



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**AZ INDUKÁLT REZISZTENCIA A NAPRAFORGÓ ÉS KÓROKOZÓJA A
PLASMOPARA HALSTEDII KAPCSOLATÁBAN**

Doktori (PhD.) értekezés tézisei

KÖRÖSI KATALIN

GÖDÖLLŐ

2011

A doktori iskola

Megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Vezetője: Dr. Heszky László egyetemi tanár
Az MTA rendes tagja
SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Genetika és Biotechnológiai Intézet

Témavezetők: Dr. Virányi Ferenc egyetemi tanár
Az MTA doktora
SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Növényvédelmi Intézet
Dr. Barna Balázs
Az MTA doktora
MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A napraforgó peronoszpóra (*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni) a napraforgó egyik jelentős betegsége. Az ellene való védekezés - az agrotechnikai eljárások mellett – rezisztens fajták termesztésére és fungicides vetőmagcsávázásra épül. A hagyományos védekezési módszerekkel szemben azonban több probléma is felmerülhet a gyakorlatban, amely a kórokozó genetikai változékonyságával kapcsolatos. Egyrészt a rezisztens fajtákkal (hibridekkel) szemben a kórokozónak időről-időre újabb patotípusai (rasszai) jelennek meg világszerte (Gulya, 2007), amelyek képesek megbetegíteni az addigi rezisztens fajtákat. További probléma a tradicionális védekezésben a kórokozó csökkenő érzékenysége az alkalmazott fungicidekkel szemben (Mouzeyar et al., 1994; Albourie et al., 1998; Gulya et al., 1999). Mindezek alapján a gyakorlatban is szükség lehet olyan alternatív védekezési eljárásokra, amelyek kiegészíthetik a jelenleg alkalmazott növényvédelmi módszereket, és így biztonságosabbá tehetik a napraforgó termesztését. Ezek egyike az irodalomból jól ismert és egyre szélesebb körben tanulmányozott indukált rezisztencia, amelynek leggyakoribb megnyilvánulása az ún. szisztemikus szerzett rezisztencia (SAR). Ez a növényi válasz megfelelő módon alkalmazva jól beilleszthető lenne az integrált növényvédelembe.

A szisztemikusan szerzett rezisztencia mind abiotikus, mind biotikus tényezőkkel kiváltható a növényekben (Sticher et al., 1997). Az abiotikus lehetőségek közé tartoznak az ún. növényi induktorok vagy aktivátorok, amelyek nem közvetlenül a kórokozóra hatnak, mint a hagyományos fungicidek, hanem a növény saját védekező rendszerét aktiválják, erősítik, ezzel mintegy felkészítve a növényt a kórokozó támadására (Kessmann et al., 1996). Hazánkban az első kereskedelmi forgalomban is kapható növényi aktivátor a Bion 50 WG volt, amely búzában és árpában volt engedélyezve lisztharmat ellen. A Bion hatóanyaga a benzotiadiazol (BTH: 1, 2, 3- benzotiadiazol-7-tiokarboxilsav-S-metilészter), amelynek szerkezete nagyban hasonlít a szalicilsav szerkezetére és hatásmechanizmusában is számos hasonlóságot mutat vele (Ryals et al., 1996). A benzotiadiazol mellett a két legtöbbet tanulmányozott növényi aktivátor az izonikotinsav (INA: 2,6-diklór-izonikotinsav) és az aminovajsav egyik izomerje (BABA: DL-3-aminovajsav).

Az indukált rezisztenciát már eddig is számos gazda – parazita kapcsolatban vizsgálták, a jelenség hátterében lezajló folyamatok azonban még kevésbé ismertek. Ahhoz viszont, hogy ezt a kémiai is indukálható növényi védekezési mechanizmust a jövőben tudatosan és eredményesen alkalmazhassák növényi kórokozók ellen, még számos kérdésre

kell választ adni. Az indukált rezisztencia pontosabb megismeréséhez a növényben a rezisztencia kialakulásához vezető folyamatokat kell megfigyelni és minél pontosabban jellemezni. Ennek egyik fontos része a kórokozó fertőzés hatására a növényben képződő reaktív oxigén fajták (ROS) képződését elősegítő oxidáz, illetve a ROS-t semlegesítő antioxidáns enzimek aktivitásváltozásának tanulmányozása. A polifenol-oxidázok (EC 1.10.3.1) széles körben elterjedt réztartalmú fehérjék, melyek a baktériumoktól az emlősökig megtalálhatóak az élő rendszerekben. A növények védekező rendszerében betöltött szerepüket számos, napjainkban végzett kutatás is bizonyítja (Shi et al., 2002; Mayer, 2006; Lukácsy, 2006; Tegelberg et al., 2008, Nandeshkumar et al., 2008). A növényi peroxidázok (EC 1.11.1.7.) a növényi szervezetben nagyon elterjedtek, a reakciók széles változatait képesek katalizálni (Siegel, 1993), például a növények stressz reakciójában és a növény – kórokozó kapcsolatokban betöltött szerepük is bizonyított (Low és Merida, 1996; Montalbini et al., 1995), azaz részt vesznek a rezisztencia kialakításában is. A kataláz (EC 1.11.1.6.) az egyik legjelentősebb hidrogén-peroxidot semlegesítő enzim a növényekben. Napraforgó esetében a kataláz aktivitásának változását tapasztalták számos abiotikus stressz hatására (Costa et al., 2002; Rios-Gonzalez et al. 2002; Azpilicueta et al., 2007). A növények antioxidáns védelmi rendszeréhez tartoznak a glutation-S-transzferázok (EC 2.5.1.18). A legtöbb növényi GST nehézfém-stressz, etilénkezelés, növénykórokozók elleni stressz-válasz, sebzés vagy ózon hatására indukálódik, amiből arra lehet következtetni, hogy szerepük van az oxidatív stressz elleni védekező mechanizmusokban (Marrs, 1996). Ugyanakkor a növényekben a kórokozók elleni védekezés különböző stratégiáit találhatjuk meg, így egy másik védekező mechanizmus olyan antimikrobiális peptidek szintetizálása révén történik, mint például a defenzin. A defenzint Mauch-Mani és Métraux (1998) a SAR-ral is összefüggésbe hozták és megállapították, hogy a defenzinnek az indukált rezisztencia jelátvitelében is szerepe lehet.

Az általunk tanulmányozott gazdanövény – kórokozó kapcsolatban fontos lenne tudni, hogy mi játszódik le a napraforgó növényekben a peronoszpórák fertőzés és/vagy az aktivátoros kezelés hatására és milyen reakciókhoz vezet a kettő együttes hatása. Mivel a *P. halstedii* nagy genetikai variabilitással rendelkezik, a természetben addig rezisztensnek ismert növények is fogékonyá válhatnak, másrészt a napraforgó genotípusok között is vannak különbségek a rezisztencia mértékében. Feltehető tehát, hogy indukált rezisztencia esetén a különböző fokú rezisztenciával rendelkező, illetve teljesen fogékony napraforgók eltérő módon „viselkednek”. Ugyanakkor a különböző mértékű rezisztenciával rendelkező gazdanövény genotípusok összehasonlítására irányuló kutatással a szakirodalomban alig lehet találkozni, ezért érdekesnek látszott a napraforgó és peronoszpórája kapcsolatában erre a

körülményre külön is odafigyelni. Ebben a kapcsolatban ugyanis lehetőségünk adódott az alapkérdés, azaz a szisztémikus szerzett rezisztencia tanulmányozására több, eltérő mértékű genetikai rezisztenciával rendelkező napraforgó genotípus összehasonlításában.

Munkánk során célul tűztük ki az alábbiakat:

- Az aminosav és az izonikotinsav növényi aktivátorok betegség visszaszorító hatásának tanulmányozása üvegházi és szántóföldi körülmények között, összehasonlítva a már hatékonynak bizonyult benzotiadiazollal a napraforgó és *P. halstedii* eltérő mértékű rezisztenciát mutató gazda – parazita kapcsolataiban;
- A rezisztencia induktorok és peronoszpóra rezisztencia gének hatásának összehasonlító elemzése, valamint együtt hatásuk jellemzése az alábbiak szerint:
 - mikroszkópos vizsgálatok a növény – kórokozó kapcsolatok leírására,
 - egyes, a védekezéssel kapcsolatba hozható enzimek aktivitásváltozásának, illetve növényi gének kifejeződésének nyomon követése biokémiai és molekuláris módszerekkel;
- Az aktivátorok kórokozóra gyakorolható közvetlen gátló hatásának megállapítása *in vitro* spóracsíráztatási kísérletben.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti rendszer

Vizsgálatainkhoz az RHA-274, RHA-340 és HA-335 USDA napraforgó vonalakat, illetve a *P. halstedii* egyik legelterjedtebb, 700-as patotípusát használtuk. Az RHA-274-es vonal nem rendelkezik megfelelő rezisztencia génnel a 700-as patotípussal szemben, a másik két vonal rezisztens, azonban különbség van közöttük a rezisztencia mértékében. Az RHA-340 vonal részleges, ún. HLI („hypocotyl limited”) típusú rezisztenciával rendelkezik, azaz a kórokozó csak a gyökér és szikalatti szár szöveteiben terjed, míg a HA-335-ös vonal teljesen rezisztens a 700-as patotípussal szemben (Virányi és Gulya, 1996).

A napraforgókat csíráztatás után az aktivátorok különböző koncentrációjú oldatával kezeltük, majd másnap fertőztük a kórokozó 50 000 sporangium/ml koncentrációjú szuszpenziójával. Így a következő kezeléseket vizsgáltuk:

- negatív kontrol, nem kezelt és nem fertőzött növények,

- induktoros kontrol, a kémiai aktivátorok valamelyikével kezelt és nem fertőzött növények,
- fertőzött kontrol, nem kezelt, de a kórokozóval fertőzött növények
- az induktorok valamelyikével kezelt és fertőzött növények

Tüneti értékelés

A szikleveleken megjelenő sporuláció értékeléséhez a 8-10 napos növényeket egy éjszakára páratelt térbe helyeztük, és a szikleveleken megjelenő sporangiumbevonatot 4 fokozatú skála segítségével értékeltük Oros és Virányi (1987) módszerét követve. Ezt követően, két hetes korban feljegyeztük az elpusztult növények számát, megmértük a növények magasságát és feljegyeztük a valódi leveleken klorózist mutató növények számát.

Mikroszkópos vizsgálat

A szövettani elváltozások megállapítására a mintákat a fertőzés utáni 3., 7., 10. és 15. napon vettük. A növényi mintákból kézi metszeteket készítettünk és Olympus BX50 fluoreszcensz mikroszkóp alatt ellenőriztük a kórokozó jelenlétét és egyes fejlődési alakjait (hifák, hausztóriumok), valamint értékeltük a növényi szövetek kezelésre és/vagy fertőzésre adott válaszait (Bán et al., 2004).

In vitro spóracsíráztatás

Annak megállapítására, hogy az alkalmazott aktivátoroknak van-e közvetlen gátló hatása a kórokozóra, *in vitro* körülmények között, sporangium csíráztatási kísérletet állítottunk be. Ennek során mindhárom aktivátorból alapoldatot készítettünk, és ezekből hígítással különböző koncentrációjú oldatokat készítettünk, amelyeket 1:1 arányban vegyítettünk a kórokozó sporangium szuszpenziójával. A vizsgálati mintákat 16 °C-on sötétben inkubáltuk, az értékeléseket 6 és 24 óra múlva végeztük. Mintánként és időpontonként 2×50 db sporangiumot számoltunk le mikroszkóp alatt és feljegyeztük a kiürült, valamint ki nem ürült sporangiumok számát.

Enzimanalízis

A polifenoloxidáz (PPO) és peroxidáz (POX) enzimek méréséhez a növényeket a fertőzés utáni 0., 3., 9., 13. és 17. napon vettük és a hipokotil részből sejtmentes oldatot készítettünk. A méréseket 25 °C -on, SmartSpec Plus típusú spektrofotométerrel (BioRad) végeztük. A gvajakol-függő peroxidáz (POX) aktivitását gvajakol szubsztrátummal Rathmell

és Sequeira (1974) módszere alapján határoztuk meg. A polifenol-oxidáz (PPO) aktivitását 400 nm-en végeztük, ahol a kinon kialakulásának arányát Fehrmann és Dimond (1967) módosított módszere alapján mértük.

Géntermékek felhalmozódásának mérése

Molekuláris genetikai vizsgálatokhoz a növényeket a fertőzés utáni 0., 3., 9., 13. és 17. napon vettük. Az RNS kivonást RNeasy Plant Mini Kit segítségével végeztük, követve a gyártó (Qiagen) utasításait. A kivont RNS 1µg/µl-es koncentrációjú oldatát használtuk cDNS szintézisre. A cDNS átíráshoz a BioRad iScript cDNA Synthesis Kitet használtuk, követve az ott leírt utasításokat. A keresett transzkriptumok (glutation-S-transzferáz: *Ha*-GST, defenzin: *Ha*-PDF kataláz: *Ha*-CAT2, *P.halstedii* elongációs faktor: *Ph*-TEF1) kimutatásához fél kvantitatív PCR módszert használtunk. A cDNS sokszorosítását még a folyamat exponenciális fázisában állítottuk le, tehát minden vizsgált génnél olyan, külön-külön beállított ciklusszámmal végeztük el a láncreakciót, ahol még megmaradtak a különbségek a különböző átíróadási szintek között. A PCR reakciókhoz Radwan és munkatársai (2005) valamint Azpilicueta és munkatársai (2007) által leírt, napraforgó génekre specifikus indítószekvencia-párokat (primereket) adtunk. A PCR-reakció kezdő lépése 94°C volt 3 percre, majd a megfelelő ciklusszámok szerint ismétlődő DNS-sokszorosítás következett: 94°C 15 mp-ig, Tm 15 mp-ig, 72 °C 20 mp-ig, végül egy záró elongációs lépés 72°C 5 percre. A felszaporított termékeket 1%-os agaróz gélben választottuk szét, majd etídium bromiddal tettük láthatóvá. A gélen megjelent termékeket a festést követően Quantity One programmal (BioRad) számszerűsítettük és a háztartási gén (*Ha*-EF1α) kifejeződésének segítségével normalizáltuk (Radwan et al., 2005). Az így kapott számszerűsített adatokat relatív transzkript felhalmozódásként neveztük el eredményeinkben (pl. *Ha*-PDF adat/*Ha*-EF1 α adat = *Ha*-PDF relatív transzkript felhalmozódása).

Adatfeldolgozás

Kísérleteinket legkevesebb két biológiai ismétlésben végeztük és egy kísérleten belül 3 ismétlést állítottunk be. Az eredmények statisztikai értékelése variancia-analízissel MINITAB 10.2 programcsomaggal történt. Az eltéréseket $P \leq 0,05$ szinten minősítettük szignifikánsnak.

3. EREDMÉNYEK

A betegség tünetek visszaszorítása

A fogékony növények sziklevelein megjelenő sporangium bevonat kiterjedése alapján megállapítható, hogy az induktoros kezelés szignifikánsan csökkentette a sporuláció mértékét a nem kezelt növényekhez képest. Ebben a vonatkozásban mind a BTH, mind az INA két alkalmazott koncentrációja (100 és 200 mg/L) lényegesen jobb eredményt adott, mint a BABA, bár ez utóbbi koncentrációjának emelésével párhuzamosan szintén csökkent a sporangium bevonat területi aránya a fogékony növények sziklevelein. A rezisztenciával nem rendelkező növényeknél a tőpusztulást és a levélklorózis mennyiségét is szignifikánsan csökkentették a kezelések. A növénymagasság mérések alapján a kezelések stimuláló hatással voltak a fogékony, fertőzött növényekre és ebben a vonatkozásban nem volt különbség a három induktor hatása között. A részlegesen rezisztens vonal esetében az INA aktivátornak volt jelentős hatása a növények magasságára; a nem fertőzött növények a kezelés hatására szignifikánsan magasabbak, míg a fertőzött növények szignifikánsan alacsonyabbak lettek. A növénymagasság vonatkozásában a teljes rezisztenciával rendelkező növényekben a kezelés hatására nem tapasztaltunk változást.

Szabadföldi kísérleteinkben csak fogékony kapcsolatot vizsgáltunk. Az aktivátorral is kezelt és fertőzött növények mindegyik értékelési időpontban szignifikánsan magasabbak voltak, mint a nem kezelt növények, emellett az aktivátoros kezelésben is részesített fertőzött növények nagyobb tányért képeztek a nem kezelt növényekhez képest.

Kórszöveti változások

Mikroszkópos megfigyeléseink során azt találtuk, hogy a fertőzés utáni 7. naptól jelentős mértékben visszaszorult a kezelt fogékony növények hipokotiljában a kórokozó, míg a szöveti nekrosisok mennyisége nőtt. Bár a kezelés hatására a részlegesen rezisztens növények hipokotiljában szintén csökkent a kórokozó előfordulása, azonban ezzel együtt a szöveti nekrosisok előfordulása is csökkent. A teljesen rezisztens napraforgó vonalban nem tapasztaltuk sem a kórokozó jelenlétét, sem bármilyen szöveti elváltozást.

Induktorok közvetlen gátló hatása a kórokozó sporangiumaira

In vitro sporangium csíráztatási kísérleteinkben megállapítottuk, hogy az induktorok bizonyos mértékben gátolták a sporangiumok csírázását. Ez a gátló hatás a BTH esetében mindegyik alkalmazott koncentrációban tapasztalható volt, különösen 160 mg/L-es

koncentráció mellett, az INA esetében pedig a két legmagasabb dózis, a 100 és 200 mg/L koncentráció fejtett ki szignifikáns gátló hatást a sporangiumok csírázására. A BABA aktivátor 500, 1000 és 2000 mg/L koncentrációban gátolta szignifikánsan a kiürült sporangiumok számát.

Enzimaktivitás változások BTH kezelés, illetve P. halstedii fertőzés hatására

Az enzimek vizsgálatánál a fogékony növényekben (mind a fertőzött mind a fertőzetlen állományt tekintve) azt tapasztaltuk, hogy nőtt a PPO és POX enzimek aktivitása a BTH-kezelés hatására. Minden esetben a kezelt és fertőzött növények mutatták a legnagyobb enzimaktivitást. A részlegesen rezisztens kapcsolatban az induktoros kezelés önmagában növelte, míg a fertőzéssel együtt csökkentette a két enzim aktivitását, igaz az eltérés nem minden esetben volt szignifikáns. Ezzel szemben a teljes rezisztenciával rendelkező napraforgókban mind a fertőzés, mind a kezelés hatására nőtt az enzimaktivitás, a fogékony genotípushoz hasonlóan. A fogékony és rezisztens kapcsolatok összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a részleges rezisztenciával rendelkező kezeletlen, fertőzött növényekben az enzimek aktivitása magasabb értéket mutatott, mint a csak fertőzött fogékony növényekben. Ez utóbbiakban csak a BTH kezelés és fertőzés együttesen váltott ki ilyen hatást. Különbséget találtunk a kétféle napraforgó genotípusban akkor is, ha a kezelt és nem kezelt, fertőzött növények POX enzimre vonatkozó válaszait hasonlítottuk össze. A fogékony RHA-274 napraforgóban ugyanis a BTH jelentősen fokozta a fertőzés indukáló hatását, míg a részlegesen rezisztens RHA-340 vonalban ennek az ellenkezője történt. Már az első mintavételi napon (0. nap) elkülönültek egymástól a nem fertőzött és fertőzött növények aktivitási adatai és ez az enzimaktivitásbeli különbség az idő előrehaladtával csak növekedett. A két eltérő mértékű rezisztenciával rendelkező napraforgó vonal összehasonlításban azt találtuk, hogy fertőzés hatására erőteljesebb lett az enzimaktivitás a részlegesen rezisztens, mint a teljesen rezisztens növényben.

Induktorok, illetve P. halstedii fertőzés hatása a génkifejeződésre

A betegség-ellenállósággal kapcsolatba hozható gének, a GST, a CAT és a PDF vizsgálata során mértük a géntermékek felhalmozódását induktoros kezelés, fertőzés és ezek együttes alkalmazása során. A GST esetében azt tapasztaltuk, hogy a fogékony, nem fertőzött növényekben az aktivátoros kezelések csak kis mértékben növelték a transzkriptumok felhalmozódását, míg a fertőzés önmagában jelentősen fokozta azt. Az induktorok valamelyikével is kezelt, fertőzött növényekben tovább fokozódott a GST felhalmozódása. A

részleges rezisztenciával rendelkező növényekben a kezelés önmagában nem okozott lényeges változást, ugyanakkor a fertőzés, a fogékony növényekhez hasonlóan, itt is a génkifejeződés szignifikáns növekedését eredményezte, csak sokkal korábban, mint a fogékonyokban. Teljes rezisztencia esetében az aktivátoros kezelés sem a fertőzetlen, sem a fertőzött növényekben nem okozott jelentős GST felhalmozódást, viszont a fertőzés a másik két genotípushoz hasonlóan megnövekedett transzkriptum felhalmozódással járt. Összehasonlítva a három kísérletbe vont napraforgó vonalban jelentkező változásokat megállapítható, hogy a részleges rezisztenciával rendelkező növényekben volt a legintenzívebb a GST kifejeződése, továbbá a két rezisztens vonalban a fertőzést követően azonnal nőtt a GST aktivitása, míg a fogékony növényekben ez a növekedés jóval később jelentkezett.

PDF esetében, fogékony kapcsolatban, a csak fertőzött, kezeletlen napraforgókban a fertőzés utáni 9. naptól mértünk génaktivitást, amely azonos szinten maradt a kísérlet végéig. Ezzel szemben a kezelt és fertőzött növényekben már a 3. napon mértünk transzkriptum felhalmozódást és ez a továbbiakban meredeken emelkedett egészen a 13. napig. A növekedés mértéke mindhárom induktor esetében szignifikáns volt. Leghamarabb a BTH-val kezelt növények érték el a maximumot, és a legmagasabb értéket az INA kezelés adta. Rezisztens növényekben az aktivátoros kezelések nem okoztak lényeges változást a PDF kifejeződésében, valamint hasonlóan a GST esetében tapasztaltakhoz, mind a két rezisztencia típusnál hamar, már a 3. naptól kezdve aktiválódott a defenzin gén, míg a fogékony növényekben ez későbbi időpontra tolódott, és alacsonyabb szinten maradt. Másrészt különbséget találtunk a kétféle rezisztens napraforgó génkifejeződésének intenzitásában és időbeni lefutásában. Míg a teljes rezisztenciával rendelkező napraforgó vonalban a fertőzés utáni 3. napon magasabb génaktivitást tapasztaltunk, mint a HLI típusú növényekben, ez utóbbiakban az aktivitás a fertőzés utáni 13. naptól a 17. napig tovább növekedett, a teljesen rezisztens növényekben azonban nem.

A kataláz génaktivitását tekintve azt tapasztaltuk, hogy az aktivátoros kezelések önmagukban nem változtatták meg a génkifejeződés mértékét a fogékony növényekben, fertőzés hatására azonban jelentős mértékű aktivitás növekedést tapasztaltuk. A legmagasabb génaktivitást a kezelt és fertőzött napraforgókban tapasztaltuk. A három vizsgált aktivátor hatása között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. A részleges rezisztenciával rendelkező vonal esetében, a fogékony napraforgókhoz hasonlóan, nem tapasztaltunk változást a kezelések hatására a nem fertőzött növényekben. A fertőzés önmagában viszont ebben a genotípusban is növelte a CAT gén kifejeződését és ez a hatás már a 0. naptól kezdve jelentkezett. Összehasonlítva a két napraforgó genotípust megállapítottuk, hogy a részlegesen

rezisztens vonal nagyobb mérvű CAT aktivitással válaszolt a fertőzésre, mint a fogékony. A teljes rezisztenciával rendelkező növényekben az aktivátoros kezelések önmagukban nem okoztak változást a gén kifejeződésében, viszont fertőzés hatására megnövekedett a génaktivitás, hasonlóan az előző két genotípushoz. A kezelés és a fertőzés együttes hatására tapasztaltuk itt is a legmagasabb génaktivitást. A három genotípust összehasonlítva megállapítottuk, hogy a rezisztens napraforgókban fertőzés hatására hamarabb és nagyobb mértékben nőtt meg a kataláz gén aktivitása, mint a fogékony növényekben, továbbá a legmagasabb aktivitást a részlegesen rezisztens növényekben tapasztaltuk.

Annak megismerésére, hogy a *P. halstedii* biomassza a kezeléseket, illetve a fertőzést követően milyen mennyiségben van jelen a különböző rezisztenciájú napraforgó szöveiben, a mikroszkópos vizsgálatok mellett molekuláris genetikai módszert is alkalmaztunk. A *P. halstedii*-re specifikus géntermék (*Ph-TEF1*) felhalmozódását csak a fogékony és a részleges rezisztenciával rendelkező növényekben vártuk és kaptuk. Fogékony napraforgó esetében a kezeletlen mintákban szignifikánsan nagyobb volt a géntermék felhalmozódás az aktivátorral kezeltékhez képest, tehát a kezelések visszaszorították a kórokozó terjedését a szövetekben. A részlegesen rezisztens növényekben jóval alacsonyabb értékeket kaptunk a *P. halstedii* -re tervezett primer által felszaporított géntermékekre, mint a fogékony napraforgókban. Míg az első két mintavételi időpontban nem találtunk a kórokozó jelenlétére utaló molekuláris jelet, ezt követően a kezeletlen mintákban meredeken emelkedett a géntermék mennyisége a 13. napig, majd kissé visszaesett. A kezelések hatása ebben a genotípusban is megmutatkozott, hiszen az aktivátorral is kezelt növényekben kevesebb kórokozót mutattunk ki, mint a nem kezeltékben.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Megállapítottuk, hogy - üvegházi körülmények között - a BTH-hoz hasonlóan az INA és a BABA is jelentősen mérsékli a fogékony napraforgó növényeken a *P. halstedii* által kiváltott betegségi tüneteket (törpülés, sporuláció a szikleveleken, levélklorózis), egyúttal visszaszorítja a növényi szövetekben a kórokozó képletek kialakulását. A kórokozó növekedésének gátlását sikerült molekuláris módszerekkel is megerősíteni.
2. Az INA és BABA szántóföldi körülmények között is hatékonyan bizonyult a törpülés mérséklésére, ugyanakkor a kezelés hatására nőtt a napraforgók tányérátmérője.

3. Irodalmi adatokkal ellentétben, *in vitro* körülmények között mindhárom induktornál tapasztaltunk koncentrációtól függő sporangium csírázást gátló hatást.
4. Megállapítottuk, hogy az induktoros kezelés mind a fogékony, mind a teljesen rezisztens napraforgókban fokozta a PPO és POX aktivitását, azonban a részleges rezisztenciával rendelkező növényekben ettől eltérő hatás érvényesült. Genetikailag rezisztens napraforgókban fertőzés hatására hamarabb és nagyobb mértékben nőtt a védekezéssel kapcsolatos enzimek (PPO, POX) aktivitása, mint a fogékony növényekben.
5. Kimutattuk, hogy az induktoros kezelések önmagukban nem okoztak jelentős változást a rezisztens állapottal összefüggésbe hozható gének (GST, PDF, CAT) kifejeződésében, fertőzés hatására viszont nőtt a napraforgó növényekben a GST, PDF és CAT gének kifejeződése, a rezisztens növényekben korábban, mint a fogékonyakban.
6. Elsőként bizonyítottuk, hogy az indukált rezisztenciával kapcsolatba hozható fehérje természetű géntermékek megjelenése és aktivitása nem a genetikai rezisztencia mértékével, hanem a szöveti nekrozisok mennyiségével hozható összefüggésbe.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Kísérleteink alapján kibővült a napraforgó-peronoszpóra ellen hatékony növényi aktivátorok, más néven rezisztencia induktorok száma, hiszen a BTH mellett az INA és a BABA aktivátorokkal kezelt fogékony napraforgókban is visszaszorultak a tipikus peronoszpórás tünetek (sporuláció, tópusztulás, klorózis, törpülés). Ezek az eredményeink megegyeznek a BTH-nál már korábban tapasztalt hatással (Bán et al. 2004). Érdemes megemlíteni, hogy BABA esetében csak a legnagyobb koncentrációval (2000 mg/L) értünk el jó eredményt, ezt a dózist Cohen és munkatársai (1999) is hatékonynak találták kísérleteikben a szőlőperonoszpórával szemben.

Az üvegházi körülmények között hatékonyan bizonyult aktivátoros kezelések és koncentrációk szabadföldi körülmények között alkalmazva is hasonló eredményt adtak, hiszen fogékony napraforgókon gyengítették illetve visszaszorították a peronoszpórás fertőzéssel járó törpülést, valamint mérsékeltek a csökkent tápanyagok kialakulását. Szabadföldi viszonyok között több szerző is sikeresen alkalmazta a BTH-t különböző kórokozók elleni rezisztencia indukálására (Bubici et al., 2006; Cole, 1999).

A vizsgált aktivátoroknak a fogékony kapcsolatra gyakorolt pozitív hatását mikroszkópos vizsgálataink is igazolták. A kezelt növényekben kevesebb kórokozó képlet alakult ki, és az érintett szövetekben megjelentek a rezisztens kapcsolatra jellemző nekrozisok is. Hasonló szöveti reakciót váltott ki tehát a kezelés a fogékony növényben, mint amelyet a peronoszpórával szemben genetikailag rezisztens, *Pl* géneket hordozó napraforgó fajtáknál lehetett tapasztalni (Mouzeyar et al., 1993). A részlegesen rezisztens genotípus esetében mind a BTH-val, mind az INA-val kezelt növényekben kevesebb nekrozist találtunk a kezelt és fertőzött, mint a nem kezelt növényekben. Felvetődik a kérdés, hogy vajon a részleges rezisztenciával rendelkező vonalban az aktivátoros kezelés „gyengítette”-e a növény rezisztenciájának megnyilvánulását. Véleményünk szerint a kérdésre nem a válasz, hiszen a rezisztencia ezekben a növényekben is kialakult, amit az is bizonyít, hogy kevesebb kórokozót találtunk a kezelt növények érintett szöveiben, mint a kezeletlenekben. Feltételezzük, hogy ebben a kapcsolatban másfajta, nem elsősorban a nekrozissal szorosan összefüggő rezisztenciával állunk szemben, amint azt a teljesen rezisztens vonalban tapasztalhattuk.

In vitro spóracsíráztatási kísérleteinkben megállapítottuk, hogy bizonyos mértékig mind a három aktivátor gátolta a rajzospórák kiszabadulását a sporangiumokból. A szakirodalomban eredményünket megerősítő (Bengtsson et al., 2006; Lopez et al., 2002; Meyer et al., 2006) és cáfoló adatokat is lehet találni (Cohen et al., 1999 Kessmann et al., 1996). Eredményeink értékelésénél azonban figyelembe kell venni, hogy ezek a vegyületek a gyakorlati alkalmazás során nem kerülhetnének közvetlenül kapcsolatba a *P. halstedii* sporangiumaival.

Hozzánk hasonlóan a BTH kezelés hatására napraforgóban kialakult megnövekedett enzimaktivitásról több szerző is beszámolt. Nandeshkumar és munkatársai (2008) kitozán kezeléssel valamint fertőzéssel idéztek elő peroxidáz és polifenoloxidáz aktivitás emelkedést napraforgóban, míg Serrano és munkatársai (2007) kitináz és peroxidáz enzimaktivitás növekedésről számoltak be BTH-val kezelt napraforgók hipokotil szöveiben. Utóbbi szerzők szintén a napraforgó és peronoszpórájának kapcsolatát vizsgálták, azonban szűkebb gazda – parazita kapcsolatban és csak egy mintavételi időpontban. A részlegesen rezisztens genotípus vizsgálatára vonatkozóan nem találtunk utalást a szakirodalomban, így erre a rezisztencia mechanizmusra vonatkozó adataink úttörő jellegűek, tehát a jelenség további vizsgálata ezért is feltétlenül indokolt. Szükségesnek tartjuk kibővíteni a részleges rezisztenciát hordozó genotípusok körét keresve a genetikai és indukált rezisztencia egymásra hatásáért vagy éppen egymás hatásának csökkentéséért felelős faktorokat. Figyelemre méltó

eredménynek tartjuk annak kimutatását, hogy a rezisztens növényekben hamarabb kezd el növekedni és magasabb értéket ér el a két vizsgált enzim aktivitása, mint a fogékonyban. Ennek az eredményünknek részben ellentmond Harrach és munkatársainak (2008) az árpa liztharmattal kapcsolatos tapasztalata. Sedlarova és munkatársai (2007) pedig a saláta-peronoszpórával folytatott kísérleteikben nem kaptak egyértelmű választ arra, hogy a fogékony vagy a rezisztens növények rendelkeznek-e nagyobb enzimaktivitással a fertőzést követően.

Kísérleteinkből egyértelműen látható, hogy a rezisztens állapottal összefüggésbe hozható gének kezelés hatására történt aktivitásnövekedése szoros kapcsolatban áll a napraforgó védekező rendszerének hatékonyabb működésével. A kezelt napraforgók ugyanis képessé váltak arra, hogy bizonyos szinten ellenálljanak a *P. halstedii* támadásának és ez mind a betegségtünetek, mind maga a kórokozó visszaszorításában megnyilvánult. A háttérben lejátszódó kedvező folyamatokra pedig részben az enzimek, részben a rezisztenciával kapcsolatos gének változásaiból lehet következtetni. Természetesen hangsúlyozzuk, hogy a napraforgó-peronoszpóra esetében még távol vagyunk az indukált rezisztencia mechanizmusának megértésétől és különösen annak megválaszolásától, hogy milyen módon kapcsolódnak egymáshoz, pontosabban hatnak egymásra, pozitív vagy negatív vonatkozásban, a domináns *Pl* rezisztencia gének és a kémiai természetű rezisztencia induktorok. E két faktor bonyolult egymásra hatását sejtetik a részleges rezisztenciát mutató vonal vizsgálata során kapott eredmények is. További megválaszolatlan kérdés még ezeknek a rezisztencia induktoroknak a gyakorlati alkalmazási lehetősége a napraforgó peronoszpórás betegsége elleni védelemben. A szabadföldi kísérletünkben kapott kedvező eredmények biztatóak, azonban a kísérletek folytatása szükséges. Különös figyelmet érdemelnének a különböző mértékű ellenállósággal rendelkező napraforgók, beleértve az ún. nem-rassz specifikus rezisztenciát is.

6. FELHASZNÁLT IRODALOM

- ALBOURIE, J. M., TOURVIEILLE, J., LABROUHE, D.T. (1998): Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii*. European Journal of Plant Pathology 104: 235-242.
- AZPILICUETA E. C., BENAVIDES P. M., TOMARO L. M., GALLEGOS S. M. (2007): Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves. Plant Physiology and Biochemistry 45: 589-595.
- BÁN R., VIRÁNYI F., KÖRÖSI K., NAGY S. (2004): Indukált rezisztencia a napraforgó-peronoszpórával szemben. Növényvédelem, 40: 545-550.

- BENGTSSON M., JORGENSEN H.J.L., PHAM A., WULFF E., HOCKENHULL J. (2006): Screening of organically based fungicides for apple scab (*Venturia inaequalis*) control and a histopathological study of the mode of action of a resistance inducer. Pome Fruit Diseases IOBC/wprs Bull. 29: 123 – 127.
- BUBICI G., AMENDUNI M., COLELLA C., D'AMICO M., CIRULLI M. (2006): Efficacy of acibenzolar-S-methyl and two strobilurins, azoxystrobin and trifloxystrobin, for the control of corky root of tomato and verticillium wilt of eggplant. Crop Protection, 25: 814–820.
- COHEN Y., REUVENI M., BAIDER A. (1999): Local and systemic activity of BABA (DL-3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. European Journal of Plant Pathology, 105: 351–361.
- COLE D.L. (1999): The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. Crop Protection, 18: 267-273.
- COSTA H., GALLEGOS S.M., TOMARO M. (2002): Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. Plant Science, 162: 939-945.
- FEHRMANN H., DIMOND A.E. (1967): Peroxidase activity and phytophthora resistance in different organs of the potato plant. Phytopathology, 57: 69-72.
- GULYA T. (2007). Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Advances in Downy Mildew Research, eds A Lebeda & P T N Spencer-Philips, Vol. 3., pp. 121-134.
- GULYA T., DRAPER M., HARBOUR J., HOLEN C., KNODEL J., LAMELY A., MANSON P. (1999): Metalaxyl resistance in sunflower downy mildew in North America. Proceedings of the 21st Sunflower Research Workshop, January 14-15, 118-123.p.
- HARRACH B., FODOR J., POGÁNY M., PREUSS J., BARNA B. (2008): Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. European Journal of Plant Pathology, 121:21–33.
- KESSMANN H., OOSTENDORP M., STAUB T., GOERLACH J., FRIEDRICH L., LAWTON K., RYALS J. (1996): CGA 245704, mode of action of a new plant activator. Brighton Crop Protection Conference- Pest and Diseases, pp. 961-966.
- LOPEZ A.M.Q, LUCAS J.A. (2002): Effects of plant defence activators on anthracnose disease of cashew. European Journal of Plant Pathology, 108: 409–420.
- LOW P.S., MERIDA J.R. (1996): The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. Physiologia Plantarum, 96:532-542.
- LUKÁCSY GY. (2006): A fürtrítítás idejének és mértékének hatása a „furmint” és „hárslevelű” fajták vegetatív és generatív teljesítményére Tokaj-Hegyalján. Doktori értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Növénytermesztési és kertészeti tudományok.
- MARRS K. A. (1996): The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47: 127–158.
- MAUCH-MANI B., MÉTRAUX J.-P. (1998): Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. Annals of Botany, 82: 535-540.
- MAYER A. (2006): Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. Phytochemistry, 67: 2318-2331.
- MOUZEYAR, S., LABROUHE, D.T., VEAR, F. (1993): Histopathological studies of resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). Journal of Phytopathology, 139: 289-297.

- MOUZEYAR, S., LABROUHE, D.T., VEAR, F. (1994): Effect of host-race combination on resistance of sunflower, *Helianthus annuus* L., to downy mildew *Plasmopara halstedii*. *Journal of Phytopathology*, 141: 249-258.
- MONTALBINI P., BUONAURIO R., UMESH-KUMAR N.N. (1995): Peroxidase activity and isoperoxidase pattern in tobacco leaves infected with tobacco necrosis virus and other viruses inducing necrotic and non necrotic alterations. *Journal of Phytopathology*, 143:295-301.
- NANDESHKUMAR P., SUDISHA J., RAMACHANDRA K.K., PRAKASH H.S., NIRANJANA S.R., SHEKAR S.H. (2008): Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72: 188-194.
- OROS G., VIRÁNYI F. (1987): Glasshouse evaluation of fungicides for the control of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *Annals of Applied Biology*, 110: 53–63.
- RADWAN O., MOUZEYAR S., VENISSE J S., NICOLAS P., BOUZIDI M. F. (2005): Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1683-2693.
- RATHMELL W. G., SEQUEIRA L. (1974): Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. *Plant Physiology*, 53: 317-318.
- RIOS-GONZALEZ K., ERDEI L., LIPS H. (2002): The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources. *Plant Science*, 162: 923-930.
- RYALS J.A., NEUENSCHWANDER U.H., WILLITS M.G., MOLINA A., STEINER H-Y., HUNT M.D. (1996): Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8: 1808-1819.
- SEDLAROVA M., LUHOVA L., PETRIVALSKY M., LEBEDA A. (2007): Localisation and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 607-616.
- SERRÁNO A.R., DEL CASTILLO J.L., NOVO J.J., OCAÑA A.F., RODRÍGUEZ M.V.G. (2007): Chitinase and peroxidase activities in sunflower hypocotyls: effects of BTH and inoculation with *Plasmopara halstedii*. *Biologia Plantarum*, 51: 149-152.
- STICHER L.B., MAUCH-MANI B., MÉTRAUX J.P. (1997): Systemic acquired resistance. *Annual review of Phytopathology*, 35: 235-270.
- SHI C., DAI Y., XU X., XIE Y., LIU Q. (2002): The purification of polyphenol oxidase from tobacco. *Protein Expression and Purification*, 24: 51-55.
- SIEGEL, B.Z. (1993): Plant peroxidases-an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*, 12: 303-312.
- TEGELBERG R., JULKUNEN-TIITTO R., VARTIAINEN M., PAUNONEN R., ROUSI M., KELLOMAKI S. (2008): Exposures to elevated CO₂, elevated temperature and enhanced UV-B radiation modify activities of polyphenol oxidase and guaiacol peroxidase and concentrations of chlorophylls, polyamines and soluble proteins in the leaves of *Betula pendula* seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 308-315.
- VIRÁNYI F., GULYA T. (1996): Expression of resistance in the *Plasmopara halstedii*-sunflower pathosystem. *ISA Symposium I. Disease Tolerance in Sunflower*, Beijing, 13 June 1996, pp. 14–21.

7. A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Impakt faktoros angol nyelvű cikk

K. Körösi, R. Bán, B. Barna, F. Virányi (2010): Biochemical and molecular changes in downy mildew-infected sunflower triggered by resistance inducers. *Journal of Phytopathology* (in press)

Lektorált angol nyelvű cikk

K. Körösi, N. Lázár, F. Virányi (2009): Resistance to downy mildew in sunflower induced by chemical activators. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 44, 1-9.

Lektorált magyar nyelvű cikkek

Körösi K., Virányi F., Bán R. (2007): Növényi aktivátorok hatása a napraforgó peronoszpórási betegségére. *Növényvédelem* 43, 597-602.

Bán R., Virányi F., **Körösi K.**, Nagy S. (2004): Indukált rezisztencia a napraforgó-peronoszpórával szemben. *Növényvédelem* 40, 545-550.

Konferenciák angol nyelvű írott anyagai

K. Körösi, F. Virányi (2010): Antioxidant activity changes in downy mildew-infected sunflower triggered by BTH. *Proceedings of the ISA-VNIIMK International Symposium "Sunflower Breeding on Resistance to Diseases"* 23-24. June, 2010, Krasnodar, Russia, p. 167.

K. Körösi, F. Virányi (2009): Induction of defense-related genes in downy-mildew infected sunflower plants treated with resistance inducer. In: F. Feldmann, D.V. Alford, C. Furk (Eds.) *Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors: Current Potential and Future Demands, Proceedings of the 3rd International Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe*, Berlin, pp. 465-472. ISBN 978-941261-05-1

K. Körösi, F. Virányi (2008): Molecular changes in downy mildew-infected sunflower triggered by resistance inducers. In: L. Velasco (Ed.) *Proceedings of the 17th International Sunflower Conference*, 8-12. June, 2008, Cordoba, Spain, Vol.1, 157-161.

K. Körösi, N. Lázár, F. Virányi (2007): Resistance response to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*) activated by chemical inducers. In: A. Lebeda, P.T.N. Spencer-Phillips (Eds.) *Advances in Downy Mildew Research*, Vol. 3, 237-241. ISBN 80-86636-19-4

Bán, R., Virányi, F., Nagy, S., **Körösi, K.** (2004): Investigations of the induced resistance to *Plasmopara halstedii*. In: G. J. Seiler (Ed.) *Proceedings of the 16th International Sunflower Conference*, 29 August – 2 September, 2004, Fargo, USA, Vol. 1, 89-91.

Magyar nyelvű tudományos előadások írásos anyagai

Körösi K., Virányi F. (2009): Védekezésben szerepet játszó gének indukált rezisztenciával kapcsolatos aktiválódása peronoszpórával fertőzött napraforgó növényekben 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, p. 27.

Lázár N., **Körösi K.**, Virányi F. (2008): Növényi aktivátorok hatása a napraforgó peronoszpórával fertőzött növények betegségeire. XVIII. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum, pp. 92-95.

Kegye Zs., **Körösi K.**, Virányi F. (2008): A napraforgó- peronoszpórával szemben kiváltott indukált rezisztencia hatására végbemenő változások napraforgóban 54. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, p. 24.

Körösi K., Virányi F., Bán R. (2007): Három immunaktivátor hatásának vizsgálata a napraforgó peronoszpórával fertőzött növények betegségeire. 53. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, p. 43.

Körösi K., Bán R., Virányi F. (2005): Újabb adatok a napraforgó-peronoszpórával szemben indukált rezisztencia vizsgálatához. 51. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, p. 26.

Bán R., Virányi F., Nagy S., **Körösi K.** (2004): A napraforgó-peronoszpórával szembeni indukált rezisztencia vizsgálata. 50. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, p. 74.