

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**β -aminovajsav (BABA) kezelés hatása a szőlő levélsodródását
okozó vírus 1 (GLRaV-1) terjedésére a növényben**

Szerző: MÁTAI ANIKÓ

Biológus MSc II. évfolyam

Témavezető: Dr. JAKAB GÁBOR

Pécsi Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Biológiai Intézet



TARTALOMJEGYZÉK

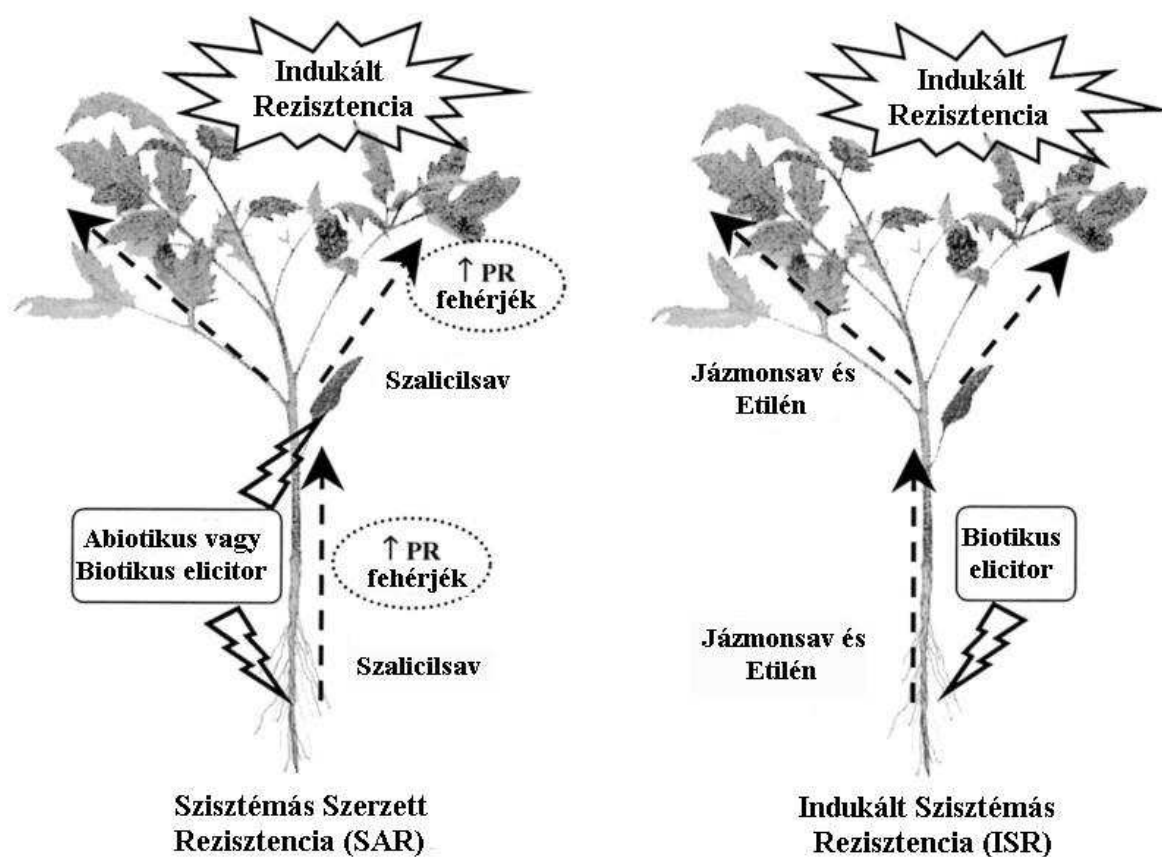
1. BEVEZETŐ	3
1. 1. A növények védelmi rendszere	3
1. 2. A β -aminovajsav (BABA)	4
1. 3. A levélsodródás komplex	5
1. 4. A szőlő levélsodródását okozó vírus 1 (GLRaV-1)	6
2. CÉLKITŰZÉS	8
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	9
3. 1. Növényi anyag	9
3. 2. β -aminovajsavas kezelés	9
3. 3. Zölddugványozás	10
3. 4. Összes RNS kivonás	10
3. 5. Reverz transzkripció	11
3. 6. Szemikvantitatív PCR	11
3. 7. Gélelektroforézis	11
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	13
4. 1. A β -aminovajsavas kezelés hatásának vizsgálata	13
4. 2. A védelmi szignálútvonalakat jelző gének expressziójának vizsgálata	15
4. 3. Oxidatív stresszt jelző gének expressziójának vizsgálata	16
5. ÖSSZEFOGLALÁS	18
6. IRODALOM	19
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	22

1. BEVEZETŐ

1. 1. A növények védelmi rendszere

Az utóbbi években egyre fontosabbá vált a hagyományos kémiai növényvédő-szerek környezetbarát vegyületekkel, módszerekkel való helyettesítése. Ehhez elsősorban arra van szükség, hogy megismerjük a növények védelmi mechanizmusait.

A növények védelmi rendszere állandó és valamilyen biotikus vagy abiotikus stimulus hatására indukálható elemekből épül fel. A kiváltó tényezőtől függően az indukált rezisztencia lehet szisztémás szerzett rezisztencia (SAR / systemic acquired resistance) és indukált szerzett rezisztencia (ISR / induced systemic resistance) (1. ábra).



1. ábra: A növények indukált rezisztenciájának két típusa.

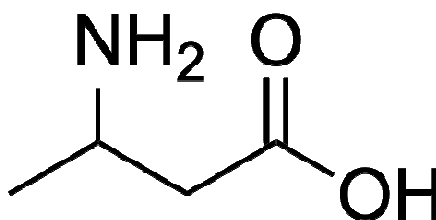
A kiváltó tényezőtől függően a növényekben szisztémás szerzett rezisztencia (SAR) vagy indukált szisztémás rezisztencia (ISR) alakul ki. A SAR-t szalicilsav és patogenezishez kötött (PR) fehérjék, míg az ISR-t jázmonsav és etilén akkumulációja jellemzi (VALLAD and GOODMAN, 2004).

Szisztémás szerzett rezisztenciát biotikus stressz, illetve virulens vagy avirulens kórokozóval való érintkezés vált ki (STICHER *et al.*, 1997; DAT *et al.*, 1998; BORSANI *et al.*, 2001; SILVERMAN *et al.*, 2005). A SAR szalicilsav akkumulációhoz és patogenezishez kötött (PR / pathogenesis related) fehérjék expressziójához vezet (GAFFNEY *et al.*, 1993; NAWRATH and MÉTRAUX, 1999; VAN LOON, 1997; VALLAD and GOODMAN, 2004). Nem patogén baktériumok hatására indukált szisztémás rezisztencia alakul ki a növényben, miközben jázmonsav és etilén halmozódik fel (PIETERSE and VAN LOON, 1999).

Számos természetes és mesterséges vegyületet leírtak már, amelyek indukálják rezisztencia válaszok kialakulását (KESSMANN *et al.*, 1994; YAMAGUCHI, 1998).

1. 2. A β -aminovajsav (BABA)

Közel 50 éve írták le először, hogy a nem fehérjealkotó aminosav, a β -aminovajsav (BABA / beta-aminobutyric acid) (2. ábra) alkalmas rezisztencia indukálására (PAPAVIZAS and DAVEY, 1963; PAPAVIZAS, 1964).



2. ábra: A β -aminovajsav (BABA) szerkezete.

A BABA indukálta rezisztencia (BABA-IR) egy mechanizmusában egyedi rezisztenciaválasz, ami szoros összefüggést mutat a priming, azaz érzékenyítés jelenségével. A priming során az alap rezisztencia kapacitása fokozódik, így a növények gyorsabb és erősebb reakcióra képesek patogén támadásakor (ZIMMERLI *et al.*, 2000; JAKAB *et al.*, 2001; TON and MAUCH-MANI, 2004). Az indukált rezisztencia kutatása jórészt a kezeléseknek a védelmi mechanizmusokra és a hozzájuk kapcsolódó génexpresszióra gyakorolt közvetlen hatásaira koncentrált. Mivel a BABA képes szalicilsav- és abszcizinsav-függő jelátviteli útvonal aktiválására is (ZIMMERLI *et al.*, 2000; TON and MAUCH-MANI, 2004) hatékony védelmet nyújt biotikus és abiotikus stressz esetén is (COHEN, 2002). Laboratóriumi és szabadföldi kísérletekben igazolták, hogy a BABA

kezelés védelmet biztosít baktériumok, gombák, petespórások és fonálférgek ellen (JAKAB *et al.*, 2001).

Nagyon kevés adat áll egyelőre rendelkezésünkre vírusokkal szembeni hatékonyságáról. Egyedül a dohány mozaikos betegségét okozó vírussal (TMV / tobacco mosaic virus) szembeni hatását vizsgálták részletesen. Levelekre permetezve nekrotikus foltokat idéz elő, ami reaktív oxigéngyökök keletkezésével (ROS / reactive oxygen species), lipid peroxidációval és kallóz képződéssel jár együtt (COHEN, 1994; SIEGRIST *et al.*, 2000). Ezen kívül feltételezhető, hogy a szalicilsav gátolja a vírusfertőzések három fő lépését: a replikációt, a sejt-sejt és a nagyobb távolságú terjedést (MURPHY and CARR, 2002). A korábbi kutatások eredményei alapján érdemes vizsgálni a BABA más vírusokkal szembeni hatékonyságát.

1. 3. A levélsodródás komplex

A szőlőnek (*Vitis vinifera*) több vírusos megbetegedése is ismert. Az egyik legnagyobb gazdasági jelentőségű a levélsodródás komplex. A betegséget a 20. század elején „Rossore” illetve „Rugeau” néven Olaszországban és Franciaországban is leírták (SANNINO, 1906; RAVAZ and VERGE, 1924).

A tüneteket a floem kötött *Closteroviridae* család több szerotípusa egyenként, vagy egymással valamilyen kombinációban váltja ki. Ezeket a betegség után szőlő levélsodródást okozó vírusoknak (GLRaV / grapevine leafroll associated viruses) nevezték el. Eddig összesen 9 szerotípust (GLRaV 1-9) hoztak összefüggésbe a betegséggel (MENG *et al.*, 2005).

A fertőzés hatására kisebb szőlőfürtök fejlődnek, később és kevesebb bogyó érke be, ráadásul a cukortartalom is csökken, a levelek a fonáki oldal felé sodródnak. Vörös szőlőfajtákon a levelek vöröses, fehér szőlőfajtákon sárgás elszíneződése figyelhető meg (BOVEY *et al.*, 1980; LÁZÁR and BISZTRAY, 2011) (3. ábra).

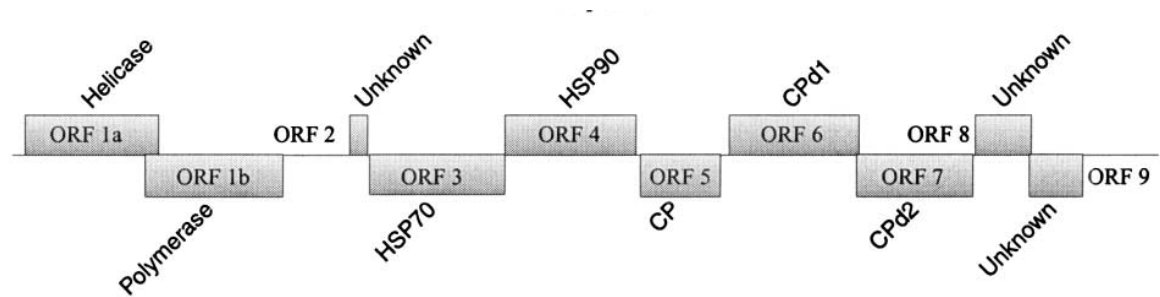


3. ábra: A levélsodródás komplex jellegzetes tünete, a vörös szőlőfajtákon jelentkező vöröses levélszíneződés.

A szőlő levélsodródást okozó vírus 1 (GLRaV-1) az egyik legjelentősebb szerotípus az egész világon (MARTELLI *et al.*, 1997), és a magyarországi szőlőültetvényeken is igen gyakori.

1. 4. A szőlő levélsodródását okozó vírus 1 (GLRaV-1)

A szőlő levélsodródást okozó vírus 1 (GLRaV-1) egy pozitív szálú RNS vírus. Nyújtott pálca alakú partikulumai kb. 2000 nm nagyságúak (LÁZÁR and BISZTRAY, 2011). A kb. 17000 nukleotidból álló genom 10 fehérjét kódol (FAZELI and REZAIAN, 2000): helikázt, RNS-függő RNS polimerázt, kis hidrofób fehérjét (LITTLE and REZAIAN, 2005), hősokk fehérje 70 (HSP70 / heat shock protein 70) homológ fehérjét, hősokk fehérje 90-szerű (HSP90 / heat shock protein 90) fehérjét, köpenyfehérjét (CP / coat protein), a köpenyfehérje két módosult másolatát (CPd / diverged coat protein) és két ismeretlen funkciójú fehérjét (4. ábra).



4. ábra: A GLRaV-1 genomi szerkezete.

A genom 10 fehérjét kódol: helikáz, polimeráz, kis hidrofób fehérje, hősokk fehérje 70-nel (HSP70) homológ fehérje, hősokk fehérje 90-szerű (HSP90) fehérje, köpenyfehérje (CP), a köpenyfehérje két módosult másolata (CPd1, CPd2) és két ismeretlen funkciójú fehérje (Unknown).

A vírus fertőzött szaporítóanyaggal és vektorokkal terjed. Magyarországon a viaszos akác-pajzstetű (*Heliococcus bohemicus*), a juhar-pajzstetű (*Phenacoccus aceris*) és a gyapjastetű (*Pulvinaria vitis*) segítségével terjed (LÁZÁR and BISZTRAY, 2011).

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja az volt, hogy kiderítsük a β -aminovajsav (hasonlóan a dohány mozaikos betegségét okozó vírussal szemben) hatásos védelmet biztosít-e szőlő levélsodródást okozó vírus 1 fertőzés esetén a szőlőben.

Ennek érdekében a következőket tettük:

1. Vírusfertőzött szőlőnövényeket kezeltünk β -aminovajsavval.
2. A kezelés hatékonyságának ellenőrzésére a vírus titer változását vizsgáltuk reverz transzkripció PCR-al egy-egy hajtás különböző régióiból származó levelekben.
3. Ezután reverz transzkripció PCR-al vizsgáltuk a kezelt növény, és az arról származó dugványnövény levelében a vírus titert.
4. Mindezekkel párhuzamosan vizsgáltuk a mintákban a védelmi szignálútvonalakhoz és oxidatív stresszhez kapcsolódó gének expressziós mintázatának változásait.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3. 1. Növényi anyag

Kísérleteinkhez a vírusfertőzött szőlővesszőket dr. Lázár János biztosította a kecskeméti Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetből. Összesen 21 Leányka (*Vitis vinifera*) (5. ábra) fajtájú növény állt rendelkezésünkre, melyeket 300 ml perlitben gyökerezettünk. Ezek közül 5-öt kontrollként alkalmaztunk, a maradék 16 rendszeres β -aminovajsavas kezelésben részesült.



5. ábra: β -aminovajsavas kezelést kapott Leányka szőlők a kísérlet megkezdésekor.

3. 2. β -aminovajsavas kezelés

A kezeléseket 2012. május 4-én kezdtük meg a Pécsi Tudományegyetem Szőlészeti és Borászati Intézetének telephelyén. A növényeket 8 héten keresztül minden héten egy alkalommal 30 ml 300 mg/l koncentrációjú β -aminovajsavval (végkoncentráció: 30 mg/l) öntöztük alulról. A köztes időkben (a nagy szárazságra való tekintettel) volldünger csapvízzel öntöztük. A kezeléseket 2012. június 29-én szüntettük meg.

3. 3. Zölldugványozás

A kezelt növényeket zölldugványozással továbbszaporítottuk. Egy-egy hajtást két szárcsomós részekre osztottunk. Az alsó alatt 1 cm-t, a felső felett 2-3 cm-t hagytunk meg a szárból. Az alsó nódusztól eltávolítottuk a levelet, Botrytis ellenes szerrel kezeltük őket. A dugványokat 200 ml nedves perlitben gyökereztettük növénynevelőben napi 6 órás megvilágítás és 24 °C állandó hőmérséklet mellett.

3. 4. Összes RNS kivonás

A kezelés hatásosságának vizsgálatához szükséges volt a szabad szemmel történő értékelésen túl a vírus titer változás megállapítása is. Ehhez első lépésként totál RNS-t vontunk ki két tünetmentes (2. és 13. jelzésű) és egy tüneteket mutató (7. jelzésű) növény egy-egy hajtásáról származó alsó (A), középső (K) és felső (F) régióiból származó levelekből, a hajtás csúcsi részeiből kapott dugványok (D) leveleiből, illetve az eredeti vesszők (E) fiatalabb leveleiből. Kontrollként (C) kezeletlen vesszőről származó levelet használtunk.

A növényi minta 0,5 ml-éhez 1 ml 65 °C-os kivonó puffert (2% CTAB, 2% PVP K30, 100mM pH:8,0 Tris HCl, 25mM pH:8,0 EDTA, 2M NaCl) adtunk (0,5µl spermidin, 20µl β-merkaptoetanol melegített pufferhez frissen hozzáadva), 5 percig 65 °C-on inkubáltuk, majd jégen lehűtöttük. 1 térfogatnyi kloroformmal összeráztuk, 13000 rpm-mel 5 percig centrifugáltuk. A felülúszóhoz 0,5 ml kloroformot adtunk, és újra 13000 rpm-mel 5 percig centrifugáltuk. A felülúszóhoz 1/3 térfogatnyi LiCl-ot (8M) adtunk, óvatosan összeforgattuk, egy éjszakán át 4 °C-on tároltuk. Másnap 4 °C-on 130000 rpm-mel 20 percig centrifugáltuk. A csapadékhoz 300 µl 0,5% SDS (3xH₂O + DEPC) oldatban feloldottuk, és 1 térfogatnyi kloroformot adtunk hozzá. Összerázás után 10 percig centrifugáltuk 13000 rpm-mel. A felülúszóhoz 0,1 térfogatnyi 3M pH:5,0 NaAc-ot és 3 térfogatnyi etanolt adtunk, óvatosan összeráztuk, éjszakára -20 °C-ra raktuk. Ezután 4 °C-on 13000 rpm-mel 20 percig centrifugáltuk, a csapadékot 70%-os etanollal mostuk. Újra centrifugáltuk 13000 rpm-mel 5 percig. A csapadékról a felülúszót eltávolítottuk, majd jégen szárítottuk. A csapadékot 35 µl 3xH₂O + DEPC -ben oldottuk fel. Az RNS minőségét 1% agaróz gélen ellenőriztük, a reverz transzkripcióhoz használt mennyiségeket ez alapján állítottuk be.

3. 5. Reverz transzkripció

Azért, hogy a található szubgenomi RNS-ek ne zavarják az expressziós mintázatot, a genom közepén található HSP70 génre tervezett primert használtuk a vírus kimutatására. A védelmi szignálútvonalakat és oxidatív stresszt jelző gének átírásához random hexamer primert (FERMENTAS) alkalmaztunk. Relatív kvantifikáláshoz a szőlő actin génjét választottuk ki.

A kivont RNS 2 μ l-éhez hozzáadtunk 0,5 μ l primert (gén-specifikus primerpár esetén a reverz primert) és 10,5 μ l RNáz mentes vizet. Összekevertük, 5 percre 65 °C-os termosztátba raktuk, majd jégen inkubáltuk. Hozzáadtunk 4 μ l 5xRT Reaction Buffert (FERMENTAS), 2 μ l 10mM dNTP-t (FERMENTAS) és 1 μ l Reverse Transcriptase-t (FERMENTAS). Az elegyet 1 órán át 42 °C-on inkubáltuk, majd az enzim inaktiválásához 10 percre 70 °C-on tartottuk. A szemikvantitatív PCR reakciókhoz ezt a törzs cDNS-t tízszeres hígításban alkalmaztuk.

3. 6. Szemikvantitatív PCR

A hagyományos polimeráz láncreakcióhoz a reverz transzkripció során kapott cDNS tízszeres hígításából vettünk 5 μ l-t, amihez 1 μ l primert (0,5-0,5 μ l forward és reverz primer gén-specifikus primerpár esetén), 45 μ l puffert (5 μ l 10xDream Taq Green Buffer (FERMENTAS), 1 μ l 10mM dNTP (FERMENTAS), 38 μ l víz) és 0,2 U Dream Taq (FERMENTAS) enzimet adtunk.

A vírus kimutatására a következő PCR programot használtuk: 1. 94 °C 4 min, 2. 94 °C 30 sec, 3. 52 °C 45 sec, 4. 72 °C 1 min, 5. GO TO 2 34x, 6. 72 °C 5 min, 7. END.

A védelmi szignálutakat jelző génekre tervezett primerek esetén alkalmazott PCR program: 1. 94 °C 4 min, 2. 94 °C 30 sec, 3. 56 °C 45 sec, 4. 72 °C 1 min, 5. GO TO 2 34x, 6. 72 °C 5 min, 7. END.

3. 7. Gélelektroforézis

A PCR termékek elválasztására 1,2%-s agaróz gél-t használtunk, amelyet TBE pufferrel (89mM Tris, 89mM bórsav, 2mM EDTA) készítettünk el és 0,1 μ g/ml végkoncentrációban etídium-bromidot adtunk hozzá. A minták mellett GeneRuleTM 100 bp DNS Ladder pluszt

(fragmenthosszok: 100, 200, 300, 400, **500**, 600, 700, 800, 900, **1031**, 1200, 1500, 2000, 3000 bp; a vastag betűvel jelzettek erősebben látszanak a gélen) is elválasztottunk (FERMENTAS). Ezt követően BioDoc-It[™] fotodokumentációs rendszer (BioImaging system, www.uvp.com) segítségével végeztük el a kiértékelést.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4. 1. A β -aminovajsavas kezelés hatásának vizsgálata

A β -aminovajsavas kezelés hatását legkönnyebben úgy tudtuk ellenőrizni, hogy megvizsgáltuk a vírus titerének változását. Ehhez a HSP70 gén expressziója megfelelő támpontot ad. A génexpresszió és a vírus titer egyenes arányosságban áll egymással.

Kíváncsiak voltunk, hogy egy hajtáson belül hogyan változik a fertőzöttség mértéke a fiatalabb részek felé haladva. Ehhez egy-egy hajtás három különböző régiójából, nevezetesen az alsó (A) (legidősebb), a középső (K) és a felső (F) (legfiatalabb) régiójából származó levelet használtuk mintaként. A mintavétel után a vesszőket hagytuk tovább növekedni. Egy, a mintavétel után fejlődött levél (E) vírustartalmát is vizsgáltuk. Ezeken kívül az eredeti vesszőről nyert zölddugvány levelét (D) is bevontuk a kísérletbe. Pozitív kontrollnak (C) egy nem kezelt szőlővessző levelét használtuk.

Először kiválasztottunk egy tünetmentes vesszőt (2. jelzésű) és az ebből eredeztetett mintákon vizsgáltuk a vírusgenom HSP70 génjének jelenlétét (kb. 550 bp) (6. ábra).

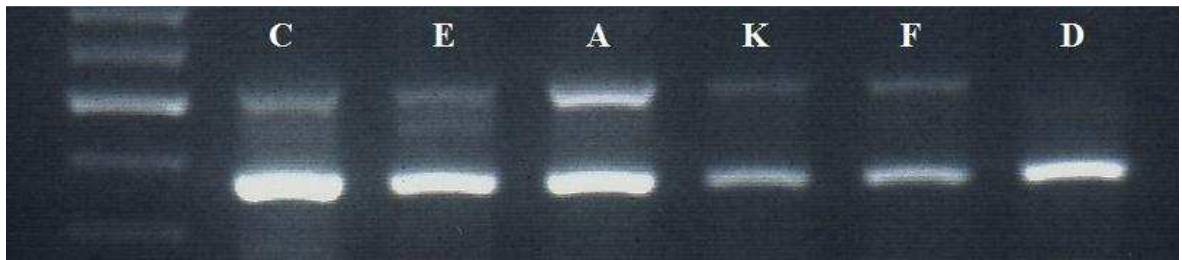


6. ábra: A 2. jelzésű növényi mintákban a HSP70 (kb. 550 bp) gén tesztelése RT-PCR-rel.

C: kontroll, **E:** eredeti növény, **A:** alsó régió, **K:** középső régió, **F:** felső régió, **D:** zölddugvány növény. A minták mellett 100 bp DNS molekulásúly marker.

Azt tapasztaltuk, hogy legmagasabb volt a vírus titer az alsó hajtásrégióból származó levélben. Ez fokozatosan csökkent az egyre fiatalabb részek felé haladva, a dugványnövényről származó mintában pedig nem volt kimutatható a vírus jelenléte.

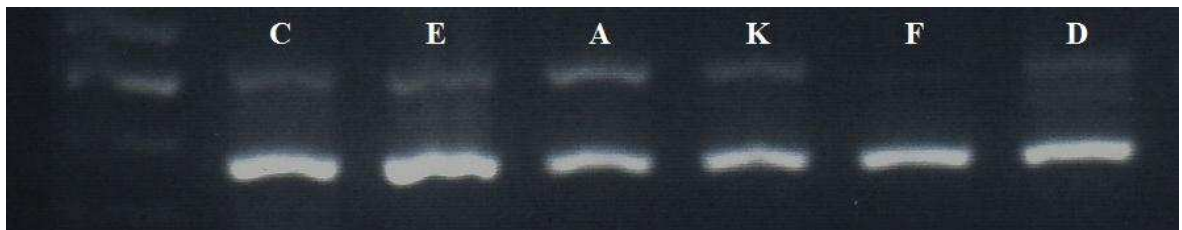
A kísérletet megismételtük úgy, hogy a vírus HSP70 gén mellett a szőlő actin génjének (kb. 400 bp) expresszióját is vizsgáltuk két tünetmentes (2. és 13. jelzésű) és egy tüneteket mutató (7. jelzésű) növényről származó mintákkal (7., 8. és 9. ábrák). A szőlő háztartási gén segítségével már relatív kvantifikálást is végezhattünk.



7. ábra: A 2. jelzésű növényi mintákban a HSP70 (kb. 550 bp) és az actin (kb. 400 bp) gének tesztelése RT-PCR-ral.

C: kontroll, **E:** eredeti növény, **A:** alsó régió, **K:** középső régió, **F:** felső régió, **D:** zölldugvány növény. A minták mellett 100 bp DNS molekulásúly marker.

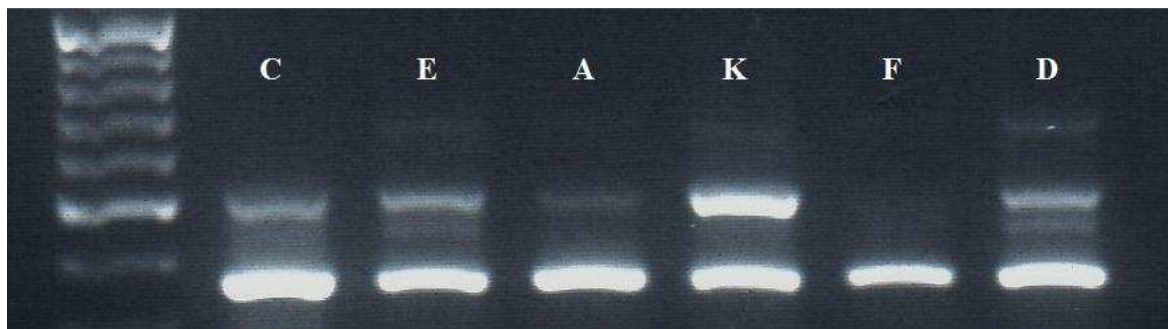
A 2. jelzésű növényi mintákkal végzett kísérletben ugyanazt az eredményt kaptuk, mint korábban.



8. ábra: a 13. jelzésű növényi mintákban a HSP70 (kb. 550 bp) és az actin (kb. 400 bp) gének tesztelése RT-PCR-ral.

C: kontroll, **E:** eredeti növény, **A:** alsó régió, **K:** középső régió, **F:** felső régió, **D:** zölldugvány növény. A minták mellett 100 bp DNS molekulásúly marker.

A másik tünetmentes vesszőről (13. jelzésű) származó minták vizsgálatakor szinte ugyanazt az eredményt kaptuk, mint, a 2. jelzésű minták esetében. Az egyetlen különbség az volt, hogy a dugványnövény mintájában is kismértékben kimutatható volt a vírus jelenléte.



9. ábra: a 7. jelzésű növényi mintákban a HSP70 (kb. 550 bp) és az actin (kb. 400 bp) gének tesztelése RT-PCR-ral.

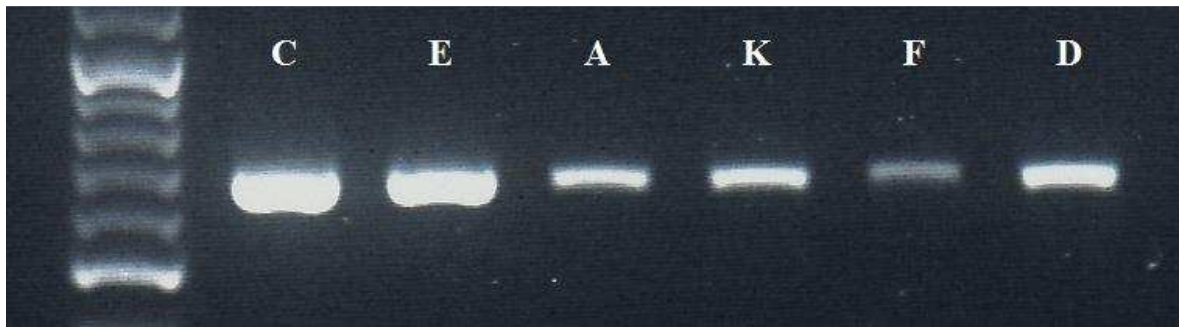
C: kontroll, E: eredeti növény, A: alsó régió, K: középső régió, F: felső régió, D: zölddugvány növény. A minták mellett 100 bp DNS molekulásúly marker.

A 7. jelzésű vessző nemcsak szemmel láthatóan mutatott tüneteket, hanem a PCR reakció során kapott mintázat is eltért a tünetmentes mintáktól. A legmagasabb fertőzöttségi szintet a középső hajtásrégióból származó mintában kaptunk. A dugványnövény levelében is magas vírus titert láthatunk.

Az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a β -aminovajsavas kezelés hatékonyan alkalmazható a szőlő kémiai védelmére és kigyógyítására (kuratív hatás) GLRaV-1 fertőzéssel szemben. Ahhoz azonban, hogy minden növény tünetmentes legyen, még pontosítani kell a kísérleti beállításokat (pl.: β -aminovajsav koncentrációja, kezelések gyakorisága, kezelés időtartama, stb.). Ezek alapján érdemes lehet a β -aminovajsav teljes hatóspektrumának, azaz más vírusokkal szembeni hatékonyságának vizsgálata is.

4. 2. A védelmi szignálútvonalakat jelző gének expressziójának vizsgálata

Az előzőekben leírtakkal párhuzamosan megkezdjük a mintákban vizsgálni a védelmi szignálútvonalakhoz kapcsolódó gének expresszióját. Ehhez a tüneteket mutató 7. jelzésű, és a tünetmentes 13. jelzésű növények mintáit használtuk fel (10. és 11. ábrák).



10. ábra: A 7. jelzésű növényi mintákban a jázmonsav/etilén-függő védelmi szignálútvonalhoz tartozó gén (HSR1 primer, kb. 700 bp) tesztelése RT-PCR-ral.

C: kontroll, E: eredeti növény, A: alsó régió, K: középső régió, F: felső régió, D: zölddugvány növény. A minták mellett 100 bp DNS molekulásúly marker.



11. ábra: A 13. jelzésű növényi mintákban a jázmonsav/etilén-függő védelmi szignálútvonalhoz tartozó gén (HSR1 primer, kb. 700 bp) tesztelése RT-PCR-ral.

C: kontroll, E: eredeti növény, A: alsó régió, K: középső régió, F: felső régió, D: zölddugvány növény. A minták mellett 100 bp DNS molekulásúly marker.

Mindkét növény esetében azt tapasztaltuk, hogy az eredeti növény fiatal levelében mérhető a legnagyobb génexpresszió, de még ez is alacsonyabb, mint a kezeletlen mintában kapott érték. Ezen kívül, a tüneteket mutató növény esetében magasabb expresszió figyelhető meg, mint a tünetmentes növény mintáiban. Pontos következtetéseket a többi szőlővesszőről mintákkal elvégzett vizsgálatok után vonhatunk le.

A szalicilsav-függő védelmi szignálútvonalhoz kötött génexpresszió vizsgálata még folyamatban van.

4. 3. Oxidatív stresszt jelző gének expressziójának vizsgálata

Továbbá elkezdtük vizsgálni a tüneteket mutató (7. jelzésű) és a tünetmentes (13. jelzésű) növényi mintákban az oxidatív stresszhez kapcsolt gének expresszióját (12. és 13. ábrák).



12. ábra: A 7. jelzésű növényi mintákban az oxidatív stresszhez kötődő gén (GST1 primer, kb. 800 bp) tesztelése RT-PCR-ral.

C: kontroll, **E:** eredeti növény, **A:** alsó régió, **K:** középső régió, **F:** felső régió, **D:** zölddugvány növény. A minták mellett 100 bp DNS molekulásúly marker.



13. ábra: A 13. jelzésű növényi mintákban az oxidatív stresszhez kötődő gén (GST1 primer, kb. 800 bp) tesztelése RT-PCR-ral.

C: kontroll, **E:** eredeti növény, **A:** alsó régió, **K:** középső régió, **F:** felső régió, **D:** zölddugvány növény. A minták mellett 100 bp DNS molekulásúly marker.

Az eredmények alapján elmondható, hogy az eredeti szőlővessző fiatal levelében mutatható ki a legintenzívebb oxidatív stressz. A tünetmentes növényről származó mintákban magasabb a génexpresszió mértéke, mint a tüneteket mutató mintákban. Pontos következtetéseket a többi szőlővesszőről mintákkal elvégzett vizsgálatok után vonhatunk le.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Számos kutatási eredmény bizonyította az elmúlt években, hogy a β -aminovajsav (BABA) sokféle kórokozóval szemben képes rezisztenciaválaszt indukálni növényekben. Mind laboratóriumi, mind szabadföldi kísérletekben igazolták, hogy a BABA kezelés védelmet biztosít baktériumokkal, gombákkal, petespórásokkal és fonálférgekkel szemben is. Nagyon kevés adat van azonban a vírusbetegségekkel szembeni hatékonyságáról, eddig még csak a dohány mozaikos betegsége (TMV) elleni hatékonyságát írták le.

A BABA egy mechanizmusában egyedi rezisztenciaválaszt képes indukálni növényekben, ami szorosan összefügg a priming jelenségével. Az indukált rezisztenciára jellemző, hogy számos kórokozó ellen képes hatékony védelmet nyújtani. Ez a széles spektrumú védelem nem más, mint az alapvető védelmi mechanizmusok gyorsabb és erősebb reakciója a patogén támadásakor. Ezt a megnövekedett válaszkapacitást nevezzük primingnak. Az indukált rezisztencia kutatása jórészt a kezeléseknek a védelmi mechanizmusokra és a hozzájuk kapcsolódó génexpresszióra gyakorolt közvetlen hatásaira koncentrált. Ezt a mechanizmust kívántuk kihasználni a szőlő GLRaV-1 vírussal szembeni védelmében.

Kísérleti rendszerként a magyarországi szőlőkben gyakori floem kötött closterovírus fajt, a GLRaV-1 vírust választottuk. Fertőzött Leányka vesszőket hajtattunk 300 ml vizes perlitben, és hetente öntöztük 30 ml 300 mg/l koncentrációjú BABA oldattal. A kezelés végén (8 hét) néhány növény mutatott ugyan tüneteket, de számos közülük teljesen tünetmentes lett. RT-PCR vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a vírus titer fokozatosan csökken a tünetmentes növények fiatalabb részeiben. Ezen növények hajtásainak csúcsi részeiből kapott dugványok teljesen vírusmentesekké váltak és további BABA kezelést nem igényeltek. Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk, hogy az oxidatív stresszhez, illetve a különböző védelmi útvonalakhoz (szalicilsav-függő, jázmonsav/etilén-függő) kapcsolódó génexpresszió hogyan változott a kezelés következtében.

Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy a BABA-kezelés hatékonyan alkalmazható a szőlő kémiai védelmére és kigyógyítására (kuratív hatás) GLRaV-1 fertőzéssel szemben. A kezelések pontos beállítására, illetve a BABA teljes hatóspektrumának (más vírusokkal szembeni hatékonysága) megismerésére azonban még további kísérletek szükségesek.

6. IRODALOM

1. BORSANI, O., VALPUESTA, V., BOTELLA, M. A. (2001): Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* **126**: 1024-1030.
2. BOVEY, R., GARTEL, W., MARTELLI, G. P., VUITENEZ, A. (1980): Virus and virus-like diseases of grapevines. Editions Payot, Lausanne
3. COHEN, Y. (1994): β -Aminobutyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **44**: 273-288.
4. COHEN, Y. (2002): β -Amino-butyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Dis.* **86**: 448-457.
5. DAT, J. F., FOYER, C. H., SCOTT, I. M. (1998): Change in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard plants. *Plant Physiol.* **118**: 1445-1456.
6. FAZELI, C. F., REZAIAN, M. A. (2000): Nucleotide sequence and organization of ten open reading frames in the genome of Grapevine leafroll-associated virus 1 and identification of three subgenomic RNAs. *J. Gen. Virol.* **81**: 605-615.
7. GAFFNEY, T. P., FRIEDRICH, L., VERNOOIJ, B., NEGROTTO, D., NEYE, G., UKNES, S., WARD, E., KESSMANN, H., RYALS, J. (1993): Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754-756.
8. JAKAB, G., COTTIER, V., TOQUIN, V., RIGOLI, G., ZIMMERLI, L., MÉTRAUX, J.-P., MAUCH-MANI, B. (2001): β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**: 29-37.
9. KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, T., HERZOG, J., WARD, E., UKNESS, S., RYALS, J. (1994): Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 439-459.
10. LÁZÁR, J., BISZTRAY, GY. D. (2011): Virus and virus-like diseases of grapevine in Hungary. *Int. J. Hort. Sci.* **17** (3): 25-36.
11. LITTLE, A., REZAIAN, M. A. (2005): Improved detection of grapevine leafroll-associated virus 1 by magnetic capture hybridisation RT-PCR on a conserved region of viral RNA. *Arch. Virol.* **151**: 753-761.
12. MARTELLI, G. P., SILDARELLI, P., BOSCHIA, D. (1997): Filamentous viruses of the grapevine: closteroviruses. In: Monette, P. L. (ed.): *Filamentous Viruses of Woody Plants*. Trivandrum, India: Research Signpost, pp.: 1-9.
13. MENG, B., LI, C., GOSZCZYNSKI, D. E., GONSALVES, D. (2005): Genome sequences and structures of two biologically distinct strains of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and sequence analysis. *Virus Genes* **31**: 31-41.

14. MURPHY, A. M., CARR, J. P. (2002): Salicylic acid has cell-specific effects on tobacco mosaic virus replication and cell-to-cell movement. *Plant Physiol.* **128**: 552-563.
15. NAWRATH, C., MÉTRAUX, J.-P. (1999): Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**: 1393-1404.
16. PAPAIVIZAS, G. C. (1964): Greenhouse control of *Aphanomyces* root rot of peas with aminobutyric acid and methylaspartic acid. *Plant Dis. Rep.* **48**: 537-541.
17. PAPAIVIZAS, G. C., DAVEY, C. B. (1963): Effect of amino compounds and related substances lacking sulfur on *Aphanomyces* root rot of peas. *Phytophthoraology* **53**: 116-122.
18. PIETERSE, C. M. J., VAN LOON, L. C. (1999): Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* **4**: 52-58.
19. RAVAZ, L., VERGE, G. (1924): Le rugeau de la vigne. *Progrès Agricole et Viticole* **45**: 11-17, 35-38, 86-89, 110-113, 135-141.
20. SANNINO, F. A. (1906): Il rossore delle viti. *Rivista di Patologia Vegetale* **1**:162-163.
21. SIEGRIST, J., OROBER, M., BUCHENAUER, H. (2000): β -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **56**: 95-106.
22. SILVERMANN, F. P., PETRACEK, P. D., HEIMAN, D. F., FLEDDERMAN, C. M., WARRIOR, P. (2005): Salicylate activity. 3. Structure relationship to systemic acquired resistance. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 9775-9780.
23. STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J.-P. (1997): Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**: 235-270.
24. TON, J., MAUCH-MANI, B. (2004): β -Amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-independent priming for callose. *Plant J.* **38**: 119-130.
25. VALLAD, G. E., GOODMAN, R. M. (2004): Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* **44**: 1920-1934.
26. VAN LOON, L. C. (1997): Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**: 753-765.
27. YAMAGUCHI, I. (1998): Activators of systemic acquired resistance. In: HUTSON, D. H., MIYAMOTO, J. (eds.): *Fungicidal activity: Chemical and biological approaches to plant protection*. New York. Wiley & Sons Inc., pp.: 193-219.

28. ZIMMERLI, L., JAKAB, G., MÉTRAUX, J.-P., MAUCH-MANI, B. (2000): Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12920-12925.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkámat a PTE Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Növényélettani Tanszékén végeztem. Köszönettel tartozom a tanszék munkatársainak, hogy munkám elvégzésében segítettek.

Köszönöm Dr. Lázár Jánosnak a kutatáshoz a növényi anyag biztosítását, illetve Werner János egyetemi tanársegédnek a szőlővesszők gondozásában és a kezelésben nyújtott segítségét.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Jakab Gábor egyetemi tanárnak munkám irányításáért és a sok segítségért, tanácsért.

Köszönöm a tanszék laboránsának, Kovácsné Balogh Zsuzsannának a kísérletek elvégzéséhez szükséges technikai háttér biztosítását.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a biztatást és támogatást.

„Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez”

Alulírott Mátai Anikó a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- a β -aminovajsavas kezelést,
- a zöld dugványozást,
- az összes RNS kivonást,
- a reverz transzkripciót,
- a szemikvantitatív PCR-t
- a gélelektroforézist

végeztem el.

.....

aláírás

Pécs, 2013. január 06.