

EGY MOLEKULÁRIS NÖVÉNYKÓRTANI VIZSGÁLATOK CÉLJÁRA JAVASOLHATÓ NÖVÉNY–GOMBA KÖLCSÖNHATÁS

Tóth Evelin, Czuppon Bálint, Fodor József, Bozsó Zoltán és Pogány Miklós

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

Email: pogany.miklos@agrar.mta.hu

*Növénybiológiai kutatásaink egyik alapvető modellszervezete a *Nicotiana benthamiana*. A faj molekuláris növénykórtani célokra történő felhasználását tovább erősítené egy olyan növénypatogén gomba alkalmazása, mely a növényen specifikus tüneteket okoz és laboratóriumi körülmények között könnyen és megbízhatóan használható. Munkánkban bemutatjuk, hogy a *Cercospora nicotianae* hemibiotróf dohánykórokozó gomba hatékonyan fertőzi a *N. benthamiana* egyedeit. A laboratóriumi vizsgálatok céljára eddig nem elterjedt *N. benthamiana*–*C. nicotianae* gazda–parazita kapcsolatot a molekuláris növénykórtani és kóréletani kutatások kézenfekvő modellrendszere lehet.*

Kulcsszavak: *Cercospora*, *Nicotiana benthamiana*, valós idejű PCR, szingulett oxigén, növényi hormonok

Egy Ausztráliában honos vad dohány, a *Nicotiana benthamiana* Domin (Goodspeed 1954) az egyik leggyakrabban alkalmazott tesztnövény növényvirológiai kutatásokban (Chakrabarty és mtsai 2007, Obrepalska-Stepłowska és mtsai 2013, Fan és mtsai 2014, Senthil-Kumar és Mysore 2015). A *N. benthamiana* vírusfogékonysága látványosan nagyobb a többi dohányfajhoz képest, melynek hátterében feltehetően egy RNS-függő RNS-polimerázt kódoló gén mutációja áll (Yang és mtsai 2004). A mutáció következtében az enzim nem működőképes, ami mérsékli a géncsendesítés folyamatát, és végső soron a vírus RNS-ek degradációját. A Web of Science bibliográfiai adatbázisban a *N. benthamiana* dohányra vonatkozó találatok mintegy fele (1540) az elmúlt 5 évben megjelent munkákra vonatkozik. Ennek hátterében nem pusztán a tudományos tartalmú közlemények elektronikus formájú elterjedése áll, mert más fontos vírusdiagnosztikai tesztnövények (*Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana clevelandii*) esetében nem tapasztalható hasonló mértékű növekedés

a találatok számában az elmúlt éveket szemügyre véve. Milyen okokra vezethető vissza a *N. benthamiana* tudományos munkákban történő felhasználásának nagyfokú emelkedése? A *N. benthamiana* egyrészt hatékony szervezetnek bizonyult más fajokból származó fehérjék kifejeztetésére rekombináns növényi vírusvektorok közreműködésével (Klimyuk és mtsai 2014, Moon és mtsai 2014). Részben a növényvírus-alapú vektorok kifejlesztése segítette később a vírus-indukált géncsendesítés (VIGS) módszerének felfedezését, ami szintén remekül használható *N. benthamiana* növényekben, és kiváló eszköz növényi gének szerepének tanulmányozására (Bubici és mtsai 2015, Senthil-Kumar és Mysore 2015). A *N. benthamiana* jól használható továbbá idegen fehérjék transziens kifejeztetésére bináris plazmidot hordozó *Agrobacterium tumefaciens* sejtszuszpenzióval történő infiltráció (agroinfiltráció) révén a kérdéses fehérjék funkciójának, illetve sejten belüli lokalizációjának megállapítására, vagy nagyobb mennyiségben való termeltetésére (Goodin és mtsai 2008, Ding és mtsai 2014).

Mindezek az okok eredményezték azt, hogy a *N. benthamiana* mára a növénybiológia egyik alapvető modellszervezetévé vált.

A növénypatogén vírusokkal ellentétben csak viszonylag kevés olyan kórokozó gombafaj ismert, mely specifikus tüneteket okoz *N. benthamiana* növényeken és laboratóriumi körülmények között is jól használható. Laboratóriumi körülmények közötti fertőzésére többnyire az alábbi fonalas szerveződésű kórokozók használatosak: a biotróf *Erysiphe cichoracearum* (Xiao és mtsai 2003) és *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina* (Hall 1989), valamint a hemibiotróf és nekrotróf *Colletotrichum* spp. (Dean és mtsai 2002), *Phytophthora* spp. (Becktell és mtsai 2006, Rajput és mtsai 2014), *Sclerotinia sclerotiorum* (Veluchamy és mtsai 2012), és *Botrytis cinerea* (Asai és Yoshioka 2009).

A *Cercospora nicotianae* Ellis & Everhart a közönséges dohány (*Nicotiana tabacum* L.) jól ismert kórokozója trópusi és szubtrópusi éghajlatú területeken, a dohány cercosporás levélfoltosságát (békaszem betegség) okozza (Alasoadura és Fajola 1970, Shew és Lucas 1991). Hemibiotróf kórokozó, kezdetben élő növényi szövetet kolonizál, majd a kolonizáció előrehaladtával sejthalált indukál és nekrotroffá válik (Daub és mtsai 2013). Konídiumok segítségével szaporodó (anamorf) gomba, az ivaros alakja nem ismert, de valószínűleg tömlősgomba, mint más *Cercospora* fajok (Sivanesan 1985). A cercosporás levélfoltosság kialakulása szorosan összefügg a gomba toxintermelésével (Upchurch és mtsai 1991). A *Cercospora* fajok által termelt cercosporin fénysugárzás hatására gerjesztődik, és a levegő oxigénjével reagálva aktív oxigén formák, elsősorban szingulett oxigén termelődését váltja ki (Daub és Ehrenshaft 2000). Az aktív oxigén átjárhatóvá teszi a sejtmembránokat, tápanyagforrást biztosítva a gomba sejtközötti járatokban található hifái számára.

A nemzetközi szakirodalomban mindössze egy korábbi utalás található arra vonatkozóan, hogy a *N. benthamiana*–*C. nicotianae* kölcsönhatást kísérletes körülmények között alkalmazták (Nielsen és mtsai 1992). Egy

cukorrépából származó kitináz hatását vizsgálták transzgenikus *N. benthamiana* növényekben, tesztelve azok cercosporás levélfoltossággal szembeni ellenállóságát. Tekintettel arra, hogy a kitináz gén beépítése nem befolyásolta a növények ellenállóságát cercosporával szemben, az észlelt tünetek és a kölcsönhatás egyéb részleteinek bemutatása nem szerepel a fenti közleményben.

Tehát a *N. benthamiana* cercosporás levélfoltossággal szemben mutatott érzékenységének részletes jellemzése eddig nem történt meg, és a kórélettani célokra való felhasználása egyáltalán nem terjedt el.

Munkánkban ismertetjük a *N. benthamiana*–*Cercospora nicotianae* kölcsönhatást. A fertőzöttség mértékét az elhalt levélfelület arányának megállapításával és kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qPCR) segítségével határoztuk meg. Hogy bizonyítsuk alapvető növényi hormonok jelátvitelének fontosságát a kórfolyamatban, egy szalicilsav analóggal, egy etilénbioszintézist gátló vegyülettel és jázmonsavval végeztünk kezeléseket.

Anyag és módszer

Növénynevelés, a kórokozó fenntartása, inokuláció

A kísérletekhez használt *N. benthamiana* és *N. tabacum* növényeket üvegházban neveltük virágföld és tőzeg 1:1 arányú keverékét tartalmazó cserepekben. A 16 óra nappalhosszúság érdekében kiegészítő megvilágítást alkalmaztunk. A növények fertőzésére 8-12 hetes korukban került sor.

A fertőzéses vizsgálatokhoz a *C. nicotianae* ATCC® 18366™ izolátumát (Ehrenshaft és Daub 1994) alkalmaztuk. A gomba fenntartását és a fertőzéshez használt inokulum előállítását Beckman és Payne (1983) alapján végeztük. A tartós tenyészeteket ferdeagaros kémcsőben, burgonya-dextróz agar (PDA) táptalajon, paraffin olaj alatt tároltuk 20 °C hőmérsékleten. A fertőzés előtt Petri-csészékben, PDA táptalajra oltva tenyésztettük a gombát szobahőmérsékleten. Ilyen körülmények között a gomba csak micé-

liumot képez. A konídiumtermelés elősegítése érdekében a PDA táptalajon nőtt friss micéliumból steril vízzel szuszpenziót készítettünk, amit V8 agar lemezre szélesztettünk és 16 órás napi megvilágítás mellett 18–20 °C hőmérsékleten 7 napig inkubáltunk. A V8 táptalaj az alábbiak szerint készült: egy doboz (300 ml) V8 zöldséglevet 4,5 g kalcium-karbonáttal összekevertünk, majd lecentrifugáltunk (3000 rpm, 10 min). A felülszót ötszöröseére hígítottuk desztillált vízzel és 1,5% agar hozzáadása után kuktában 15 percig főztük. A konídiumokat a táptalaj felületéről ecset segítségével mostuk le kuktában sterilizált 0,2% zselatin oldatban. Az így nyert szuszpenziót három réteg gézen átszűrtük, és Bürker-féle sejtszámláló kamra segítségével 5×10^4 konídium/ml sűrűségűre állítottuk be a fertőzés előtt. A szuszpenziót szükség esetén a fenti zselatin oldattal hígítottuk és kézi permetezővel megcsorgásig permeteztük a növények felületére. Az inokulált cserpes növényekre átlátszó nejlonzacskót húztunk a magas páratartalom biztosítása érdekében, majd azokat egy kevés vizet tartalmazó tálcán négy napra növénynevelő kamrába helyeztük 27 °C állandó hőmérséklet és 16 órás napi megvilágítás mellett. Ezt követően a növényeket üvegházba helyeztük vissza. A kórokozó fertőzőképességének fenntartásához tapasztalataink szerint időnként célszerű inokulált és tüneteket mutató növény leveléről visszaizolálni a gombát. Ennek során tüneteket mutató leveldarabokat vágunk ki, melyeket Petri csészében nedves szűrőpapírra helyeztünk, és 20 °C hőmérsékleten, 16 óra napi megvilágítás mellett 3 napig inkubáltunk. A sporuláló gombatelepekből csipesz segítségével óvatosan, sztereomikroszkóp alatt mintát vettünk, amit steril körülmények között PDA táptalajra helyeztünk.

Gombabiomassza meghatározása valós idejű PCR-rel

A cercospórával fertőzött *N. benthamiana* növényeknek 4 alsó és 4 felső levelemeletéről, a *N. tabacum* növények esetében pedig 3 alsó és 3 felső levelemeletről gyűjtöttünk be levélmintát három független biológiai ismétlésben. A leveleket folyékony nitrogénben fagyasztottuk le

és –70 °C-on tároltuk. Folyékony nitrogénben való eldörzsölést követően a mintákban található növényi és gomba eredetű DNS-t GE Healthcare Nucleon Phytopure kit segítségével vontuk ki a termékhez csatolt használati útmutató leírását követve. A DNS-minták koncentrációját egységesen 10 ng/ml DNS-tartalomra hígítottuk. Fertőzött növényi mintáinkban relatív gombabiomassza mennyiséget határoztunk meg hányadost képezve a különböző fajú és élettani állapotú levelek gomba és növényi DNS-re kapott értékeiből. Az azonos mintákban található növényi és gomba DNS mennyiségét külön reakciókban követtük nyomon. A minták növényi és gomba genomi DNS-tartalmát C1000Touch Thermal Cycler PCR készülék és CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) segítségével mértük a gyártó útmutatását követve. Mintáinkban a gomba-DNS mennyiségét a *C. nicotianae aktin* szekvenciára (GenBank: JX143144.1) tervezett primerpár segítségével határoztuk meg: Fw 5'-CAGGAAGGAG GAGCTGACAT-3'; Rev 5'-AGTCCTT CTGGCCCATACC-3'. A termék 140 nukleotid hosszú. Növényi DNS-ünk mennyiségét dohány (*N. tabacum*) *aktin* szekvenciára (GenBank: X69885.1) specifikus primerpárral vizsgáltuk: Fw 5'-CGGAATCCACGAGACTACATAC-3'; Rev 5'-GGGAAGCCAAGATAGAGC-3'. A termék hossza 230 nukleotid. PCR vizsgálatainkat a KAPA BIOSYSTEMS SYBR FAST qPCR Master Mix felhasználásával folytattuk. Három független biológiai minta DNS kivonatát mértük három-három technikai ismétlésben, melyeknek számtani átlagát és a standard hibát tüntettük fel. Az eredmények statisztikai elemzését egytényezős varianciaanalízissel és LSD-próbával végeztük.

Hormonkezelések

Kilenc hetes, üvegházban nevelt *N. benthamiana* növények föld feletti részét az inokulumhoz kevert 0,35 mM acibenzolar-S-metillel (szalicilsav-analóg), 0,1 mM aminos-toxi-vinil-glicinnel (etilén bioszintézis-gátló) és 1mM metil-jázmonsav hormonnal kezeltük a

fertőzéssel egy időben. Minden kezelést nyolc növényen végeztünk el, a kísérletet kétszer ismételtük meg. A kezeléseket által előidézett tüneti változásokat úgy számszerűsítettük, hogy a fertőzött leveleken kifejlődött nekrotikus területét viszonyítottuk a teljes levélfelülethez. A Gimp képszerkesztő program hisztogram funkciója segítségével meghatároztuk az inokulált levelek felületét adó teljes képpont értéket és a nekrotikus tüneteket mutató levélrészek képpont értékét, majd a kétféle hányadosát számítottuk ki.

Szingulett oxigén szenzor használata

A cercospórával fertőzött levelekben a Singlet Oxygen Sensor Green (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) fluoreszkáló reagenst használtuk a szingulett oxigén kimutatására. A reagenst először metanolban oldottuk fel, így 5 mM-os törzsoldatot kaptunk, amiből desztillált vízzel hígítást végeztünk, elkészítve a vizsgálatokhoz használt 1,5 mM végkoncentrációjú oldatot. A fertőzött levelek lemezéből 3–4 mm × 3–4 mm-es darabokat vágunk, majd a levéldarabok színére ráhelyeztünk 1–1 cseppet a fluoreszkáló reagensből. Ezeket fénytől védve 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, azután fedőlemezletakartuk és Olympus BX51 típusú fluoreszcens mikroszkóppal, 470–490 nm/515 nm excitációs/emissziós szűrők beiktatásával vizsgáltuk.

Eredmények

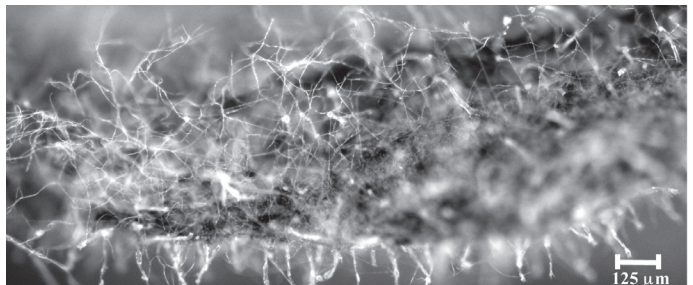
A N. benthamiana a C. nicotianae gazdanövénye

A cercospórák levélfoltosság tünetei a kilenc hetes *N. benthamiana* növények alsó, idősebb levelein jelentek meg leghamarabb. Három-négy nappal az inokuláció után (tehát a 27 °C-on történő inkubá-

ció utolsó 24 órájában) először az alsó leveleken váltak láthatóvá a tünetek. Ezek kezdetben apró nekrotikus léziók voltak, melyek fokozatosan, napról-napra növekedtek. Az is megfigyelhető volt, különösen idősebb leveleken, hogy a tünetek egyszerre jelentek meg egy nagyobb, több mm átmérőjű foltban. A tünetek a következő 4–5 napon látványosan erősödtek. Újabb és újabb léziók jelentek meg, melyek összefolytak (1. ábra), s megjelentek a tünetek a növény fiatal felső levelein is. A nagyobb átmérőjű léziók esetén volt megfigyelhető, hogy a központi részükből konídiumképződés indult ki nedves körülmények között. Ha ezeket a nagyobb nekrotikus foltokat tartalmazó leveleket 3 napra nedveskamrába helyeztük, a levél színén és fonákán egyaránt megjelent a sporuláló gomba sűrű szövedéke (2. ábra), ami PDA táptalajra oltva a *C. nicotianae* telepeire jellemző morfológiájú telepeket adott. Ezekből a tenyészetekből konídiumszuszpenziót készítve az első inokuláció esetében tapasztalt tünetekkel azonos tüneteket kaptunk a *N. benthamiana* levelein.



1. ábra. *Cercospora nicotianae* által okozott tünetek *Nicotiana benthamiana* leveleken 7 nappal az inokuláció után. (A jobb oldali két levél azonos korú egészséges növényről származik.)



2. ábra. *Cercospora nicotianae* konídiumtartó rajta konídiumokkal *Nicotiana benthamiana* nekrotikus levéldarabján

A *N. benthamiana* lényegesen fogékonyabb a *C. nicotianae* gomba fertőzésére, mint a *N. tabacum*

Fontosnak tartottuk tisztázni, hogy a *N. benthamiana* fogékonysága a cercosporás levélfoltosság iránt milyen fokú a gomba fő gazdanövényével, a közönséges dohányjal (*N. tabacum* L.) összehasonlítva.

Tekintettel arra, hogy a két faj fejlődése (növekedésük, levélméreteik stb.) eltérő, ezért 8 és 12 hetes *N. tabacum* növényeket is inokuláltunk kilenc hetes *N. benthamiana* egyedekkel együtt. A *C. nicotianae* fertőzés tünetei *N. tabacum* levelein később, az inokuláció után 7–12 nappal jelentek meg (ugyanaz *N. benthamiana* esetében 3–4 nap), és a tünetek mértéke is enyhébb volt a *N. benthamiana* levelein tapasztalt tünetekhez képest (3. ábra). A tünetek összehasonlítása mellett meghatároztuk a levelekben a gomba kolonizációjának szintjét is, megmérve a gomba biomassza relatív mennyiségét valós idejű PCR módszerrel két különböző levélemelet szint (alsó, szeneszcens és felső, juvenilis) értékeit összevetve. Ezek az adatok megerősítették a tünetek megfigyelése során tett észlelésünket, mely szerint a *N. benthamiana* valóban fogékonyabb a gomba fertőzése iránt, mert mind az alsó, mind a felső leveleiben nagyobb mennyiségű gombabiomassza volt kimutatható a *N. tabacum* leveleiben mértéhez képest (1. táblázat). A nyolc és tizenkét hetes *N. tabacum* növények cercospora fertőzés iránti fogékonysága nem különbözött számottevően.

A növényi hormonok módosítják a *C. nicotianae* okozta tüneteket

Megvizsgáltuk, hogy a levelekre permetezéssel kijuttatott növényi növekedésszabályzó anyagok, vagy ezek bioszintézisének inhibitorai képesek-e a *C. nicotianae* által okozott tüneteket módosítani *N. benthamiana* gazdanövényen. A szalicilsavval analóg acibenzolar-S-metil (korábbi elnevezése benzotiadiazol) és az etilén bioszintézisét gátló amino-etoxi-



3. ábra. *C. nicotianae* tünetei 8 hetes *N. tabacum* (bal oldali növény) és 9 hetes *N. benthamiana* (jobb oldali növény) levelein 7 nappal az inokuláció után

1. táblázat

***C. nicotianae* gombabiomassza relatív mennyisége 9 hetes *N. benthamiana* és 12 hetes *N. tabacum* növények leveleiben valós idejű PCR módszerrel meghatározva 7 nappal az inokuláció után**

<i>N. benthamiana</i> alsó levelek	<i>N. benthamiana</i> felső levelek	<i>N. tabacum</i> alsó levelek	<i>N. tabacum</i> felső levelek
1,27±0,19 _a	0,36±0,1 _b	0,07±0,01 _a	0,06±0,01 _a

Eltérő betűk az átlagok közti szignifikáns különbséget jelölnek 99 százalékos megbízhatósági szinten, kivéve „b” és „c” esetében, melyek egymástól 90 százalékos megbízhatósági szintű eltérést jelölnek.

vinil-glicin hasonló mértékben gátolta a gomba által okozott betegségi tünetek megjelenését az inokulációt követő 4–8 nap között (2. táblázat). A tizedik naptól kezdve azonban a kezelt és kezeletlen növények közötti különbség már nem volt számottevő, feltehetőleg a levelekre kijuttatott vegyületek lebomlása miatt. A metil-jázmonát kezelés az előbb említett kezelésekkel ellentétes hatással volt a *C. nicotianae* okozta tünetekre, ennek a növényi hormonnak a levelekre juttatása növelte a gomba által okozott tünetek súlyosságát (2. táblázat). A három

2. táblázat

Következtetések

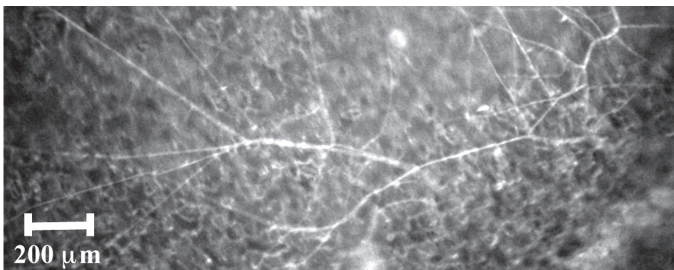
Exogén hormonkezelés hatása a *C. nicotianae* által okozott tünetek kifejlődésére *N. benthamiana* növényeken kilenc nappal az inokuláció után értékelve

Levél-emelet	Desztihált víz	Acibenzolar-s-metii	Amino-etoxi-vinil-glicin	Metil-jázmonát
nekrotizált levélfelület százalékos aránya (%) ± SE				
1.	100 ± 0	70,3 ± 19	100 ± 0	100 ± 0
2.	100 ± 0	52,8 ± 21	27,5 ± 16	87,5 ± 12
3.	87,2 ± 13	41,2 ± 20	20,5 ± 16	68,7 ± 20
4.	83,8 ± 16	36,8 ± 20	10,5 ± 6	56,1 ± 16
5.	42,9 ± 18	42,0 ± 19	18,2 ± 7	60,6 ± 14
6.	47,8 ± 18	54,6 ± 20	47,1 ± 13	73,8 ± 17
7.	48,7 ± 18	34,6 ± 21	46,2 ± 15	86,6 ± 13
8.	34,8 ± 15	4,1 ± 3	9,8 ± 3	89,6 ± 9
9.	30,3 ± 16	2,3 ± 2	8,8 ± 7	84,5
10.	36,6 ± 17	0 ± 0	21,0 ± 18	56,9

vegyület alkalmazott koncentrációi esetében nem tapasztaltunk közvetlen gombagátló hatást a *C. nicotianae* PDA táptalajon nőtt tenyésztén vizsgálva.

A C. nicotianae szingulett oxigén termelése N. benthamiana levelelen

A szingulett oxigén jelenlétét a *C. nicotianae* fertőzés után fluoreszcens szenzor és mikroszkóp segítségével mutattuk ki a leveleken. A *N. benthamiana* levelek felületén lévő *C. nicotianae* hifákban jól detektálható volt a festődés, tehát feltehetőleg a bennük képződő cerkosporin szingulett oxigén termelődését generálta (4. ábra).



4. ábra. Szingulett oxigén kimutatása nekrotikus *N. benthamiana* levélszövetben lévő *C. nicotianae* hifákban. A vizsgálat Singlet Oxygen Sensor Green fluoreszkáló reagens és fluoreszcens mikroszkóp segítségével történt

Vizsgálataink során vizuálisan értékeltük a cerkosporás levélfoltosság tüneti megjelenését, és a gomba biomasz-számának mérésével jellemeztük a *N. benthamiana* kölcsönhatását a jelentős dohánykór- okozó *C. nicotianae* gombával. Megfigyeléseink alátámasztják azt, hogy a *C. nicotianae* növénykórokozó gomba laboratóriumi körülmények között jól használható és fontos biológiai modell szervert leveleinek konidiumsuszpenzióval történő fertőzésére. A betegség-tünetek látványosak, és a tünetek súlyossága tapasztalataink szerint az inokulum sűrűségének alkalmas megválasztásával is befolyásolható. A növény levelein képződő gombabiomassa mennyisége valós idejű PCR módszerrel kvantitatív módon detektálható.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a *N. benthamiana* lényegesen fogékonyabb a gombakórokozó fertőzése iránt, mint a közönséges dohány, ami párhuzamot mutat azzal a nagyobb fogékonysággal, amit a *N. benthamiana* növény-vírusokkal szemben mutat. Elképzelhető, hogy a fokozott gombafogékonyság hátterében is az RNS-függő RNS-polimeráz mutációja áll (Yang és mtsai 2004). Ismert, hogy az RNS interferencia jelenségének nem csupán a növények vírus ellenállóságában van szerepe, hanem patogén gombákkal szembeni védekezésben is (Ellendorf és mtsai 2009, Lopez és mtsai 2011).

A hormonok hatását vizsgáló kísérlet tapasztalatai arra utalnak, hogy a vizsgált növény-gomba kölcsönhatásban a szalicilsav-függő és az etilén-/jázmonsav-függő folyamatok egyaránt lényeges szabályozó szerepet játszanak (Glazebrook 2005).

Megjegyezzük, hogy a *N. benthamiana*–*C. nicotianae* kölcsönhatás perspektivikus növény–kórokozó rendszer lehet növényi és gomba eredetű nukleinsavak és fehérjék patológiai szerepének VIGS technológiával folytatott tanulmányozására.

Tekintettel arra, hogy a *C. nicotianae* cercosporin toxin termelése szingulett oxigén képződésével jár, a kölcsönhatás alkalmas lehet szingulett oxigén biológiai hatásainak vizsgálatára is.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal kutatási témapályázata (OTKA K104730), valamint a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja (BO_609_12) támogatta.

IRODALOM

- Alasoadura, S.O.** and **Fajola, A.O.** (1970): Studies on the 'frog eye' disease of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Nigeria. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 42: 177–185.
- Asai, S.** and **Yoshioka, H.** (2009): Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 22: 619–629.
- Beckman, P.M.** and **Payne, G.A.** (1983): Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zea-maydis* and lesion development in corn. *Phytopathology*, 73: 286–289.
- Becktell, M.C., Smart, C.D., Haney, C.H.** and **Fry, W.E.** (2006): Host–pathogen interactions between *Phytophthora infestans* and the solanaceous hosts *Calibrachoa* × *hybrida*, *Petunia* × *hybrida*, and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Disease*, 90: 24–32.
- Bubici, G., Carluccio, A.V., Cillo, F.** and **Stavolone, L.** (2015): Virus-induced gene silencing of pectin methylesterase protects *Nicotiana benthamiana* from lethal symptoms caused by Tobacco mosaic virus. *European Journal of Plant Pathology*, 141: 339–347.
- Chakrabarty, R., Banerjee, R., Chung, S.-M., Farman, M., Citovsky, V., Saskia A. Hogenhout, S.A., Tzfira, T.** and **Goodin, M.** (2007): pSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: probing *Nicotiana benthamiana*–virus interactions. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 20: 740–750.
- Daub, M.E.** and **Ehrenshaft, M.** (2000): The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. *Annual Review of Phytopathology*, 38: 461–490.
- Daub, M.E., Herrero, S.** and **Chung, K.R.** (2013): Reactive oxygen species in plant pathogenesis: The role of perylenequinone photosensitizers. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19: 970–989.
- Dean, J.D., Goodwin, E.H.** and **Hsiang, T.** (2002): Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of b-1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colletotrichum destructivum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20: 347–356.
- Ding, B.J., Hofvander, P., Wang, H.L., Durrett, T.P., Stymne, S.** and **Löfstedt, C.** (2014): A plant factory for moth pheromone production. *Nature Communications*, 5: 3353.
- Ehrenshaft, M.** and **Daub, M.E.** (1994): Isolation, sequence, and characterization of the *Cercospora nicotianae* phytoene dehydrogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2766–2771.
- Ellendorff, U., Fradin, E. F., de Jonge, R.** and **Thomma, B. P.** (2009): RNA silencing is required for Arabidopsis defence against *Verticillium* wilt disease. *Journal of Experimental Botany*, 60: 591–602.
- Fan, H.Y., Sun, H.W., Wang, Y., Zhang, Y.L., Wang, X.B., Li, D.W., Yu, J.L.** and **Han, C.G.** (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
- Glazebrook, J.** (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 205–227.
- Goodspeed, T.H.** (1954): The Genus *Nicotiana*: Origins, Relationships and Evolution of Its Species in the Light of their Distribution, Morphology and Cytogenetics. *Chronica Botanica*, Waltham, MA, U.S.A.
- Hall, G.** (1989): *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, No. 98. Wallingford, UK: CAB International, Sheet 975.
- Klimyuk, V., Pogue, G., Herz, S., Butler, J.** and **Haydon, H.** (2014): Production of recombinant antigens and antibodies in *Nicotiana benthamiana* using 'Magniflection' technology: GMP-compliant facilities for small- and large-scale manufacturing. *Plant Viral Vectors, Book Series: Current Topics in Microbiology and Immunology*, 375: 127–154.
- Lopez, A., Ramirez, V., Garcia-Andrade, J., Flors, V.** and **Vera, P.** (2011): The RNA silencing enzyme RNA

- polymerase v is required for plant immunity. *PLoS Genetics*, 7:e1002434.
- Moon, K.B., Lee, J., Kang, S., Kim, M., Mason, H.S., Jeon, J.H. and Kim, H.S.** (2014): Overexpression and self-assembly of virus-like particles in *Nicotiana benthamiana* by a single-vector DNA replicon system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 8281–8290.
- Nielsen, K.K., Mikkelsen, J.D., Kragh, K.M. and Bojsen K.** (1993): An acidic class-III chitinase in sugar-beet - induction by *Cercospora beticola*, characterization, and expression in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6: 495–506.
- Obrepalska-Stepowska, A. Wiczorek, P. Budziszewska, M. Jeszke, A. and Renaut, J.** (2013): How can plant virus satellite RNAs alter the effects of plant virus infection? A study of the changes in the *Nicotiana benthamiana* proteome after infection by Peanut stunt virus in the presence or absence of its satellite RNA. *Proteomics*, 13: 2162–2175.
- Rajput, N.A., Zhang, M.X., Ru, Y.Y., Liu, T.L., Xu, J. Liu, L. Mafurah, J.J. and Dou, D.L.** (2014): *Phytophthora sojae* effector PsCRN70 suppresses plant defenses in *Nicotiana benthamiana*. *PLOS ONE*, 9: e98114.
- Senthil-Kumar, M. and Mysore, K.S.** (2015): Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Nature Protocols*, 9: 1549–1562.
- Shew, H.D. and Lucas, G.B.** (1991): Compendium of Tobacco Diseases (American Phytopathological Society Press, St. Paul), pp. 20–21.
- Sivanesan, A.** (1985): The *Mycosphaerella* teleomorph of *Cercospora dioscoreae-pynifoliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 85: 743–774.
- Upchurch, R.G., Walker, D.C., Rollins, J.A., Ehrenshaft, M. and Daub, M.E.** (1991): Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2940–2945.
- Veluchamy, S., Williams, B., Kim, K. and Dickman, M.B.** (2012): The CuZn superoxide dismutase from *Sclerotinia sclerotiorum* is involved with oxidative stress tolerance, virulence, and oxalate production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78: 14–23.
- Xiao, S., Charoenwattana, P., Holcombe, L. and Turner, J.G.** (2003): The Arabidopsis genes *RPW8.1* and *RPW8.2* confer induced resistance to powdery mildew diseases in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16: 289–294.
- Yang, S.J., Carter, S.A., Cole, A.B., Cheng, N.H. and Nelson, R.S.** (2004): A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 6297–6302.

A PLANT–FUNGUS PATHOSYSTEM FOR STUDIES IN MOLECULAR PLANT PATHOLOGY

Evelin Tóth, B. Czuppon, J. Fodor, Z. Bozsó and M. Pogány

Plant Protection Institute, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences
H-1022 Budapest, Herman Ottó út 15.
Email: pogany.miklos@agrar.mta.hu

Nicotiana benthamiana has become a crucial model organism in plant biology. Introduction of a specialized tobacco fungal pathogen would greatly improve its usefulness in functional plant pathological studies as well. We present results showing that *Cercospora nicotianae* a specialized hemibiotrophic tobacco pathogen is capable of efficiently colonizing *N. benthamiana*. The *N. benthamiana*–*C. nicotianae* pathosystem has been found to be a convenient interaction for laboratory use with potential to be a pathogenic fungus–plant model system.

Keywords: *Cercospora*, *Nicotiana benthamiana*, real-time PCR, singlet oxygen, plant hormones

Érkezett: 2015. március 25.