

Bacsó Renáta

PD83831

## ZÁRÓJELENTÉS

### A szőlő lisztharmat rezisztencia biokémiai és molekuláris mechanizmusai

#### c. posztdoktori OTKA pályázathoz

Az Európában termesztett *Vitis vinifera* (a továbbiakban *V. vinifera*) fajhoz tartozó szőlőfajták egyike sem rezisztens a szőlőlisztharmattal (*Erysiphe necator*) szemben, ugyanakkor bizonyos szőlőfajok (pl. *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. amurensis*), és az ezek felhasználásával nemesített ún. fajhibridek részlegesen vagy teljes mértékben lisztharmat-ellenállóak.

A *Muscadinia rotundifolia* vad faj vizsgálata során megállapították, hogy a lisztharmattal szembeni rendkívüli ellenállásának az oka ebben a vad fajban a dominánsan öröklődő *RUN1* gén (Barker, 2005). 2002-ben ifj. Kozma Pál és kutató csoportja különböző genetikai térképezési módszerekkel bebizonyították, hogy a '*M. rotundifolia*' x '*V. vinifera*' hibrid-vonalakban a lisztharmattal szembeni rezisztencia az utódokban hasadást mutat (Hoffmann, 2008a). A '*M. rotundifolia* x '*V. vinifera*' introgresszió egyedeiben jelenlévő *RUN1* rezisztenciagénnek köszönhetően a kórokozó csupán 24 óráig volt életképes, majd ezután elpusztult.

Vojtovics és munkatársai (1987) bizonyították elsőként, hogy egy sor ázsiai *V. vinifera* fajta is rendelkezik lisztharmat-rezisztenciával. Hoffmann és munkatársai (2008a, b) figyelték meg, hogy a fertőzés bekövetkezése után 48 órával halt el a kórokozó úgy, hogy a hausztóriumok elsorvadnak. Kozma Pál a lisztharmat-rezisztens *V. vinifera* 'Kishmish vatkana' fajtát cseppkeresztelte (introgresszió) a *V. vinifera* 'Nimrang' termesztésben lévő fogékony fajtával. Így előállított egy olyan rezisztens vonalat, amiben a *V. vinifera* 'Kishmish vatkana'-ban jelenlévő *REN1* gént felhasználva rezisztencia alakult ki. Ez az első nemesítéssel előállított rezisztens *Vitis vinifera* vonal (Katula-Debreceni et al., 2010).

#### Az *Erysiphe necator* populációinak genetikai változékonysága

Bizonyos észak-amerikai szőlőfajok ellenállóságot mutatnak az európai szőlőlisztharmattal szemben. Ugyanakkor egyes leírások szerint amerikai szőlőfajokat is fertőznek az ott jelenlévő *E.*

*necator*-patotípusok. Amerikai kutatók Európa, Ausztrália, Észak- valamint Dél-Amerika területéről 146 izolátumot gyűjtöttek, és ezeket elemezték. Eredmények szerint az Európából begyűjtött minták mikroszatellit-elemzésük alapján két genetikai csoportba oszthatóak. Ezek az A és B izolátumok ugyanakkor megtalálhatóak az Amerikából gyűjtött izolátumok között is, ott azonban ezek mellett még több csoportot is ki tudtak alakítani. Ez arra utal, hogy az amerikai *E. necator*-populáció genetikailag sokkal színesebb, és ezen fertőző ágenseknek eddig csak egy részét hurcolták be Európába (Brewer, 2010). A jelenleg ismert *RUN1* és *RENI* gének az Európában meglévő A és B izolátumokkal szemben ugyan rezisztenciát biztosítanak, de a rezisztencianemesítés feladata itt még korántsem ér véget, ha a leírt amerikai izolátumok ellen is védelmet biztosító rezisztenciaforrást keresünk. Amennyiben bármely más területről (Amerikából vagy Ausztráliából) szőlőlisztharmat kerülne az öreg kontinensre, abban az esetben az izolátumok feltételezhetően akadály nélkül fertőzhetnék az eddig ellenállónak tartott vonalakat (Frenkel, 2012).

### **Az ellenálló képesség biokémiai háttere**

A **szalicilsav** a növényvilágban általánosan elterjedt növényi hormon, mely jelátvivő molekulaként bizonyítottan több rezisztencia-formában kulcsszerepet tölt be számos biotróf és hemibiotróf kórokozókval szemben (Delaney et al., 1994; Vlot et al., 2009). Vad – lizsthattal szemben ellenálló – szőlőfajban (*V. aestivalis*) kimutatták, hogy a levelekben fertőzetlenül is nagy mennyiségben van jelen a szalicilsav, míg az ismert ún. „védekezési gének” alig aktiválódnak a fertőzés során. Nemes fogékony szőlőfajtában (*V. vinifera* 'Cabernet sauvignon') ezzel szemben fertőzetlen körülmények között kis mennyiségben mutatható ki a szalicilsav, viszont az ismert „védekezési gének” fertőzés hatására nagy mennyiségben indukálódnak. (Fung et al., 2008).

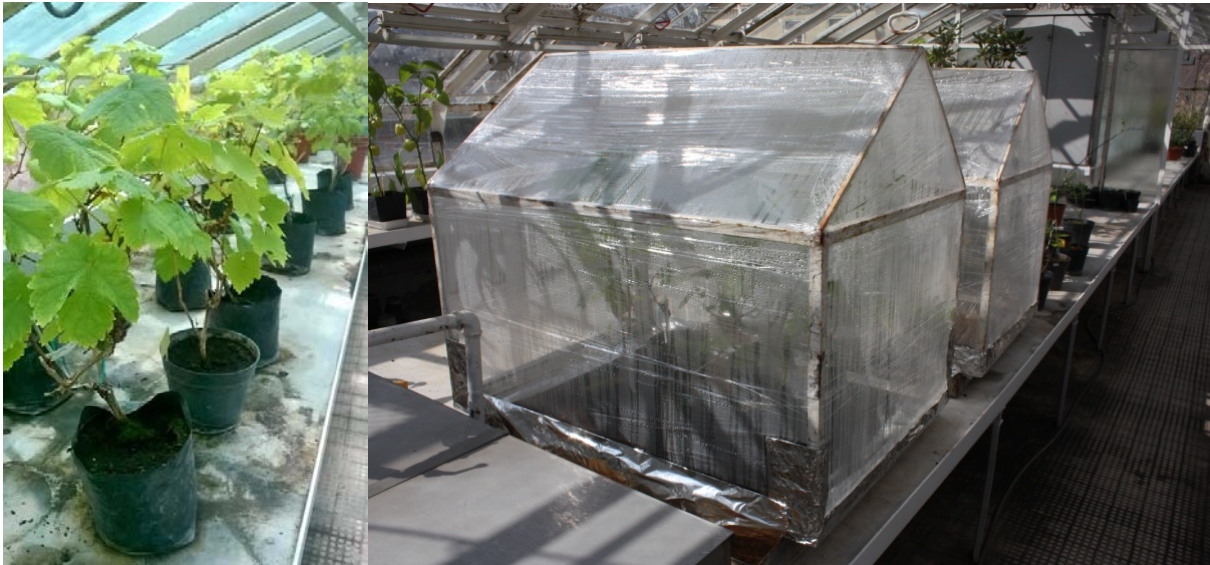
Az utóbbi években végzett vizsgálataink szerint a hiperszenzitív (HR típusú) rezisztencia esetében a szuperoxid szabadgyököknek alapvető szerepe lehet az ellenálló képességben. Ez a típusú **reaktív oxigénfajta (ROS)** egyáltalán nem keletkezik a fertőzött, fogékony növényekben, de az ellenállóakban kb. 48 órával a fertőzést követően igen, a nem-gazda rezisztenciát mutató fajtákban pedig még korábban. Ez tehát egy idáig kevésbé tanulmányozott rezisztencia-típusjellemző mechanizmusa lehet, ugyanis a reaktív oxigénfajták képesek megölni, vagy gátolni a patogéneket a megfertőzött növényekben (Király et al., 1993. Levine et al., 1994, Wu et al., 1995, Chamnongpol et al., 1998; Künstler et al., 2015). Ezen eredményeinket egy szemle cikkben foglaltuk össze (Király et al., 2013).

### **Anyag és módszer**

#### *Felhasznált növényanyag*

Vizsgálatainkat a Kozma Pál által nemesített *Vitis vinifera* 'Kismish vatkana' x *Vitis vinifera* 'Nimrang' és a *Muscadinia rotundifolia* x *Vitis vinifera* kettős keresztezésből létrejött *RUN1* és *RENI*

rezisztenciagént tartalmazó egyedeken végeztük (ezek között minden rezisztenciátípusú - *RUN1*, *REN1*, *RUN1+REN1* és fogékony, illetve rezisztenciagént nem tartalmazó - egyed megtalálható)(1. ábra).

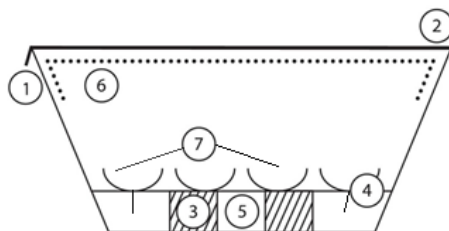


1. ábra: A szőlőtőkék üvegházi nevelése (balra) és izolálásuk speciális izolációs kamrákban (jobbra)

#### *A mesterséges fertőzés menete*

Lisztharmatgomba-inokulummal végeztünk mesterséges fertőzési kísérleteket. Minden vonalról (*RUN1* gént tartalmazó vonal, *REN1* gént tartalmazó vonal, fogékony vonal, illetve *RUN1* és *REN1* gént is tartalmazó vonal) 3 levelet vágunk le és egy tálcára helyeztünk azokat (2. ábra). Izolált körülmények között tartott lisztharmatos egyedek segítségével fertőztük a vizsgálni kívánt egyedek leveleit oly módon, hogy a leveleket összeérintettük, majd ragasztószalaggal rögzítettük egymáshoz. Ezután a tálcában lévő rács alá vizet öntöttünk, ügyelve rá, hogy a levélgyekek beleérjenek, de a levelek felülete ne legyen vizes. Végül folpack fóliát feszítettünk a tálca tetejére a gomba fejlődéséhez ideális magas páratartalom fenntartása érdekében. 24 óra elteltével eltávolítottuk a ragasztószalagot, és vele a fertőző növényi részt, és egy 23°C-os állandó hőmérsékletű, 16 óra nappal és 8 óra éjjel megvilágítású fényszobában helyeztük el a mintákat további 6 napra. A fertőzés lefolyását naponta, mikroszkóppal ellenőriztük.

1. tál
2. folpack fólia
3. hungarocell kocka
4. műanyag háló
5. víz
6. páralecsapódás
7. szőlőlevelek



2. ábra: Szőlők inkubálására használt izolációs egység, melyben a szőlőlisztharmat fertőzést követően egy hétig tartottuk a szőlőleveleket (Magyari, 2014 nyomán)

Egy hét elteltével a fertőzött levelek egy részét mikroszkóp alatt vizsgáltuk meg. Anilinkékkel festett (Seemüller, 1976), illetve tejsavas forralással készített preparátumokat vizsgáltunk; egyszerű, valamint Nomarski-féle (DIC = Differential Interference Contrast) optikát használva (Nikon Eclipse 80i, Spot 4.5) (részletesen ld. Magyari, 2014).

#### *Szuperoxid detektálása – NBT festés*

A szuperoxid felhalmozódást az ún. nitroblue-tetrazolium (NBT)–festéssel teszteltük (lásd Király et al., 2002; Hüchelhoven és Kogel, 1998). A fertőzések után 1, 2 és olykor 3 nappal vizsgáltuk a szuperoxid akkumulációt a fertőzött levelekben.

#### *Molekuláris módszerek*

A fertőzött szőlőlevelekből a DNS kivonást Plant Genomic DNA Extraction Miniprep System kittel (Viogene) végeztük. A szőlő lisztharmat DNS-szintű kimutatásához (valós idejű PCR analízis) Biorad CFX96-os PCR-készüléket használtunk. SYBRGreen I interkalálódó festéket adtunk a mintákhoz a detektálás elősegítésére. Indítószekvenciaként lisztharmat nukleáris riboszomális RNS génkomplex ITS (internal transcribed spacer) szakaszára tervezett általános primert használtunk, mely ugyan nem specifikus a szőlő lisztharmatra, azonban a szőlőt a lisztharmatok közül csak a szőlőlisztharmat képes fertőzni (Cunnington, 2003). Belső kontrollként állandó mennyiségben jelenlévő szőlő génre (ún. *housekeeping* génre) betapadó indító szekvenciát Szalontai et al. (2009) szerint használtunk.

A géningdukciós vizsgálatok során a szőlőből RNS-t vontunk ki a Sigma-Aldrich Plant Total RNA kit segítségével, majd reverz transzkripciót alkalmazva (Sigma-Aldrich) cDNS-eket állítottunk

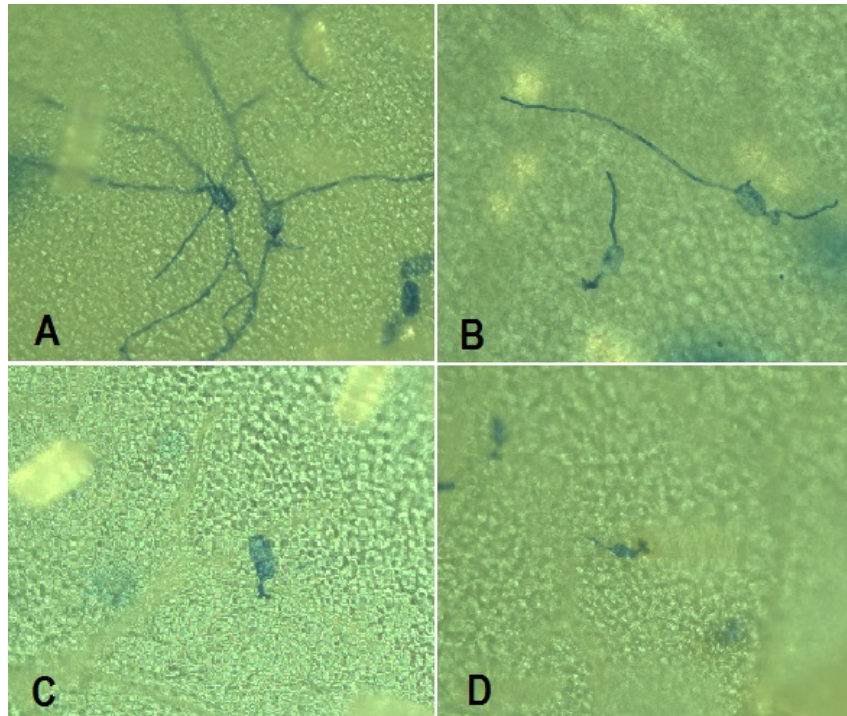
elő. Ezekben a cDNS mintákban valós idejű (*real-time*) PCR segítségével specifikus indítoszekvenciák alkalmazásával vizsgáltuk különböző gének indukcióját.

A szalicilsav méréseket az MTA ATK MGKI-ben Dr. Szalai Gabriella végezte el számunkra, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel.

## **Eredmények**

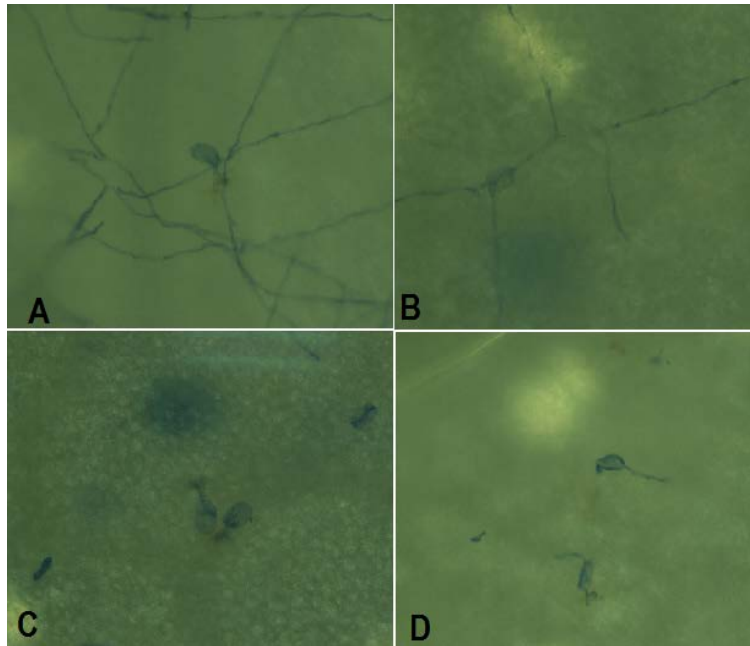
### **A *RUNI* és *RENI* rezisztencia gének egyidejű jelenléte nem növelte a szőlők lisztharmattal szembeni ellenálló képességét**

A fertőzést követő második napon a fogékony levelek felületén megfestve a lisztharmatot jól látható volt a kifejlődött gombahifa szövedék (ld. 3/A. ábra). *RENI* rezisztenciagént tartalmazó vonalakon már a 2. napon is szemmel láthatóan kevesebb hifát és konídiumokat találtunk (3/B. ábra), konídiumtartót és lefűződő konídiumokat nem. *RUNI* rezisztenciagént tartalmazó vonalakon (3/C. ábra) nem volt megfigyelhető konídiumok lefűződése, ezen felül a hifák fejlődése is csökevényes. A két rezisztenciagént együttesen hordozó vonalakban hasonló jelenség volt megfigyelhető, mint a *RUNI* rezisztenciagént hordozó vonalakban: a hifák csökevényesen fejlődtek, a telepek nem nőttek meg (ld. 3/D. ábra). Már a második napon egyértelműen érzékelhető a rezisztenciagének hatása, az érintett levelekben alacsonyabb a lisztharmatgomba szaporodásának volumene.



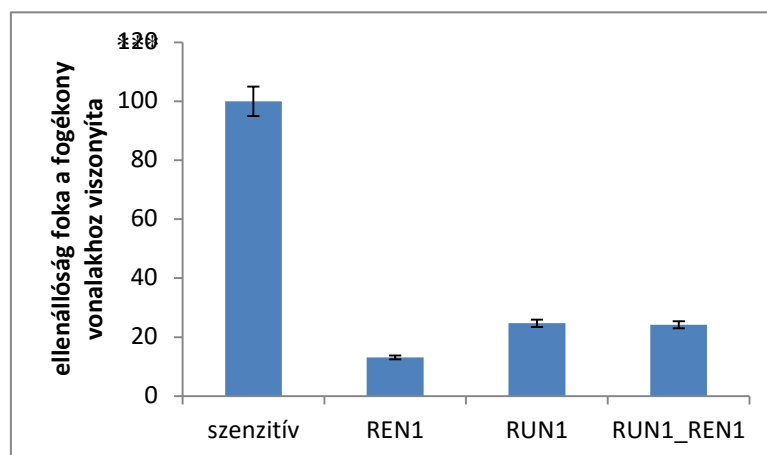
**3. ábra:** *Lisztharmat fertőzési hatékonyságának nyomon követése mesterségesen fertőzött, különböző rezisztencia géneket tartalmazó szőlővonalakon (2 napos fertőzésről készült sztereomikroszkópos felvétel 400X nagyítással szintelenített és anilinkékkel festett levelekről). A.) fogékony fajta B.) REN1 rezisztenciagént hordozó vonal C.) RUN1 rezisztenciagént hordozó vonal D.) piramidált, RUN1 és REN1 rezisztenciagént tartalmazó vonal (forrás: Magyar, 2014.)*

Hasonló eredményeket összegezhetünk egy hét elteltével a vizsgált leveleken, mint a két napos fertőzések során: a fogékony leveleken (4/A. ábra) az idő előrehaladtával nagy tömegű micélium fejlődött, melyek sűrűn elágaztak. A *REN1* gént tartalmazó leveleken (4/B. ábra) már jóval kevesebb hifa növekedett, ezek kevésbé ágaztak el, csökevényesek voltak. Konídiumok lefűződését sem észleltük. A *RUN1* gént hordozó alany levelén (4/C. ábra) feltételezhetően a rezisztencia gén hatására a gomba nem tudott tovább fejlődni a levélben, a hifák növekedése megállt. A hifák végén ezen felül hausztóriumokat figyeltünk meg a legtöbb esetben. A két rezisztencia gént együttesen hordozó leveleken (4/D. ábra) megfigyeléseink során ugyanazt tapasztaltuk, mint a *RUN1* rezisztenciagént hordozó vonalakban (hasonlóan a 2 napos fertőzésekhez): a hifák csökevényesen fejlődtek, a telepek nem nőttek meg. Jól láthatóan a rezisztenciagének gátolják a gomba növekedését, szaporodását pedig megakadályozzák, ugyanakkor a *RUN1* gén jelenléte hatékonyabban gátolja a kórokozót. Hasonló eredményt hozott a tejsavas preparátumok vizsgálata is, a rezisztenciagént hordozó vonalakon sokkal kevesebb hifa fejlődött, mint a fogékony fajtákon.



**4. ábra:** Lisztharmat fertőzési hatékonyságának nyomon követése mesterségesen fertőzött, különböző ellenállóságú szőlővonalakon (egy hetes fertőzésről készült sztereomikroszkópos felvétel 400X nagyítással színtelenített és anilinkékkel festett levelekről). **A.)** fogékony fajta **B.)** REN1 rezisztenciagént hordozó vonal **C.)** RUN1 rezisztenciagént hordozó vonal **D.)** piramidált, RUN1 és REN1 tartalmú vonal (forrás: Magyarai, 2014. )

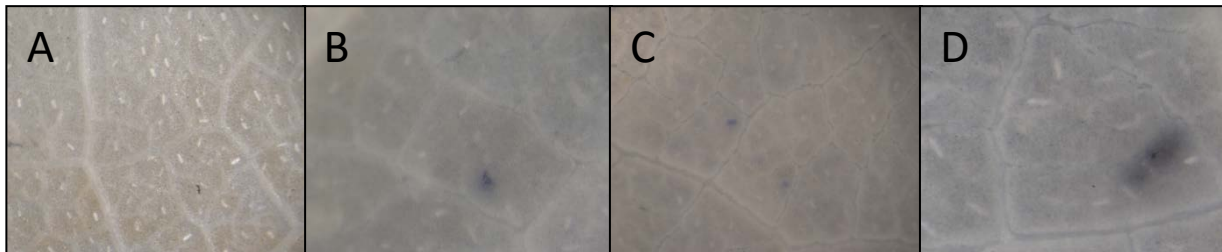
Valós idejű (*real-time*) PCR segítségével is megvizsgáltuk a lisztharmatgomba szaporodását a *REN1* és *RUN1*, valamint *REN1+RUN1* rezisztenciagéneket tartalmazó szőlőkben. A fogékony mintákhoz képest csaknem 80%-kal kevesebb lisztharmatot mértünk a rezisztens vonalakban, ugyanakkor a *RUN1*, a *REN1* és a *RUN1+REN1* piramidált vonalak között nem találtunk szignifikáns különbséget az *ITS* gén amplifikált mennyiségében (5. ábra).



**5. ábra:** Szőlő lisztharmat (*E. necator*) detektált mennyisége 7 nappal a fertőzést követően különböző rezisztenciagéneket hordozó szőlő vonalakban. (Forrás Magyarai, 2014. )

A kísérleteinkben alkalmazott gazda-kórokozó kapcsolatokban a *RUN1* és *REN1* rezisztencia gén együttes jelenléte (piramidálás) nem eredményezett hatékonyabb rezisztenciát, mint amit a *RUN1* gén önmagában biztosítani képes. Elképzelhető azonban, hogy más lisztharmat izolátumokkal történő fertőzéskor a piramidálás előnyösen befolyásolja a rezisztenciát, ahogy ezt más növény-kórokozó kapcsolatoknál is leírták (Horváthné, 2013)

#### **A *RUN1* és *REN1* gének által biztosított lisztharmat rezisztencia markere a szuperoxid felhalmozódás**



**6. ábra:** Szuperoxid felhalmozódás kimutatása NBT festéssel fogékony Sárfehér fajtán (A), *RUN1* rezisztenciagént (B), *REN1* rezisztenciagént (C), és *RUN1+REN1* gént együttesen tartalmazó vonalon, 2 nappal a szőlőlisztharmat fertőzést követően (saját kép).

Mivel saját és mások korábbi eredményei szerint a szuperoxid felhalmozódásának alapvető szerepe lehet a növényi betegség rezisztenciában (Király et al., 1993. Levine et al., 1994, Wu et al., 1995, Chamnongpol et al., 1998; Király et al., 2013), kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen szerepet játszhat a szuperoxid a szőlő lisztharmattal szembeni ellenálló képességében? A szuperoxid felhalmozódását a fertőzött levélszövetekben NBT festéssel mutattuk ki, először a lisztharmat-fertőzést követően 1 nappal. Tapasztalataink alapján a rezisztens növények fertőzött leveleiben jól látható volt a szuperoxid felhalmozódása. A fogékony levelekkel szemben az egy, vagy két rezisztenciagént tartalmazó levelekben mindig kimutatható volt valamilyen szintű szuperoxid felhalmozódása a fertőzés hatására. A rezisztenciagént tartalmazó vonalak között azonban nem lehetett különbséget tenni a felhalmozódás mértéke, vagy gyorsasága alapján (6. ábra).

Egy héttel a fertőzést követően mikroszkópos felvételeken még mindig látszott a megnövekedett szuperoxid jelenléte, de csak a rezisztens növényeken.

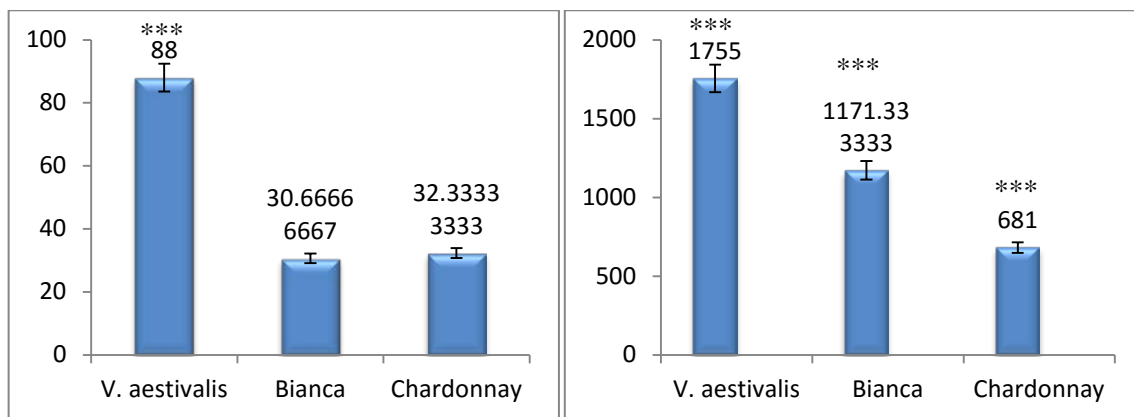
A rezisztens növényekben korai (1 napon belüli) szuperoxid felhalmozódást detektáltunk a nemgazda (búza lisztharmat, *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) fertőzések során is, mely azonban a fogékony növényekben szintén kimutatható volt. A növényeket árpa lisztharmattal (*B. graminis* f.sp. *hordei*) fertőzve (szintén nemgazda, ún. 'non-host' gazda-parazita kapcsolat) enyhe szuperoxid felhalmozódást tapasztaltunk a szőlő lisztharmatra rezisztens egyedekben, míg a fogékonyokban ez



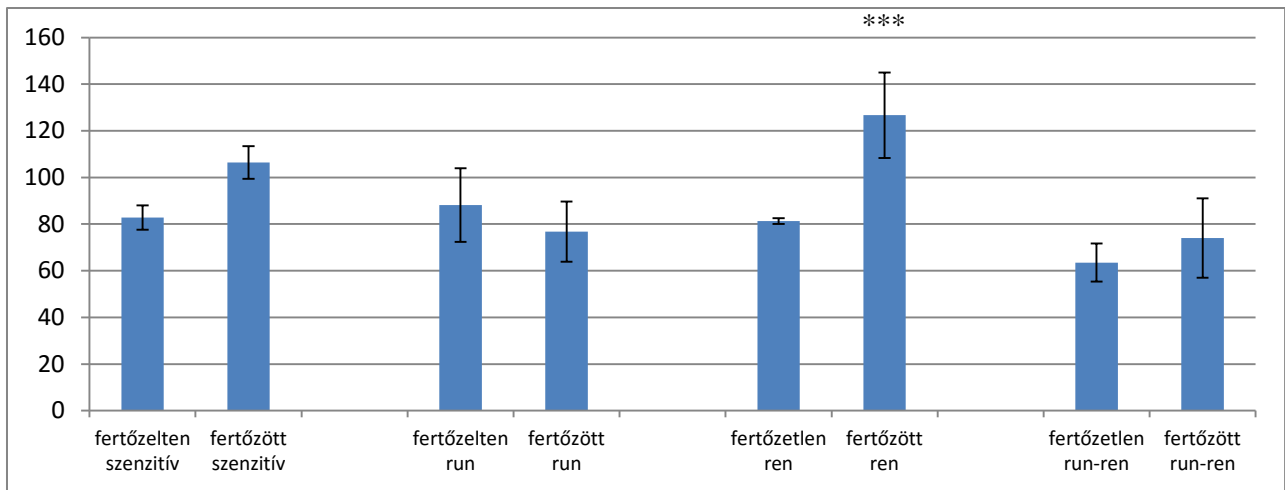
nem volt megfigyelhető. Ugyanakkor a rezisztens szőlőkben a 'non-host' fertőzéskor megfigyelt szuperoxid felhalmozódás közel egy nappal korábban jelent meg, mint a 'host' (szőlő lisztharmat) fertőzésekkor, ami egybeesik más növény-kórokozó kapcsolatokban kapott eredményeinkkel is (Bacsó et al., 2011a; Király et al., 2013). Hangsúlyozandó azonban, hogy a szuperoxid lisztharmat rezisztenciában betöltött szerepének alaposabb tisztázásához szőlő esetében pontosabb, jobban kvantifikálható módszerek használata is indokolt lenne, mint amilyen például a fluoreszcens festés.

### A szalicilsav önmagában nem elegendő marker a lisztharmattal szembeni ellenálló képesség kimutatására

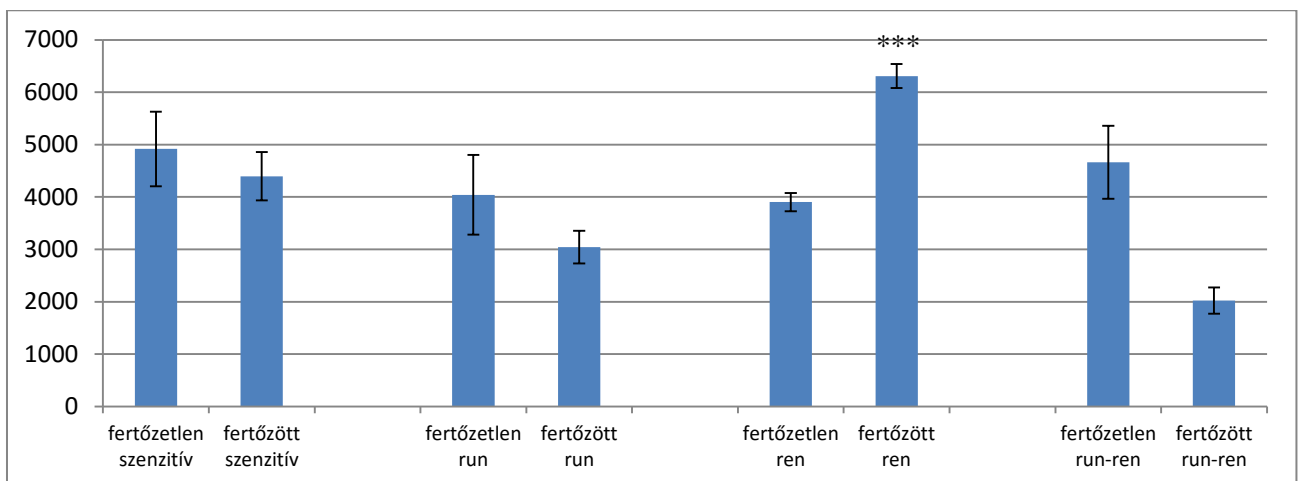
Szakirodalmi adatok alapján a szalicilsav a biotróf és hemibiotróf kórokozók támadásakor jelátvivő szerepet tölt be (Glazebrook, 2005) és aktiválhat számos, a védekezéssel kapcsolatos jelátviteli utat, így például a reaktív oxigének képződését is (Pieterse et al., 2009). Kovács és munkatársai (Fung et al., 2008), és saját eredményeink is arra engednek következtetni, hogy bizonyos rezisztenciagének esetében ez a szőlőnél sincs máskülönb, hiszen a fajhibrid, és így magasabb ellenállóságot mutató Bianca-ban, illetve a vad faj *V. aestivalis*-ban sokkal több szalicilsavat mértünk fertőzeten körülmények között is, mint a fogékony Chardonnay-ban (ld. 7. ábra).



**7. ábra:** Szabad szalicilsav (balra) illetve kötött szalicilsav (jobbra) szintje különböző lisztharmat ellenálló (*V. aestivalis*, Bianca) és fogékony (Chardonnay) szőlőfajban, fajhibridben, illetve fajtában (\*\*\* 99%-os szignifikanciaszinten eltérést mutat a többi mintától).



**8. ábra:** Szabad szalicilsav szintek fertőzetlen és szőlő lisztharmattal fertőzött szőlőlevelekben egy héttel a fertőzést követően (\*\*\* 99%-os szignifikanciaszinten eltérést mutat a többi mintától) szenzitív Chardonnay, Run1, Run1 és Run1-Ren1 vonalakon.



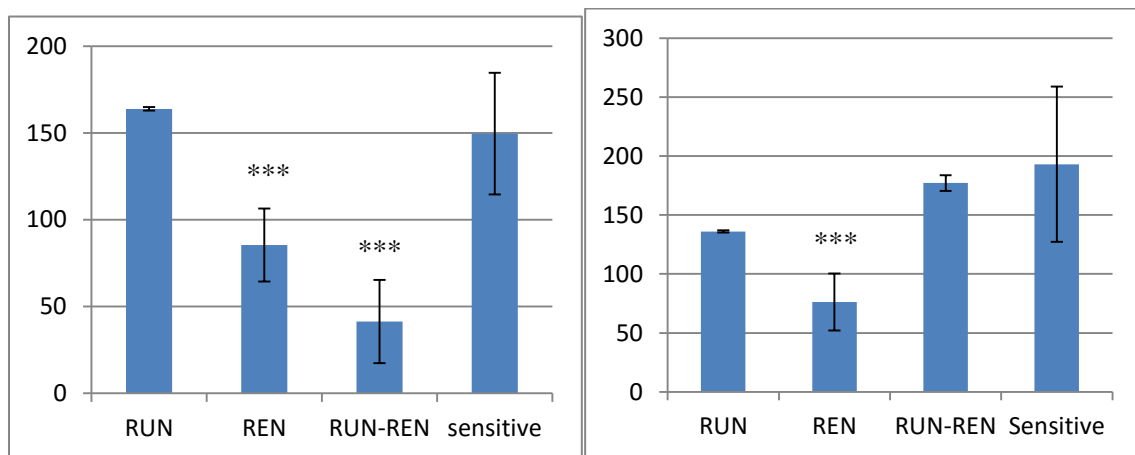
**9. ábra:** Kötött szalicilsav szintek fertőzetlen és szőlő lisztharmattal fertőzött szőlőlevelekben egy héttel a fertőzést követően (\*\*\* 99%-os szignifikanciaszinten eltérést mutat a többi mintától) szenzitív Chardonnay, Run1, Run1 és Run1-Ren1 vonalakon.

Lisztharmat fertőzés hatására az általunk vizsgált rezisztenciagéneket tartalmazó szőlő vonalak közül a *REN1* vonalakban mértünk nagyobb szalicilsav mennyiséget a fertőzetlen állapothoz képest, a többi vonalban nem volt magasabb a szalicilsav szint fertőzés előtt, és fertőzés után sem, mint a fogékony vonalakban (8. és 9. ábra).

Nemgazda lisztharmat kórokozóval (Árpa lisztharmat) történő fertőzés során nem detektáltunk szignifikáns eltérést a vonalak szalicilsav tartalma között.

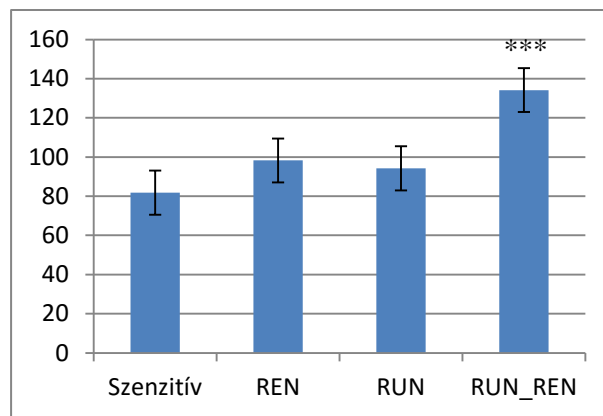
## A *RUN1* és a *REN1* rezisztenciagének egymástól eltérő jelátviteli utakon keresztül okoznak megnövekedett ellenálló-képességet a lisztharmat fertőzéssel szemben

Különböző ROS képzéssel összefüggő gének indukcióját vizsgálva azt találtuk, hogy egy glutation-peroxidáz gén expressziója a *RUN1+REN1* géneket tartalmazó vonalakban volt a legkisebb két nappal a szőlőlisztharmat fertőzést követően (10. ábra). A gén által kódolt enzim felelős a növényi peroxidok (pl. hidrogén-peroxid) glutation segítségével történő lebontásáért, így a gén működésének – részleges - hiánya növelheti a ROS (hidrogén-peroxid) mennyiségét a növényben, ezáltal is erősítve a betegség ellenállóképességet. Ezen eredmények szerint az alacsony glutation-peroxidáz aktivitásnak a *REN1* rezisztenciában lehet szerepe és ez a jelleg még a *RUN1+REN1* egyedekben is domináns (sőt, talán a piramidálás egyik markere).



**10. ábra:** Egy glutation-peroxidáz gén indukciója két nappal a szőlő lisztharmat fertőzést követően fogékony, és rezisztenciagéneket tartalmazó (*RUN1*, *REN1*, és *RUN1+REN1*) vonalakban.(balra). Kataláz enzimet kódoló gén indukciója két nappal a szőlő lisztharmat fertőzést követően fogékony, és rezisztenciagéneket tartalmazó (*RUN1*, *REN1*, és *RUN1+REN1*) vonalakban (jobbra) (\*\*\*) 99%-os szignifikanciaszinten eltérést mutat a többi mintától).

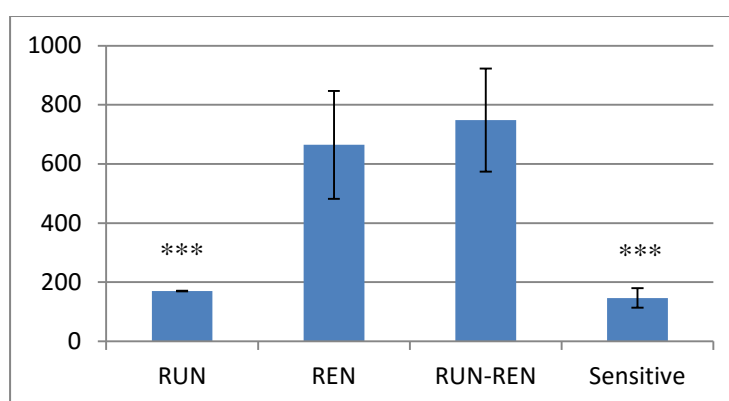
A kataláz enzim kódolásáért felelős *CAT* gén indukciójának vizsgálatakor megfigyeltük, hogy 2 nappal a lisztharmat fertőzés után a *REN1* gént tartalmazó vonalakban jelentősen lecsökkent a gén expressziója a többi vonalhoz képest. Ezek szerint a csökkent kataláz aktivitásból (is) adódó nagyobb hidrogén-peroxid tartalomnak a *REN1* rezisztenciában lehet szerepe, de ez a tulajdonság *RUN1+REN1* piramidált egyedekben nem jelenik meg.



**11. ábra:** WRKY2 gén indukciója két nappal a szőlő lisztharmat fertőzést követően fogékony, és rezisztenciagéneket tartalmazó (RUN1, REN1, és RUN1+REN1) vonalakban (\*\*\*) 99%-os szignifikanciaszinten eltérést mutat a többi mintától).

A lignin felhalmozódásért felelős WRKY2 transzkripciós faktort kódoló szőlő gén (Guillaumie et al., 2010) a *RUN1+REN-1* piramidált vonalakban indukálódott számottevően 2 nappal a szőlőlisztharmat fertőzést követően, míg a többi vonalban kisebb mértékben expresszáldott. Ismert, hogy a lignin felhalmozódás kórokozók (pl. lisztharmatok) fertőzésekor a növényi sejtfalat erősíti, ezáltal fokozva a betegség rezisztenciát (Thordal-Christensen et al., 1997). Eredményeink szerint a fokozott WRKY2 expresszió feltehetően a piramidálás egyik markere.

A dehidroaszorbát-reduktáz (*DHAR*) és monodehidroaszorbát-reduktáz (*MDHAR*) gének indukciójában nem találtunk szignifikáns különbséget a vonalak között, míg a szalicilsav-glikoziltranszferáz enzimet kódoló gén (*SGT*) jelentősen indukálódott fertőzés hatására a *REN1*- és a *RUN1+REN1* vonalakban (12. ábra). Ezek szerint a *REN1* gén általi rezisztenciában a kötött szalicilsavnak lehet jelentős szerepe, mely a *RUN1+REN1* piramidált vonalakban dominánsan jelenik meg.



**12. ábra:** Egy szalicilsav-glikoziltranszferáz (*SGT*) gén indukciója két nappal a szőlő lisztharmat fertőzést követően fogékony, és rezisztenciagéneket tartalmazó (RUN1, REN1, és RUN1+REN1) vonalakban

Összefoglalva, az ismertett adatok alátámasztják, hogy:

1/ A *RUNI* és *RENI* rezisztencia gének egyidejű jelenléte nem növeli a szőlő liztharmattal szembeni ellenálló képességet,

2/ biokémiai szempontból legalább kétféle típusú liztharmattal szembeni rezisztencia-mechanizmus létezik szőlő növényekben.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a monogénes, vagy a két rezisztenciagénnel piramidált szőlőkben egészen más módon működik a védelmi mechanizmus, mint a vad fajokban.

- Vad fajok esetében a szalicilsav által meghatározott rezisztencia mechanizmus érvényesül,
- a nemes szőlő (*V. vinifera*) ellenállósága a korai ROS (szuperoxid,  $O_2^-$ ) felhalmozódással függ össze\*

Ugyanakkor a génindukciós vizsgálatok rávilágítottak arra is, hogy a *RUNI* és a *RENI* rezisztenciagént tartalmazó *V. vinifera* vonalakban szőlőliztharmat fertőzés hatására eltérő módon indukálódik számos, a reaktív oxigénformák szintjének szabályozásáért, lignin felhalmozódásáért, vagy éppen szalicilsav termeléséért felelős gén. Mindez azt mutatja, hogy a *RUNI* és a *RENI* gén is különböző módon hat, eltérő biokémiai/életteni mechanizmusú liztharmat rezisztenciát határoz meg.

A jövőben a *RUNI* és a *RENI* gének által biztosított liztharmat rezisztencia biokémiai/életteni hátterének alaposabb megismerése hozzájárulhat a hatékonyabb nemesítéshez.

\*A mesterségesen indukált korai ROS-felhalmozódásnak a dohánymozaik vírussal (TMV) szembeni tünetmentes rezisztenciában játszott szerepére mutat rá a pályázati időszakban megjelent egyik munkánk (Bacsó et al., 2011b), A korai ROS-felhalmozódás tünetmentes vírus rezisztenciában játszott szerepére utalhat az a nemrég publikált eredményünk is, ahol elsőként mutatjuk ki, hogy a dohánynekrózis vírus (TNV) tünetmentesen is képes megfertőzni az *Arabidopsis thaliana* modellnövényt, de jelentősebb mértékben csak az inokulált levelekben (lokálisan) halmozódik fel, szisztemikus terjedése alig kimutatható (Bacsó et al., 2016). A pályázati időszakban azt is bizonyítottuk, hogy a kis koncentrációban történő ROS-kezelések dohányban részleges tüneti rezisztenciát idéznek elő, azonban a kórokozók szintje nem változik (Hafez et al., 2012).

### Hivatkozások:

Bacsó R., Besenyi E., Király L. (2011a): Superoxide may inhibit pathogens and disease symptom expression in plants resistant to pathogens. 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, 2011. július 5-8, Budapest, p. 243.

Bacsó R., Hafez Y.M., Király Z., Király L. (2011b): Inhibition of virus replication and symptom expression by reactive oxygen species in tobacco infected with *Tobacco mosaic virus*. Acta Phytopathologica and Entomologica Hungarica, 46, 1-10.

Bacsó R., Künstler A., Király L. (2016): *Tobacco necrosis virus* replication and spread in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia – a potential system for studying plant defense reactions to symptomless virus infections. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38: 139.

Barker C.L., Donald T., Adam-Blondon A. F., Pauquet J., Ratnaparkhe M.B., Bouquet A., Adam-Blondon A.-F., Thomas M., Dry I. (2005): Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *RUN1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theoretical Applied Genetics*, 111: 370-377.

Brewer M. T., Michael G. M. (2010): Phylogeography and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, from diverse *Vitis* species. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 268.

Cunnington J. H., Takamatsu S., Lawrie A. C., Pascoe I.G. (2003): Molecular identification of anamorphic powdery mildews (*Erysiphales*). *Australasian Plant Pathology*, 32: 421–428.

Frenkel O., I Portillo M. T., Brewer J. P., Cadle- Davidson L., Milgroom M. G. (2012): Development of microsatellite markers from the transcriptome of *Erysiphe necator* for analysing population structure in North America and Europe. *Plant pathology*, 61: 106-119.

Chamnongpol S., Willekens H., Moeder W., Langebartels C., Sandermann H., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (1998): Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 5818-5823.

Katula-Debreceni D., Lencses A.K., Szozo A., Veres A., Hoffmann S., Kozma P., Kovacs L.G., Heszky L., Kiss E. (2010): Marker-assisted selection for two dominant powdery mildew resistance genes introgressed into a hybrid grape population. *Scientia Horticulturae*, 126: 448-453.

Delaney T.P., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Wyman K., Negrotto D., Gaffney T., Gut-Rella M., Kessman H., Ward E., Ryals J.A. (1994): A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 226: 1247-1250.

Fung R. W. M., Gonzalo M., Fekete Cs., Kovács L. G., He Y., Marsh E., McIntyre L., Schachtman D. P., Qiu W. (2008): *Powdery mildew* induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiology*, 146: 236-249.

Glazebrook, J. (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 205–27.

Guillaumie S, Mzid R, Méchin V, Léon C, Hichri I, Destrac-Irvine A, Trossat-Magnin C, Delrot S, Lauvergeat V. (2010): The grapevine transcription factor WRKY2 influences the lignin pathway and xylem development in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 72(1-2): 215-34.

Hafez Y.M., Bacsó R., Király Z., Künstler A., Király L. (2012): Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suppresses necrotic disease symptoms. *Phytopathology*, 102: 848-856.

Hoffmann S. (2008a): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása a szőlő lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciára nemesítésében. Doktori értekezés, Gödöllő.

Hoffmann S., Gaspero G. D., Kovács L., Howard S., Kiss E., Galbács Zs., testolin R., Kozma P. (2008b): Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish Vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 427-438.

Horváthné Uhrin A. (2013): Őszi búza × *Triticum timopheevii* hibrid utódainak jellemzése. Doktori disszertáció. Szent István Egyetem.

Hückelhoven R., Kogel K-H. (1998): Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* fsp. *hordei*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 292-300.

Király L., Künstler A., Bacsó R., Hafez Y.M., Király Z. (2013): Similarities and differences in plant and animal immune systems – What is inhibiting pathogens? *Acta Phytopathologica and Entomologica Hungarica*, 48: 187-206.

Király Z., Barna B., Kecskés A., Fodor J. (2002): Down-regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by tobacco mosaic virus. *Free Radical Research*, 36: 981-991.

Király Z., El-Zahaby H., Galal A., Abdou S., Ádám A., Barna B., Klement Z. (1993): Effect of oxy free radicals on plant pathogenic bacteria and fungi and on some plant diseases. In: Mózsik Gy, Emerit I, Fehér J, Matkovics B, Vincze Á (eds.): *Oxygen Free Radicals and Scavengers in the Natural Sciences*. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 9-19.

Kozma P. (2002): Goals and methods in grape resistance breeding in Hungary. *International Journal of Horticultural Sciences*, 8: 41-46.

Künstler A., Bacsó R., Hafez Y.M., Király L. (2015): Reactive oxygen species and plant disease resistance. In: D.K. Gupta, J.M. Palma, F.J. Corpas (eds): *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*. Springer International Publishing, Switzerland pp. 269-303.

Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. (1994): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79: 583-593.

Magyari J. (2014): Szőlőlisztharmat rezisztenciagének hatásfokának vizsgálata *Erysiphe necatorra*. Szakdolgozat, Corvinus Egyetem, Budapest.

Pieterse C.M.J., van Wees S.C.M., Hoffland E., van Pelt J.A., van Loon L. C. (1996): Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, 8: 1225-1237.

Szalontai B., Stranczinger Sz., Palfalvi G., Mauch-Manib B., Jakab G. (2009): The taxon-specific paralogs of grapevine PRLIP genes are highly induced upon powdery mildew infection. *Journal of Plant Physiology*, 169: 1767– 1775.

Seemüller E. (1976): Demonstration of mycoplasma-like organisms in the phloem of trees with pear decline or proliferation symptoms by fluorescence microscopy? *Journal of Phytopathologica*, 85: 368-372.

Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D.B. (1997): Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal*, 11: 1187-1194.

Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. (2009): Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 177–206.

Vojtovics K. A. (1987): *Novie kompleksno-usztojcsivuje sztolovuje szorta vinograda*. Kisinev, Kartja moldovenjaszke, 15p.

Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Levine E.B., Fitzsimmons K.C., Shah D.M. (1995): Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 7: 1357-1368.