A ubiquitin conjugating protein coding gene (UBI-3) was used as reference gene. Empty columns: mock-inoculated leaves; black columns: ObPV-inoculated leaves; gray columns: PMMoV-inoculated leaves. Mean values of three independent parallel experiments are shown  $\pm$  SD. The symbols \*, \*\* and \*\*\* show significant differences between mock- and virus-inoculated plants at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively. Statistical significance were evaluated by Student's t-test.

A *FAD* gének gyors aktiválódását megfigyelték már szójánál és petrezselyemnél is gomba elicitor kezelést vagy bakteriális fertőzést követően (Kirsch és mtsai 1997; Zou és mtsai 2005). A saját kísérleti eredményeink az endoplazmatikus retikulum membrán-szerkezetének a fontosságát mutatják a tobamovírusokkal fertőzött paprika levelekben, hiszen valamennyi jelentősen indukálódó *FAD* gén az endoplazmatikus retikulumba beágyazódó enzimet kódol. A TMV fertőzött növényekben már korábban kimutatták az endoplazmatikus retikulum membránjainak a szerepét a replikációs komplex kialakulásában (Más és Beachy 1999).

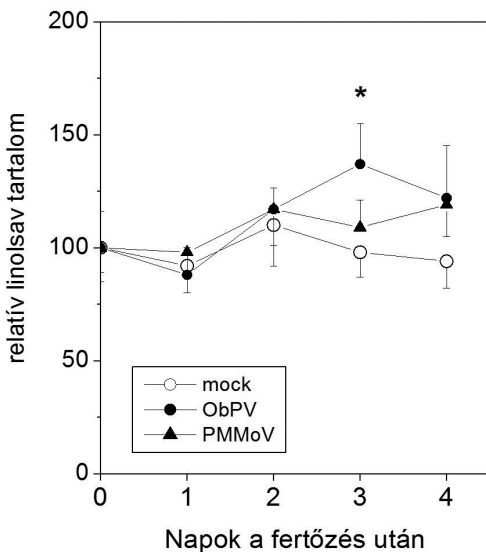
A vírusfertőzött növényi levelekben gyakran megfigyelhető az oxigén redukált, reaktív formáinak (elsősorban a szuperoxidnak és a hidrogén-peroxidnak) a korai felhalmozódása (Hernández és mtsai 2016). Ez az ún. oxidációs stressz az ObPV-inokulált paprikalevelekben is megfigyelhető, míg a PMMoV esetében nem (nem közölt adat). Feltételeztük, hogy az ObPV fertőzés hatására meginduló oxidációs stressz szerepet játszhat a *FAD* gének korai indukációjában is. Ezért megvizsgáltuk a különböző hidrogén-peroxid koncentrációjú oldatokkal történő kezeléseket hatásait a *FAD* génjeinek expressziójára paprika levélkorongokon, RT-qPCR módszerrel. A hidrogén-peroxid kezeléseket néhány órán belül jelentősen megnövelték két *omega-6-FAD* gén (*FAD2* és *FAD3*) expresszióját, és ez a hatás fokozatosan nőtt a hidrogén peroxid emelkedő koncentrációjával (3. ábra). Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a reaktív oxigén származékok felszaporodása a fertőzött levelekben hozzájárulhat a *FAD* gének aktiválódásához.

A qPCR eredményeink szerint a vírusfertőzések hatására döntően az *omega-6-FAD* gének egy csoportja aktiválódott. Ezek a gének olyan *FAD* enzimeket kódolnak, melyek az olajsav (C18:1) – linolsav (C18:2) átalakulást katalizálják. Feltételeztük, hogy ezek a génextpressziós változások a vírusfertőzött paprikalevelek zsírsav-összetételnek a megváltozásában is tükröződnek és GC-MS vizsgálatokat végeztünk ennek bizonyítására.



3. ábra. Különböző koncentrációjú hidrogén-peroxid kezelések hatása két paprika omega-6-zsír-sav-deszaturáz (FAD2 és FAD3) gén expressziós mintázatára. Jelmagyarázatok: fehér oszlopok: vizes kontroll; világosszürke: 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; sötétszürke: 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; fekete: 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  
 Figure 3. The effect of hydrogen peroxide treatments in various concentrations on the expression levels of two pepper omega-6 fatty acid desaturase (FAD2 and FAD3) genes. Explanation of column shades: empty: water control; light grey: 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; dark grey: 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; black: 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A levelek zsír-sav összetételét elemezve az ObPV fertőzés hatására valóban kimutatható volt a linolsav mennyiségének szignifikáns, mintegy 39%-os emelkedése három nappal a fertőzést követően (4. ábra). A PMMoV-fertőzött levelekben nem észleltük a linolsav mennyiségének változását.



lezzük, hogy az omega-6-deszaturáz enzimek szerepet játszanak a paprika levelek vírus-rezisztenciájában azáltal, hogy a membrán szerkezetét a vírus replikáció számára kedvezőtlen módon alakítják át.

**Köszönetnyilvánítás**

A kutatás az NKFIH K-124131 pályázat támogatásával készült. A kísérletben használt TL 1791 paprika vetőmagot dr. Zatykó Lajos (Zöldségtermesztési Kutatóintézet, Budatétény) bocsátotta rendelkezésünkre.

4. ábra. ObPV és PMMoV fertőzések hatásai a paprika levelek linolsav (C18:2) tartalmára. A kísérleteket három ismétlésben végeztük el, az ábrán a középértéket és a szórást mutatjuk be. Jelmagyarázat: \* szignifikáns különbség a mock és az ObPV-inokuláció között p < 0,05 valószínűséggel. A statisztikai értékeléseket Student-féle t-tesztel végeztük el.

Figure 4. Effects of ObPV and PMMoV inoculations on the linoleic acid (C18:2) content of pepper leaves. Mean values of three independent parallel experiments are shown ± SD. The symbol \* shows a significant difference between mock- and ObPV-inoculated leaves at p < 0.05. Statistical significances were evaluated by Student's t-test.

**Következtetések**

Az ObPV-fertőzött, rezisztens paprika levelekben öt FAD gén erőteljesen aktiválódott már egy nappal a fertőzést követően. Ezek a FAD gének az endoplazmatikus retikulum membránjaiban elhelyezkedő omega-6-deszaturázokat kódolják melyek az olajsav–linolsav átalakulást katalizálják. A gén-expressziós vizsgálatokkal összhangban a zsír-sav elemzés kimutatta, hogy az ObPV-fertőzött levelekben megnőtt a linolsav mennyisége. Az omega-6-FAD gének szabályozásában feltételezhető a hidrogén-peroxid, mint jelátvivő anyag szerepe. Az eredmények alapján feltéte-

## IRODALOM

- Bookout, A. L. and Mangelsdorf, D. J.** (2003): Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nucl. Recept. Signal.* 1: e012, 1–7.
- Christie, W.W.** (1993): Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: **Christie, W.W.** (ed.): *Advances in Lipid Methodology – Two*. Oily Press, Dundee. 69–111.
- Csilléry, G., Tóbiás, I. and Ruskó, G.** (1983): A new pepper strain of tomato mosaic virus. *Acta Phytopathol. Hung.*, 18: 195–200.
- Culver, J. N., Lindbeck, A. G. C. and Dawson, W. O.** (1991): Virus-host interactions: induction of chlorotic and necrotic responses in plants by tobamoviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 29: 193–217.
- Edwardson, J.R. and Christie, R.G.** (1997): *Viruses Infecting Peppers and Other Solanaceous Crops*. Agricultural Experiment Station, University of Florida, Gainesville, USA, 770 pp.
- Gullner, G., Künstler, A., Király, L., Pogány, M. and Tóbiás, I.** (2010): Up-regulated expression of lipoxygenase and divinyl ether synthase genes in pepper leaves inoculated with Tobamoviruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 74: 387–393.
- Hernández, J.A., Gullner, G., Clemente-Moreno, M.J., Künstler, A., Juhász, C., Díaz-Vivancos, P. and Király, L.** (2016): Oxidative stress and antioxidative responses in plant-virus interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 94: 134–148.
- Horváth, J. and Beczner, L.** (1983): Viruses of vegetable plants in Hungary and some of their properties. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.*, 18: 237–254.
- Horváth, J., Kazinczi, G., Takács, A., Pribe, D., Bese, G., Gáborjányi, R. and Kadlicskó, S.** (2000): Virus susceptibility and resistance of Hungarian pepper varieties. *Intern. J. Hort. Sci.*, 6: 68–73.
- Horváth, J., Kovács, J., Kazinczi, G. and Takács, A.P.** (2004): Reaction of *Capsicum* genotypes to Obuda pepper virus, Tobacco mosaic virus and Cucumber mosaic virus. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 23: 117–120.
- Hulse-Kemp, A.M., Maheshwari, S., Stoffel, K., Hill, T.A., Jaffe, D., Williams, S.R., Weisenfeld, N., Ramakrishnan, S., Kumar, V., Shah, P., Schatz, M.C., Church, D.M. and Van Deynze, A.** (2018): Reference quality assembly of the 3.5-Gb genome of *Capsicum annuum* from a single linked-read library. *Hortic. Res.*, 5: 4.
- Ishibashi, K., Nishikiori, M. and Ishikawa, M.** (2010): Interactions between tobamovirus replication proteins and cellular factors: their impacts on virus multiplication. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 23: 1413–1419.
- Juhász, C., Tóbiás, I., Ádám, A.L., Kátay, G. and Gullner, G.** (2015): Pepper 9- and 13-lipoxygenase genes are differentially activated by two tobamoviruses and by hormone treatments. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 92: 59–69.
- Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E.J. and Klessig, D.F.** (2001): A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 9448–9453.
- Kachroo, A., Lapchyk, L., Fukushige, H., Hildebrand, D., Klessig, D. and Kachroo, P.** (2003): Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid and jasmonic acid-mediated defense pathways in the *Arabidopsis* ssi2 mutant. *Plant Cell*, 15: 2952–2965.
- Kim, K.J., Lim, J.H., Lee, S., Kim, Y.J., Choi, S.B., Lee, M.K., Choi, D. and Paek, K.H.** (2007): Functional study of *Capsicum annuum* fatty acid desaturase 1 cDNA clone induced by Tobacco mosaic virus via microarray and virus-induced gene silencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362: 554–561.
- Kirsch, C., Hahlbrock, K. and Somssich, I. E.** (1997): Rapid and transient induction of a parsley microsomal delta-12 fatty acid desaturase mRNA by fungal elicitor. *Plant Physiol.*, 115: 283–289.
- Lee, W.M., Ishikawa, M. and Ahlquist, P.** (2001): Mutation of host  $\Delta 9$  fatty acid desaturase inhibits brome mosaic virus RNA replication between template recognition and RNA synthesis. *J. Virol.*, 75: 2097–2106.
- Los, D.A. and Murata, N.** (1998): Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1394: 3–15.
- Más, P. and Beachy, R.N.** (1999): Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J. Cell. Biol.*, 147: 945–958.
- Rys, M., Juhász, C., Surówka, E., Janeczko, A., Saja, D., Tóbiás, I., Skoczowski, A., Barna, B. and Gullner, G.** (2014): Comparison of a compatible and an incompatible pepper-tobamovirus interaction by biochemical and non-invasive techniques: chlorophyll a fluorescence, isothermal calorimetry and

- FT-Raman spectroscopy. *Plant Physiol. Biochem.*, 83: 267–278.
- Salamon P.** (2006): Növények és vírusok kapcsolatai a paprika (*Capsicum*)-tobamovírus patoszisztémákban. Doktori (PhD) Értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Doktori Iskola.
- Tóbiás I., Fraser R. S. S. and Gerwitz, A.** (1989): The gene-for-gene relationship between *Capsicum annuum* L. and tobacco mosaic virus: effects on virus multiplication, ethylene synthesis and accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 35: 271–286
- Upchurch, R.G.** (2008): Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol. Lett.*, 30: 967–977.
- Weichert, H., Stenzel, I., Berndt, E., Wasternack, C. and Feussner, I.** (1999): Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves – preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS Lett.*, 464: 133–137.
- Yaeno, T., Matsuda, O. and Iba, K.** (2004): Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant J.*, 40: 931–941.
- Zou, J., Rodriguez-Zas, S., Aldea, M., Li, M., Zhu, J., Gonzalez, D.O., Vodkin, L.O., DeLucia, E. and Clough, S.J.** (2005): Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 18: 1161–1174.

## INDUCTION OF FATTY ACID DESATURASE GENES IN PEPPER LEAVES FOLLOWING TOBAMOVIRUS INOCULATIONS

**E. Balogh, Cs. Juhász, T. Dankó, J. Fodor, I. Tóbiás and G. Gullner**

*Plant Protection Institute, Centre for Agricultural Research  
1022 Budapest, Herman Ottó út 15, Hungary*

The genus *Tobamovirus* includes many virus species with great agronomic importance and many of them also infects pepper. Tobamoviruses are positive-strand RNA viruses, and their replication occurs in viral replication complexes, which are bound to intercellular membranes of host plants. The structure of host membrane lipids is greatly influenced by the level of their unsaturated fatty acid chains. The biosynthesis of unsaturated fatty acids is catalyzed by various fatty acid desaturase (FAD) enzymes. Efficient viral replication heavily depends on the structure of membrane lipids including their desaturation level. Hence, the activity of FAD enzymes may also influence the rate of virus replication and FADs may play a role in pathogen defense through the regulation of fatty acid composition. In the present study the expression of six pepper (*Capsicum annuum* L.) FAD genes were evaluated in pepper leaves infected with *Obuda pepper virus* (ObPV) (incompatible interaction) and *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (compatible interaction). We used a pepper cultivar harbouring the  $L^3$  resistance gene. The ObPV inoculation markedly induced the expression of several *omega-6-FAD* genes, while PMMoV inoculation exerted a smaller effect on FAD genes. The fatty acid composition of virus infected pepper leaves was also evaluated and increased level of linoleic acid (C18:2) was detected in ObPV-inoculated leaves. We suppose that the marked activation of pepper omega-6 fatty acid desaturase genes can induce changes in the host membrane lipid composition that are unfavorable to ObPV replication.

**Keywords:** fatty acid composition, fatty acid desaturase, linoleic acid, membrane lipid, pepper, tobamovirus

*Érkezett: 2019. június 6.*