SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

Doktori (PhD.) értekezés

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
Növényi Genetika és Biotechnológia Intézet

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

....

Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék 3
Rövidítések jegyzéke 5
1. Bevezetés 7
2. Irodalmi áttekintés 9
2.1. A napraforgó-peronoszpóra 9
2.2. A napraforgó-peronoszpórával fertőzött fogékony és rezisztens növények tünetei 11
2.2.1. Kompatibilis kapcsolat 11
2.2.2. Inkompatibilis kapcsolat 11
2.3. A szisztemikusan szerzett rezisztencia (SAR) 13
2.3.1. A rezisztencia és a SAR fogalma 13
2.3.2. A SAR felfedezése 13
2.3.3. A rezisztencia lokális és szisztemikus indukálása 14
2.3.3.1. A SAR kialakulása a növényben 15
2.3.4. A szisztemikusan szerzett rezisztencia „költsége” (fitnesz veszteség) 18
2.3.5. A kémiailag indukált SAR 19
2.3.5. 1. Indukált rezisztenciát kiváltó vegyületek 20
2.3.6. Az aktivátoros kezelés összeegyeztethetősége a konvencionális fungicides védelemmel 26
2.4. A növények védekezési reakciói 27
2.4.1. A reaktív oxigén formák (ROS) szerepe 27
2.5. A reaktív oxigénformák méregtelenítése 27
2.5.1. Polifenol oxidáz (PPO) 27
2.5.2. Gvajakol-peroxidáz (POX) 28
2.5.3. Kataláz (CAT) 29
2.5.4. Glutation-S-transzferáz (GST) 29
2.6. Defenzin szerepe a növényekben 30
3. Anyag és módszer 31
3.1. Növény és kórokozó 31
3.2. Aktivátoros kezelés 31
3.3. Mesterséges fertőzés 32
3.4 Tüneti értékelés 32
3.5. Mikroszkópos vizsgálat 32
3.6. Szabadföldi kísérletek 33
3.7. *In vitro* sporangium csíráztatás 34
3.8. Enzimek aktivitásvizsgálata 35
3.8.1. Gvajakol-peroxidáz (POX) aktivitás mérése 35
3.8.2. Polifenol-oxidáz (PPO) aktvitás mérése 35
3.9. Génkifejeződési vizsgálatok 36
3.10. Statisztikai elemzések 37
4. Eredmények 39
4.1. Makroszkópos tüneti értékelés 39
4.2. A növényi aktivátorok hatása a napraforgó-peronoszpórára szabadföldi körülmények között 45
4.3. Szöveti változások a kezelt és/vagy fertőzött napraforgó növényekben 47
4.4. A növényi induktorok közvetlen hatása a *Plasmopara halstedii* sporangiumainak csírázására *in vitro* körülmények között 53
4.5. Az indukált rezisztenciával kapcsolatba hozható enzimek aktivitásváltozásai 54
4.5.1. A POX aktivitásának változása 54

4.5.2. A PPO aktivitásának változása 58
4.6. Az indukált rezisztenciával összefüggésbe hozható génkifejeződés változások 61
4.6.1 A glutation-S-transzferáz (GST) gén kifejeződés változása 61
4.6.2. A defenzin (PDF) gén kifejeződésének változása 64
4.6.3. A kataláz (CAT) gén kifejeződésének változása 68
4.6.4. A kórokozó jelenlétének kimutatása 71
4.7. Új tudományos eredmények 74
5. Következtetések és javaslatok 77
5.1. A növények makroszkópos változásainak értékelése 77
5.2. A szöveti szinten megfigyelt változások jelentősége 79
5.3. Az *in vitro* gátló hatás jelentősége 79
5.4. A vizsgált enzimek szerepe a rezisztenciában 80
5.5. A rezisztens állapottal összefüggésbe hozható gének 81
6. Összefoglalás 85
7. Summary 89
8. Mellékletek 91
M1. Irodalomjegyzék 91
M2. RNeasy Mini Kit leírása 111
M3. iScript cDNS szintézis kit leírása 112
M4. Fermentas Taq DNS polimeráz protokoll PCR vizsgálathoz 113
9. Köszönetnyilvánítás 114

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BTH	benzothiadiazol (syn: acibenzolar-S-metil ASM)
BABA	ß-aminovajsav (ß-aminobutirc acid)
CAT	kataláz (catalase)
CLI	sziklevélig terjedő fogékonyság (*cotyledon limited infection*)
GST	glutation-S-transzferáz
HLI	hipokotilig terjedő fogékonyság (*hypokotil- limited infection*)
HR	túlérzékenységi válasz (*hypersensitive reaction*)
INA	izonikotinsav (isonicotinic acid)
PDF	defenzin (*plant defensin*)
PCR	nukleinsav-sokszorosítás polimeráz enzimmel láncreakcióban (*polymerase chain reaction*)
POX	gvajakol-függő peroxidáz (*peroxidase*)
PPO	polifenol-oxidáz (*polyphenol-oxidase*)
PR	kórfolyamat függő (pathogenesis-related)
ROS	reaktív oxigén formák (*reactive oxygen species*)
RT-PCR	reverz transzkripcióval egybekötött nukleinsav-sokszorosítás
SA	szalicilsav (*salicylic acid*)
SAR	szisztemikus szerzett rezisztencia (*systemic acquired resistance*)
Tm	olvadási hőmérséklet a PCR reakcióban („melting temperature”)

1. BEVEZETÉS

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, így képesek megbetegíteni az addigi rezisztens fajtákat. További probléma a tradicionális védekezésben a kórokozó csökkenő érzékenysége az alkalmazott fungicidekkel szemben. Mindezek alapján a gyakorlatban is szükség lehet olyan alternatív védekezési eljárásokra, amely 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. 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. 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, hatásmechanizmusukban számos hasonlóságot és különbözőséget is igazoltak a kutatók. A benzotiadiazol mellett a két legtöbbet tanulmányozott növényi aktivátor az izonikotinsav (2,6-diklór-izonikotinsav) és a vajsav különböző izomerjei (elsősorban a ß-aminovajsav).

Az indukált rezisztenciát már eddig is számos gazda – parazita kapcsolatban vizsgálták a jelenség hátterében lezajló folyamatok azonban még kevéssé ismertek. Ahhoz viszont, hogy ezt a kémiailag is kiváltható növényi védekezési mechanizmust a jövőben tudatosan és eredményesen alkalmazhassák növényi kórokozók ellen, még számos kérdésre kell választ adni. Az indukált rezisztencia megismeréséhez a növényben lejátszódó folyamatokat kell megfigyelni és minél pontosabban jellemezni. A vizsgált gazda-parazita kapcsolatban fontos lenne tudni, hogy mi játszódik le a napraforgó növényekben a peronoszpórás fertőzés és/vagy az aktivátoros kezelés hatására és milyen reakciókhoz vezet a kettő együttes hatása. Mivel a kórokozó nagy genetikai

variabilitással rendelkezik, a szabadföldön addig rezisztensnek ismert növény is fogékonnyá válhat, másrészt a napraforgó genotípusok között is vannak különbségek a rezisztencia fokában. Fontos lenne tehát tudni, hogy hogyan „viselkednek” az indukált rezisztencia során a különböző fokú rezisztenciával rendelkező és a teljesen fogékony növények. Különböző fokú 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 szisztemikus szerzett rezisztencia tanulmányozására több, eltérő mértékű genetikai rezisztenciával rendelkező napraforgó genotípus összehasonlításában.

Célkitűzéseink a fentiek alapján a következők voltak:

1. Az aminovajsav 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* gazda – parazita kapcsolatban;
2. A növényi induktor és rezisztencia gének hatásának összehasonlító elemzése, illetve együtthatásuk jellemzése az alábbiak szerint:
   – mikroszkópos vizsgálatok a növény – kórokozó kapcsolatok leírására,
   – enzimanalízis egyes, a védekezéssel kapcsolatba hozható enzimezek aktivitás változásának kimutatására,
   – vagy génkifejeződésének megállapítására
3. *In vitro* spóracsíráztatási kísérlet az aktivátoroknak a kórokozóra gyakorolt közvetlen gátló hatásának megállapítására.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A napraforgó-peronoszpóra

A napraforgó peronoszpórás megbetegedésének kórokozója a *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berlese et de Toni. A kórokozó az Oomycota törzsbe, ezen belül a *Peronosporales* rend *Peronosporaceae* családjába tartozik. A betegséget először 1902-ben írták le Észak-Amerikában (Sackston, 1981), az európai kontinensen Jaczewski fedezte fel először kártételét a Szovjetúnióban 1931-ben (Savulescu, 1941), hazánkban Podhradszky mutatta ki és határozta meg 1949-ben (Podhradszky, 1954). A betegség kialakulása jelentős károkat okozhat, a kórokozó változékonysága és kitűnő alkalmazkodóképessége miatt igen nehezen küzdhető le.

A betegségnek szisztemikus és lokális tünetei egyaránt előfordulhatnak. A szisztemikus fertőzés hatására csírakori pusztulás, kisebb-nagyobb mértékű törpülés alakul ki. A levél erek mentén klorózis, a levelek fonákán pedig fehér színű bevonat látható, melyet a kórokozó sporangiumtartói és sporangiumai alkotnak. A törpült napraforgók ízközei rövidülnek, ezáltal a levelek szokatlanul sűrűn állnak a növényen („káposztajelleg”). A beteg növényeken tányér nem képződik, vagy nagyon apró lesz. Ritkábban előforduló szisztemikus tünetei a különböző levéltorzulások, a tányér másodlagos zöldülése, illetve az úgynevezett szártövi golyvásodás (Virányi, 1999a). A szisztemikus tünetek mellet fontosak a lokális, másodlagos tüneteket is. Ezek a leveleken megjelenő, kisméretű, világoszöld klorotikus foltok. Önmagukban a termést nem befolyásolják, de a kórokozó a leveleken megjelenő foltokból kiindulva szisztemizálódhat a növényben, és bejuthat a képződő magokba is. A sporangiumtartók csúcsi részükön hármas elágazásúak, amelyekről nagyméretű (25-30×16-29 µm), megnyúlt, tojásdad alakú sporangiumok fűződnek le (Spring et al., 1991).

A kórokozó a talajba visszakerült növényi maradványokban oospórákkal, vagy a kaszatok belsejében, micéliumos alakban telel, illetve marad fenn. Goossen és Sackston (1968) kutatásai azt mutatják, hogy az oospóra a talajban évekig is életképes maradhat. A kórokozó homotalliás szaporodású, de heterotalliás is lehet (Spring, 2000). A növényre került spóra a sejtközötti járatokban hifákat fejleszt (intercelluláris növekedés) (Doken, 1986), azokon szívókák, ún. hausztóriumok nőnek. A fertőző hifa csúcsában vezikulum felhalmozódás jelzi a fokozott enzimtevékenységet. A gomba biotróf táplálkozású, tehát a gazdanövény élő sejtjeit parazitálja, azoktól vonja el a szükséges tápanyagot. A biotróf kapcsolat megteremtése szempontjából a legfontosabb a gazdasejtekbe behatoló hausztóriumok fejlesztése, amely lehetővé teszi a tartós egyensúlyi állapotot a parazita és a gazdanövény között; a közöttük lezajló folyamatok az

extrahausztóriális mátrix közvetítésével történnek (Érsek és Hornok, 1985). A fertőzött fogékony növényekben lezajló élettani változások közül fontos a terpenoidok szintézisének felgyorsulása, valamint a fitoalexin- felhalmozódás (Spring et al., 1991).

A kórokozó fertőzéséhez kedvező a hűvösebb idő (14-19 °C), megfelelő csapadékkal és páratartalommal párosulva (Horváth, 1995). Mesterséges fertőzéshez 16 °C az ajánlott hőmérséklet, ilyen körülmények között 4-5 óra alatt megtörténik a rajzospórák kirajzása és csírázása (Virányi, 1999a).

A kórokozónak különböző patológiai változatai (patotípusok vagy rasszok) alakultak ki. Az időjárási feltételek mellett a különféle rasszok agresszivitása és virulenciája is döntő lehet a fertőzés kialakulása szempontjából. A különböző patotípusok mindegyike jól körülhatárolható virulenciával rendelkezik (Gulya et al, 1998; Kormány és Virányi, 1997). A világon eddig legkevesebb 36 rassz fordul elő (Gulya, 2007). A magyarországi rasszokat virulenciájuk alapján Virányi és Gulya (1995) 6 rasszba sorolta az 1976 és 1993 között magyarországi termőhelyekről begyűjtött minták alapján. A magyarországi patotípusok (rasszok) előfordulási gyakoriságuk sorrendjében a 700-as, a 710-es, a 730-as és a 330-as, míg a korábban leggyakoribb 100-as (európai rassz) visszaszorult (Gulya, 1995).

A napraforgó-peronoszpóra elleni védelem az agrotechnikai, genetikai és kémiai eljárások együttes alkalmazásával lehet csak sikeres. A védekezésben alapvető szerepet játszik az agrotechnikai rendszabályok betartása: az 5-6 éves vetésváltás, a korai vetés, a gyomgazdák (pl.: *Xanthium strumarium, Ambrosia artemisiifolia*) irtása és az árvakelések megsemmisítése (Virányi, 1999b; Walcz et al., 2000). A rezisztens hibridek termesztése alapvető védekezési mód. A nemesítés során a betegség ellenállóság génjének beültetésére perspektivikus módszer a csíraplazma-tenyésztés, az interspecifikus hibridizáció és a vad fajok alkalmazása (Skoric, 1992). Az új *Plasmopara halstedii* rasszok megjelenése, illetve a kórokozóban kialakuló rezisztencia miatt is fontos a nemesítők munkája (Albourie et al., 1998). A védekezés harmadik lehetősége a fungicides kezelés. A napraforgó esetében ez kaszatcsávázást jelent, szisztemikus hatású metalaxyl/mefenoxam hatóanyagú szerrel. Újabban Franciaországban, az Egyesül Államokban és Spanyolországban a metalaxil hatásának csökkenését tapasztalták, azaz a kórokozó rezisztenssé válhat a metalaxillal szemben (Mouzeyar et al., 1994; Albourie et al., 1998; Gulya et al., 1999).

2.2. A napraforgó-peronoszpórával fertőzött fogékony és rezisztens növények tünetei

2.2.1. Kompatibilis kapcsolat

Egy kórokozó és gazdanövényének találkozása során a fertőzött növényi sejtekben és szövetekben létrejövő elváltozásokban is megnyilvánulhatnak a funkcionális zavarok. A fertőzés következtében a sejtfal elváltozásai és a plazmamembrán károsodásai figyelhetők meg.

A napraforgó-peronoszpóra fertőzését követően a fogékony növényben a kórokozó micéliuma intercellulárisan terjed a gyökérben és a hipokotil szárrészben mind hosszanti, mind pedig keresztirányban. Mind a kéreg-, mind a bélparenchimát átjárja, miközben gömb alakú hausztóriumokat bocsát a gazdanövény sejtjeibe a tápanyagfelvétel biztosítására (Mouzeyar et al., 1993). A megtámadott sejtek semmilyen kóros elváltozást nem mutatnak. Idővel a kórokozó eljut a sziklevelekbe és az epikotilba, amelynek következménye a már korábban említett szisztemikus tünetek megjelenése.

Fogékony növényekben a szövettani vizsgálatok kallóz képződést mutattak ki a hausztóriumok körül és ligninlerakódást a gombafalak környezetében. A kompatibilis gazda-parazita kapcsolatot fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva a megtámadott sejtek falának, valamint a hifa körüli sejtközötti állománynak erős fluoreszkálása (autofluoreszcenciája) volt megfigyelhető (Mouzeyar et al., 1993; Mazeyrat et al., 1999). A fentebb leírt növényi reakciók függetlenek a növény fajtájától, illetve a kórokozó patotípusától, vagyis azonosak a különböző kompatibilis gazda-parazita kapcsolatokban (Gulya et al., 1996).

2.2.2. Inkompatibilis kapcsolat

A kompatibilis kapcsolatokkal ellentétben, ahol a fertőzést követően mindig hasonló folyamatok játszódnak le, a napraforgó-peronoszpórával szembeni rezisztenciának több típusa létezik (Gulya et al., 1996). A rezisztencia egyik formája az, melynek során a kórokozó a növénybe való behatolást követően felnő a sziklevelekig, sőt ott sporulációra is képes. A legelső nódusz úgy tűnik, hogy gátat szab a kórokozó terjedésének, így az nem tud továbbjutni a lomblevelekbe. Ez a típusú reakció jellemző például az RHA 274- es vonalnak a 100-as patotípussal szemben mutatott rezisztenciájára. Ezt a CLI (cotyledon-limited) típusú rezisztenciafajtát II-es típusú rezisztenciának nevezték el (Mouzeyar et al., 1994). Ennél hatékonyabb típusú rezisztencia során a kórokozó növekedése a gyökerekre és a hipokotil alsóbb részeire korlátozódik, így a kórokozó nem jut el a

sziklevelekig. Ez a HLI (hypocotyl- limited) típusú (Virányi és Gulya, 1996) vagy I-es típusú (Mouzeyar et al., 1994) rezisztencia, amely például az RHA 340-es napraforgó vonal és a *P. halstedii* 700-as patotípusának kapcsolatában figyelhető meg. A fent említett két részleges (I-es és II-es) ellenállósággal szemben a teljes rezisztenciával rendelkező napraforgó növényekben a kórokozó nem képes megtelepedni. Ez a teljes rezisztenciával (immunitás) rendelkező növényekben figyelhető meg, többek között a HA 335-ös vonal és a 700-as patotípus kapcsolatában.

A rezisztens növények megtámadott és hirtelen elhalt (hiperszenzitív) sejtjeinek citoplazmája szemcsés, barnás elszíneződést mutat, a környező sejtek megnyúlnak, osztódásnak indulnak és mindez - mikroszkóp alatt vizsgálva - pókhálószerű mintázatra (spider's web) emlékeztet (Mouzeyar et al., 1993). A megtámadott és a hiperszenzitíven reagáló sejtek citoplazmája, de még inkább a sejtfala erősen fluoreszkál UV megvilágítás alatt. Mindezek mellett a kórokozó képletei (micélium, hausztórium) is megjelenhetnek a részlegesen ellenálló növények szöveteiben, de a gomba növekedése erősen gátolt és csak a kéregparenchimában található meg (Virányi, 1979). A hiperszenzitív reakciót (HR) mutató sejtek falában kallóz képződés és ligninlerakódás is megfigyelhető. A fertőzés hatására a rezisztens növények szöveteiben fenol vegyületek és egyéb másodlagos anyagcseretermékek halmozódnak fel. Genetikai vizsgálatok szerint a napraforgó-peronoszpórával fertőzött ellenálló növényekben fenilalanin ammónia-liáz, kitináz és ubiquitin transzkriptumok keletkeznek, amelyeknek fontos szerepük lehet az ellenállóság kialakításában (Mazeyrat et al., 1999). A hiperszenzitív reakció által kiváltott nekrózisok megjelenése mindig együtt jár az oxidatív reakciók aktiválásával (Goodman et al., 1991). A növényi sejtek a patogén gomba behatolásának hatására aktív oxigént termelnek, amelyek közül ki kell emelni a szuperoxidot, a hidrogén- peroxidot és a hidroxil-gyököt (Baker és Orlandi, 1995). A szinglett oxigén a növényben gyorsan átalakul szuperoxiddá és hidrogén-peroxiddá (Foyer és Halliwell, 1976). Mivel azonban az aktív oxigénformák mérgezőek a növényekre, ezért szükség van a méregtelenítésükre, illetve az őket termelő folyamatok szabályozására. Az aktív oxigénformák méregtelenítését antioxidánsok végzik (Van Kuijk et al., 1987).

A hiperszenzitív reakció megjelenése éppen annak a következménye, hogy az oxidatív és reduktív folyamatok egyensúlya megbomlik (Ádám et al., 1989). E folyamat következtében a fenolok oxidációja túlzott mértékűvé válik és ez a sejtszerkezet felbomlásához (nekrózisok kialakulásához) vezet. A HR által kiváltott nekrózisok megjelenése mindig párhuzamos az oxidatív reakciók aktiválásával (Goodman et al., 1991).

A hiperszenzitív reakcióval kapcsolatos növényi sejtnekrózist valószínűleg a képződő szuperoxid szabad gyök és más toxikus szabad gyökök indukálják (Ádám, 1989). Az aktív oxigénformáknak több szerepe van a növényekben. Egyik igen fontos szerepük a

mikroorganizmusok károsítása. Emellett még az indukált sejtfalszilárdítás, génaktiválás és a sejthalál kialakításában is fontos szerepet játszanak.

2.3. A szisztemikusan szerzett rezisztencia (SAR)

2.3.1. A rezisztencia és a SAR fogalma

A rezisztencia az élőlények azon képessége, hogy egy kórokozó vagy más, számukra károsító tényező hatását leküzdjék (Agrios, 1988). A szisztemikusan szerzett rezisztencia a rezisztencia azon formája, amikor egy elsődleges fertőzést (immunizációt) követő egy újabb fertőzés esetén a növény rezisztenciát mutat a kórokozók szélesebb körével szemben (Kuc, 1982; Cohn et al. 2001). A SAR-t élettani immunitásnak is szokták nevezni (Chester, 1933). Az indukált növény rezisztenssé válik a virulens kórokozó támadásával vagy más károsítóval szemben a védekező rendszerének gyorsabb aktiválódása révén. A SAR kórfolyamat függő (PR) (pathogenesis-related) fehérjék szintézisével és szalicilsav termelődéssel jellemezhető (Van Loon, 1997). A SAR-t, mint kórokozó fertőzésre adott választ írták le először, azonban nem lehet elkülöníteni, hogy melyik kórokozó vált ki SAR-t és melyik nem. Számos példa bizonyítja, hogy kórokozók széles skálája képes kiváltani az indukált rezisztenciát, de arra is találunk példát, hogy egyes kórokozók nem képesek indukálni a SAR-t (Ryals et al., 1994).

2.3.2. A SAR felfedezése

Az elképzelés, miszerint a növények képesek a saját védekező rendszerüket aktiválni és rezisztenciát indukálni a kórokozók ellen, már közel 100 éve ismert. A legkorábbi munkákat Chester összegezte 1933-ban, aki a korai 20. század számos leírását áttekintette (Chester, 1933). Más összefoglalók szintén részletezik a korai vizsgálatokat (Matta, 1971; Kuc, 1982; Sequeira, 1983).

A legkorábbi beszámoló, ami a betegségek elleni indukált rezisztenciáról szól, a 20. század első feléből származik, ahol Bernard bemutatta, hogy orchidea csíranövényt gyenge patogenitású rizoktóniával előfertőzve megemelkedett rezisztenciára való képességet eredményezett a növényben a jóval patogénebb rizoktónia izolátummal szemben (Allen, 1959). Később Müller és Börger bemutatta, hogy a burgonyagumó bevágott felületét egy avirulens fitoftóra rasszal fertőzve lokálisan indukálta a rezisztenciát ugyanezen kórokozó virulens rasszával szemben (Müller, 1959). Ha a nekrotikus, HR-t mutató szöveteket óvatosan eltávolították, a közvetlenül a nekrotikus szövetek alatt lévő egészséges szövetek szintén rezisztensek lettek a virulens fitoftóra izolátumokkal szemben.

Az 1950-es években, az indukálható védelem kezdeti biokémiai bizonyítékát mutatták be (Kuc, 1957) és ez magába foglalta az indukált rezisztenciát is. Williams és Kuc (1969) kimutatták, hogy a D-, vagy DL-fenilalanin rezisztenciát indukált alma levelekben a ventúriás varasodás ellen. Hijwegen (1963) kísérleteiben azt tapasztalta, hogy a fenilszerin rezisztenciát indukálhat az uborkában, és az 1970-es évek végére a szalicilsavról is bebizonyították, hogy a rezisztencia induktora (White, 1979). Mindezek után számos szintetikus és természetes anyagról bizonyosodott be, hogy rezisztenciát indukálnak (Kessmann et al., 1994; Cohen 2002). Az első szintetikus rezisztencia aktivátor, a BTH (1, 2, 3- benzotiadiazol-7-tiokarboxilsav- S- metilészter) az 1990es években került kereskedelmi forgalomba, és több más rezisztenciát indukáló anyagot is azonosítottak. Napjainkban már megszámlálhatatlanul sok publikáció született az indukált rezisztenciával kapcsolatban, számos gazda-parazita kapcsolatot feldolgozva.

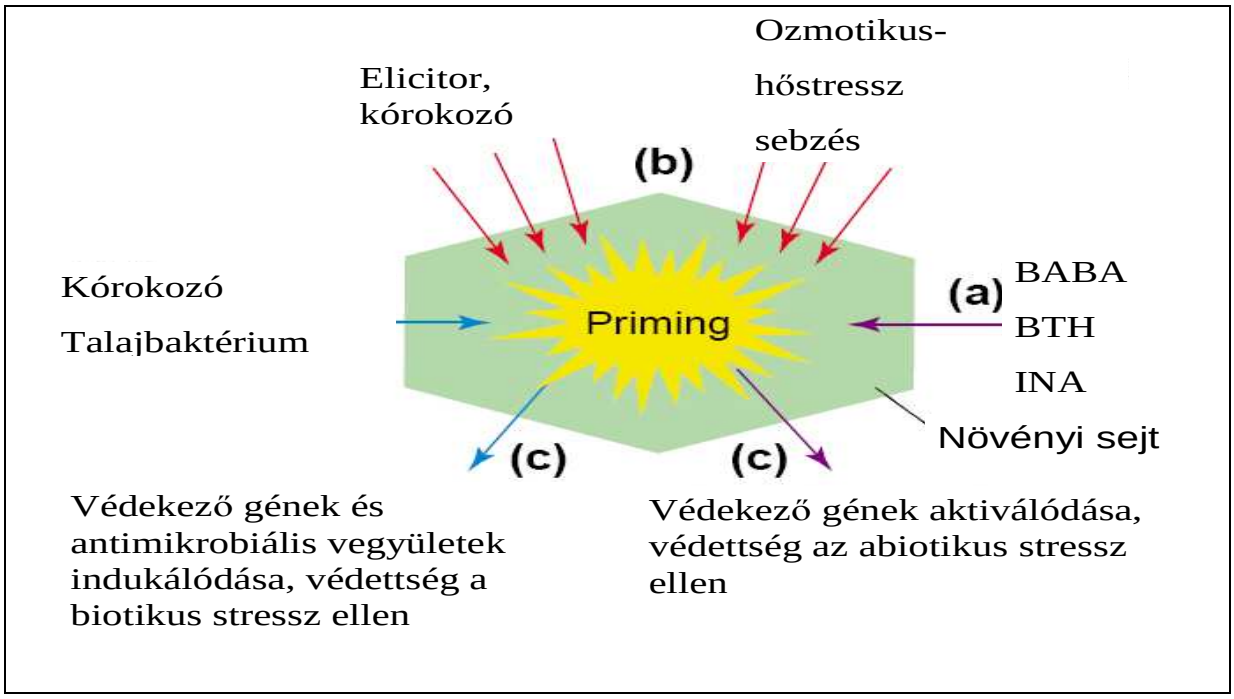
Az elmúlt 10 évben a különböző kutatások alapján világossá vált, hogy a kórokozók elleni indukált rezisztenciának nem csupán egy típusa létezik. Legalább két formája ismert, a szisztemikusan szerzett rezisztencia (SAR) és az indukált szisztemikus rezisztencia (ISR) (Sticher et al., 1997; Van Loon et al., 1998). Az ISR-t bizonyos növényi növekedést elősegítő talajbaktériumok (PGPR: plant growth-promoting-rhizobacteria) törzsei képesek indukálni (Van Loon et al., 1998). A SAR szalicilsav jelátvitel és kórfolyamat függő (PR) fehérjék szisztemikus kifejeződésétől függ (Sticher et al., 1997; Hammerschmidt et al., 1999), így az ISR abban is különbözik tőle, hogy az etilén és jázminsav észlelésétől is függ, és ez nincsen kapcsolatban a PR gének kifejeződésével. Azonban a SAR és ISR is egyaránt széles spektrumú rezisztenciát biztosít a növényeknek.

2.3.3. A rezisztencia lokális és szisztemikus indukálása

Az indukált rezisztencia lehet lokális és szisztemikus. A lokális indukált rezisztencia azokban az esetekben alakul ki, amikor az indukáló kezelést (kórokozóval vagy kémiai induktorral) ugyanazon a helyen alkalmazzák, mint a későbbi kórokozóval történő fertőzést. A szisztemikusan indukált rezisztencia esetében a kiváltott rezisztencia térben elválasztódik az indukálás pontjától. Bár a lokális és a szisztemikus rezisztencia térben eltérő, mindkettő kialakulásához szükség van inkubációs időre a kezelés után, valamint a rezisztencia egyik esetben sem specifikus.

A lokális rezisztencia esetében a kórokozó gátlásának hátterében a „védekezőrendszer termékei”, mint például a kórfolyamat- függő fehérjék (PR protein), az érintett sejt falának változásai állnak, amelyeknek köszönhetően a kórokozó fejlődése megáll (Hammerschmidt, 1999). A szisztemikus rezisztencia esetében az indukáló vagy rezisztenciát aktiváló kezelés az indukált résztől távolabbi növényi részekben is érvényesül, és lehetővé teszi a védekező rendszer gyors működésbe lépését a fertőzéssel szemben.

Ha a növényt „kihívó fertőzésnek” vetik alá a kórokozóval való érintkezés vagy az aktivátoros kezelés után, a fiziológia válaszok (és így a rezisztencia kialakulása) sokkal gyorsabban figyelhetők meg és nagyobb kiterjedésűek, mint a nem kezelt kontroll növényekben. Ez a jelenség az úgynevezett priming (Zimmerli et al., 2000; Conrath et al., 2002) (1. ábra). A rezisztenciát nem csak kórokozókkal lehet indukálni, hanem kémiai vegyületekkel (később részletezve: BTH, INA, BABA), növényi kivonatokkal (Baysal és Zeller, 2004; Kagale et al., 2004; Jayaraj et al., 2008) illetve abiotikus stresszorokkal is (pl. paraquat, ózon, sóoldat) (Király et al., 1991; Sandermann et al., 1998; Strobel és Kuc, 1995). A felsoroltak közül a növényvédelem számára talán a legígéretesebb lehetőség a kémiai induktorok használata.



1. ábra A növényben a BABA, INA vagy BTH kezelés hatására a növényi sejt sokkal gyorsabban vagy hatékonyabban reagál a kórokozó fertőzésére. A kezelés hatására a sejtek jobban meg tudják védeni magukat az abiotikus stresszektől, mint például a sebzés. (a) a priming lépés (b) biotikus és abiotikus stresszorok (c) lehetséges válaszok (Conrath et al., 2002).

2.3.3.1. A SAR kialakulása a növényben

A növényi hormonok közül a jázminsav (JA), szalicilsav (SA) és etilén (ET) a fő szabályozója az indukált rezisztenciának (Pieterse és Van Loon, 1999; Glazebrook, 2001; Thomma et al., 2001). A növények a fenti a jelátvivők specifikus keverékének termelésével válaszolnak a károsítók (kórokozók, kártevők) támadására. A jelátvivők termelése változik mennyiségben,

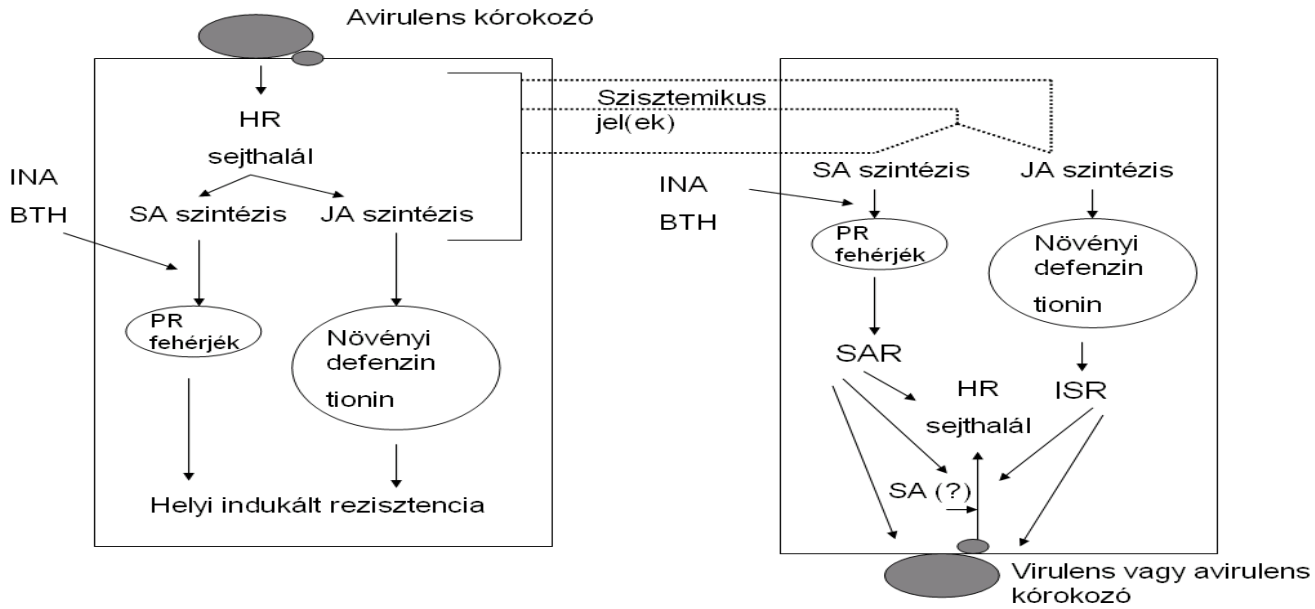
elrendezésben, időzítésben, valamint a védekezésben szerepet játszó gének különböző csoportját aktiválják, amelyeket végül is a támadóval szembeni védekezési válasz természete határoz meg (Reymond és Farmer, 1998; Rojo et al., 2003; De Vos et al., 2005). Különböző lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) – kórokozó kölcsönhatások teljes expressziós profiljáról mutattak ki átfedést a SA-, JA- és ET- függő védekezési mechanizmusok között (Glazebrook et al., 2003; De Vos et al., 2005). A kommunikálás a jelátviteli utak között egy erőteljes szabályozó lehetőséget nyújt, ami lehetővé teszi a növény jól összehangolt védekezési válaszait. Más növényi hormonok, mint például az abszcizinsav (ABA), brassinosteroidok és auxinok is valószínűleg szerepet játszhatnak a kórokozók elleni indukált rezisztenciában, de ezek jelentősége nem annyira ismert (Jamenson, 2000; Ton és Mauch-Mani, 2004; Mauch-Mani és Mauch, 2005; Ton et al., 2005).

A szalicilsav, a jázminsav és az etilén a növényi fejlődésben betöltött szerepükön kívül az elsődleges védekező válaszok szabályozásában is fontosak. Sok esetben a mikrobiális kórokozók fertőzése és a növényevő ízeltlábúak támadása kapcsolatban van a fent említett hormonok megemelkedett termelésével, és velejárója jól meghatározott, a védekezésben fontos szerepet játszó géncsoportok aktiválódásának (Maleck et al., 2000; Schenk et al., 2000; Reymond et al., 2004; De Vos et al., 2005). Sőt mi több, ezeknek a vegyületeknek a külső alkalmazása gyakran eredményezi a rezisztencia megemelkedett szintjét is (Van Wees et al., 1999). Az SA - függő védekezési reakció általában összefüggésben van a programozott sejthalállal, amit HR néven ismerünk. Ez a válasz megállítja a növekedő biotróf kórokozót azzal, hogy megöli a megfertőzött sejtet. Valójában ez a védekezés a biotrófok széles köre ellen hatékony, de általában nem véd a nekrotrófokkal szemben (Govrin és Levine, 2000; Thomma et al., 2001). Viszont JA - függő védekezési válaszok, amelyek nincsenek összefüggésben a programozott sejthalállal, a nekrotrófok ellen adnak alternatív védekezést (McDowell és Dangl, 2000)

Az SA központi szerepe a NahG transzgenikus növények használatával vált nyilvánvalóvá. A NahG növények a bakteriális *NahG* gént fejezik ki, ami a szalicilát hidroxilázt kódolja, amely a szalicilsavat alakítja át katekollá, így a transzformált növény nem képes szabad szalicilsavat felhalmozni. Így például dohány és lúdfű NahG mutáns növények fokozott fogékonyságot mutattak oomicéták, gombák, baktériumok és vírusok széles körével szemben (Delaney et al., 1994; Kachroo et al., 2000).

Az SA további szerepének tisztázására a kutatók számos transzgénikus növényt hoztak létre. A recesszív muntáns npr1 (PR-1 nélküli), sai1 (SA érzéketlen), nim1 (immunitás nélküli) és eds5 (megemelt betegség tünettel rendelkező) traszgénikus lúdfű növények, normál hiperszenzitív reakciót mutattak, ha avirulens kórokozóval fertőződtek, de a fertőzésre adott védekezési válaszuk nem tökéletes (Cao et al., 1994; 1997; Delaney et al., 1995; Ryals et al., 1996; Shah et al., 1997). Az npr1, sai1 és a nim1 normál SA szintet termel, de az SA észlelésük alulszabályozott. A kémiai

aktivátoroknak, mint például az INA vagy a BTH ezeken a növényeken nincs hatásuk, ami azt mutatja, hogy ezeknek a vegyületeknek a jelátviteli útja hasonló az SA-hoz. Azonban egyes szerzők szerint a SAR-nak feltehetően nem csak egyetlen jelátviteli útja lehetséges (Mauch-Mani és Métraux, 1998). Az alternatív jelátviteli utak létezését támasztják alá azok a kutatások is, amelyekben a kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag defenzinek (PDF) és tioninok szerepét vizsgálták a védekező folyamatok során. Lúdfüvet használva modell növényként Penninckx és munkatársai (1996) kimutatták, hogy a PDF 1.2 erősen indukálódott avirulens *Alternaria brassicicola* hatására. Azonban az SA és az INA nem aktiválta a defenzin fehérje és mRNS-ének felhalmozódását. Ezzel ellentétben Radwan és munkatársai (2005) PDF felhalmozódást tapasztaltak rezisztens naprafrogó növényekben SA kezelés hatására. A szisztemikus rezisztencia jelátvitelét tanulmányozta munkájában Mauch-Mani és Métraux, akik egy jól áttekinthető, összefoglaló ábrát is készítettek a SAR lehetséges jelátviteléről (2. ábra). Az ábra azt mutatja, hogy mi történik az első avirulens kórokozó fertőzése során a növényi szövetben, valamint a távolabb eső szövetekben egy következő fertőzéssel szemben.



Közvetlenül megtámadott növényi szövet

A megtámadott növényi szövettől távolabb eső, szisztemikus választ kifejtő szövet

2. ábra A SAR indukálása és kifejeződése lokális és szisztemikus kapcsolatban. (Mauch-Mani és Métraux, 1998). BTH: 1, 2, 3- benzotiadiazol-7-tiokarboxilsav- S- metilészter, HR: hiperszenzitív reakció, INA: 2,6-diklór-izonikotinsav, ISR: indukált szisztemikus rezisztencia, JA: jázminsav, PR: kórfolyamat függő fehérje, SA: szalicilsav, SAR: szisztemikus szerzett rezisztencia

2.3.4. A szisztemikusan szerzett rezisztencia „költsége” (fitnesz veszteség)

A növények annak érdekében, hogy növeljék a természetes ellenálló képességüket metabolikus erőfeszítést tesznek, ami többlet energia felhasználással jár. Ez az ún. fitnesz veszteség, ami azt jelenti, hogy a rezisztens növénynek valamivel alacsonyabb lesz a reprodukciós képessége, mint a kevésbé rezisztensnek (Simms és Fritz, 1990). Más szavakkal, ha forráshiány alakul ki, akkor a növény fennmaradását a fokozott rezisztencia csökkenti. A rezisztencia költsége több forrásból eredhet, például az energia és a növényi építőkövek elvonása a növekedési és reproduktív folyamatoktól, öntoxicitás, más kórokozókkal szembeni érzékenység, mutualista szervezetek gátlása (Purrington, 2000).

Ma már számos kísérlet bizonyítja, hogy a SAR csakugyan okoz ilyen jellegű veszteségeket a növénynek. Egy tanulmányban speciálisan a SAR során bekövetkezett elosztási károk meghatározását tűzték ki célul; búza növényt kezeltek BTH-val károsítómentes környezetben és

szignifikáns csökkenést tapasztaltak a biomassza gyarapodásban és a termésben, és ez a hatás erősen függött a nitrogén ellátottságtól (Heil et al., 2000). Hasonlóan a lúdfű növények SA-val kezelve kevesebb szemet hoztak, mint a nem kezelt kontrol növények (Cipollini, 2002). A BTH magasabb dózisban (0.5 és 2 mg/ml) enyhe klorózist okozott a napraforgón, és a hajtás friss tömegének csökkenéséhez vezetett 14 nappal a kezelés után (Prats et al., 2002). Más növények esetében is találhatunk számtalan példát arra, hogy az aktivátoros kezelés negatívan befolyásolta a növények növekedését (Csinos et al., 2001; Latunde-Dada és Lucas, 2001; Ziadi et al., 2001; Louws et al., 2001; Romero és Ritchie, 2001; Buzi et al., 2004). Ez az általános eltolódás a normális anyagcsere működéstől a védekező metabolizmusok felé (Scheideler et al., 2002) azonban csökkentheti az aktuálisan szükséges proteinek *de novo* szintézisét valamint a fotoszintézist is (Logemann et al., 1995; Somssich és Hahlbrock, 1998; Lian et al., 2000), ugyanakkor a rezisztencia „költségei" kiváltódnak egy esetleges fertőzés során.

Felvetődik a kérdés, hogy mi lehet az oka annak, hogy a BTH kezelés nem növeli a növekedést és a hozamot dacára a sikeresen visszaszorított betegségtüneteknek? Bár a BTH-t általában nem tekintik fitotoxikusnak, klorózis kialakulásáról és csökkent növekedésről számolnak be az alkalmazás után (Cole, 1999; Lopez és Lucas, 2002). A kérdésre a magyarázat még napjainkban sem született meg. További probléma a meggyőző magyarázat megalkotásában az, hogy ez a jelenség nagymértékben függ az abiotikus növekedési tényezőktől (Heil et al., 2000; Cipollini, 2002; Délano-Frier et al., 2004). Tény azonban, hogy számos bizonyíték van a SAR növényi fitneszre gyakorolt gátló hatásáról, ha kórokozómentes kondíciók között alakul ki (Durrant és Dong, 2004; Heil és Baldwin, 2002). Ezt is figyelembe kell venni egy esetleges, SAR-t is tartalmazó növényvédelmi technológia kialakításánál.

A SAR sikere mellett szólhat az a tény, hogy az indukció által kiváltott rezisztencia variabilitást okoz a növényegyedek között, amelyekhez a kórokozók nehezebben tudnak alkalmazkodni (Karban et al., 1997), így csökkenhet annak a veszélye, hogy állandó szelekciós nyomás hatására egyre virulensebb kórokozók válogatódnak ki.

2.3.5. A kémiailag indukált SAR

A kutatók között felvetődött, hogy a SAR kémiai aktivátorainak szerepe lehet a növényvédelemben is, hiszen az abiotikus aktivátorok használata egy ígéretes lehetőség a mezőgazdaságban az indukált rezisztencia felhasználására. A kórokozók okozta fertőzés mellett bizonyos molekulák is képesek a növényekben SAR-t indukálni, így a növények védekezése aktiválható lenne a velük való kezeléssel. A szisztemikusan szerzett rezisztenciát szervetlen (foszfátsók) és szerves (szalicilsav, jázminsav, nikotinamid) vegyületeken kívül szintetikusan előállított kémiai anyagokkal is aktiválhatjuk (Sticher et al., 1997). Erre azért lehet szükség, mert a

növények által termelt szalicilsav és származékainak gyakorlati használatát nehezen lehet megoldani, mivel a növények a felhalmozódott szalicilsavat 2-β-glukozid formában elraktározzák. Ezért olyan mesterséges úton előállított vegyületekre volt szükség, amelyek helyettesíthetik a szalicilsavat. Számos kémiai induktort ismertek el a kereskedelemben a világszerte, és folyamatos ezeknek a vegyületeknek a hatásmechanizmusára és a lehetséges gyakorlati alkalmazásukra vonatkozó kutatás. Az abiotikus induktorok listáját és jellemzőjét számos munkában megtalálhatjuk (Tuzun és Kloepper, 1995; Karban és Kuc, 1999; Lyon és Newton, 1999).

A SAR aktivátorokkal szemben támasztott 3 legfontosabb követelményt Kessmann és munkatársai (1994) fogalmazták meg; (1) ne legyen direkt hatásuk a kórokozó szervezetre, (2) ugyanazon kórokozók ellen indukáljanak rezisztenciát, mint a biológiailag aktivált SAR, (3) azokat a SAR markergéneket indukálják, amelyeket adott esetben egy kórokozó is indukálna. E három kitétel általános elfogadottsága miatt ezeknek a tulajdonságnak a vizsgálata a SAR jelenségével kapcsolatban végzett kutatásokban elengedhetetlen.

2.3.5. 1. Indukált rezisztenciát kiváltó vegyületek

Az indukált rezisztenciát kiváltó aktivátorok általában nem specifikusak, általános rezisztenciát indukálva a kórokozók széles köre ellen hatékonyak és taxonómilailag egymástól távol álló növényekben is működnek. Az aktivátorok kémiailag eltérő anyagok lehetnek, amelyek nem mutatnak specifikációt a rezisztenciát indukáló képességükben, azonban figyelembe kell venni, hogy néhány anyag sokkal hatékonyabb a rezisztencia aktiválásában egyik növényfaj esetében, mint a másikban.

Szalicilsav

A szalicilsav valószínűleg az első vegyületek egyike, amelyről felfedezték, hogy rezisztenciát indukál, emellett a növényekben is megtalálható (White, 1979; Ward et al., 1991).

A szalicilsavnak a SAR kialakulása során nagy jelentőséget tulajdonítanak a kutatók. Azért is fontos erről a vegyületről is szólni, mert a leginkább ismert növényi aktivátorokat (BTH, INA) több kutató a szalicilsav funkcionális analógjának tekinti, valamint strukturálisan is nagyon hasonlítanak egymásra (3. ábra). A SAR kezdeti szakasza összefüggésben van a SA szint megemelkedésével, mind lokálisan a fertőzés helyén, mind szisztemikusan a távolabbi szövetekben is (Mauch-Mani és Métraux, 1998). Az SA szint megemelkedik a floemben a SAR megfigyelése előtt, és exogén SA kezelés indukálja sok gén kifejeződését, ami a természetes úton végbemenő fertőzésére is kifejeződik (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990; Rasmussen et al., 1991; Reymond és Farmer, 1998; Maleck et al., 2000). Továbbá a SAR a kórfolyamat függő fehérjéket kódoló gének csoportjának aktiválódásával is összefüggésben van, amelyek közül néhánynak

antimikrobiális hatása is lehet (Van Loon, 1997). Az SA külső adagolásával vagy a funkcionális analógjával az INA vagy BTH-val SAR-t lehet indukálni és ugyanazon PR géneket aktiválják (Ryals et al., 1996). A szalicilsav szerepének tisztázására olyan transzgénikus növényeket állítottak elő (NahG növények), amelyek nem tudnak SA-t felhalmozni. Ezek a módosított növények SAR kialakítására képtelenek voltak, és nem mutatnak PR gén aktiválódást sem a fertőzés hatására (Gaffney et al., 1993; Lawton et al., 1996). Mindezek azt mutatják, hogy az SA nélkülözhetetlen a SAR jelátviteli rendszerében.

BTH (ASM)

A BTH (1, 2, 3- benzotiadiazol-7-tiokarboxilsav- S- metilészter, *syn*: acibenzolar-S-metil) a Novartis cég (Syngenta) fejlesztésének köszönhető, ebből készült az első kereskedelmi forgalomban is megjelent immunaktivátor, a Bion® 50 WG. A Bion hatására a növények ellenálló képessége fokozódik, azaz megerősíti a növényben amúgy is meglévő védekezési mechanizmusokat, ugyanakkor a kórokozó szervezetekre nincs közvetlenül befolyással (Rácz, 1996). A készítmény hazánkban 2004-ig volt engedélyezett őszi búzában lisztharmat ellen 60 g/ha-os, tavaszi árpában szintén lisztharmat ellen 50 g/ha-os adagban. Amerikában Actigard néven készült belőle kereskedelmi forgalomba hozott szer.

A BTH szerkezete és hatásmechanizmusa is hasonló a szalicilsavéhoz (Ryals et al., 1996) (3. ábra), de dózisát tekintve 100-szor kisebb mennyiséget kell felhasználni belőle. A szerkezeti hasonlóságok miatt olyan feltételezést is megfogalmaztak, miszerint az SA, a BTH és az INA az indukált rezisztencia folyamata során ugyanahhoz a receptorhoz kapcsolódik, bár ennek a bizonyítása még nem történt meg (Ryals et al., 1996). A BTH hatásának molekuláris vizsgálata dohányon és lúdfüvön azt mutatta, hogy aktiválja a SAR utakat, utánozva a szalicilsavat (Gaffney et al., 1993; Friedrich et al., 1993; Lawton et al., 1996). Napjainkban a genetikai kutatások előretörésének köszönhetően azonban kimutattak számos különbséget a BTH és az SA által indukált génekben (Heidel és Baldwin, 2004; Bovie et al., 2004). Fontos különbség a SA-hoz képest, hogy a BTH (és az INA is) képes rezisztenciát indukálni az SA felhalmozására képtelen NahG transzgénikus növényekben, ami azt mutatja, hogy a SA-tól függetlenül működik a SAR jelátvitelében (Ryals et al., 1996). Azonban a BTH, az INA és az SA is képtelen SAR-t indukálni a már fentebb említett nim1 mutáns lúdfű növényekben, ami pedig azt mutatja, hogy mindhárom vegyület ugyanazon a jelátviteli kaszkádon keresztül aktiválja a SAR-t (Delaney et al., 1995; Lawton et al., 1996).

A benzotiadiazolról számos munka bemutatta, hogy rezisztenciát képes indukálni különböző növényekben a kórokozók széles köre ellen (Vallad és Goodman, 2004), és feltehetően ez a legjobban ismert szintetikus aktivátor, amiből kereskedelmi terméket is kifejlesztettek (Kessman et

al., 1996). A legtöbb esetben a BTH aktiválta rezisztencia kapcsolatban volt a PR fehérjék megemelkedésével, mint például a peroxidáz, kitináz vagy 1-3-glükanáz. Azonban a kutatások során arra is fény derült, hogy a BTH kezelés aktiválta gének egy csoportja nem mindig egyezik meg a kórokozók által indukált védekező génekkel (Yu és Muehlbauer, 2001).

Az első vizsgálatokat a hatóanyag fejlesztése során búzában végezték el. Ezek alapján különösen hatékony lisztharmat ellen (Görlach et al., 1996) és 10 hétig is védelmet nyújthat a növény számára (Ruess et al., 1996). A növény a levelein és a gyökérzetén keresztül gyorsan felveszi a hatóanyagot, amely akropetálisan, bazipetálisan, valamint transzlaminálisan is szállítódik (Rácz, 1996).

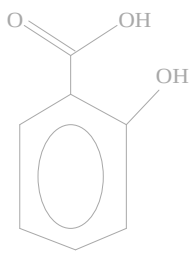
A kijuttatási módokat tekintve a BTH-t többféleképpen is hatékonyan lehet alkalmazni a különböző kórokozókkal szemben. Hazánkban a BTH-ból készült Bion-t permetezve juttatták ki a növényekre, de az irodalomból más kijuttatási, kezelési módokat is találunk; levélre permetezés mellet (Meyer et al., 2006; Stadnik és Buchenauer, 2000; Lopez és Lucas, 2002; Dann et al., 1998; Narusaka et al., 1999; Tosi és Zazzerini, 2000) talajbeöntözést (Anfoka, 2000; Tosi et al., 1999; 2000; Lopez és Lucas, 2002), szárba injektálást és magkezelés (Latunde-Dada és Lucas, 2001) egyaránt.

A BTH hatékonyságát napraforgó növényeken is tesztelték. Sauerborn és munkatársai (2002) kísérletükben napraforgó magokat kezeltek BTH-val, és azt tapasztalták, hogy csökkent a szádor károsítása. Az oomicéták ellen is hatékonynak bizonyult a BTH (Godard et al., 1999; Perez et al., 2003; Ali et al., 2000), így a vizsgálatokból a napraforgó-peronoszpóra sem maradt ki. Legelőször Tosi és munktársai (1999) vizsgálták a BTH napraforgó-peronoszpóra elleni hatását. Az aktivátort talajbeöntözésként és levélre permetezve is tesztelték, és mindkét alkalmazás hatékonynak bizonyult. Azonban a legmagasabb koncentrációban (300 mg/kg talaj feletti dózisban) a talajbeöntözés fitotoxikus tüneteket okozott a növényeken. A BTH csírakezelésként is hatékonyan szorította vissza a peronoszpórás tünetek kialakulását a napraforgóban (Bán et al., 2004a; Serrano et al., 2007; Körösi et al., 2009).

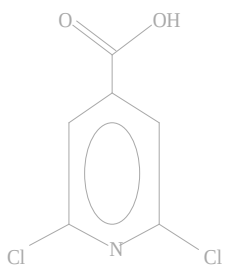
A növényi aktivátorok esetében a legtöbb kutató véleménye szerint szükség van bizonyos idő elteltére, amíg a rezisztencia a növényben aktiválódik, és csak ennek az időnek az eltelte után tudja a növény a kórokozó ellen hasznosítani az aktivátor által kiváltott SAR-t. Ezért a SAR-t vizsgáló munkák többségében az aktivátorokat a fertőzés előtt alkalmazták a növényeken. Azonban olyan kísérlet is található a szakirodalomban, ahol a BTH kuratív hatásáról számolnak be, tehát a fertőzés utáni aktivátoros kezelés is hatékonynak bizonyult a kórokozó ellen, viszont a két kezelési időpontot összehasonlítva a fertőzés utáni kezelések hatása elmaradt a fertőzés előtti kezelések hatékonyságától (Tosi et al., 1999; 2000; Bán et al., 2004b).

A BTH *in vitro* hatásának vizsgálatával - a Kessmann és munkatársai (1994) által megszabott és általánosságban elfogadott 3 kitétel miatt is - a SAR-ral foglalkozó munkákban sokszor találkozhatunk. A BTH-t hatóanyagként tartalmazó, Bion 50 WG növényi aktivátor engedélyezését megelőzően széleskörű vizsgálatot folytattak a szer gombákra gyakorolt közvetlen hatásának tanulmányozása céljából, amiben megállapították, hogy a szernek nincsen közvetlen hatása a kórokozókra (Kessmann et al., 1996). Oomicéták esetében a legtöbb szerző nem talált *in vitro* gátló hatást a szer vizsgálata során (Cohen, 1994 b; Godard et al.,1999; Pajot et al., 2001). Azonban arra is találunk példát az irodalomban, hogy a BTH-nak gátló hatása van az egyes kórokozó szervezetekre; Bengtsson és munkatársai (2006) a *Spilocea pomi* konídiumok csírázására kifejtett gátló hatásáról, Meyer és munkatársai (2006) a *Rhizoctonia solani* hifa növekedésére gyakorolt gátló hatásról számoltak be. A gátló hatás értékelésénél azonban érdemes figyelembe venni, hogy létrejön-e közvetlen kapcsolat a kórokozó szervezet és a növényi aktivátor között az alkalmazás során (Körösi et al., 2009).

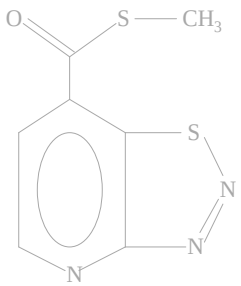
Az aktivátorok által kiváltott védettséget számos tényező befolyásolhatja, amit a gyakorlati alkalmazás esetén figyelembe kell venni. Kísérletekben azt tapasztalták, hogy a BTH hatékonyságát nagymértékben meghatározza a kezelt növény célzott kórokozóval szembeni rezisztencia foka (Pradhanang et al., 2005), a növényi szövet kora, valamint a növény fejlettsége és a környezet (Rupe és Gbur, 1995; Panter és Jones, 2002). Bár a BTH képes sikeresen rezisztenciát indukálni számos gazda-parazita kapcsolatban, találhatunk a szakirodalomban olyan munkát is, ami arról számol be, hogy a BTH nem indukálta a rezisztenciát vagy az indukált rezisztencia szintje nagyon alacsony volt (Lemay et al., 2002; Zhang et al., 2001; Ishii et al. 1999).



szalicilsav
SA



2,6-diklór-izonikotinsav
INA



benzotiadiazol
BTH

3. ábra Az SA, INA és a BTH szerkezeti képlete

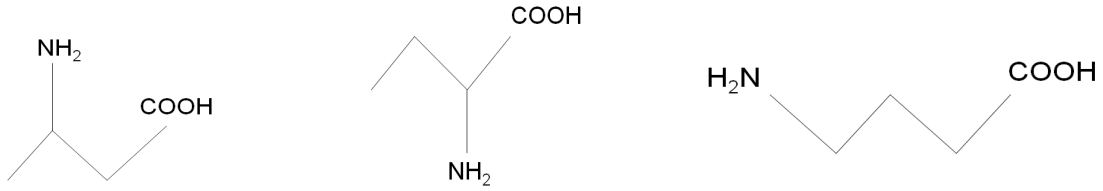
INA

Az első izonikotinsav származékot (a benzotiadiazolokkal együtt) uborka növények használatával azonosították (den Hond, 1998). Az INA szerkezete nagy hasonlóságot mutat az SA és a BTH szerkezetével (3. ábra). A 2,6-diklór-izonikotin sav és a metilésztere volt az első szintetikus vegyület, amiről bebizonyították, hogy aktiválja a SAR-t, és gondoskodik a patogének széles köre elleni rezisztenciáról (Métraux et al., 1991; Vernooij et al., 1995). Azonban ahogyan az SA-t, az INA-t sem képesek elég jól tolerálni a termesztett növények (Ryals et al., 1996; Lopez et al., 2002). Ennek ellenére a szerzett rezisztenciával foglalkozó kutatók több kísérletben is alkalmazták az INA- t, mint rezisztencia aktivátort. Az INA hatását vizsgáló munkákban általában az INA mellett a BTH-t, vagy más növényi aktivátor hatékonyságát is tesztelik, ezért a szakirodalomban csak kifejezetten az INA-ra fókuszáló munkákat keveset találhatunk. A kísérletek nagy részében több aktivátor hatását vizsgálják (Lopez és Lucas, 2002; Schweizer et al., 1999; Dann et al., 1998; Görlach et al., 1996).

BABA

A nem fehérje természetű DL-3-aminovajsavról (ß-aminovajsav) (BABA) közel 40 éve bizonyították be, hogy indukált rezisztenciát aktivál borsó növényben az *Aphanomyces euteiches* kórokozó ellen (Papavizas és Davey, 1963). Azóta számos publikációban mutatták be, mint SAR aktivátort, a gazda-parazita kapcsolatok széles skáláján tesztelve.

A BABA a természetben ritkán figyelhető meg és alig található meg a növényekben. A BABA strukturálisan hasonló izomerjeit (GABA: γ-aminovajsav, AABA: α-aminovajsav) (4. ábra) nem találták annyira alkalmasaknak indukált rezisztencia kiváltására, mint a ß izomert (Cohen et al., 1999; Ovadia et al., 2000; Siegrist et al., 2000; Oka és Cohen, 2001). Ton és Mauch-Mani (2004) kísérleteikben bemutatták, hogy a BABA rezisztenciát indukál a lúdfűben az *Alternaria brassicicola* és a *Plectosphaerella cucumerina* ellen, míg a BTH nem volt hatékony e két kórokozó ellen. A BABA-val kezelt lúdfű növények gyorsabban és sokkal hatékonyabban reagáltak különféle abiotikus stresszekre, mint például a magas hőmérséklet, magas sótartalom és szárazság, ami arra utalhat, hogy néhány általános molekuláris komponens a felelős a biotikus és abiotikus stresszért is (Jakab et al., 2005).



DL-3-aminovajsav BABA | DL-2-aminovajsav AABA | 4-aminovajsav GABA

4. ábra Az α-, ß- és γ- aminovajsav szerkezeti képlete

Mivel a növények széles körében aktív, a BABA esetében számos leírást találhatunk, hogy hogyan lehetne a gyakorlatban is alkalmazni. A BABA-Cu komplexet tesztelték szőlőn, ahol hatékonynak bizonyult a kombináció a peronoszpóra ellen (Reuveni et al., 2001).

Számos munka irányult a BABA indukálta rezisztencia hátterére. A BABA kezelés dohányban, 10mM koncentrációban reaktív oxigénformák kialakulásához, lipid peroxidációhoz, a léziók körüli kallóz indukálásához és az SA szint megnövekedéséhez vezetett (Siegrist et al., 2000). A BABA, hasonlóan a BTH-hoz, PR fehérjék felhalmozódását okozza a növényekben. Így például a BABA indukálta a PR-1a, kitináz és glükanáz aktivitását dohányban, paradicsomban és paprikában (Cohen et al., 1999; Siegrist et al., 2000), de lúdfűben, karfiolban és dohányban nem volt ilyen hatású (Cohen, 1994a; Jakab et al., 2001; Silué et al., 2002). Ez azt sugallja, hogy a PR fehérjék nem az egyedüli kiváltói a BABA okozta változásoknak, ami kallóz lerakódáshoz, lignifikációhoz és hiperszenzitivitáshoz vezet néhány növényben (Cohen et al., 1999; Siegrist et al., 2000). Dohányban Cohen (1994b) kimutatta, hogy érdekes módon különbség volt a PR fehérjék indukálásában attól függően, hogy a növény melyik részét kezelték az aktivátorral. A BABA-ról ismert, hogy szisztemikusan mozog a paradicsomban, dohányban és szőlőben (Cohen et al., 1999) és ez magyarázhatja a szisztemikus védettséget a kórokozók ellen a növényekben (Cohen et al., 1999; Siegrist et al., 2000).

A BABA aktiválta SAR során erős SA felhalmozódást is tapasztaltak, ami nagyobb mértékű volt, mint csak a fertőzés hatására kialakuló SA szint növekedés (Hwang et al., 1997). A BTH és INA kezelés hatására azonban nem tapasztaltak a növényekben megemelkedett SA szintet (Ryals et al., 1996), ami mutathatja a három aktivátor jelátvitele közötti különbséget is.

Irodalmi adatokból ismert, hogy a BABA aktivitása a koncentráció növekedésével párhuzamosan növekszik (Baysal, 2005; Pajot et al., 2001) és viszonylag magas dózis szükséges a megfelelő védettség kialakulásához (Cohen et al., 1994) összehasonlítva például a BTH-val és az INA-val. A napraforgó peronoszpóra esetében vizsgálták a BABA hatékonyságát (Tosi et al., 1998),

és azt tapasztalták, hogy az aktivátornak nincsen *in vitro* hatása a kórokozóval szemben, és viszonylag magas dózisban (150-250 mg/kg talaj), talajbeöntözésként alkalmazva védelmet nyújtott a peronoszpórával szemben, viszont a növényen fitotoxikus tünetek alakultak ki. Hasonlóképpen több oomicéta kórokozóval végzett kísérletben sem gátolta *in vitro* körülmények között a kórokozókat a BABA (Cohen, 1994a; 1994b; Cohen et al., 1994; 1999; Tosi et al., 1998), ugyanakkor a BTH-hoz hasonlóan, a szakirodalomban *in vitro* gátló hatásról beszámoló munka is található. Jeun és munkatársai (2004) szerint a BABA gátolta a *Colletotrichum orbiculare* spóráinak csírázását.

2.3.6. Az aktivátoros kezelés összeegyeztethetősége a konvencionális fungicides védelemmel

Az indukált rezisztencia biológiai korlátjai arra a következtetésre juttatták a kutatókat, hogy a növényi aktivátorokat inkább kiegészítő lehetőségként kell számításba venni az integrált növényvédelemben, mint a fungicidek direkt helyettesítőiként (Lyon és Newton, 1999). A kereskedelmi forgalomban is elérhető aktivátor, a Messenger használatát is a konvencionális fungicidekkel való rotációban ajánlják, míg a Bion felhasználásánál is azt ajánlják, hogy a terméket „ajánlatos tankban összekeverni más regisztrált termékkel aminek kuratív hatása is van, hiszen ha a betegség már jelen van az alkalmazás időpontjában, akkor így lehet biztosítani a megfelelő védettséget a betegség ellen. Olyan kezdeményezések, mint az EUREPAG (European Retail Produce Good Agricultural Practice) szintén támogatja az integrált növényvédelem használatát a hosszú távú fejlesztésért és a fenntartható mezőgazdasági termelésért (Reglinski et al., 2007).

A fungicidek alapvetőek a betegségek elleni védelemben a növénytermesztő rendszerekben. Az élelmiszerekben fennmaradó szermaradványok miatti aggodalom azonban használatuk korlátozásához vezetett, valamint arra sarkallta a kutatókat, hogy hatékony módszereket találjanak a fungicid használat csökkentésére. Ez szintén elvezetett a SAR és a konvencionális módszerek ötvözéséhez. A BTH és fungicidek növényi betegségek elleni együttes használatáról számoltak be Jorgensen és munkatársai (1997), Stadnik és Buchenauer (1999), Willingham és munkatársai (2002), Miles és munkatársai (2004) valamint Leskovar és Kolenda (2002).

Hasonlóan a BTH-hoz, a BABA és az INA esetében is azt tapasztalták a kutatók, hogy az aktivátor kombinálása a konvencionális fungicidekkel jobb védelmet biztosít, mint a fungicid vagy az aktivátor önmagában alkalmazva (Ortega et al., 1998; Reuveni et al., 2001; Baider és Cohen, 2003). Ezt a tulajdonságukat különösen jól ki lehet használni a fungicidrezisztencia kiküszöbölésére.

Az aktivátor – termesztett növény egymásra hatásának vizsgálata (Reglinski et al., 1994; Romero és Ritchi, 2001) azt mutatja, hogy egyes fajták alkalmasabbak az indukált rezisztencia alkalmazására, mint mások. Az aktivátoros kezelésre való alkalmasság egy opcionális válogatási

kritérium lehetne a nemesítési programokban. Sajnos sok mai, magas termést produkáló növényfajta mutat hiányosságot a természetes rezisztenciában a régi fajtához vagy a vad változathoz képest. Ez pedig arra enged következtetni, hogy a magas termésre és más kívánatos jellegzetességekre történő nemesítés csökkenti a növények védekezési potenciálját (Rosenthal és Dhirzo, 1997).

2.4. A növények védekezési reakciói

2.4.1. A reaktív oxigén formák (ROS) szerepe

Amióta ismertté vált, hogy szuperoxid termelés indukálódik a burgonyában a fitoftórával való interakcióban, számos növényben mutatták ki a ROS termelést kórokozó fertőzést követően (Doke, 1983). A növény – kórokozó kölcsönhatásokban a ROS-ok elsősorban a plazmamembránban termelődnek (Sagi és Fluhr, 2001) és a ROS termelése és felhalmozódása kapcsolatba hozható a sejthalál indukálásával a HR során (Grant és Loake, 2000). Bár a HR kialakulásánál a ROS elsődleges jelnek tűnhet, számos esetben nem feltétel az indukálódása (Dorey et al., 1999; Hirasawa et al., 2005). A ROS-ok szerepe a növényi sejthalálban vagy annak kiváltásában még mindig vitatott kérdés. A ROS-nak lehet direkt toxikus hatása is a növényi sejtekre, hiszen a hidrogén peroxid külső adagolása sejthalált indukál (Levine et al., 1996).

2.5. A reaktív oxigénformák méregtelenítése

Az aktív oxigénformák a növények számára is mérgezőek, ezért a növénynek szüksége van az aktív oxigénformák méregtelenítésére, amelyet antioxidánsok végeznek (Van Kuijk et al., 1987). Antioxidánsoknak tehát azokat az anyagokat nevezzük, amelyek az aktív oxigén formák károsító hatását csökkentik. Az antioxidánsok lehetnek enzimatikusak (kataláz, szuperoxid-dizmutáz, aszkorbát-peroxidáz, dehidro-aszkorbát-reduktáz stb.) és nem enzimatikus (glutation, aszkorbinsav, karotinoidok) működésűek.

2.5.1. Polifenol oxidáz (PPO)

A polifenol-oxidázok (EC 1.10.3.1) széles körben elterjedt réztartalmú fehérjék, melyek a baktériumoktól az emlősökig megtalálhatóak az élő rendszerekben A szövetek sérülése során lejátszódó barnulási reakciók a polifenol-oxidázok működéséhez köthetők, fenoloidok oxidálásával kinonvegyületek képződnek, amelyek polimerizációra hajlamosak. Ez áll a legtöbb jól ismert növényi barnulási folyamat hátterében (Shi et al., 2002). A fenol-oxidázok a sejtorganellumokban, illetve a citoplazmában szabadon találhatók. A levelek fenol-oxidázai főként a kloroplasztiszokban membránokhoz kötötten fordulnak elő (Tolbert, 1973). Az öregedéssel aktivitásuk a háromszorosára is emelkedhet.

A polifenol-oxidázok feltételezett élettani szerepe: elméletileg képesek terminális oxidázként NAD(P)H_2 oxidálására; szerves vegyületek hidroxilációját katalizálják; reakciótermékeik (kinonok) szerepet játszanak a védekezési reakciókban (Butt, 1980).

Szerepük van továbbá a védekezésben is, a keletkező kinonok mérgezőek – a kórokozón kívül többnyire a növényi sejtet is elpusztítják, így jöhetnek létre nekrotikus foltok.

Mióta Arnon (1949) felfedezte a látens PPO-t a thilakoid membránban, meglehetősen sok információ vált ismertté. Mayer és Harel (1979) szerint a polifenol-oxidázoknak védekező szerepük van a növény – kórokozó kölcsönhatásokban. A növények védekező rendszerében betöltött szerepüket számos, napjainkban végzett kutatás is bizonyítja (Shi et al., 2002; Mohammadi és Kazemi, 2002; Li et al., 2002; Mayer, 2006; Lukácsy, 2006; Tegelberg at al., 2008). A napraforgó esetében Nandeshkumar és munkatársai (2008) azt tapasztalták, hogy *Plasmopara halstedii* fertőzés után 12 órával megnövekedett a PPO aktivitás mind a rezisztens, mind a fogékony növényekben.

2.5.2. Gvajakol-peroxidáz (POX)

A növényi peroxidázok (EC 1.11.1.7.) protohem prosztetikus csoportot tartalmazó végoxidázok. A növényi szervezetben nagyon elterjedtek, a reakciók széles változatait képesek katalizálni (Siegel, 1993), működésük során H-donor vegyületeket oxidálnak hidrogén-peroxid segítségével:

$$\text{Donor (red)} + H_2O_2 \rightarrow \text{donor (ox)} + 2H_2O$$

A H-donorra nézve gyenge az enzim specificitása: *in vivo* fenolok, aszkorbinsav, indolecetsav, aminok, citokróm-c, és szervetlen ionok is lehetnek H-donorok a reakcióban, *in vitro* aktivitás mérésekhez pedig számos vegyület alkalmazható, például a gvajakol vagy a pirogallol. A legszélesebb körben alkalmazott vegyület miatt gvajakol-peroxidáznak is nevezik az ebbe a csoportba tartozó enzimeket.

Eloszlásuk az egyes szövetekben, szervekben az egyedfejlődés során változik. A peroxidázoknak számos élettani szerepük lehet (Asada, 1992), többek között részt vesznek a lignifikációban (Gross, 1978), az etilén képződésében, az indol-ecetsav bomlásában (Salin, 1987), sérüléseket elfedő anyagok képzésében játszott szerepük miatt is tanulmányozzák. Emellett 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 hidrogén-peroxid méregtelenítésében is szerepe lehet a peroxidázoknak, hiszen a H_2O_2 vagy spontán módon vagy kataláz közreműködésével bomlik le, vagy szubsztrátja lehet peroxidázoknak is. A POX aktivitásának emelkedése általános válasz szinte valamennyi stresszhatásra, mint pl. az alacsony hőmérsékletre, különböző xenobiotikumokra, a növényi kórokozók általi fertőzésre, a levegőszennyezésre, vagy a talaj megnövekedett nehézfém-tartalmára

(Rabe és Kreeb, 1979; Van Assche és Clijsters, 1990; Hegedűs et al., 1997). A peroxidázok továbbá biokémiai markerként is szerepelhetnek a szisztemikusan indukált rezisztenciában (Irving and Kuc, 1990).

Számos példa található a szakirodalomban a különböző, növényeket ért stresszek hatására bekövetkező POX aktivitás megnövekedésére. Ilyen stresszorok lehetnek például a CO_2 és UVB sugárzás (Tegelberg at al., 2008), az aktivátoros kezelés (Ananieva at al., 2004; Serráno et al., 2007) a vírus (Fodor, 1998), vagy oomicéta okozta fertőzés (Sedlarova et al., 2007).

Napraforgóban Serráno és munkatársai (2007) BTH-val kezelt, majd peronoszpórával fertőzött napraforgó növényekben mérték a gvajakol-peroxidáz aktivitását a fertőzés után 9 nappal. Vizsgálataik során megállapították, hogy a gvajakol-peroxidáz aktivitása a fertőzés hatására megnövekedett, és a legmagasabb enzimaktivitást a BTH-val előkezelt majd fertőzött fogékony növényekben mérték.

2.5.3. Kataláz (CAT)

A kataláz (EC 1.11.1.6.) az egyik legjelentősebb hidrogén-peroxidot semlegesítő enzim a növényekben. A négy alegységből álló, hem prosztetikus csoportot tartalmazó enzim főleg a peroxiszómákban, glioxiszómákban vagy a mitokondriumban található (Salin, 1987; Scandalios, 1990; Willekens et al., 1997), ahol Tolbert (1981) szerint nagyrészt a fotorespiráció és a zsírsavak bontása során keletkező H_2O_2 hidrogéndonor nélküli lebontásáért felelős az alábbi reakció szerint:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

A katalizált reakció sebessége meglehetősen nagy, viszont a kataláz szubsztrát affinitása kicsi (Willekens et al., 1995). A kataláz jelentőségét mutatja Chamnongpol et al. (1996) munkája is. Ők transzgénikus növényeken kimutatták, hogy a kataláz hiányos növényekre a nagyobb fényintenzitás letális hatású volt, míg gyenge fényben nem károsodtak a módosított növények.

Napraforgó esetében Costa és munkatársai (2002), Rios-Gonzalez és munkatársai (2002) valamint Azpilicueta és munkatársai (2007) a kataláz aktvitásának változását tapasztalták számos abiotikus stressz hatására. Azpilicueta és munkatársai (2007) vizsgálataikban 4 kataláz izoform kifejeződését vizsgálták.

2.5.4. Glutation-S-transzferáz (GST)

A növények védelmi rendszeréhez tartoznak a glutation-S-transzferázok (EC 2.5.1.18). Ezek az enzimek a citoplazmában találhatóak, és a glutation tripeptid konjugációját katalizálják különböző hidrofób, a sejtekre nézve mérgező szubsztrátumokkal (Mannervik et al., 1988). A glutation-konjugátumokat a növény kiválaszthatja a vakuólumba vagy az apoplasztba. Néhány GST glutation-peroxidázként is működik, így közvetlen védőhatást fejt ki oly módon, hogy a szerves

peroxidok inaktiválódását katalizálja glutation-diszulfid létrehozásával (Bartling et al., 1993), valamint a GSH-szint növelésével visszacsatolásos szabályozás révén. A legtöbb növényi GST nehézfémstressz, 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). A transzkripciója serkentésében az elsődleges szignál szerepét a hidrogén-peroxid játssza. Az oxidatív stressz kivédésén kívül fontos feladatuk van a sejt anyagcsere folyamataiban: például az antociánok képződésében és az auxinok aktivitásának szabályozásában és sejten belüli transzportjukban (Alfenito et al., 1998; Marrs, 1996).

2.6. Defenzin szerepe a növényekben

A növényekben a kórokozók elleni védekezés különböző stratégiáit találhatjuk meg, az egyik ilyen védekező mechanizmus olyan antimikrobiális peptidek szintetizálása révén történik, mint például a defenzin. A defenzin ciszteinben gazdag, kisméretű peptid, amely növényekben és állatokban egyaránt előfordulhat. Urdangarín és munkatársai (2000) szerint a napraforgóban kapcsolat lehet a defenzin gén megemelkedett kifejeződése és a *Sclerotinia sclerotiorum* kórokozóval szembeni fogékonyság között. Más szerzők is tapasztaltak összefüggést a defenzin kifejeződése és a növények fitoftórás fertőzése között (Solis et al., 2007). A defenzint a SAR-ral is összefüggésbe hozták Mauch-Mani és Métraux (1998), akik munkájukban kifejtették, hogy a defenzinnek az indukált rezisztencia jelátvitelében is szerepe lehet (2. ábra).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Növény és kórokozó

Kísérleteinkben az RHA-274, RHA-340 és HA-335 USDA napraforgó vonalakat, illetve a napraforgó-peronoszpóra egyik legelterjedtebb, 700-as patotípusát használtuk. Az RHA-274-es vonal nem rendelkezik megfelelő *P. halstedii* rezisztencia génnel, ezért fogékony a kórokozó 700-as patotípusával szemben. A másik két vonal rezisztens a 700-as patotípussal szemben, azonban különbség van közöttük a rezisztencia mértékében: az RHA-340 vonal részleges, ún. HLI („hypocotyl limited") típusú, részleges rezisztenciával rendelkezik, míg a HA-335-ös vonal teljesen rezisztens a 700-as patotípussal szemben (Virányi és Gulya, 1996). A kórokozó fenntartására és inokulum termelésre a teljesen fogékony (rezisztencia gént nem hordozó) GK-70 fajtát és a HA-89 vonalat használtuk.

A napraforgó kaszatokat 15%-os hígítású, kereskedelmi forgalomban kapható hipó oldatban felületileg fertőtlenítettük, ami az oldatban történő 5 perces áztatást jelentett. Ezt követően a kaszatokat folyó vízzel alaposan lemostuk, és nedves szűrőpapírba tekerve 24 °C- on csíráztattuk, amíg a gyökérkezdemények 3-5 mm hosszúságúra fejlődtek (2-3 nap). Ezután következett a csíranövények kezelése és fertőzése. A kezelések, illetve a fertőzés megtörténte után a csíranövényeket általános virágfölddel (B típusú, semleges kémhatású: pH = 6,5-7) töltött cserepekbe vagy ládákba ültettük és üvegházban szokványos feltételek között (18-24 °C, 16 óra megvilágítás) neveltük a kísérlet céljától függően 2-3 hétig.

3.2. Aktivátoros kezelés

A napraforgó csíranövényeket 6 órán át úsztattuk az egyes aktivátorok különböző koncentrációjú vizes oldatában. A BTH esetében 160 mg/l-es dózist alkalmaztunk, ami megfelel a Bion 50 WG használati engedélyében szereplő dózisnak. A BABA és az INA esetében előkísérletekben választottuk ki a megfelelő koncentrációkat (INA esetében 100 és 200 mg/l, míg a BABA esetében 125, 250, 500, 1000 és 2000 mg/l) és ezekkel a dózisokkal végeztük az üvegházi kísérleteket (tüneti értékelések, mikroszkópos vizsgálat).

A védekezéssel kapcsolatos enzimek aktivitás vizsgálatait csak a BTH aktivátort teszteltük 160 mg/l-es koncentrációt alkalmazva.

Molekuláris genetikai vizsgálatainkban az aktivátorok egy-egy koncentrációját teszteltük: BTH 160 mg/l, INA 100 mg/l és BABA 2000 mg/l.

3.3. Mesterséges fertőzés

A napraforgó csírákat az aktivátoros kezelés után egy nappal fertőztük peronoszpórával. A fogékony napraforgók sziklevelein frissen képződött *P. halstedii* sporangiumokat kétszer desztillált (bideszt) vízben óvatosan rázatva lemostuk és a kapott sporangiumszuszpenziót Bürker-kamra segítségével 50 ezer spóra/ml sűrűségűre állítottuk be. Mesterséges fertőzéshez Cohen és Sackston (1973) teljes csíranövény-bemártásos (WSI) módszerét alkalmaztuk, amely során a napraforgó csírákat 16°C-on sötétben 5–6 órán át úsztattuk a sporangium-szuszpenzióban.

Az aktivátorok és/vagy a mesterséges fertőzés hatását az alábbi kezelések alapján hasonlítottuk össze:

- NKNF – nem kezelt (csupán desztillált vízben úsztatott), nem fertőzött,
- KNF – az aktivátorok valamelyikével kezelt, nem fertőzött,
- NKF – nem kezelt (csupán desztillált vízben úsztatott), fertőzött,
- KF – kezelt és fertőzött (az aktivátorok valamelyikével kezelt, majd fertőzött).

3.4 Tüneti értékelés

A betegségtüneteket szikleveles (8–10 nappal az ültetés után) és 2–4 lomblevélpáros (14–16 nappal az ültetés után) korban értékeltük. Az első esetben a kórokozó sporulációjának elősegítésére a szikleveles növényeket egy éjszakára páratelt térbe helyeztük, és a szikleveleken megjelenő sporangium- bevonatot 4 fokozatú skála segítségével értékeltük Oros és Virányi (1987) módszerét követve a következők szerint:

- 0 értéket kapott a növény, ha nem mutatott sporulációt
- 1-et, ha a sporangium bevonat a sziklevél felületéből harmadrésznél kevesebbet foglalt el,
- 2-t, ha a sporuláció a levélfelület harmadára terjedt ki,
- 3-t, ha a sporuláció a levél felét foglalta el,
- 4-t, ha a sziklevél felénél is nagyobb hányadán volt észlelhető a sporuláció.

Minden növény esetében a fokozottabb sporulációt mutató sziklevelet értékeltük. Emellett feljegyeztük az elpusztult (tőpusztulás) növények számát is. A második értékeléskor megmértük a növények magasságát, és feljegyeztük a klorózist (a valódi leveleken) mutató növények számát is. Valamennyi kísérletet 3 ismétlésben állítottuk be és minden kezelési csoportból ismétlésenként 25 növényt értékeltünk.

3.5. Mikroszkópos vizsgálat

A szövettani vizsgálatokhoz a mintákat a fertőzés utáni 3., 7., 10. és 15. napon vettük. A talajmaradványoktól alaposan megtisztított növények hipokotil részét FAA (Formaldehyde Alcohol

Acetic Acid, 10%:50%:5% + 35% desztillált víz) oldatban fixáltuk a feldolgozásig. A tartósított növényi részeket a metszetek készítése előtt desztillált vízben áztattuk, hogy a tartósítás során kivont vizet a növényi részekbe visszapótoljuk. A növényi mintákból penge segítségével maximum néhány milliméter vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket tárgylemezre, vízbe helyeztük a vizsgálat megkezdése előtt.

A szövettani értékelést Olympus BX50 fluoreszcensz mikroszkóppal végeztük, ahol a kórokozó fejlődési alakjait (hifák, hausztóriumok), valamint a növényi sejtek fertőzésre adott válaszait értékeltük. A fluoreszcencia jelenségének a lényege az, hogy a fény vagy egyéb elektromágneses sugárzás által megvilágított anyag fényt bocsát ki magából addig, amíg a fény vagy az elektromágneses sugárzás általi stimuláció fennáll. A legtöbb szerves anyag képes rövid hullámhosszú fény (250-350 nm, UV- fény) hatására fluoreszkálni. A jelen vizsgálatokhoz kapcsolódóan ide tartoznak például a különböző kórokozó képletek (hífák, hausztóriumok, stb.). Tipikus képviselői az autofluoreszcenciára képes anyagoknak a heterociklusos vegyületek (pl. fenol, lignin), vagyis pontosan azok, amelyek a kórokozók és gazdanövényeik közötti kapcsolat kialakításában fontosak. A fluoreszcens fény mikroszkópi alkalmazásának az egyéb mikroszkópos módszerekkel szembeni előnye a nagyfokú érzékenysége és gyorsasága. Az UV-A (350 nm hullámhosszú) fény továbbá nem roncsolja a mintákat, hatására a szerves molekulák nem bomlanak el. A gombák fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatával Kwon és munkatársai (1993) foglalkozott részletesebben. A peronoszpórával fertőzött napraforgó fluoreszcens vizsgálatára a szakirodalomban több, a fentiekben már említett munka is található (Mouzeyar et al., 1993; 1994; 1995, Mazeyrat et al., 1999; Bán et al., 2004a; 2004b; Körösi et al. 2009), amelyek egyértelműen azt mutatják, hogy ez a technika alkalmas a kórokozó nyomon követésére és a növényi reakciók detektálására ebben a gazda-parazita kapcsolatban is.

A vizsgálatokhoz a szárkeresztmetszetet képzeletben négyfelé osztottuk és ennek megfelelően négyfokozatú skálát használtunk az értékeléshez. Minden negyedben külön-külön vizsgáltuk a kórokozó jelenlétét valamint a növényi válaszokat. Az értékelésnél megkülönböztettük egymástól a kéreg- és bélparenchimát is (Bán et al., 2004). Ismétlésenként (3 ismétlés) és kezelésenként 3-3 db növény hipokotilját értékeltük ilyen módon.

3.6. Szabadföldi kísérletek

A laboratóriumi körülmények között hatásosnak bizonyult kezelésekkel szabadföldi vizsgálatokat is végeztünk 2007-ben és 2008-ban. Kísérleteinkhez a teljesen fogékony, rezisztenciagént nem hordozó HA 89 napraforgó vonalat, illetve a (*P. halstedii*) 710-es patotípusát választottuk, azaz egy kompatibilis kapcsolatot kaptunk.

A napraforgó kaszatok felületi fertőtlenítését és az azt követő csíráztatást a korábban ismertetett módon végeztük, valamint az üvegházi kísérleteknél alkalmazott csíranövény kezeléseket és inokulálási módot alkalmaztuk. Az egyes kezelések jelölései a következők voltak:

- NKNF: nem kezelt és nem fertőzött,
- NKF: nem kezelt, fertőzött,
- K(BTH)NF: kezelt (BTH 160 mg/l), nem fertőzött,
- K(BABA)NF: kezelt (BABA 2000 mg/l), nem fertőzött,
- K(INA)NF: kezelt (INA 100 mg/l), nem fertőzött,
- K(BTH)F: kezelt (BTH 160 mg/l), fertőzött,
- K(BABA)F: kezelt (BABA 2000 mg/l), fertőzött,
- K(INA)F: kezelt (INA 100 mg/l), fertőzött.

A kezelések után a napraforgó csíranövényeket talajban lebomló (ún. finpot) cserepekbe ültettük, egy hétig üvegházban neveltük, majd kiültettük a Szent István Egyetem Növényvédelmi Intézetének kísérleti terén. A kiültetésnél 70 cm-es sortávot és 25 cm-es tőtávot alkalmaztunk. A területet a madarak károsítása ellen hálóval takartuk, amit két pár valódi leveles állapot után vettünk le a napraforgó növényekről.

A szabadföldi kísérletet három ismétlésben végeztük, véletlenblokk elrendezésben. Egy blokkban nyolc parcella volt és minden parcellában 25 növény. Az értékelések az alábbiakra terjedtek ki:

- Tüneti értékelés a tipikus szisztemikus betegségtünetek megjelenése alapján (folyamatosan)
- Magasság mérése (a kiültetést követően 2, 5, 7 és 11 héttel).
- Tányérátmérő mérése (a tányérok teljes kifejlődésekor).

A 2007. évben a szélsőséges időjárási körülmények miatt (vihar, jégeső) a növényállomány egy része károsodott, ezért az eredmények csak részben voltak értékelhetők. A kísérletet 2008-ban változatlan formában megismételtük.

3.7. *In vitro* sporangium csíráztatás

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 (BTH: 320 mg/l, INA: 400 mg/l BABA: 4000 mg/L), és ezekből megfelelő hígítással különböző koncentrációjú oldatokat készítettünk, amelyeket 1:1 arányban vegyítettünk a kórokozó 60 ezer sporangium/ml koncentrációjú sporangium szuszpenziójával. Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak: a BTH esetében 40, 80, 160 mg/l, INA esetében 25, 50, 100 és 200mg/L, BABA esetében pedig 50, 100, 250, 500, 1000, 2000

mg/l. A vizsgálati mintákat 16 °C-on sötétben inkubáltuk, az értékeléseket hat 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. A kísérletet 3 ismétlésben végeztük el.

3.8. Enzimek aktivitásvizsgálata

Az enzimek méréséhez a növényeket a fertőzés utáni 0., 3., 9., 13. és 17. napon vettük. Ezt a vizsgálat sorozatot csak a BTH-val (160 mg/l dózissal) kezelt növények esetében végeztük.

Az enzimmérésekhez 0–4 °C közötti hőmérsékleten sejtmentes oldatot készítettünk a napraforgó növények hipokotil részéből. Növényenként 0,5 g tömegű mintákat vettünk, előhűtött dörzsmozsárba helyeztük és mozsártörővel homogenizáltuk 3 ml hideg, 50 mM-os TRIS–HCl pufferben (pH 7,8), amely 7,5% (w/v) vízoldékony polivinil-pirrolidon K25-öt és 1 mM EDTA-Na_2-t is tartalmazott. A homogenizált növényi szövetet 10000 *g*-vel, 20 percig 4 °C -on centrifugáltuk, és a felülúszót használtuk a vizsgálatok elvégzéséhez. Az enzimkivonatot a mérés teljes időtartama alatt 4 °C -on tartottuk. A méréseket ellenőrzött hőmérsékletű küvettában, 25 °C -on végeztük, SmartSpec Plus típusú spektrofotométerrel (BioRad). A kísérletet 3 ismétlésben végeztük és ismétlésenként 3 növény hipokotiljából készítettünk nyers enzimkivonatot.

3.8.1. Gvajakol-peroxidáz (POX) aktivitás mérése

A gvajakol-függő peroxidázok aktivitását gvajakol szubsztrátummal Rathmell és Sequeira (1974) módszere alapján határoztuk meg. A reakcióelegy 2,2 ml nátrium-foszfát puffert (0,1 M, pH 6,0), 100 µl 50 mM-os gvajakolt (62 mg gvajakol feloldva 10 ml desztillált vízben, 2 mM végkoncentráció), 100 µl 12 mM-os H_2O_2-oldatot és 10 µl növényi kivonatot tartalmazott. A gvajakolból keletkező tetrakonjugátum képződését 436 nm hullámhosszúságon kvarc küvettában követtük nyomon (extinkciós koefficiens 26,6 $mM^{-1}cm^{-1}$).

3.8.2. Polifenol-oxidáz (PPO) aktvitás mérése

A polifenol-oxidáz aktivitását 400 nm-en végeztük, ahol a kinon kialakulásának arányát Fehrmann és Dimond (1967) módosított módszere alapján mértük. A reakcióelegy 2,2 ml nátrium-foszfát puffert (0,1 M, pH 6,0), 1 mM EDTA-Na_2-t, 20 mM katekolt és 200 µl növényi kivonatot tartalmazott. Az abszorbancia változást 400 nm-en követtük nyomon, a PPO aktivitás számításához a képződött termék extinkciós koefficiensét (950 M^{-1} cm^{-1}) vettük figyelembe.

.

3.9. Génkifejeződési vizsgálatok

Genetikai vizsgálatokhoz a növényeket a fertőzés utáni 0., 3., 9., 13. és 17. napon vettük. A talajból sérülésmentesen kiemelt napraforgókat alapos mosás után folyékony nitrogénben lefagyasztattuk. Az RNS-t RNeasy Plant Mini Kit segítségével vontuk ki, követve a gyártó utasításait (Qiagen, lásd. M2.). A kivont RNS mennyiségét és minőségét spektrofotométer segítségével ellenőriztük. A kivont RNS-t RNáz inhibitorral és DNáz I készítményekkel (Fermentas) kezeltük, hogy megvédjük a kivont RNS-t a bomlástól és eltávolítsuk belőle a DNS kontaminációt. Az RNS mennyiségét a mintákban az A260 értékkel határoztuk meg: c=A260 × hígítás/25 (moláris kioltási együttható), az A280 érték pedig a fehérjével való szennyezettségre utalt. Az A260/A280 arányt 1,5 és 2,0 értékek között fogadtuk el megfelelőnek. Ezt követően az RNS mintákat 1%-os formaldehid-agaróz gélen futtattuk és az elektroforézis (50 V, 20 min.) után etídium bromidos festéssel UV-fényben ellenőriztük a kivont RNS koncentrációját és épségét. 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 (lásd. M3.).

A keresett transzkriptumok kimutatásához fél kvantitatív PCR módszert használtunk: reverz transzkripciós lépéssel egybekötött nukleinsav-sokszorosítást végeztünk polimeráz enzimmel láncreakcióban, az enzimkeveréket gyártó cég utasításait követve (Fermentas, lásd. M4.). 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 átíródási szintek között. A PCR reakciókhoz Radwan és munkatársai (2005) valamint Azpilicueta és munkatársai (2007) által leírt, napraforgó génekre specifikus indítószekvencia-párokat (primereket) adtunk (1. táblázat). Kísérleteinkben 5 primerpárt használtunk. A gélen megjelenő termékek normalizálásához a napraforgó egyik háztartási génjét használtuk, az ún. elongációs faktort, amit *Ha*-EF1 α - ként jelöltünk. További, indukált állapottal összefüggésbe hozható génekre tervezett indító szekvenciák: *Ha*-GST: a glutation-S-transzferáz aktivitásának vizsgálatára, *Ha*-PDF: a növényi defenzin gén aktivitásának megfigyelésére és *Ha*-CAT2: a kataláz gén expressziójának nyomon követésére. A növényekben megjelenő *P. halstedii* mennyiségének kimutatására, és a kezelések hatékonyságának összehasonlítására a napraforgó-peronoszpóra elongációs faktorára tervezett indító szekvenciát használtunk (*Ph*-TEF1). A PCR-reakció kezdő lépése 94°C volt 3 percig, 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 percig.

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 eredményeinkben (pl. *Ha*-PDF adat/*Ha*-EF1 α adat = *Ha*-PDF relatív transzkript felhalmozódása).

A kísérletet 3 ismétlésben végeztük, és ismétlésenként 2-2 növényben vizsgáltuk a gének kifejeződését.

1.táblázat A genetikai kísérletben felhasznált primer szekvenciák. Tm: olvadási hőmérséklet (melting point), *Ha*-EF1α: háztartási gén, napraforgó elongációs faktor, *Ha*-GST: glutation-S-transzferáz, *Ha*-PDF: növényi defenzin, *Ph*-TEF1: *Plasmopara halstedii* elongációs faktor, *Ha*-CAT2: kataláz.

Gén	Génbanki azonosító szám	Primer szekvencia	Tm (°C)	Ciklusok száma	Amplifikált termék mérete (bp)
Ha-EF-1α	AAM19764	Forward 5'-AGGCGAGGTATGATGAAATTGTCA-3' Reverse 5'-GTCTCTTGGGCTCATTGATTTGGT-3'	58	25	200
Ha-GST	AY667502	Forward 5'-CCTCAGGATGCTTACGAGAAGG-3' Reverse 5'-GCAGAAATATCAACCAGGTTGATG-3'	61	26	216
Ha-PDF	AF364865	Forward 5'-ATGGCCAAAATTTCAGTTGCTTTCA-3' Reverse 5'-AAGACTTGCACTGGTCATCACAG-3'	61	30	558
Ph-TEF1	CB174619	Forward 5'-GAGTTATTAAACCCGGTATGGTTG-3' Reverse 5'-TCCATCTTCTCCGTAATCTCTTTG-3'	60,5	32	331
Ha-CAT2	AF243517	Forward 5'-TTCCCGCTTGAATGTGAAG-3' Reverse 5'-CCGATTACATAAACCCATCATC3'	50	31	248

3.10. Statisztikai elemzések

A kísérleteket legkevesebb két biológiai ismétlésben végeztük el, 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.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Makroszkópos tüneti értékelés

Az első fertőzöttség-értékelést szikleveles korban végeztük, amelynek eredményét az 5. ábra szemlélteti. A fogékony növények sziklevelein megjelenő sporangium bevonat (6. ábra) kiterjedése alapján megállapítható, hogy az aktivátorral kezelt növények fertőzöttsége szignifikánsan kisebb volt, mint a nem kezelteké. Legjobb eredményt a BTH és az INA kezelések mutatták. Az INA két alkalmazott koncentrációja (100 és 200 mg/L) között nem találtunk szignifikáns különbséget, a BABA esetében viszont a koncentráció emelésével párhuzamosan csökkent a sporangium bevonat területi aránya a fogékony növények sziklevelein. Valamennyi alkalmazott koncentráció szignifikánsan csökkentette a kórokozó megjelenésének arányát a szikleveleken, a legjobb hatást azonban a legmagasabb dózissal értük el. Sem a két legalacsonyabb koncentráció (125 és 250 mg/L), sem a következő kettő (500 és 1000 mg/L) között nem volt szignifikáns különbség. A 2000 mg/L-es BABA dózis a BTH és INA kezeléshez hasonló mértékben csökkentette a sporangiumok megjelenését a szikleveleken. A két rezisztens napraforgó vonal esetében egyik kezelésnél sem tapasztaltunk sporulációt a szikleveleken.

Mivel a tőpusztulás (7. ábra) a napraforgó-peronoszpóra egyik jellegzetes és súlyos tünete, ezért kísérleteinkben ezt a növényi választ is megfigyeltük és kezelésenként feljegyeztük az életben maradt növények százalékos arányát (2. táblázat). Látható, hogy a BABA két legalacsonyabb dózisának kivételével az aktivátorral kezelt, fogékony fertőzött napraforgók között statisztikailag több maradt életben a kezeletlen növényekhez képest. A legjobb eredményt az INA 200 mg/L, a BTH 160 mg/L és a BABA 3 legnagyobb (500, 1000, 2000 mg/L) dózisa adta, közülük az INA-val kezelt növényállományban pusztult el a legkevesebb növény. A rezisztens növények esetében nem tapasztaltunk korai növénypusztulást.

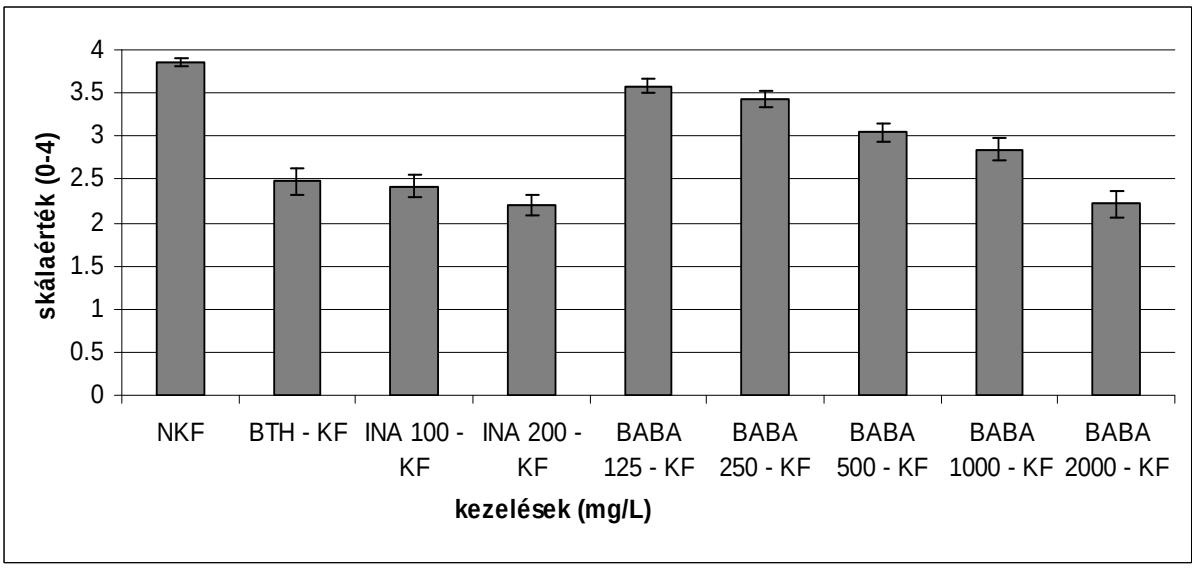
A második tüneti értékelést 15 napos korban végeztünk, amikor már megjelentek az első pár valódi levelek (3. táblázat). Ennek során a tipikus levélklorózis (8. ábra) megjelenését jegyeztük fel. A három aktivátor valamelyikével kezelt és fertőzött fogékony növények között szignifikánsan kevesebb klorotikus tünetet mutató növényt figyeltünk meg, mint a kezeletlen állományban. A legkevesebb klorózist mutató növényt az INA esetében (200 mg/L) találtuk, míg a BTH (160 mg/L), illetve a BABA (esetében a 2000mg/L) szintén jelentősen visszaszorította ezt a betegségtünetet. A BABA 125-500 mg/L közötti dózisai kivételével valamennyi kezelés 50%-nál kevesebb klorotikus növényt eredményezett. A két rezisztens vonal esetében egy növény valódi levelein sem jelent meg a klorózis.

A napraforgó-peronoszpóra tipikus tünete még a fogékony napraforgók törpülése, ezért kísérleteinkben mértük a növények magasságát is 11 nappal a kiültetést követően.

A 9. ábrán az RHA-274 növények magasságmérésének eredményeit láthatjuk csak aktivátoros kezelés, illetve kezelés és fertőzés együttes hatására. Ez a napraforgó vonal fogékony a kórokozó 700-as patotípusával szemben Az aktivátoros kezelés önmagában csak a BTH esetében okozott szignifikáns változást a nem fertőzött növényekhez képest, azaz ezek a növények szignifikánsan magasabbra nőttek a vízzel kezelt kontrol növényekhez képest. A kezelt és fertőzött növények magassági adataiban már szignifikáns különbségeket tapasztaltunk az aktivátorral kezelt és nem kezelt növények között. Valamennyi aktivátoros kezelés hatására szignifikánsan magasabbra nőttek a kezelt növények a nem kezeltekhez képest. A BTH-val kezelt növények lettek a legmagasabbak, míg a BABA esetében a koncentráció növelésével párhuzamosan nőtt a kezelt növények magassága.

A részleges (HLI) típusú rezisztenciával rendelkező, RHA-340 növények különbözően reagáltak a három aktivátorra (10. ábra). A BTH kezelés hatására kismértékben, de nem szignifikánsan, csökkent a növények magassága, míg az INA valamint a BABA kezelés hatására nagyobbak lettek a növények, az INA esetében szignifikáns a különbség. A BABA kezelésnél a koncentráció növelésével párhuzamosan növekedett az átlagos növénymagasság. A kezelt és fertőzött állományban az aktivátoros kezelések hatására csökkent a növények átlagos magassága, ez a csökkenés az INA esetében szignifikáns volt, ugyanakkor a BABA esetében érdekes megfigyelni, hogy az 500 mg/L-es koncentráció eredményezte a legnagyobb átlagos magasságot.

A teljesen rezisztens, HA-335 vonal esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást a nem fertőzött növények növekedésében a kezelések hatására, bár a BTH és a BABA két magasabb koncentrációja kissé csökkentette a növények magasságát a kontrollhoz képest, míg ez utóbbi aktivátor 500 mg/L koncentrációban volt a legjobb hatású (11. ábra). A kezelt és fertőzött HA-335 növények esetében az aktivátoros kezelések nem eredményeztek értékelhető változást a növények magasságában a kontrollhoz képest, bár a BTH és az INA hatására, ha nem is szignifikánsan, de nőtt a növények magassága.



5. ábra Az aktivátorok gátló hatása a *P. halstedii*vel fertőzött, fogékony (RHA-274) napraforgók sziklevelén megjelent sporulációra (I: 95 %-os konfidencia intervallum). A sporuláció értékelését a sziklevélen a sporangiumtartó borítottsága alapján végeztük el 4 fokozatú skála segítségével (0-nincs sporuláció, 1-4- a sporuláció <25%, 25-75%,> 75% és 100%-a a sziklevél területének) Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

6. ábra A napraforgó peronoszpóra sporangium bevonatának megjelenése a fogékony napraforgó növények (RHA-274) sziklevelén.

7. ábra Tőpusztulás a *P. halstedii* mesterséges fertőzés hatására fogékony napraforgó növényen (RHA-274), üvegházi körülmények között.

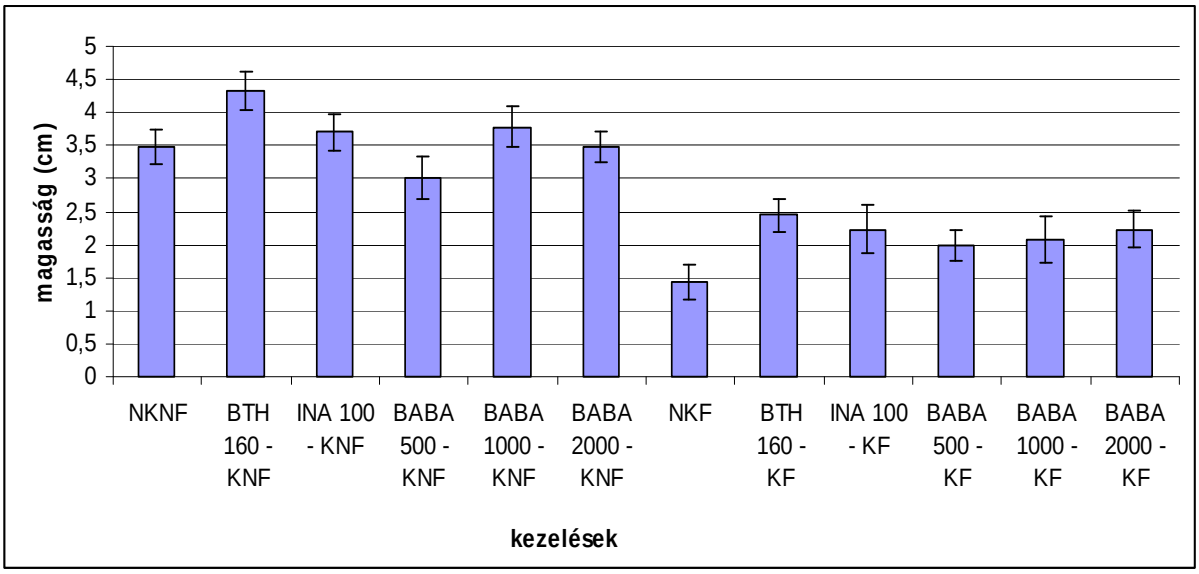
2. táblázat: Az életben maradt növények aránya fogékony, fertőzött RHA-274 napraforgó növények esetében (%) (a csillaggal jelöltek szignifikánsan különböznek a kezeletlen állománytól, P <0,05). Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

Kezelések	**Életben maradt növények (%)**
NKF	65,52%
BTH 160 - KF	95,35% *
INA 100 - KF	97,30% *
INA 200 - KF	99% *
BABA 125 - KF	76,66%
BABA 250 - KF	80%
BABA 500 - KF	94,87% *
BABA 1000 - KF	90,63% *
BABA 2000 - KF	94,12% *

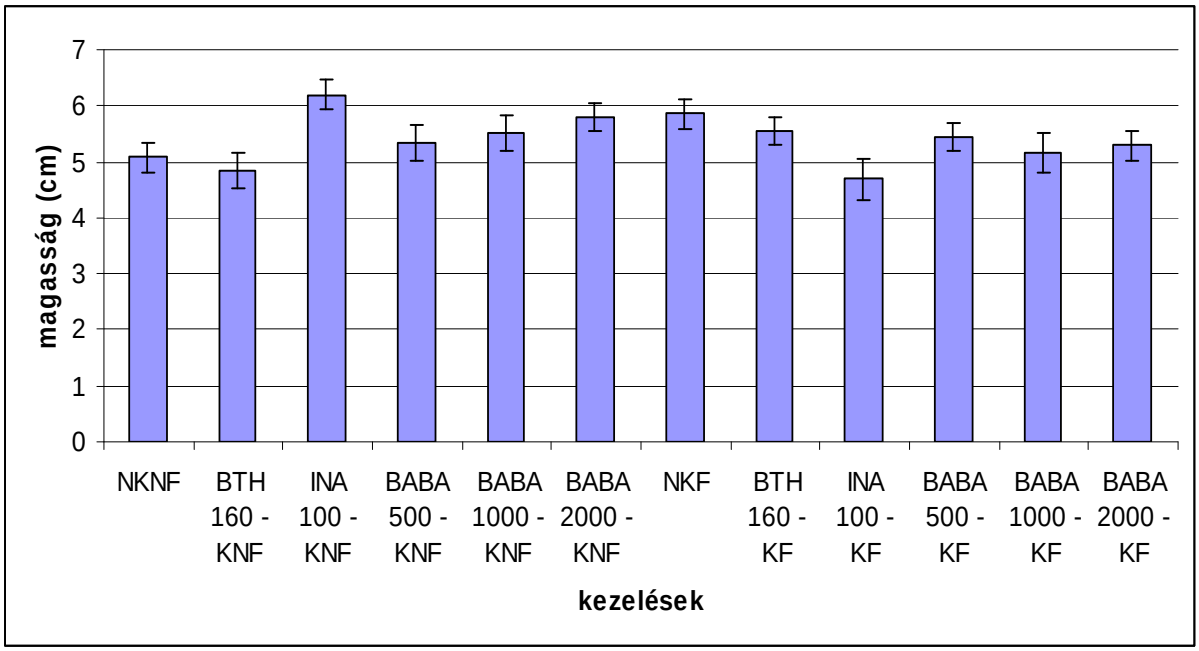
3. táblázat: Klorózis alakulása a különböző induktoros kezelések hatására *Plasmopara halstedii*-vel fertőzött RHA-274 fogékony növényállományban (15 napos korban) (a csillaggal jelölt értékek szignifikánsan különböznek a kezeletlen állománytól, P <0,05). Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

Kezelések	**Klorózis**
NKF	100%
BTH 160 - KF	48,65% *
INA 100 - KF	44,74% *
INA 200 - KF	42,11% *
BABA 125 - KF	78.78% *
BABA 250 - KF	66,67% *
BABA 500 - KF	60% *
BABA 1000 - KF	51,35% *
BABA 2000 - KF	48,57% *

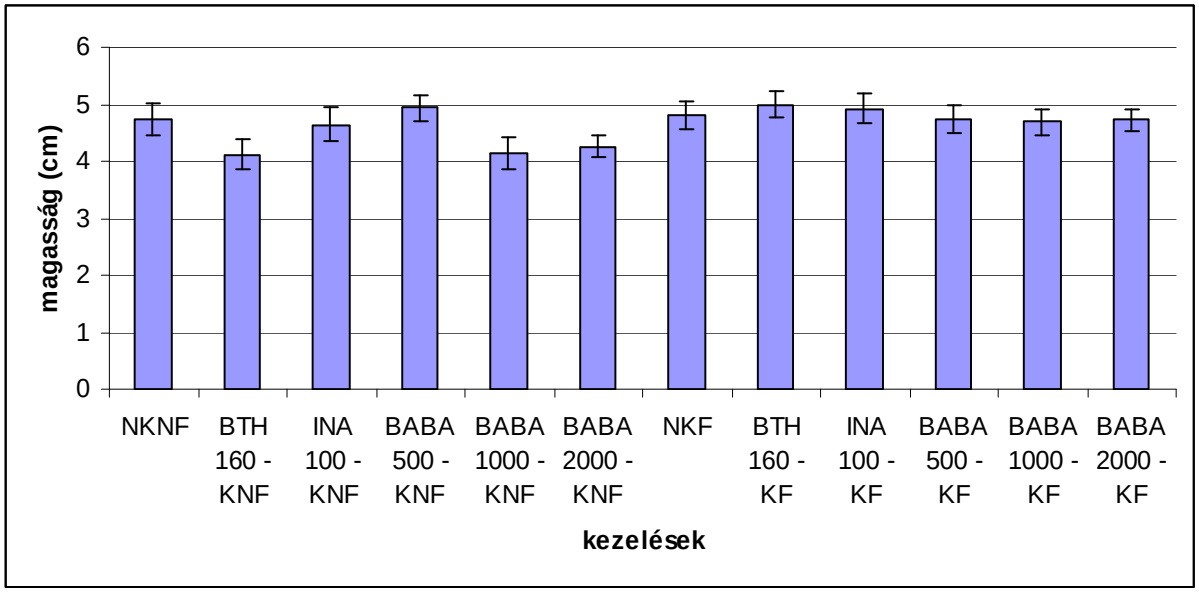
8. ábra Klorózis kialakulása a *P. halstedii* fertőzés hatására a fogékony napraforgó növények (RHA-274) első pár valódi levelén, üvegházi körülmények között.



9. ábra. Az aktivátoros kezelések hatása az RHA-274, fogékony napraforgó növények magasságának alakulására. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



10. ábra. Az aktivátoros kezelések hatása az RHA-340, részleges (HLI típusú) rezisztenciával rendelkező napraforgó növények magasságának alakulására. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



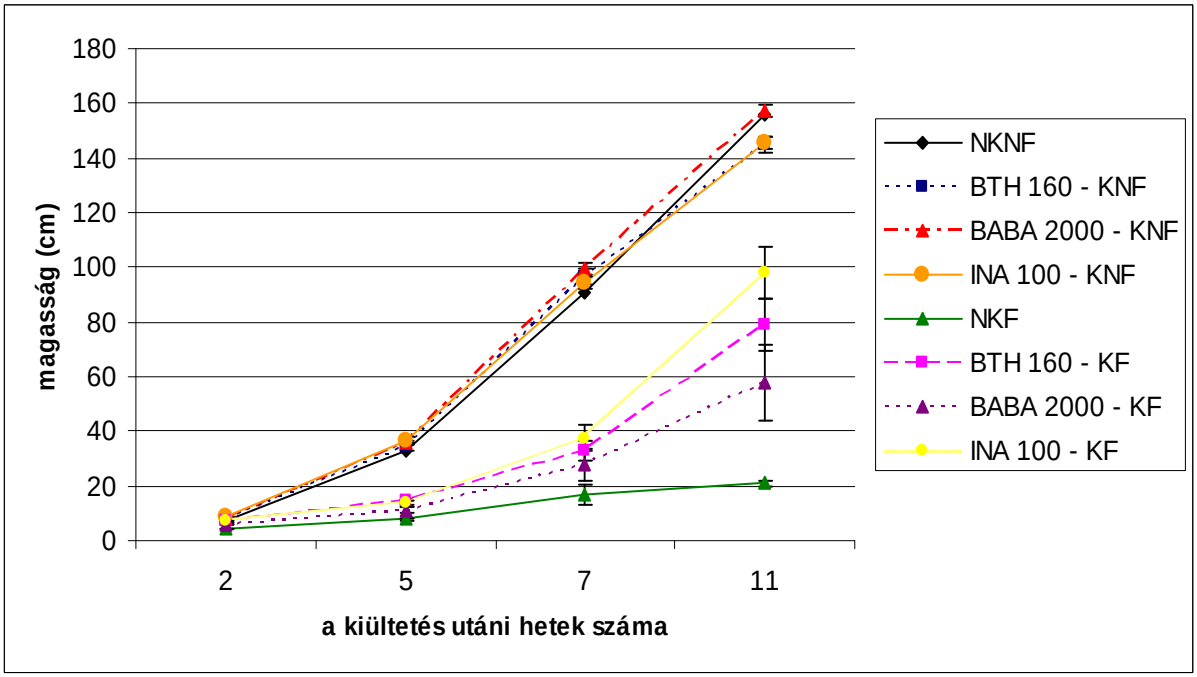
11. ábra. Az aktivátoros kezelések hatása az HA-335, teljes rezisztenciával rendelkező napraforgó növények magasságának alakulására. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (Anyag és módszer 3.3 fejezet).

4.2. A növényi aktivátorok hatása a napraforgó-peronoszpórára szabadföldi körülmények között

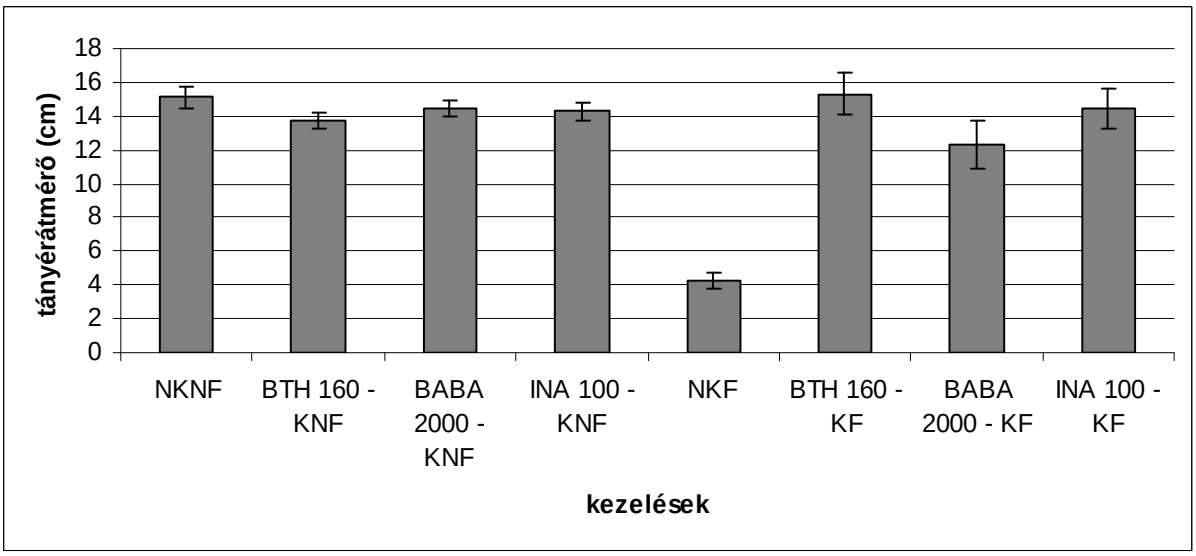
Az üvegházi körülmények között végzett kísérletsorozat folytatásaként szabadföldön is megvizsgáltuk, hogy milyen mértékben befolyásolják az egyes aktivátorok a napraforgó-peronoszpóra fertőzés tipikus tüneteinek (törpülés, visszamaradott tányér) a kialakulását fogékony kapcsolatban (*P. halstedii* 700-as patotípusa – HA-89 napraforgó vonal). Az eredményeket a 12. ábra szemlélteti. Jól látható, hogy már a 2. héttől kezdődően elkülönültek egymástól a fertőzött és a nem fertőzött növények magasság értékei. Az első két mérési időpontban még nem találtunk szignifikáns különbséget a fertőzött növények között az aktivátoros kezelések hatására, azonban a 7. héttől kezdődően az aktivátorral kezelt növények szignifikánsan magasabbak voltak, mint a nem kezeltek. Összehasonlítva a kezelt és fertőzött napraforgók magasságmérési adatait, megállapítottuk, hogy az 5 héttől kezdve egyre nagyobb mértékben látszott az aktivátoros kezelés törpülést csökkentő hatása a kezeletlen és fertőzött növényekéhez képest. Ugyanakkor a 7. héttől már az egyes aktivátorok hatásában is megmutatkoztak a különbségek. Közülük az INA hatása volt a legkifejezőbb, azaz ennél a kezelésnél látszott legmarkánsabban az aktivátor növekedés-csökkenést (törpülést) kiegyenlítő hatása. A BTH - kezelésnél kapott adatok is hasonló eredménnyel

szolgáltak, hiszen a két aktivátor között nem találtunk szignifikáns különbséget, ugyanakkor a BABA kezelés lényegesen gyengébb törpülést mérséklő hatással volt a kezelt növényekre.

Szabadföldi kísérletünkben a napraforgó tányérok teljes kifejlődésekor tányérátmérő mérést is végeztünk. A várakozásnak megfelelően lényegesen kisebb tányérok fejlődtek a fertőzött napraforgókon (13. ábra), mint a fertőzetleneken. Az aktivátoros kezelések önmagukban kismértékű tányérátmérő csökkenést eredményeztek, bár ez a csökkenés csak a BTH esetében volt szignifikáns. Látványosabb eredményeket kaptunk viszont a kezelt és fertőzött növények tányérátmérőjének alakulásában. Általánosságban elmondható, hogy mindhárom aktivátor szignifikánsan növelte a tányérok méretét a kezeletlenhez képest és közülük is a BTH - kezelésben részesült növények tányérja volt a legnagyobb. Szignifikáns különbséget mértünk a BTH és a BABA kezelések között, ugyanakkor az INA és a BTH, valamint az INA és a BABA kezelésben részesült növények között nem volt ilyen különbség a mért értékekben. Végeredményben, a BTH és az INA kezelések hatására a fertőzött napraforgókon hasonló méretű tányérok képződtek, mint a nem fertőzött és nem kezelt növényeken és ez a hasonlóság statisztikailag is igazolható volt. A BABA-nak nem volt ilyen mértékű hatása a tányérok átmérőjére.



12. ábra Fogékony napraforgók (HA-89 vonal) magasságának alakulása a különböző kezelések (aktivátorok, *P. halstedii* fertőzés) hatására a szabadföldi körülmények között (Gödöllő 2008). (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



13. ábra Fogékony napraforgók (HA-89 vonal) tányérátmérőjének alakulása a különböző kezelések (aktivátorok, *P. halstedii* fertőzés) hatására szabadföldi körülmények között (Gödöllő, 2008). (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

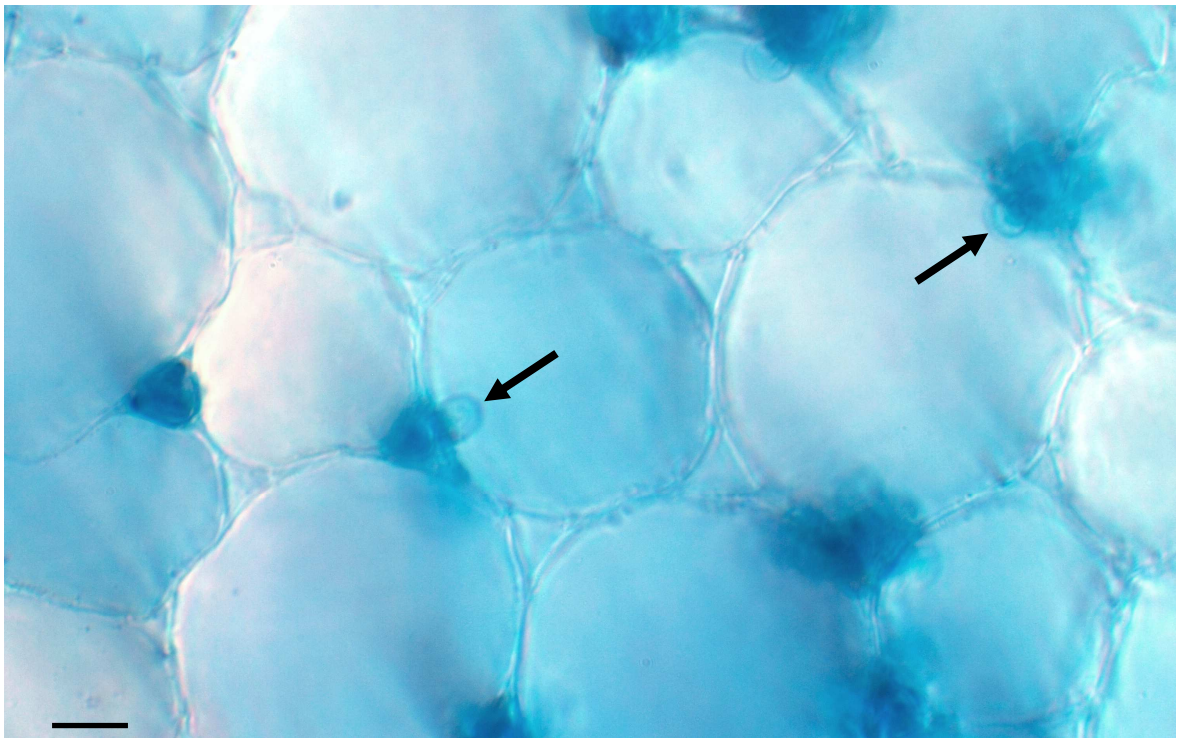
4.3. Szöveti változások a kezelt és/vagy fertőzött napraforgó növényekben

Fogékony kapcsolatban (RHA-274 vonal esetében) a napraforgók hipokotiljában változó mértékben megjelentek a kórokozó hífái és hausztóriumai (14. ábra). Ezek terjedésének mértékét a 15. ábra szemlélteti. Az első mintavételi napon, a fertőzés után 3 nappal, nem találtunk kórokozó képleteket a hipokotil szövetekben. Az idő előrehaladtával, a 7.-15. napokon vett mintákban egyre gyakoribbá vált a *P. halstedii* jelenléte, azonban a kezeletlenhez képest mindhárom aktivátor szignifikánsan csökkentette a kórokozó képletek mennyiségét. Legjobban a BTH szorította vissza a terjedését, ezt követte az INA és a BABA 2000 mg/L-es dózisa, különösen a kezelést követő első héten. Később ez a hatás már alig volt kimutatható, hasonlóan a BABA alacsonyabb dózisaihoz. A BABA hatékonysága tehát a dózis növelésével együtt nőtt, bár szignifikáns különbséget nem minden esetben találtunk a koncentrációk között.

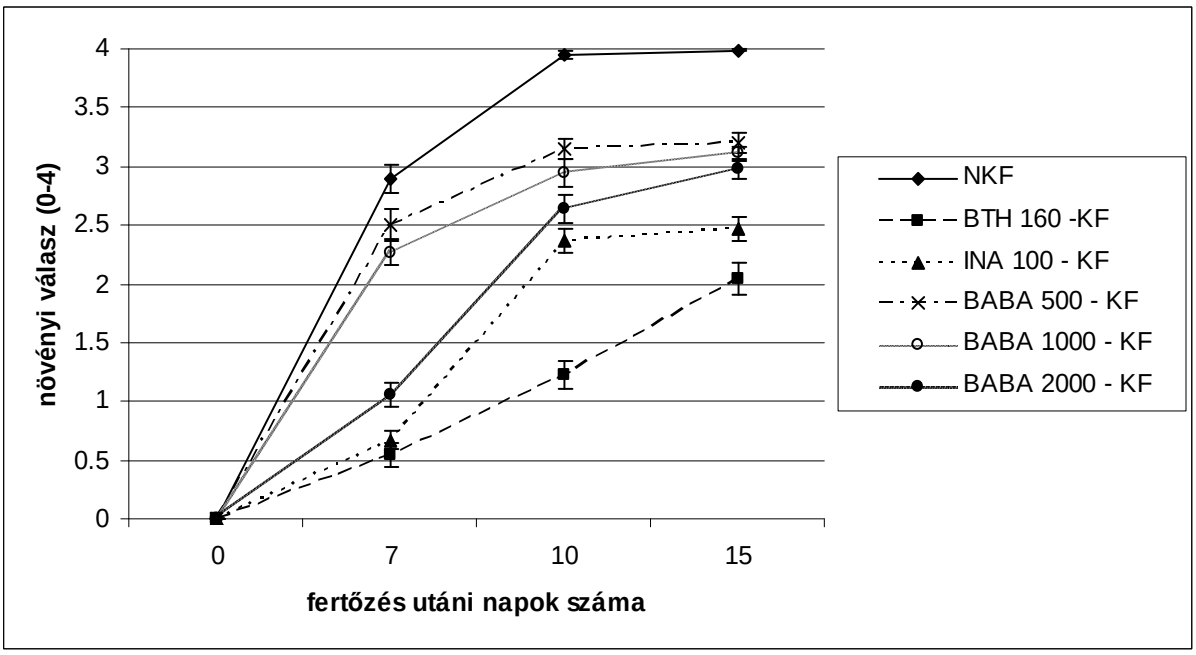
Az RHA-340-es, részleges (HLI típusú) rezisztenciával rendelkező napraforgók szárkeresztmetszeteiben megjelenő kórokozó képletek alakulását mutatja a 16. ábra. A fogékony növényekhez hasonlóan itt sem találtunk oomicéta képleteket a fertőzés utáni 3. napon. A fogékony kapcsolathoz hasonlóan az aktivátoros kezelések hatására ebben a genotípusban is csökkent a szárkeresztmetszetekben talált hifák és hausztóriumok mennyisége. A legerősebb gátlást itt is az INA és BTH kezelések mutatták, ugyanakkor a fertőzés utáni 7. napon a BABA 500 mg/L dózisával kezelt és a kezeletlen kontroll napraforgók hipokotil keresztmetszeteiben található

kórokozó képletek között még nem volt szignifikáns különbség. A 10. naptól kezdve viszont mindhárom koncentráció szignifikánsan visszaszorította a kórokozót a szövetekben.

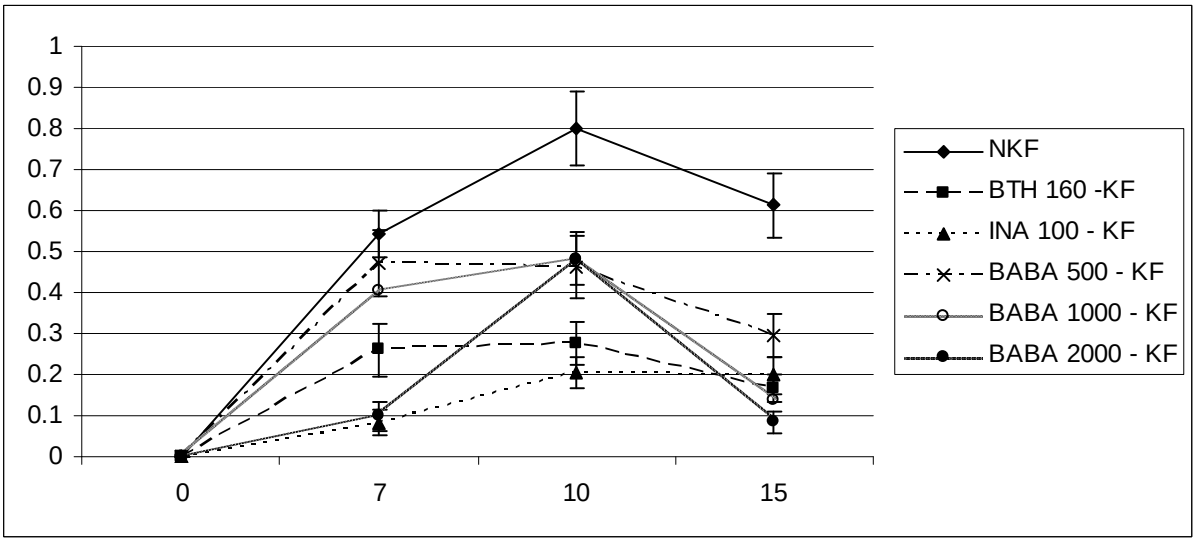
A teljes rezisztenciával rendelkező növények (HA-335) esetében a hipokotil keresztmetszetekben nem találtunk kórokozó képleteket.



14. ábra A *P. halstedii* hifáinak és hausztóriumainak megjelenése a fogékony napraforgó növény (RHA-274) hipokotil keresztmetszetében (méretezés: 100 µm)



15. ábra Az aktivátoros kezelés hatása a *P. halstedii* hifáinak és hausztóriumának fejlődésére fogékony napraforgó vonal (RHA-274) esetében. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). A kórokozó jelenlétét 0-4 közötti skálát használva értékeltük (lásd. a 3.3. fejezetet). Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött.



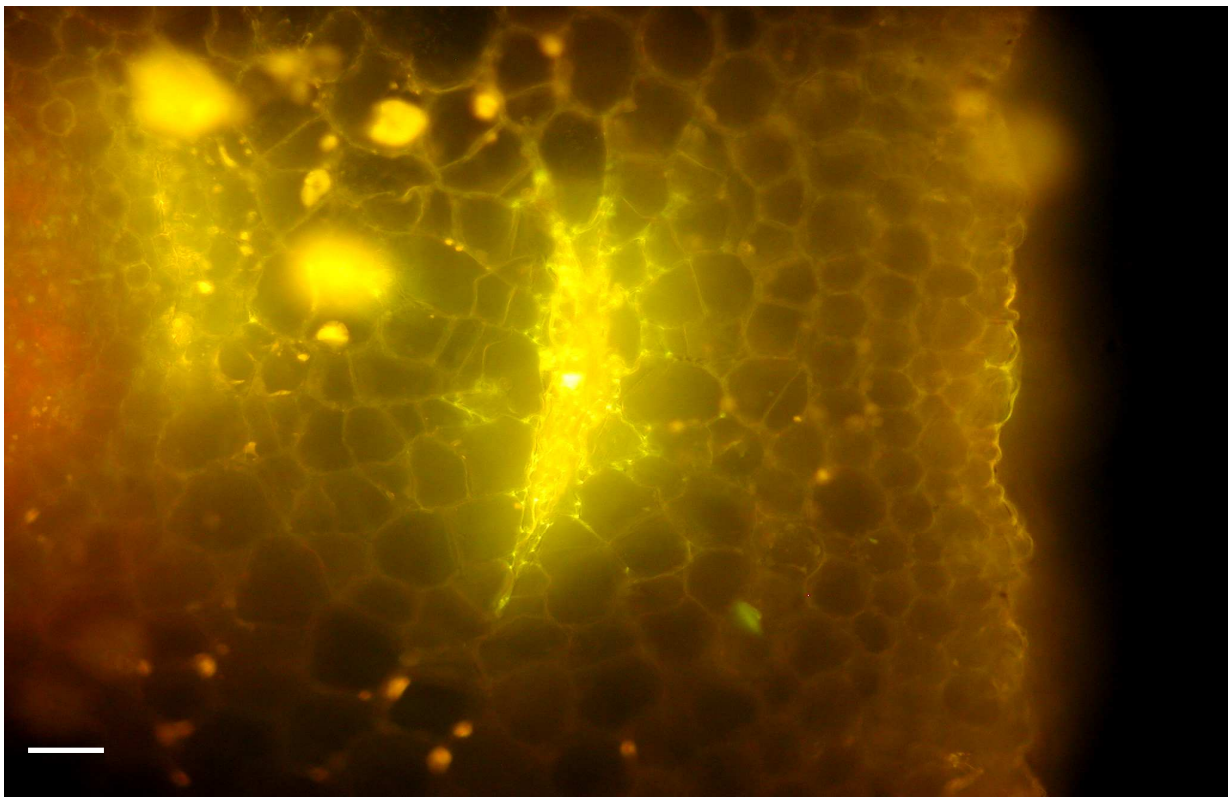
16. ábra. Az aktivátoros kezelés hatása a *P. halstedii* hifáinak és hausztóriumának fejlődésére részleges (HLI típusú) rezisztenciával rendelkező napraforgó vonal (RHA-340) esetében. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). A kórokozó jelenlétét 0-4 közötti skálát használva értékeltük (lásd. a 3.3. fejezetet). Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött.

A kórokozó hífáinak és hausztóriumainak jelenléte mellett az érintett növényi szövetekben kialakuló sejtnekrózis előfordulását is vizsgáltuk a napraforgó növények hipokotil keresztmetszeteiben. Ez a növényi válasz a genetikailag rezisztens napraforgó növényekben a

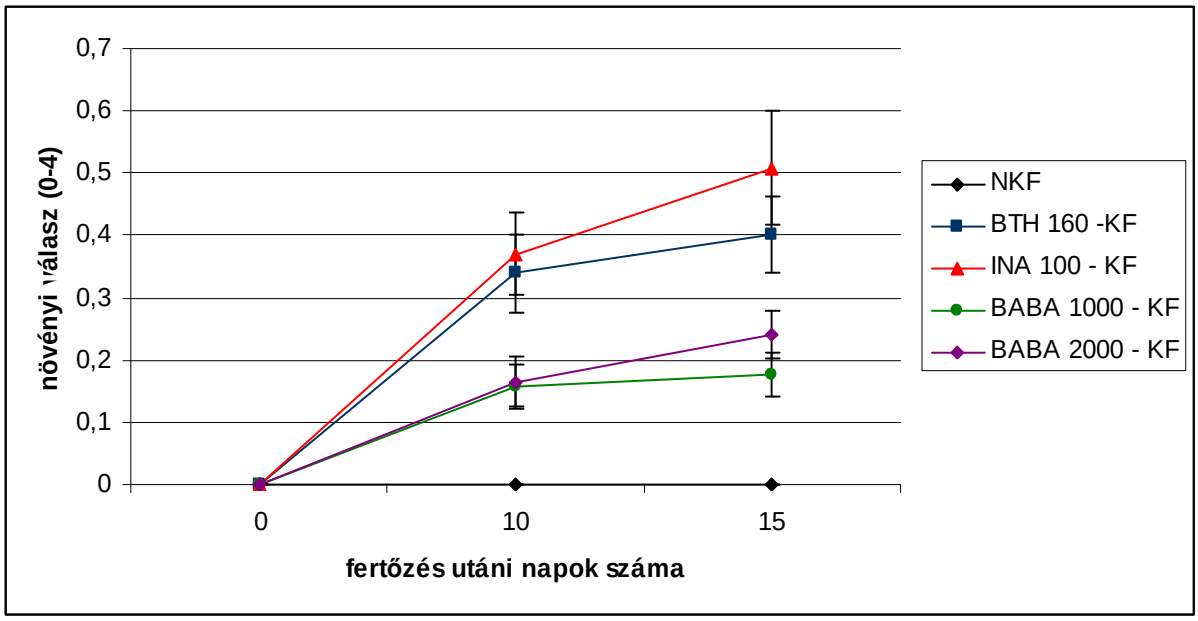
fertőzés hatására jelenik meg (17. ábra). Fogékony kapcsolatban a kezeletlen csak fertőzött növények szárkeresztmetszeteiben nem találtunk nekrózist, míg az aktivátoros kezelés hatására ezek a növények is sejtelhalást mutattak (18. ábra). Az INA kezelésben részesített növényekben alakult ki a legtöbb nekrózis és hasonló volt a helyzet a BTH kezelések esetében is. A két aktivátor között nem találtunk szignifikáns különbséget. Ez a növényi válasz a BABA-val kezelt növényekben is tapasztalható volt, azonban ebben az esetben szignifikánsan kevesebb nekrózis alakult ki, mint a másik két aktivátor esetében. A nekrózisok vizsgálatánál is megfigyeltük a kórokozó képletek megjelenésénél már tapasztalt jelenséget, vagyis ha a növényeket magasabb BABA koncentrációval kezeltük, akkor jobban kifejeződött ez a sejtválasz, azaz több nekrotizálódott sejt volt látható a szövetmintákban.

A szöveti nekrózisok megjelenését az RHA-340-es, részleges rezisztenciával rendelkező növények esetében a 19. ábra szemlélteti. A fertőzés utáni 7. napon mindhárom aktivátor esetében jelentősen kevesebb volt a sejtnekrózisok száma a kezeletlen növényekhez képest. Ebben a vonatkozásban a BABA 3 alkalmazott koncentrációja között nem találtunk szignifikáns különbséget. A fertőzés utáni 10. napon változott a kép. Ekkorra már csak az INA és a BTH kezeléseknél tapasztaltunk szignifikánsan gyengébb nekrózist és hasonló volt a helyzet a 15. napon vett szövetmintákban is azzal a különbséggel, hogy ekkor a BABA 1000 mg/L-es dózisánál szintén csökkenő mértékű nekrózis volt látható.

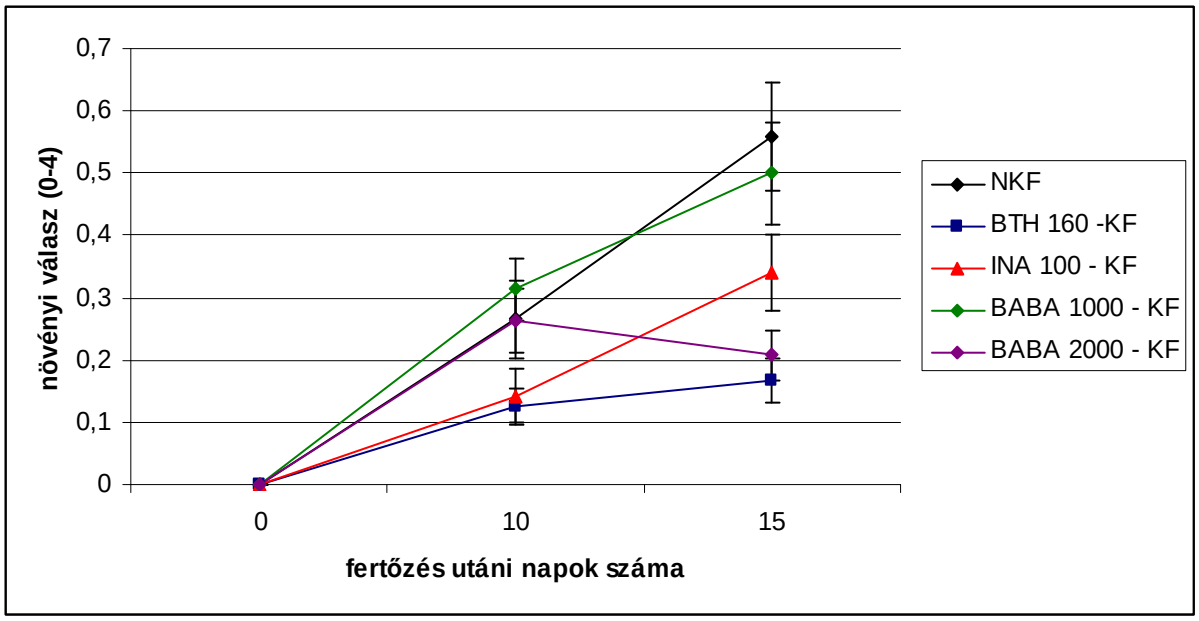
A szöveti nekrózis megjelenését a teljes rezisztenciával rendelkező, HA 335-ös vonal esetében a 20. ábra szemlélteti. A hipokotilból vett mintákban csak a gyökérnyakhoz nagyon közeli részeken találtunk sejtelhalásokat. Az aktivátoros kezelések hatására ezekben a növényekben nem tapasztaltunk lényeges változást a nekrózisokat tekintve. Míg a 7. napon a kezeletlen szövetmintákban a kezeltekhez képest kiugróan erős volt a nekrózis képződés, a későbbiekben ez a különbség jelentősen csökkent. Az alkalmazott aktivátorok között az INA kezelés mutatta a legerősebb nekrózis növelő hatást.



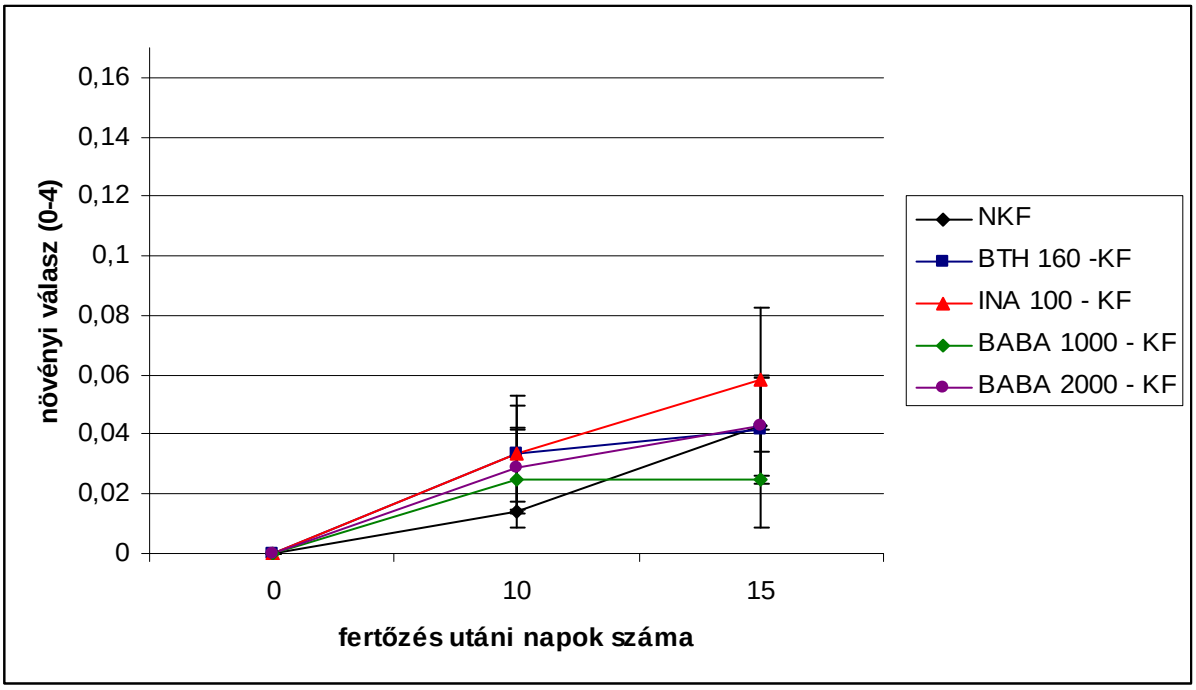
17. ábra A napraforgó hipokotil keresztmetszetében a *P. halstedii* fertőzés hatására kialakuló, pókhálószerű nekrózis UV fényben (méretezés: 160 µm)



18. ábra. Az aktivátoros kezelés hatása a *P. halstedii* által kiváltott szöveti nekrózis megjelenésére fogékony napraforgó vonal (RHA-274) esetében. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). A nekrózis mértékét 0-4 közötti skálát használva értékeltük (lásd. a 3.3. fejezetet). Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött.



19. ábra. Az aktivátoros kezelés hatása a *P. halstedii* által kiváltott szöveti nekrózis megjelenésére részleges (HLI típusú) rezisztenciával rendelkező napraforgó vonal (RHA-340) esetében. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). A nekrózis mértékét 0-4 közötti skálát használva értékeltük (lásd. a 3.3. fejezetet). Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött.



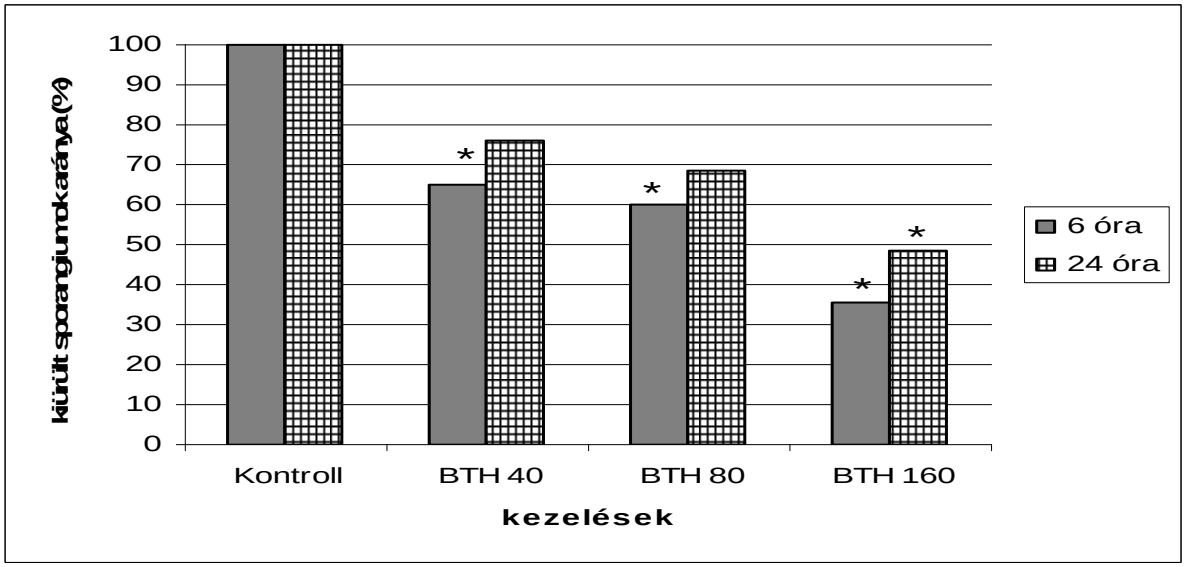
20. ábra Az aktivátoros kezelés hatása a *P. halstedii* által kiváltott szöveti nekrózis megjelenésére teljes rezisztens napraforgó vonal (HA-335) esetében (lásd. a 3.3. fejezetet). (I: 95 %-os konfidencia intervallum). A nekrózisok előfordulását 0-4 közötti skálát használva értékeltük. Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött.

4.4. A növényi induktorok közvetlen hatása a *Plasmopara halstedii* sporangiumainak csírázására *in vitro* körülmények között

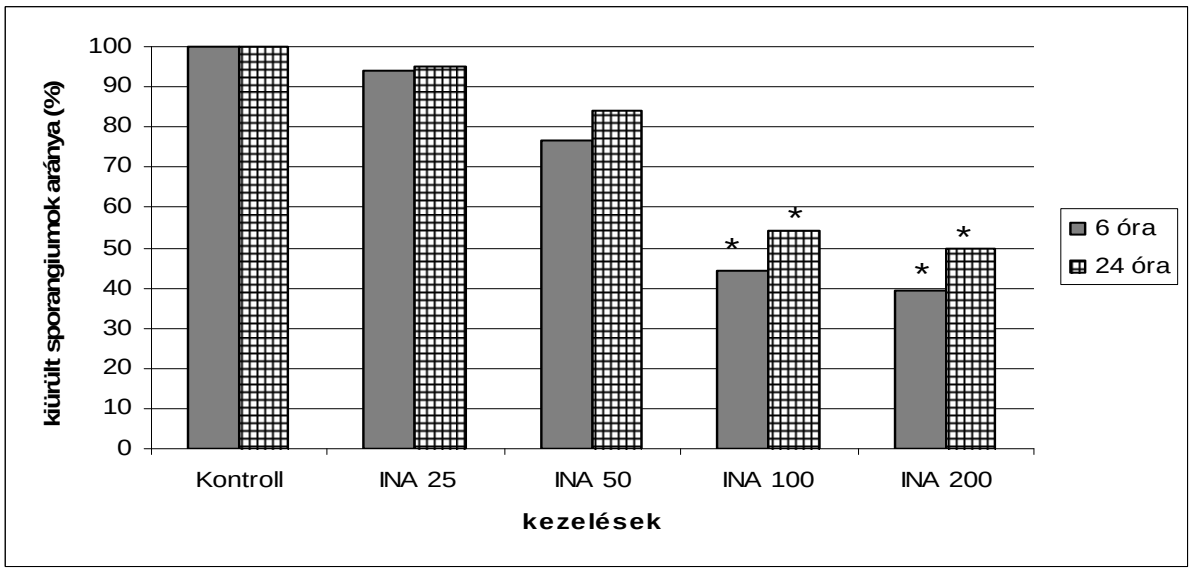
A vizsgált aktivátorok különböző koncentrációinak sporangiumokra gyakorolt hatását a 21., 22. és a 23. ábrák mutatják be. Általánosságban elmondható, hogy mindhárom aktivátor csökkentette a sporangiumok csírázását, vagyis a rajzóspórák kiszabadulását követő kiürülését az aktivátorral nem kezelt, kontroll sporangiumokhoz képest. A BTH esetében (21. ábra) az első értékelési időpontban valamennyi koncentráció szignifikánsan csökkentette a kiürült sporangiumok százalékos arányát, azonban a 24 órás inkubálást követően már csak a legmagasabb koncentrációnál (160 mg/L) tapasztalt gátlás mértéke volt szignifikáns.

Az INA hatását vizsgálva (22. ábra) azt tapasztaltuk, hogy mind az első, mind a második értékelési időpontban csak a két legmagasabb koncentráció (100 és 200 mg/L) gátolta szignifikánsan a sporangiumok csírázását.

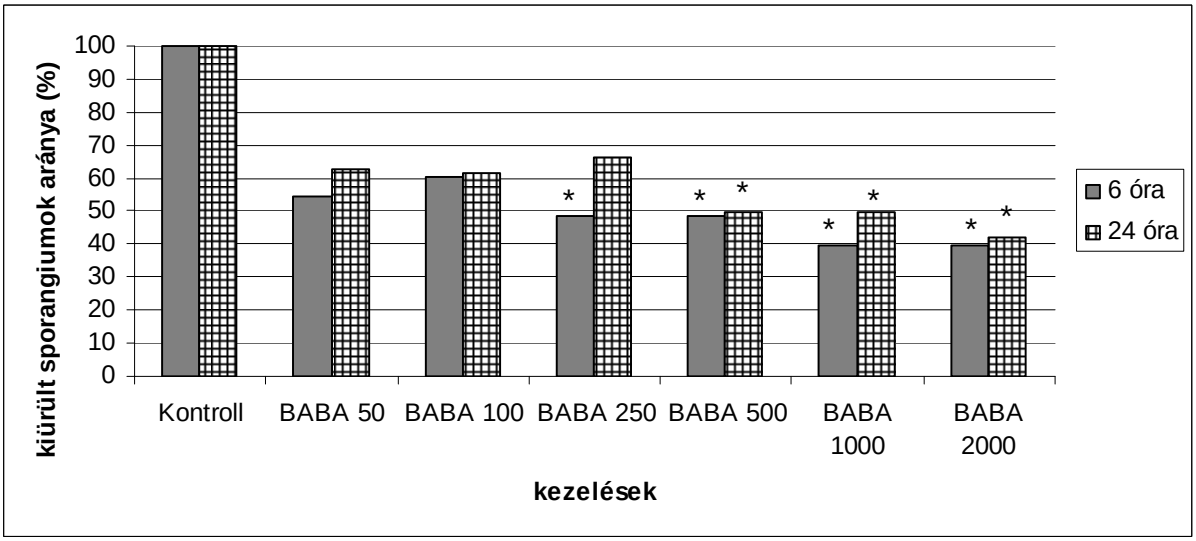
A BABA esetében a két legkisebb koncentráció (50, 100 mg/l) egyik mérési időpontban sem gátolta jelentősen a sporangiumok kiürülését (23. ábra). A magasabb dózisoknál viszont a 6. órától kezdve már a 250 mg/L, a 24. óránál pedig a többi (500, 1000, 2000 mg/L) kezelés is szignifikáns csökkenést eredményezett a sporangiumok kiürülésében.



21. ábra A BTH közvetlen sporangium csírázást gátló hatása *in vitro* körülmények között. A *-gal jelöltek szignifikánsan különböznek a kontrolltól (P <0,05).



22. ábra Az INA közvetlen sporangium csírázást gátló hatása *in vitro* körülmények között. A *-gal jelöltek szignifikánsan különböznek a kontrolltól (P <0,05).



23. ábra A BABA közvetlen sporangium csírázást gátló hatása *in vitro* körülmények között. A *-gal jelöltek szignifikánsan különböznek a kontrolltól (P <0,05).

4.5. Az indukált rezisztenciával kapcsolatba hozható enzimek aktivitásváltozásai

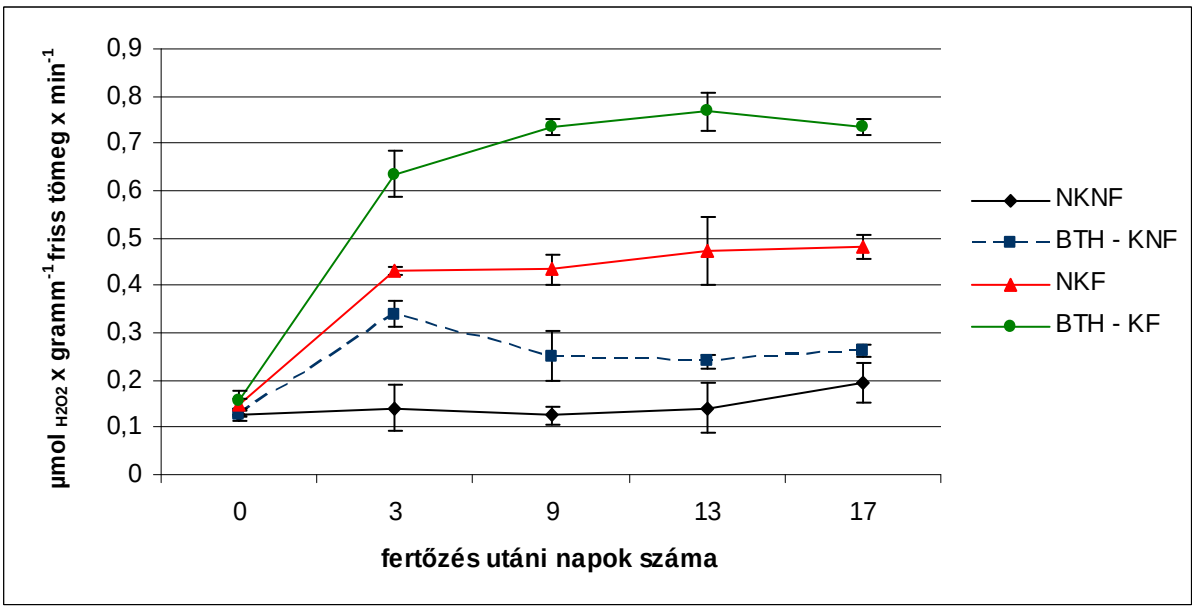
4.5.1. A POX aktivitásának változása

A BTH-val kezelt és/vagy fertőzött fogékony (RHA-274) napraforgó növények esetében a POX enzim aktivitásának változását a 24. ábra szemlélteti. A nem fertőzött növényekben a BTH kezelés fokozta az enzimaktivitást a nem kezeltekhez képest, és ez a szignifikáns emelkedés minden mintavételi időpontban fennmaradt. A fertőzés hatására az enzim aktivitása már a 3. naptól kezdve magasabb értéket mutatott a nem fertőzött növényekhez képest. A nem fertőzött növényekhez

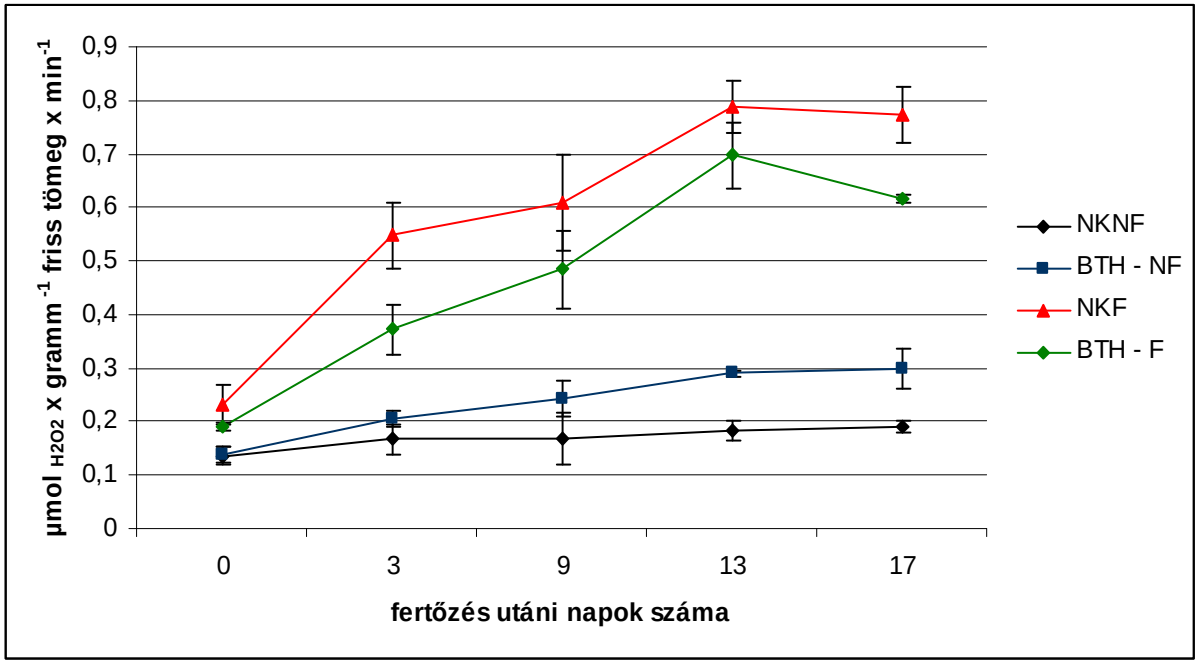
hasonlóan az aktivátoros kezelés a fertőzött napraforgókban is szignifikánsan megemelte az enzim aktivitását a nem kezeltekhez képest. A legmagasabb POX aktivitás a fogékony növényekben a kezelés és a fertőzés együttes hatására alakult ki.

A részleges rezisztenciával (HLI típusú) rendelkező, nem fertőzött növényekben a fogékony napraforgóhoz hasonló változásokat tapasztaltunk, azaz a BTH kezelés hatására ebben az esetben is fokozódott a POX aktivitása (25. ábra). Igaz, ez a növekedés a kezelt, nem fertőzött növényeknél kezdetben alig volt észlelhető és csak a 13. naptól kezdve mutatott szignifikáns különbséget a nem kezelt, nem fertőzött növényekhez képest. A fertőzés önmagában már a 3. naptól kezdve jelentősen fokozta a POX aktivitását, és ennél a kezelésnél tapasztaltuk a legmagasabb enzimaktivitást. A BTH kezelés és a fertőzés együttes hatására a részlegesen rezisztens növényekben kisebb enzimaktivitást mértünk, mint a csak fertőzött növényekben. A HLI típusú rezisztenciával rendelkező, nem kezelt és fertőzött növényekben az enzimaktivitás magasabb értéket mutatott, mint a csak fertőzött fogékony növényekben (4. táblázat). Ez utóbbiakban csak a BTH kezelés és fertőzés együttesen váltott ki ilyen hatást Különbséget találtunk a kétféle napraforgó genotípusban akkor is, amikor 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. A 4. táblázaton az is látható, hogy 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.

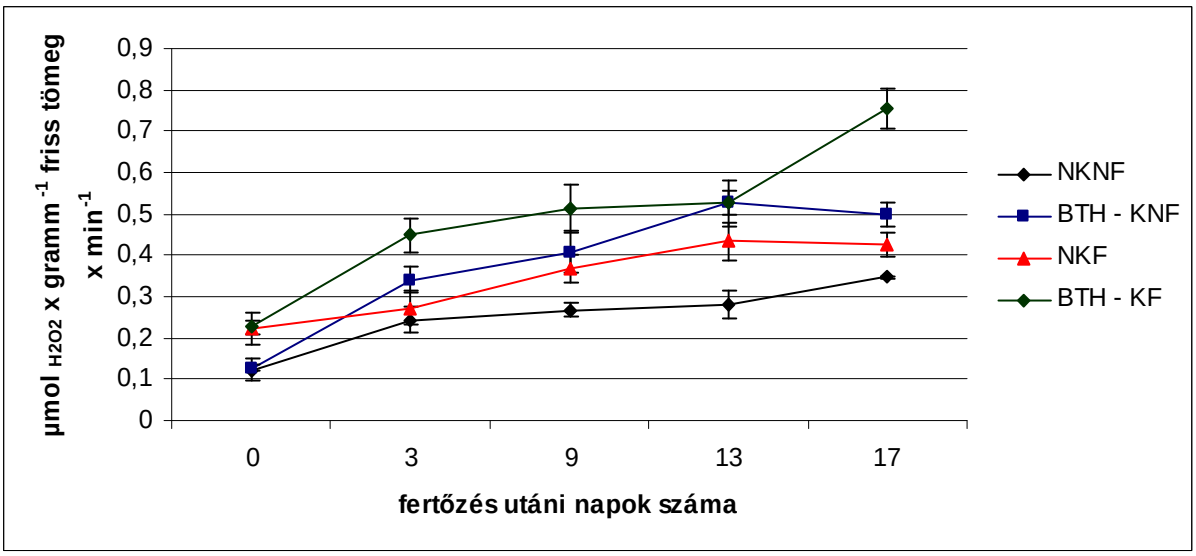
A teljes rezisztenciával rendelkező (HA-335) növényekben (26. ábra), szintén tapasztaltunk emelt szintű POX aktivitást, ennek az értéke azonban elmaradt a fogékony és részlegesen rezisztens napraforgóknál mért értékektől (4. táblázat). Emellett a nem kezelt és kezelt, fertőzött növények enzimaktivitása, igaz szignifikánsan nőtt, de mégsem olyan mértékben tért el a kontroll (NKNF) növényeknél tapasztalttól, mint az előző két napraforgó genotípus esetében.



24. ábra A POX aktivitásának változása a BTH kezelés és a *P. halstedii* fertőzésének és hatására fogékony (RHA-274) napraforgókban. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd a 3.3 fejezetet).



25. ábra A POX aktivitásának változása BTH kezelés és a *P. halstedii* fertőzésének hatására részlegesen (HLI) rezisztens (RHA-340) napraforgóban. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



26. ábra A POX aktivitásának változása BTH kezelés és a *P. halstedii* fertőzésének hatására teljes rezisztenciával rendelkező (HA-335) napraforgóban. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

4. táblázat A POX aktivitásának változása az aktivátoros kezelések és a *P. halstedii* fertőzés hatására fogékony (RHA-274), részlegesen rezisztens (RHA-340) valamint rezisztens (HA-335) növényekben. Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

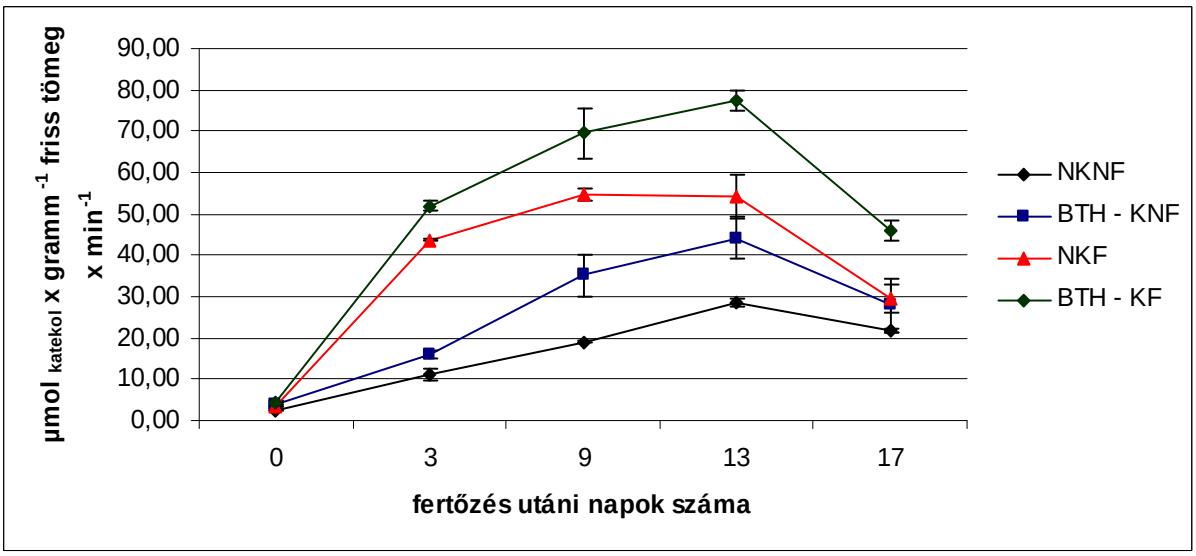
Fertőzés utáni napok száma/ kezelések	0	3	9	13	17
274 – NKNF	0.13 a	0.14 abc	0.13 a	0.14 abc	0.20 bcd
274 – KNF	0.13 a	0.34 g	0.25 def	0.24 de	0.26 e
274 – NKF	0.15 b	0.43 i	0.43 hij	0.47 hikl	0.48 jk
274 – KF	0.16 b	0.64 mn	0.74 o	0.77 op	0.74 o
340 – NKNF	0.14 ab	0.17 bc	0.17 bc	0.18 bc	0.19 bc
340 – KNF	0.14 ab	0.21 d	0.24 de	0.29 f	0.30 f
340 – NKF	0.23 de	0.55 klm	0.61 lmn	0.79 op	0.77 p
340 – KF	0.19 c	0.37 gh	0.48 hijkl	0.70 no	0.62 m
335 – NKNF	0.12 ab	0.24 e	0.27 ef	0.28 ef	0.35 g
335 – KNF	0.13 a	0.34 g	0.41 ghij	0.53 kl	0.50 jk
335 – NKF	0.22 cde	0.27 ef	0.37 gh	0.43 hij	0.42 hi
335 – KF	0.23 d	0.45 hij	0.51 jkl	0.53 jkl	0.76 op

4.5.2. A PPO aktivitásának változása

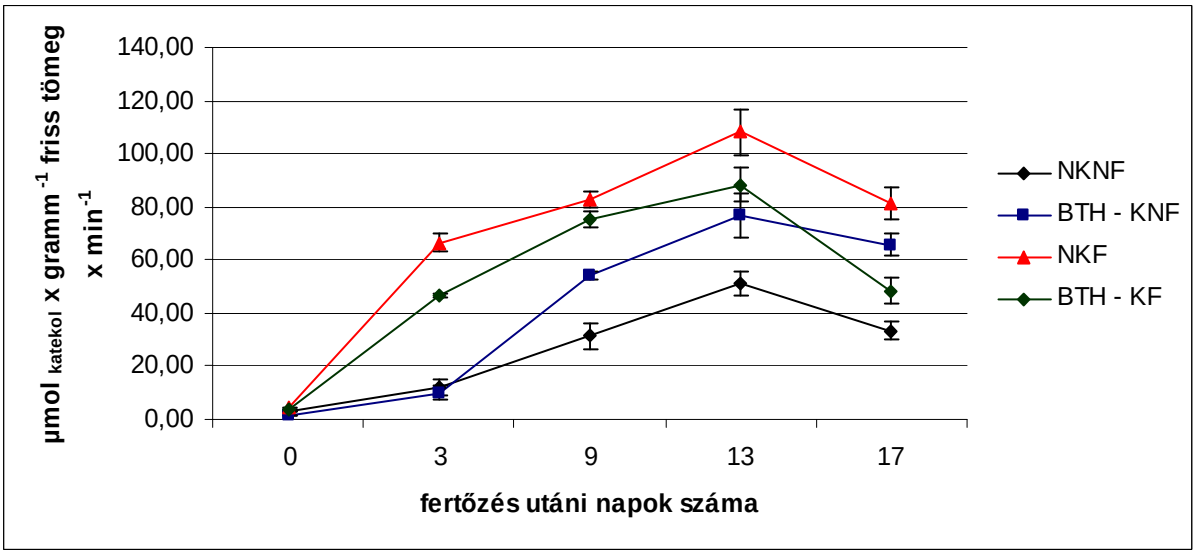
A fogékony növényekben (RHA-274) mért PPO aktivitást a 27. ábra szemlélteti. A POX-hoz hasonlóan mind a fertőzés, mind a BTH-kezelés hatására szignifikánsan növekedett a PPO aktivitása. A legmagasabb enzimaktvitást a BTH-val is kezelt, fertőzött növényekben mértük. Érdekes módon a kontroll (nem kezelt és nem fertőzött) napraforgókban is találtunk aktivitás növekedést.

Lényegében hasonló tendencia érvényesült a részlegesen rezisztens napraforgók esetében is (28. ábra). A nem fertőzött növényekben a BTH kezelés növelte az enzim aktivitását, és ez szignifikáns növekedést jelentett az első két mintavételi időpont kivételével. A fertőzés hatására a POX-hoz hasonlóan a PPO aktivitása is szignifikánsan növekedett. A fertőzött növényekben már a kísérlet kezdetén aktivitás növekedés jelentkezett, és az enzim aktivitása a 13. napig egyre fokozódott. A csak fertőzött napraforgókban magasabb PPO aktivitást tapasztaltunk, mint a BTH kezelésben is részesült és fertőzött egyedekben.

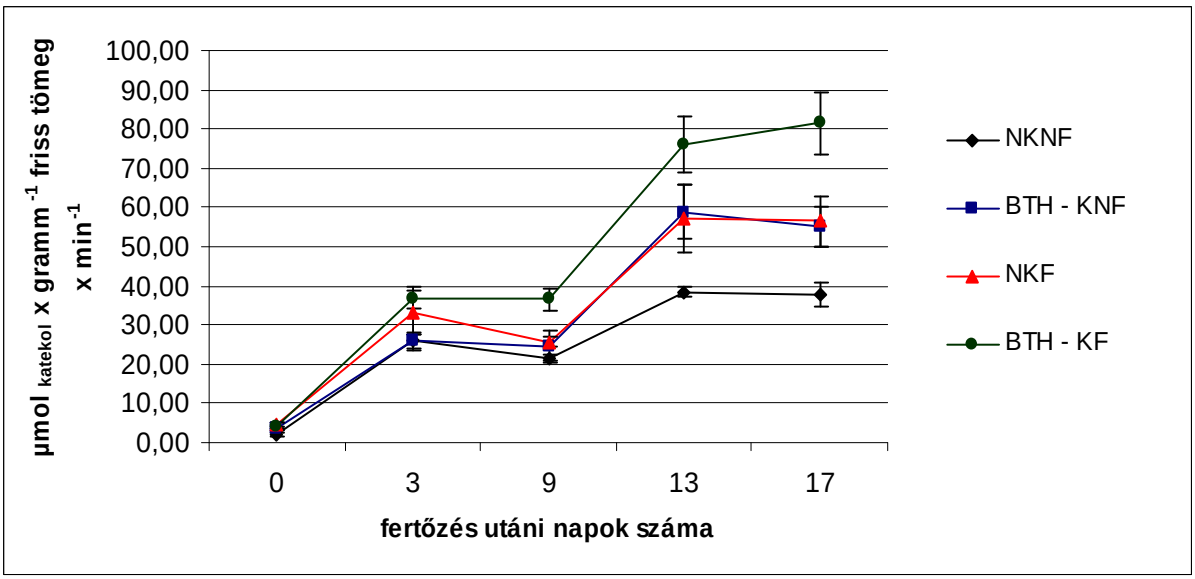
A teljes rezisztenciával rendelkező növényeknél (29. ábra), hasonlóan a fogékony növények enzimaktivitásánál tapasztaltakhoz, a BTH - kezelés megnövelte a PPO aktivitását mind a fertőzetlen, mind a fertőzött napraforgókban. Ugyanakkor a csak fertőzött növényekben a 9. naptól kezdődően a kezelt és nem fertőzött egyedekhez hasonló mértékű, azzal szinte párhuzamosan futó aktivitásnövekedést tapasztaltunk. Ennél a napraforgó genotípusnál (inkompatibilis kapcsolatban) a legjelentősebb PPO növekedést a kezelés és fertőzés együttesen idézte elő. A teljes és részleges rezisztenciával rendelkező napraforgók összehasonlítása azt mutatta, hogy az előző genotípusban kisebb volt az enzimaktivitás, mint az utóbbiban (5. táblázat).



27. ábra A PPO aktivitásának változása BTH kezelés és a *P. halstedii* fertőzésének hatására fogékony (RHA-274) kapcsolatban. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



28. ábra A PPO aktivitásának változása BTH kezelés és a *P. halstedii* fertőzésének hatására HLI típusú rezisztenciával rendelkező (RHA-340) vonal esetében. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



29. ábra A PPO aktivitásának változása BTH kezelés és a *P. halstedii* fertőzésének hatására teljes rezisztenciával rendelkező (HA-335) vonal esetében. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

5. táblázat A PPO aktivitásának változása az aktivátoros kezelések és a *P. halstedii* fertőzés hatására fogékony (274), részlegesen rezisztens (340) valamint rezisztens (335) növényekben. Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

Fertőzés utáni napok száma/ kezelések	0	3	9	13	17
274 – NKNF	2.55 b	11.28 f	19.00 h	28.54 k	21.94 i
274 – KNF	3.73 cde	15.76 g	35.22 lm	44.24 mnop	27.85 ijkl
274 – NKF	3.42 d	43.65 n	54.54 q	54.29 pq	29.50 jkl
274 – KF	4.18 e	51.94 q	69.47 rs	77.59 st	46.00 no
340 – NKNF	2.82 c	11.72 f	31.54 jkl	51.40 op	33.49 l
340 – KNF	1.49 a	10.05 f	54.21 q	76.62 st	65.80 r
340 – NKF	4.19 e	66.43 r	82.71 t	108.08 v	81.36 st
340 – KF	3.42 de	46.55 o	75.32 s	88.38 t	48.45 nop
335 – NKNF	2.24 b	25.78 j	21.46 i	38.52 m	37.78 lm
335 – KNF	3.66 de	25.81 j	24.70 ijk	58.86 rq	55.21 q
335 – NKF	4.38 e	33.11 klm	25.71 j	56.98 rq	56.59 rq
335 – KF	4.33 e	36.87 lm	36.57 lm	75.84 ts	81.51 st

4.6. Az indukált rezisztenciával összefüggésbe hozható génkifejeződés változások

4.6.1 A glutation-S-transzferáz (GST) gén kifejeződés változása

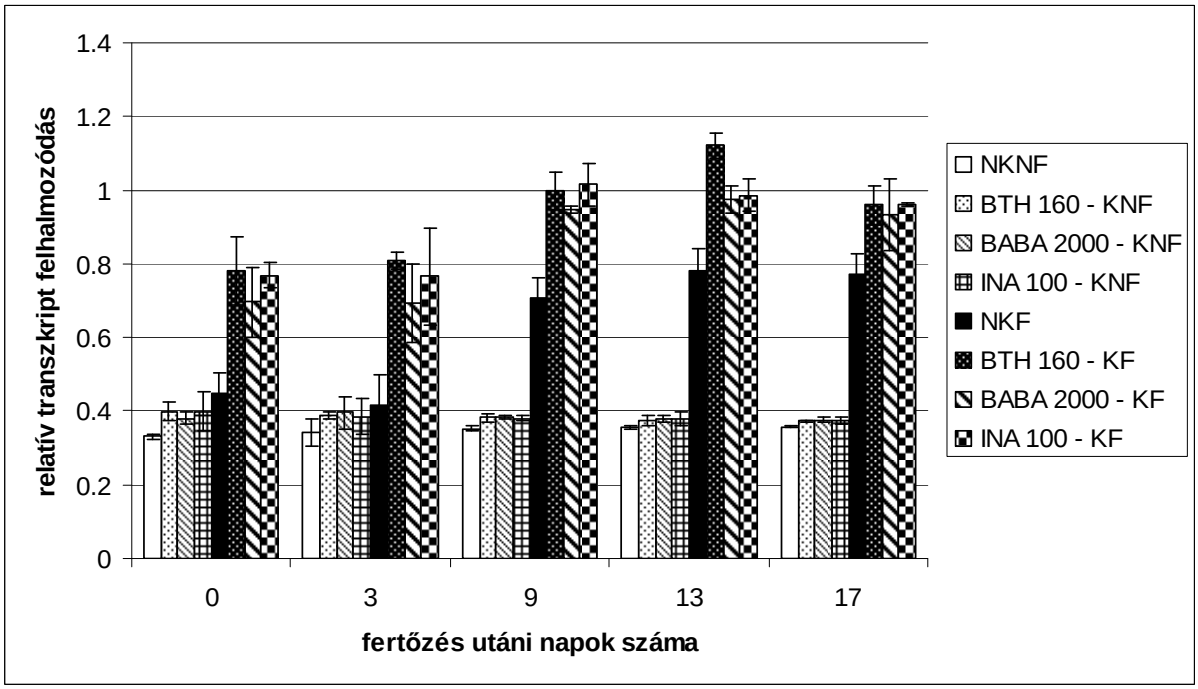
A GST gén kifejeződését fogékony, részlegesen rezisztens (HLI típusú) és teljesen rezisztens napraforgó vonalakban vizsgáltuk három aktivátor és/vagy a *P. halstedii* fertőzés hatására.

Fogékony (RHA-274), nem fertőzött növényekben az aktivátoros kezelések kissé növelték a GST transzkriptumok felhalmozódását (30. ábra). A fertőzés hatására a kezeletlen növényekben szignifikánsan megnövekedett a gén kifejeződése a nem fertőzött és nem kezelt növényekhez képest. A csak fertőzött, kezeletlen napraforgókban kezdetben csak kismértékű, a 9. naptól kezdve azonban jelentős mértékű transzkriptum felhalmozódás mutatkozott, azonban az aktivátorok valamelyikével is kezelt növényekben az első mintavételi naptól (0. naptól) magasabb a fertőzés okozta GST indukció. A GST kifejeződését egyértelműen a BTH indukálta a legjobban, azt követte sorrendben az INA majd a BABA.

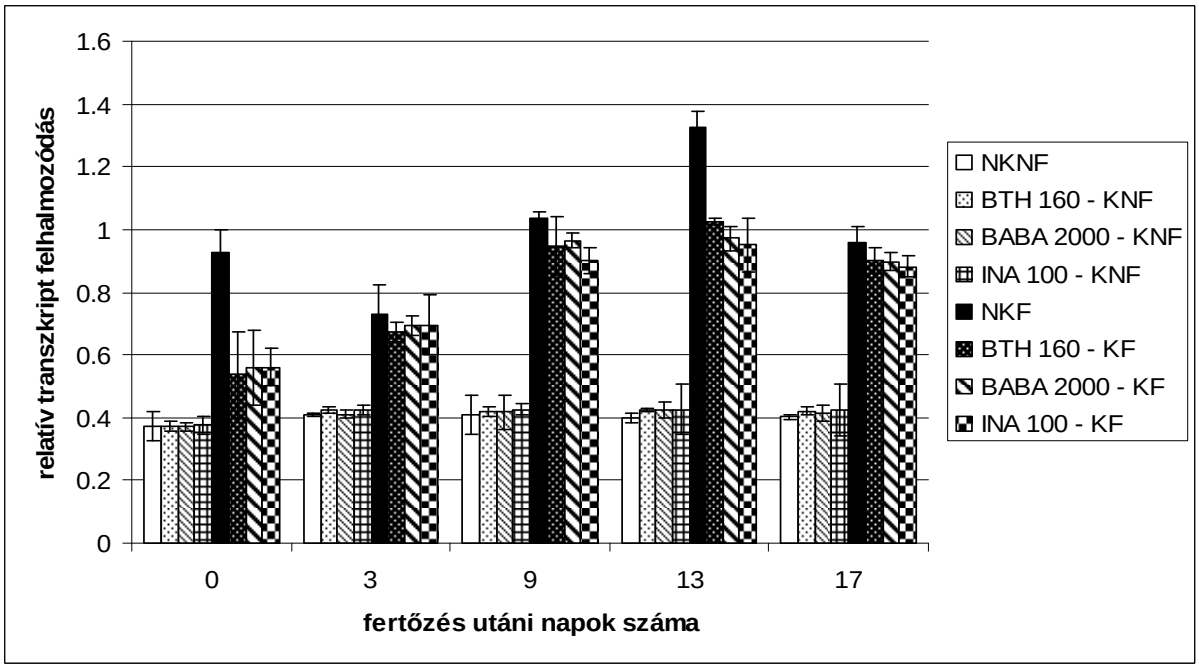
A HLI típusú rezisztenciával rendelkező (RHA-340) nem fertőzött növényekben (31. ábra) az aktivátoros kezelés nem okozott lényeges változást, ugyanakkor a fertőzés önmagában a fogékony növényekhez hasonlóan, itt is a génkifejeződés szignifikáns növekedését eredményezte, azonban a részlegesen rezisztens növényekben sokkal korábban jelentkezett a nem kezelt, fertőzött növényekben a GST nagymértékű felhalmozódása, mint a fogékonyakban. Érdekes viszont, hogy a fertőzött növényekben az aktivátoros kezelések hatására csökkent a GST kifejeződése, a csökkenés az első és a negyedik mintavételi alkalommal volt a legerőteljesebb. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a három aktivátor hatása között.

A teljes rezisztenciával rendelkező HA-335 vonal esetében az aktivátoros kezelések sem a fertőzetlen sem a fertőzött növényállományban nem okoztak jelentős változást a GST kifejeződésében (32. ábra). Másrészt viszont *P. halstedii*-vel történt fertőzés a másik két genotípushoz hasonlóan megnövekedett transzkriptum felhalmozódással járt. Hasonlóan a részlegesen rezisztens növényeknél tapasztaltakhoz, ebben a genotípusban is korábban történt a fertőzés hatására a GST aktivitásnövekedése, mint a fogékony növényekben. A teljesen rezisztens növényekben is magasabb génkifejeződést tapasztaltunk, mint a fogékony növényekben

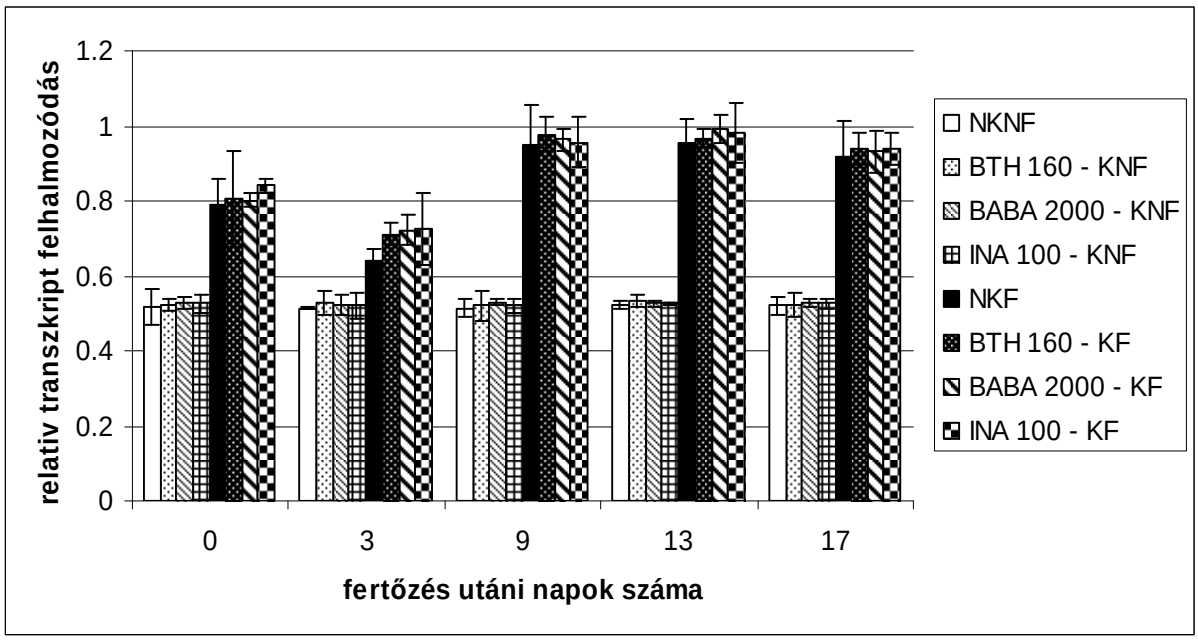
Összehasonlítva a három kísérletbe vont napraforgó vonalban jelentkező változásokat megállapítható, hogy a csak fertőzött növények esetében a részleges (HLI típusú) rezisztenciával rendelkező, RHA-340-es növényekben volt a legintenzívebb a GST kifejeződése. Továbbá a két rezisztens vonalban (RHA-340 és HA-335) a fertőzést követően azonnal nőtt a GST aktivitása, míg a fogékony növényekben (RHA-274) ez a növekedés később, a 9. naptól kezdve volt mérhető (6. táblázat).



30. ábra A GST gén kifejeződésének változása az aktivátoros kezelések valamint a *P. halstedii* fertőzés hatására fogékony (RHA-274) napraforgó növényekben. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. 3.3 fejezetet).



31. ábra A GST gén kifejeződésének változása az aktivátoros kezelések valamint a *P. halstedii* fertőzés hatására HLI típusú részleges rezisztenciával rendelkező (RHA-340) napraforgó növényekben (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



32. ábra A GST gén kifejeződésének változása az aktivátoros kezelések valamint a *P. halstedii* fertőzés hatására rezisztens (HA-335) napraforgó növényekben. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

6. táblázat GST transzkriptum felhalmozódása az aktivátoros kezelések és a *P. halstedii* fertőzés hatására fogékony (274), részlegesen rezisztens (340) valamint rezisztens (335) növényekben. Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

Fertőzés utáni napok száma/ kezelés	0		3		9		13		17	
274 – NKNF	0.33	a	0.34	a	0.35	a	0.36	a	0.36	a
274 – BTH KNF	0.40	b	0.39	ab	0.38	b	0.37	ab	0.37	ab
274 – BABA KNF	0.38	b	0.40	ab	0.38	b	0.38	b	0.38	ab
274 – INA KNF	0.40	b	0.38	ab	0.38	b	0.38	b	0.37	ab
274 – NKF	0.448	d	0.415	d	0.708	f	0.781	fg	0.770	fg
274 – BTH KF	0.782	fghi	0.810	g	0.998	hk	1.122	m	0.959	jkl
274 – BABA KF	0.696	efg	0.692	eg	0.947	k	0.975	kl	0.932	jkl
274 – INA KF	0.769	fg	0.766	eghi	1.015	l	0.985	kl	0.961	k
340 – NKNF	0.37	b	0.41	b	0.41	b	0.40	b	0.40	b
340 – BTH KNF	0.37	b	0.43	b	0.42	b	0.43	b	0.42	b
340 – BABA KNF	0.37	b	0.41	b	0.42	b	0.42	b	0.41	b
340 – INA KNF	0.38	b	0.42	b	0.43	b	0.43	b	0.42	bc
340 – NKF	0.927	hijkl	0.728	eg	1.038	jl	1.326	n	0.958	jkl
340 – BTH KF	0.537	bcde	0.673	e	0.946	ijkl	1.025	l	0.901	hj
340 – BABA KF	0.559	bcde	0.695	e	0.966	kl	0.972	kl	0.898	hj
340 – INA KF	0.561	bcd	0.695	eg	0.903	ij	0.951	ijkl	0.882	hj
335 – NKNF	0.52	c	0.51	c	0.51	c	0.52	c	0.52	c
335 – BTH KNF	0.52	c	0.53	c	0.52	c	0.53	c	0.52	c
335 – BABA KNF	0.53	c	0.52	c	0.53	c	0.53	c	0.53	c
335 – INA KNF	0.53	c	0.52	c	0.52	c	0.53	c	0.53	c
335 – NKF	0.789	fgh	0.640	e	0.950	hijkl	0.955	jkl	0.917	ghj
335 – BTH KF	0.804	fghij	0.712	f	0.977	kl	0.967	kl	0.939	jkl
335 – BABA KF	0.802	g	0.721	f	0.965	kl	0.993	l	0.931	jkl
335 – INA KF	0.841	gh	0.727	efg	0.957	jkl	0.982	jkl	0.939	jkl

4.6.2. A defenzin (PDF) gén kifejeződésének változása

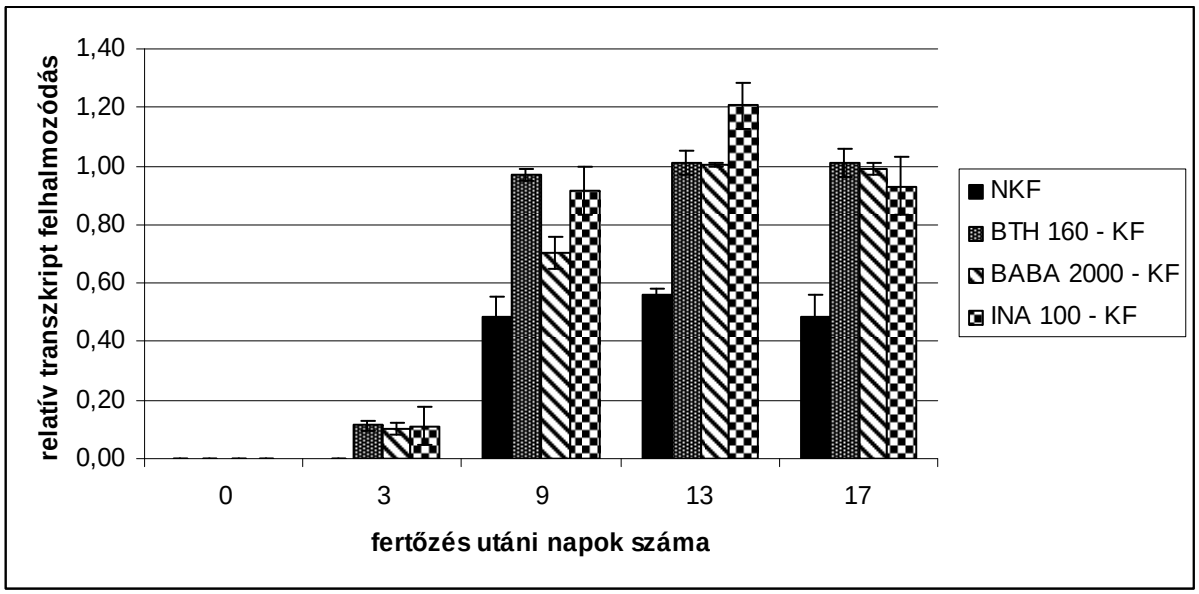
A PDF gén kifejeződésével kapcsolatos vizsgálatunk eredményét a 33., 34. és 35. ábrák szemléltetik a különböző genotípusú növények esetében. Tekintve, hogy a nem fertőzött növényekben a PDF primerekkel nem kaptunk eredményt egyik genotípusban sem, az ábrák csak a fertőzött növényekben tapasztalható változásokat szemléltetik.

Fogékony kapcsolatban a kezeletlen napraforgók az első két mintavételi időpontban (0. és 3. napon) nem mutattak PDF tanszkript felhalmozódást (33. ábra). A 9. naptól kezdve a kísérlet végéig a felhalmozódás közel azonos szinten maradt a nem kezelt, fertőzött kezelést tekintve. 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 mindhárom aktivátor hatására szignifikáns volt. Leghamarabb a BTH-val kezelt növények érték el a maximumot, és a legmagasabb értéket az INA kezelés adta.

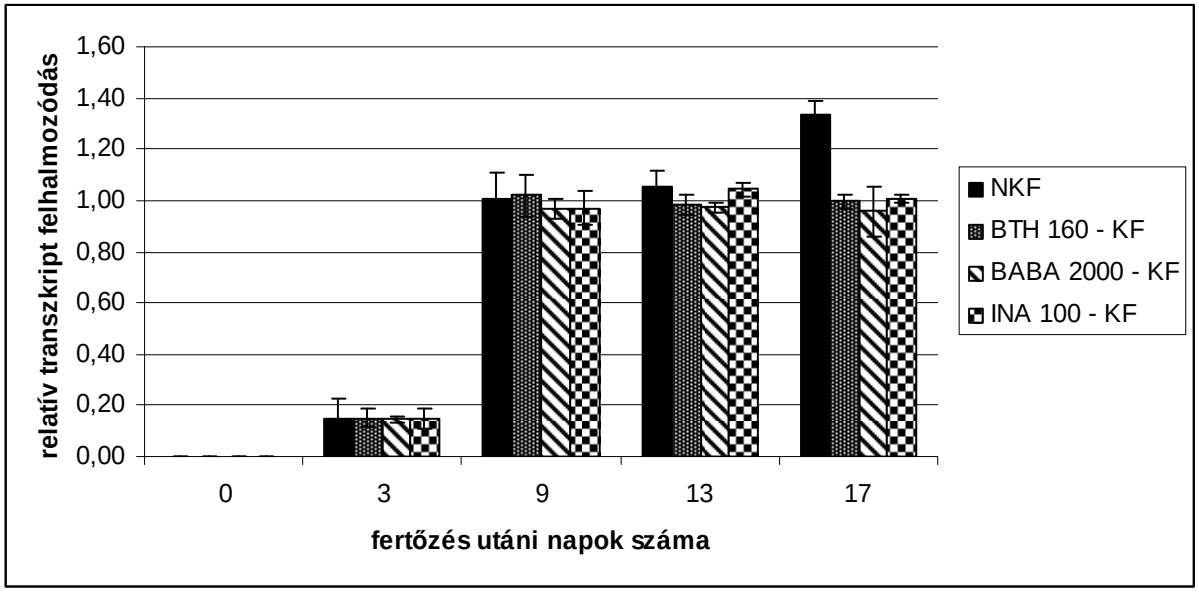
A részleges rezisztenciával rendelkező, RHA-340 vonal esetében az aktivátoros kezelések nem okoztak lényeges változást a PDF kifejeződésében, kivéve az utolsó mintavételi időpontot (17. nap), amikor a kezeletlen növényekben szignifikánsan megemelkedett a génkifejeződés (34. ábra). A HLI típusú rezisztenciával rendelkező kezeletlen növényekben már a fertőzés utáni 3. napon aktiválódott a PDF, míg a fogékony kezeletlen növényekben ez csak később következett be és összességében alacsonyabb is maradt a részlegesen rezisztens napraforgókhoz képest.

A teljes rezisztenciával rendelkező növényekben a részlegesen rezisztensekhez hasonlóan nem váltott ki jelentős változást az aktivátoros kezelés a PDF kifejeződése tekintetében (35. ábra). Ebben a genotípusban a fertőzés utáni 9. napon érte el maximumát a génaktivitás, azonban a kezeletlen növényekben ezután csökkent az aktivitás egészen a 17. napig, ezáltal a nem kezelt növények eredményei elváltak az aktivátorral kezeltekétől. A különbség az utolsó két mintavételi időben szignifikánsnak mutatkozott.

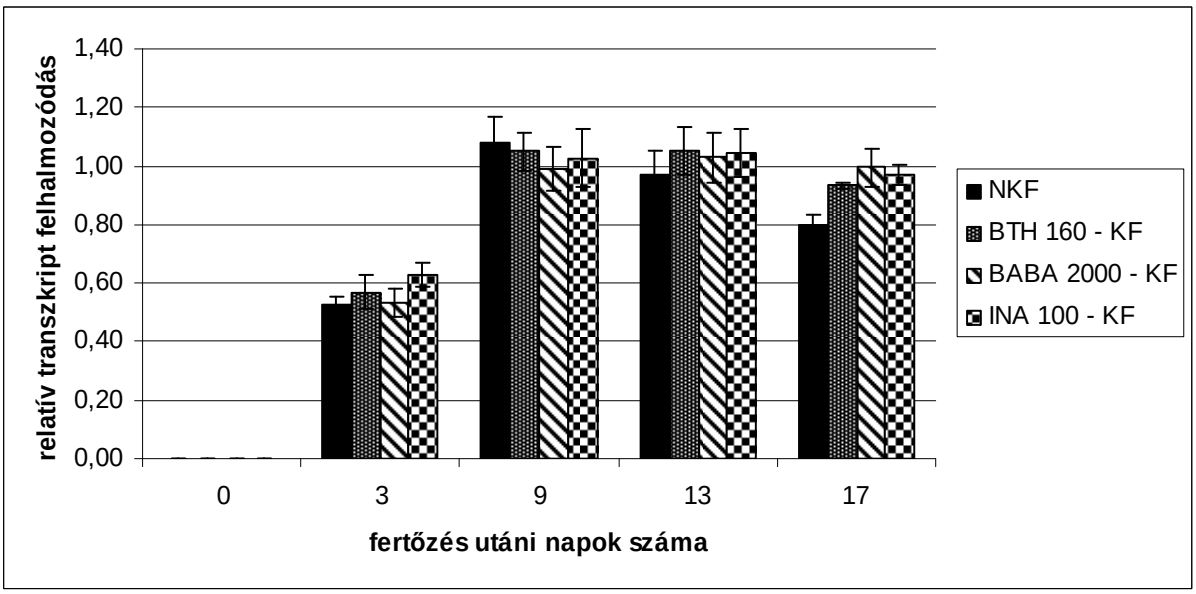
A PDF kifejeződésével kapcsolatban is megállapítható, ami a GST esetében is jól látszott, vagyis mind a két rezisztencia típusnál hamar, már a 3. naptól kezdve aktiválódott a defenzin, míg a fogékony növényekben ez későbbi időpontra tolódott. Másrészt különbséget találtunk a kétféle rezisztens napraforgó génkifejeződésének intenzitásában és időbeni lefutásában. Míg a HA-335 napraforgó vonalban a fertőzés utáni 3. napon magasabb génaktivitást tapasztaltunk, mint a HLI típusú növényekben, ez utóbbiakban viszont az aktivitás a fertőzés utáni 13. naptól a 17. napig tovább növekedett, a teljesen rezisztens növényekben nem (7. táblázat).



33. ábra A PDF gén kifejeződésének változása az aktivátoros kezelések hatására fogékony (RHA-274), fertőzött napraforgó növények esetében. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



34. ábra A PDF gén kifejeződésének változása az aktivátoros kezelések hatására HLI típusú részleges rezisztenciával rendelkező (RHA-340), fertőzött napraforgó növények esetében. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



35. ábra A PDF gén kifejeződésének változása az aktivátoros kezelések hatására teljesen rezisztens (HA-335), fertőzött napraforgó növények esetében. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

7. táblázat PDF transzkriptum felhalmozódása az aktivátoros kezelések és a *P. halstedii* fertőzés hatására fogékony (274), részlegesen rezisztens (340) valamint rezisztens (335) növényekben. Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

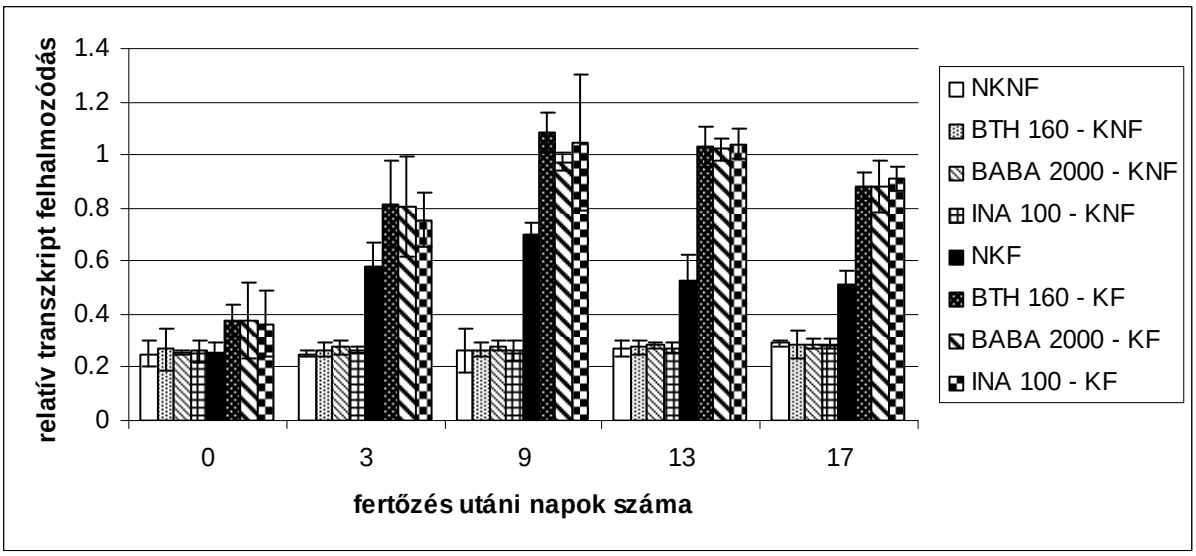
Fertőzés utáni napok száma/ kezelés	0	3	9	13	17
274 – NKF	0.00	0.00	0.48 c	0.56 c	0.48 c
274 – BTH KF	0.00	0.11 a	0.97 g	1.01 gh	1.01 gh
274 – BABA KF	0.00	0.10 ab	0.70 d	1.00 gh	0.99 gh
274 – INA KF	0.00	0.11 ab	0.92 efgh	1.21 ij	0.93 fgh
340 – NKF	0.00	0.14 ab	1.01 gh	1.06 h	1.33 j
340 – BTH KF	0.00	0.15 b	1.02 gh	0.99 gh	1.00 gh
340 – BABA KF	0.00	0.15 b	0.97 fgh	0.97 g	0.96 fgh
340 – INA KF	0.00	0.15 b	0.97 fgh	1.04 h	1.00 gh
335 – NKF	0.00	0.53 c	1.08 hi	0.97 fh	0.80 e
335 – BTH KF	0.00	0.57 c	1.05 gh	1.05 ghi	0.93 f
335 – BABA KF	0.00	0.53 c	0.99 fgh	1.03 gh	0.99 gh
335 – INA KF	0.00	0.63 cd	1.03 gh	1.05 ghi	0.97 fgh

4.6.3. A kataláz (CAT) gén kifejeződésének változása

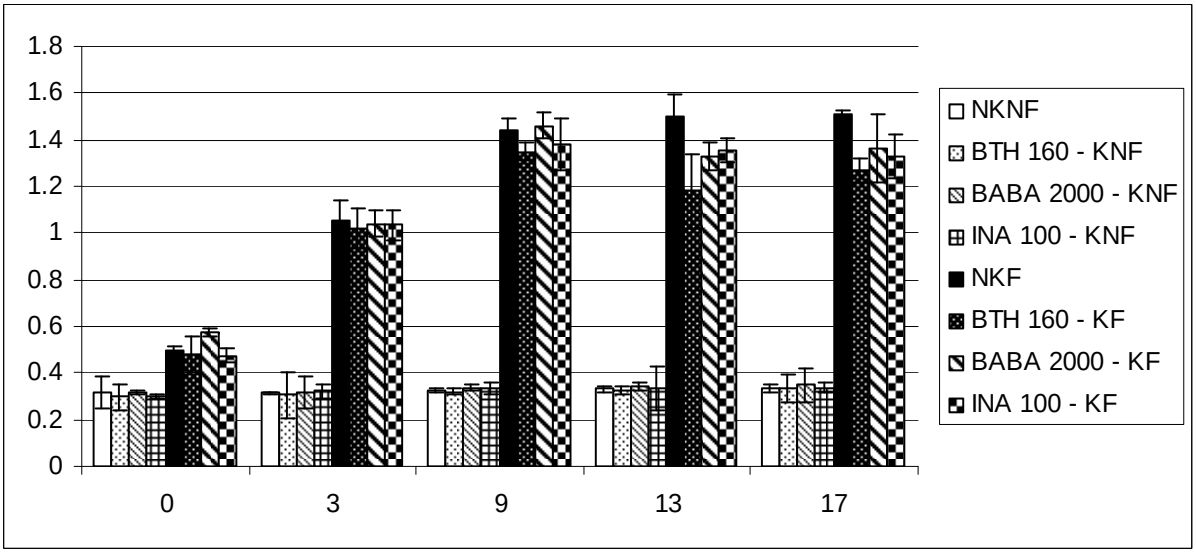
Fogékony nem fertőzött napraforgó növényekben (36. ábra) a kísérlet egészét tekintve nem találtunk különbséget a CAT kifejeződésében az egyes aktivátoros kezelések hatására. Ezzel szemben az első mintavételi nap kivételével (0. nap), a *P. halstedii* fertőzés önmagában jelentős mértékű CAT aktivitásnövekedést mutatott a kísérlet alatt. A legmagasabb CAT gén kifejeződést a kezelt és fertőzött napraforgókban tapasztaltuk, az utolsó három mintavételi napon szignifikánsan magasabb volt ezekben a növényekben a génaktivitás, mint a csak fertőzött növényeké.

A részleges rezisztenciával rendelkező RHA-340 vonal esetében a fogékony napraforgókhoz hasonlóan nem tapasztaltunk változást az aktivátoros kezelések hatására a nem fertőzött növényekben (37. ábra). A fertőzés önmagában viszont ebben a genotípusban is növelte a CAT kifejeződését és ez a hatás már a 0. naptól kezdve jelentkezett. Az aktivátoros kezelések hatására a legtöbb esetben csökkent a CAT gén aktivitása a fertőzött részlegesen rezisztens növényekben, azonban a csökkenés nem minden esetben volt szignifikáns. Ebben a vonatkozásban a BTH kezelésben részesült növényekben mértünk a legalacsonyabb értékeket. Összehasonlítva a két napraforgó genotípust elmondható, hogy a részlegesen rezisztens RHA-340 vonal nagyobb mérvű CAT aktivitással válaszolt a fertőzésre, mint a fogékony RHA-274 (8. táblázat).

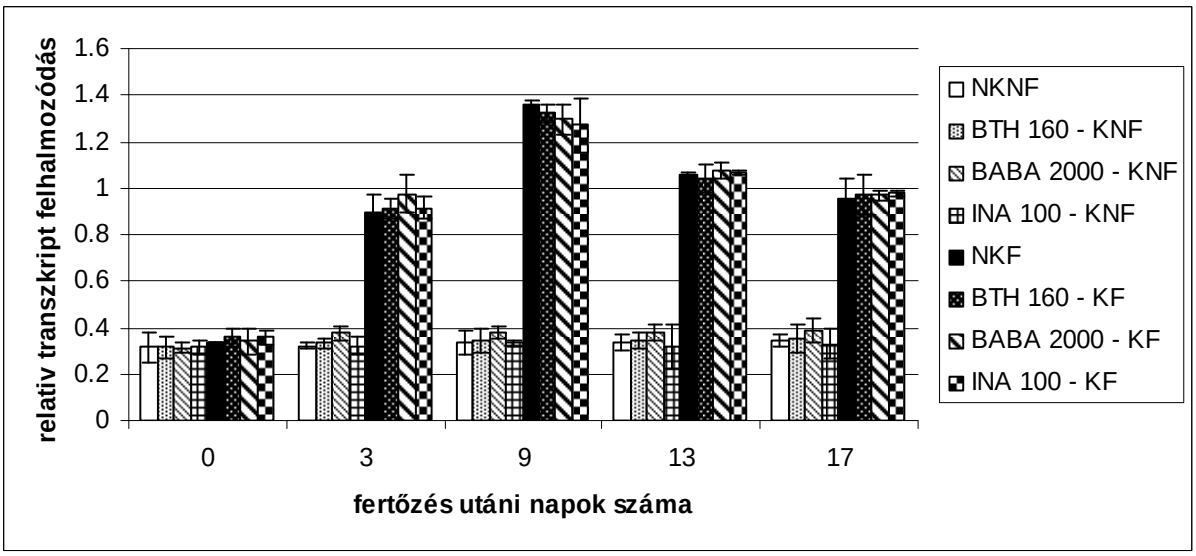
A teljes rezisztenciával rendelkező növényekben az első mintavételi napon nem tapasztaltunk változást sem a kezelések sem a fertőzés hatására (38. ábra). A 3. naptól kezdődően aztán a csak fertőzött, valamint a kezelt és fertőzött növények egyaránt jelentős mértékben fokozódó génaktivitással válaszoltak. Ez a növekedés a fertőzés utáni 9. napon érte el a maximumát és onnantól kissé csökkenő tendenciát mutatott. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a CAT gén aktivitásában a különböző aktivátorokkal kezelt növények között.



36. ábra A CAT gén kifejeződésének változása az aktivátoros kezelések valamint a *P. halstedii* fertőzés hatására fogékony (RHA-274) napraforgó növényekben. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



37. ábra A CAT gén kifejeződésének változása az aktivátoros kezelések valamint a *P. halstedii* fertőzés hatására részleges (HLI típusú) rezisztenciával rendelkező (RHA-340) napraforgó növényekben. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



38. ábra A CAT gén kifejeződésének változása az aktivátoros kezelések valamint a *P. halstedii* fertőzés hatására rezisztens (HA-335) napraforgó növényekben. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKNF- nem kezelt és nem fertőzött, KNF- kezelt és nem fertőzött, NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

8. táblázat CAT transzkriptum felhalmozódása az aktivátoros kezelések és a *P. halstedii* fertőzés hatására fogékony (274), részlegesen rezisztens (340) valamint rezisztens (335) növényekben. Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lsd. a 3.3 fejezetet).

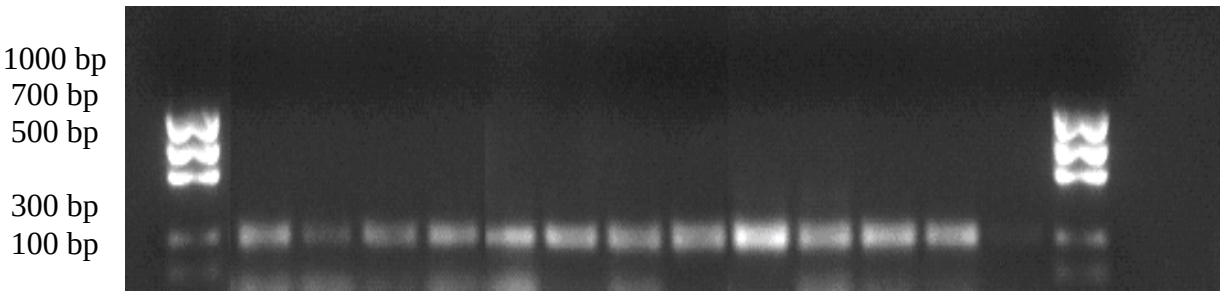
Fertőzés utáni napok száma/ kezelés	0	3	9	13	17
274 – NKNF	0.25 a	0.25 a	0.26 ab	0.27 a	0.29 ab
274 – BTH KNF	0.27 ab	0.26 a	0.27 a	0.28 ab	0.28 ab
274 – BABA KNF	0.26 a	0.28 a	0.28 a	0.28 a	0.29 ab
274 – INA KNF	0.26 a	0.27 a	0.27 a	0.27 a	0.29 ab
274 – NKF	0.26 a	0.58 cde	0.70 e	0.53 bcd	0.51 cd
274 – BTH KF	0.38 b	0.82 efg	1.08 hi	1.03 ghi	0.88 f
274 – BABA KF	0.38 abc	0.80 efg	0.97 fg	1.02 ghi	0.88 fg
274 – INA KF	0.36 abc	0.76 ef	1.05 fghij	1.04 ghi	0.91 fg
340 – NKNF	0.32 b	0.32 b	0.32 b	0.33 b	0.33 b
340 – BTH KNF	0.30 b	0.31 b	0.32 b	0.33 b	0.33 b
340 – BABA KNF	0.32 b	0.32 b	0.34 b	0.34 b	0.35 b
340 – INA KNF	0.30 b	0.32 b	0.33 b	0.33 b	0.34 b
340 – NKF	0.50 c	1.05 ghi	1.44 l	1.50 l	1.51 l
340 – BTH KF	0.48 d	1.02 fghi	1.35 k	1.18 ijk	1.27 j
340 – BABA KF	0.58 d	1.04 gh	1.46 l	1.33 jk	1.36 jk
340 – INA KF	0.48 c	1.03 ghi	1.38 kl	1.35 jk	1.33 jk
335 – NKNF	0.32 b	0.32 b	0.34 b	0.34 b	0.35 b
335 – BTH KNF	0.32 b	0.33 b	0.34 b	0.34 b	0.35 b
335 – BABA KNF	0.31 b	0.38 b	0.38 b	0.38 b	0.39 b
335 – INA KNF	0.32 b	0.32 b	0.33 b	0.32 b	0.33 b
335 – NKF	0.33 b	0.89 fg	1.36 k	1.06 i	0.95 fgh
335 – BTH KF	0.36 b	0.91 fg	1.32 jk	1.04 ghi	0.97 fghi
335 – BABA KF	0.34 ab	0.97 fghi	1.30 jk	1.07 i	0.97 g
335 – INA KF	0.36 b	0.91 fg	1.27 jk	1.07 i	0.98 g

4.6.4. A kórokozó jelenlétének kimutatása

Annak bizonyítására, hogy a *P. halstedii* biomassza a kezeléseket követően milyen mennyiségben van jelen a napraforgó szövetekben, a mikroszkópos vizsgálatok mellett molekuláris genetikai módszert is alkalmaztunk. Ehhez a *P. halstedii* elongációs faktorát (*Ph*-TEF1) használtuk. Géntermék felhalmozódást csak a fogékony és a részleges (HLI típusú) rezisztenciával rendelkező növényekben vártunk és kaptunk (40. és 41. ábrák), hiszen a teljesen rezisztens növényekben a kórokozó nem képes megtelepedni és terjedni.

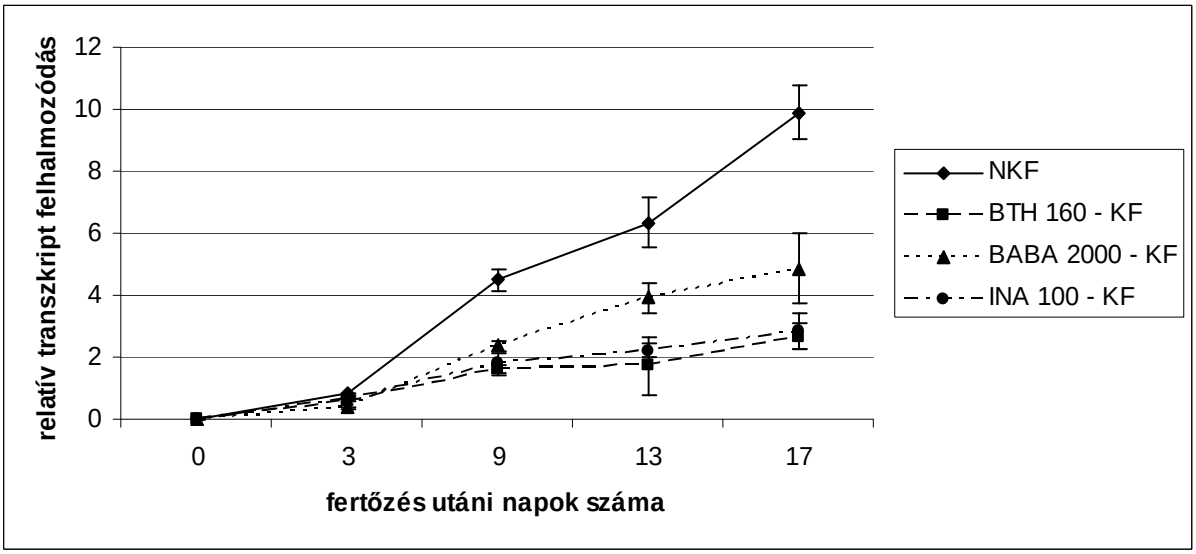
A Ph-TEF1 indítószekvencia segítségével agaróz gélen látható polimeráz láncreakció termékeit fogékony növények esetében a 39- ábra mutatja, a fertőzés utáni 3., 9. és 13. napon. A fogékony növényekben a kórokozó jelenlétét és időbeni növekedését a 40. ábra mutatja. A 0. napon nem tudtuk kimutatni a kórokozót a növényi anyagból. A fertőzés után 3 nappal már volt mérhető géntermék, ekkor azonban még nem volt különbség az aktivátorral kezelt illetve nem kezelt növényekben a kórokozó mennyiségét tekintve. A 9. naptól kezdve aztán a kezeletlen mintákban jelentősen nőtt a géntermék felhalmozódás és ennek mennyisége szignifikánsan magasabb volt az aktivátorral kezeltekhez képest. Ugyanakkor az aktivátoros kezelések, bár nem egyforma mértékben, látványosan visszaszorították a kórokozó terjedését a szövetekben. A BTH és az INA esetében a géntermék mennyisége egyaránt alacsony értéken maradt, a BABA-val kezelt növényekben viszont a másik két aktivátorhoz képest szignifikánsan kisebb volt a kórokozót gátló hatás.

A részlegesen rezisztens növényekben jóval alacsonyabb értékeket kaptunk a *P. halstedii* -re tervezett primer által felszaporított géntermékekre, mint a fogékony napraforgókban (40. ábra). Az első két mintavételi időpontban nem találtunk a kórokozó jelenlétére utaló jelet, ezt követően viszont a kezeletlen mintákban meredeken emelkedett a géntermék mennyisége a 13. napig, majd kissé visszaesett. Bár a 9. naptól kezdődően a BTH-val és INA-val kezelt napraforgókban is megjelent és gyenge emelkedést mutatott a transzkriptum felhalmozódás, ez az érték a kezeletlenhez képest alacsony szinten maradt egészen a kísérlet végéig. Érdekes, hogy a BABA-kezelés eredményeként a 13. napig sokkal kisebb mennyiségben tudtuk csak a transzkriptumot kimutatni ezekből a mintákból. Ettől kezdve viszont mindhárom aktivátoros kezelés közel azonos mennyiségű géntermékkel volt jellemezhető. A kísérleti adatok szerint a részlegesen rezisztens növényekben az utolsó mintavételi napra csökkent a kórokozó mennyisége.

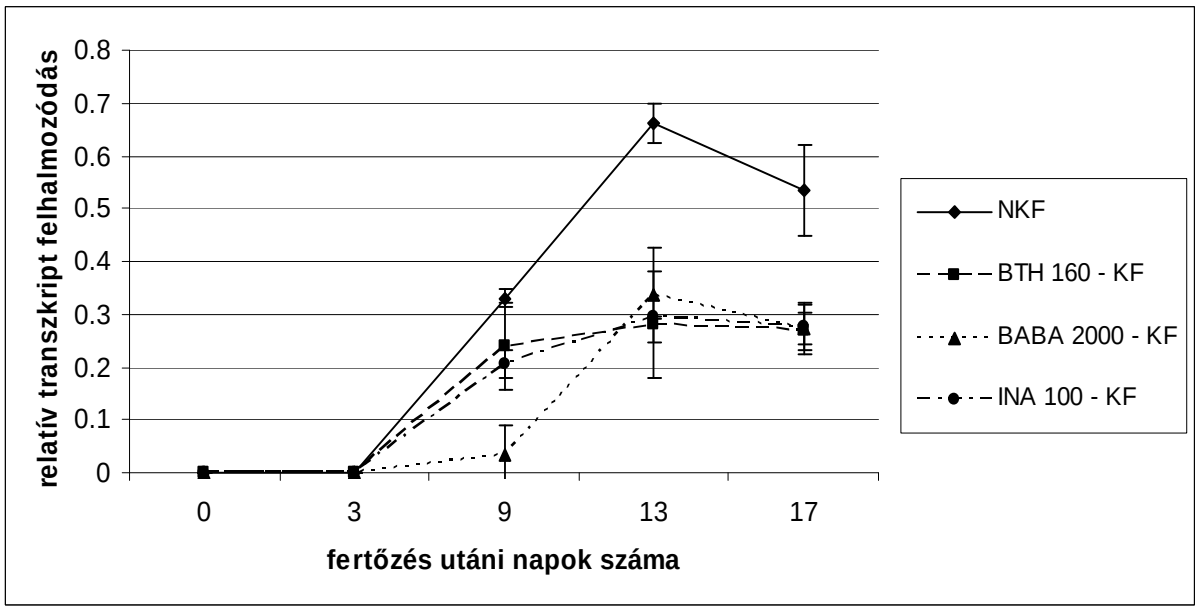


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

39. ábra PCR módszerrel, *Ph*-TEF1 primer alkalmazásával kapott PCR termékek agaróz gélelektroforézissel fogékony növények esetében. M: molekulasúly marker. Minták sorrendje 1: NKF, fertőzés után 3 nappal; 2: BTH 160 -KF, fertőzés után 3 nappal; 3: INA 100 -KF, fertőzés után 3 nappal; 4: BABA 2000 -KF, fertőzés után 3 nappal, 5: NKF, fertőzés után 9 nappal; 6: BTH 160 -KF, fertőzés után 9 nappal; 7: INA 100 -KF, fertőzés után 9 nappal; 8: BABA 2000 -KF, fertőzés után 9 nappal; 9: NKF, fertőzés után 13 nappal, 10: BTH 160 -KF, fertőzés után 13 nappal; 11: INA 100 -KF, fertőzés után 13 nappal; 12: BABA 2000-KF, fertőzés után 13 nappal; 13: negatív kontroll.



40. ábra A *Plasmopara halstedii* jelenlétére utaló géntermék felhalmozódás fogékony (RHA-274) napraforgó növényekben aktivátoros kezelést követően. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).



41. ábra A P*lasmopara halstedii* jelenlétére utaló géntermék felhalmozódás részlegesen rezisztens (RHA-340) napraforgó növényekben aktivátoros kezelést követően. (I: 95 %-os konfidencia intervallum). Rövidítések: NKF- nem kezelt és fertőzött, KF- kezelt és fertőzött (lásd. a 3.3 fejezetet).

4.7. Új tudományos eredmények

1. Megállapítottuk, hogy - üvegházi körülmények között - a BTH-hoz hasonlóan az INA és a BABA is visszaszorítja a fogékony napraforgó növényeken a *P. halstedii* által okozott tüneteket (törpülés, sporuláció a szikleveleken, levélklorózis), valamint csökkenti a növényi szövetekben kialakuló kórokozó képletek mennyiségét. Az INA és BABA szántóföldi körülmények között is hatékonynak bizonyult a törpülés mérséklésére, ugyanakkor a kezelés hatására nőtt a napraforgók tányérátmérője.

2. Irodalmi adatokkal ellentétben, *in vitro* körülmények között mindhárom induktornál tapasztaltunk sporangium-csírázást gátló hatást.

3. Genetikailag rezisztens napraforgókban fertőzés hatására hamarabb és nagyobb mértékben nőtt a védekezéssel kapcsolatos enzimek (PPO, POX, GST) aktivitása, mint a fogékony növényekben, ugyanakkor a BTH kezelés a rezisztens, kezeletlen növényekben megfigyelhető szintre emelte az enzimek aktivitását.

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 ellenkező hatás érvényesült, azaz kezelés hatására csökkent az enzimaktivitás.

5. Kimutattuk, hogy az induktoros kezelések önmagukban nem okoztak jelentős változást a rezisztens állapottal összefüggésbe hozható gének (GST, PDF, CAT) kifejeződésében.

6. A fertőzés hatására nőtt a napraforgó növényekben a GST, PDF és CAT gének kifejeződése, a rezisztens növényekben korábban és erőteljesebben, mint a fogékonyakban, azonban az aktivátorok hatására a fogékony vonalban is korábban megmutatkozott a génindukció.

7. Molekuláris módszerekkel is igazoltuk azt a mikroszkópos megfigyelést, mely szerint a rezisztencia induktorok eredményesen visszaszorítják a kórokozó növényen belüli fejlődését.

8. A három vizsgálatba vont induktor közül minden tekintetben a BTH mutatta a legjobb hatást a betegség visszaszorításában és a rezisztens állapottal összefüggésbe hozható, védekezéssel kapcsolatos enzimek aktivitás növelésében, valamint a védekezésben szerepet játszó gének kifejeződésében.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A szisztemikus szerzett rezisztencia, közismert angol betűszóval a SAR, sokoldalúan kutatott téma napjainkban, amelyet már eddig is számos növény és kórokozó kapcsolatában tanulmányoztak. A napraforgó-peronoszpóra gazda – parazita kapcsolatban viszont ez a rezisztencia forma, és különösen ennek háttere még alig ismert, viszont kezdeti eredmények már rendelkezésre állnak. Így például korábbi vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a benzotiadiazol (BTH) nevű kémiai induktor visszaszorítja fogékony napraforgóban a tipikus peronoszpórás tüneteket (Bán et al., 2004). Ennek alapján joggal gondoltuk, hogy a kezelés hatására a növényekben kialakult SAR gátló hatással van a kórokozóra, illetve a betegség kialakulására. Széleskörű vizsgálatokat kezdtünk tehát a SAR hátterének alaposabb megismerésére. A BTH mellett további két kémiai induktort, valamint a fogékony napraforgón kívül részlegesen rezisztens, ún. HLI-típusú és teljes rezisztenciával rendelkező genotípusokat is bevontunk a kísérleteinkbe. A korábbi tüneti és szövettani vizsgálatokat pedig kiterjesztettük egyes enzimek, illetve a SAR-ral összefüggésbe hozható gének kifejeződésének tanulmányozására.

5.1. A növények makroszkópos változásainak értékelése

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy – a BTH mellett – az általunk kiválasztott két másik aktivátorral (INA és BABA) kezelt fogékony napraforgókban is visszaszorultak a tipikus peronoszpórás tünetek (sporuláció, tőpusztulás klorózis, törpülés) és ezek az eredmények megegyeznek a BTH-nál már korábban tapasztalt hatással (Bán et al. 2004). Az INA kezelést követően nem találtunk lényeges különbséget a két alkalmazott dózis (100 és 200 mg/l) hatása között, míg a BABA esetében a két alacsonyabb dózis (125 és 250 mg/l) is nyújtott bizonyos fokú védettséget, de csupán az általunk alkalmazott legmagasabb dózis (2000 mg/l) biztosított a BTH kezeléshez hasonló eredményt. Ezt a dózist Cohen és munkatársai (1999) is hatékonynak találták a BABA aktivátorral végzett kísérleteikben szőlőperonoszpórával szemben.

További megfigyelésünk, hogy egyes aktivátoros kezelések (BTH és a BABA magasabb dózisai) a teljes rezisztenciával rendelkező fertőzetlen növények esetében gátolták a növények növekedését a nem kezeltekhez képest, azonban ez a növekedésbeli különbség nem volt szignifikáns. Más szerzők is tapasztaltak hasonló jelenséget (csökkent biomassza és gyökértömeg, kevesebb szemtermés) a SAR kifejeződése nyomán kórokozómentes növényekben (búza, lúdfű) (Heil et al., 2000; Cipollini, 2002), és megállapították, hogy a SAR kifejeződése kórokozómentes környezetben negatív hatással van a növények reprodukciójára és növekedésére.

Egyes kórokozó – növény kapcsolatokban Cohen és munkatársai (1999) (szőlő – peronoszpóra) valamint Siegrist és munkatársai (2000) (dohány – dohány mozaik vírus) a BABA, míg Dann és munkatársai (1998) (szója – szklerotínia) valamint Lopez és munkatársai (2002) (kesudió – colletotrichumos betegség) az INA rezisztenciát indukáló hatása mellett annak fitotoxikus hatásáról is beszámoltak. Kísérleteink ezt nem támasztották alá, hiszen az általunk alkalmazott módon és dózisban az INA nem okozott fitotoxikus tüneteket a napraforgón sem üvegházi sem szántóföldi körülmények között.

Az üvegházi körülmények között hatékonynak 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 mérsékelték a csökött tányérok kialakulását. Ugyanakkor azt is tapasztaltuk, hogy a BTH és az INA szignifikánsan visszafogta a növények növekedését, valamint kisebb mértékben csökkentette a kezelt növények tányérátmérőjét. Ez a hatás feltehetően a szakirodalomból is ismert ún. fitnesz veszteségnek köszönhető, ami szabadföldi kísérletekben jobban kifejeződik, mint üvegházi körülmények között (Heil, 2007). Egyes szerzők szerint a fitnesz veszteség akkor figyelhető meg, ha a rezisztencia olyan körülmények között fejeződik ki, amikor aktuálisan nem indokolt a rezisztencia kialakulása, például nincsen fertőzés (Heil, 2002; Heil és Baldwin, 2002). Ennek a rezisztens állapotnak a kialakulását nem fertőzött növényekben jól mutatják saját eredményeink is, hiszen a fogékony és teljes rezisztenciával rendelkező növényekben az aktivátoros kezelés (tehát a SAR kialakulása) nyomán mind az a védekezéssel összefüggésbe hozható enzimek aktivitása, mind a rezisztens állapottal összefüggő gének kifejeződése fokozódott.

Szabadföldi viszonyok között - hozzánk hasonlóan - több szerző is sikeresen alkalmazta a BTH-t különböző kórokozók (padlizsán verticilliumos hervadása, dohány *Pseudomonas syringae pv. tabaci* kórokozója) elleni rezisztencia indukálására (Bubici et al., 2006; Cole, 1999). Kísérletünkben egyszeri BTH kezelést alkalmaztunk sikerrel, ezzel szemben Dann és munkatársainak (1998) több kezelésre volt szüksége a szklerotíniás fertőzés mérséklésére napraforgóban. Ismertek olyan kísérletek is a szakirodalomból, amikor a BTH-t fungicidekkel (strobilurinok, rézhidroxid) kombinálva alkalmazták szabadföldi körülmények között (Romero et al., 2001; Miles et al., 2004; La Mondia, 2009). Napraforgó esetében eddig még nincs tudomásunk ilyen próbálkozásról, ezért érdemes lenne ebben a gazdanövény – kórokozó rendszerben is az aktivátorok és fungicidek együttes hatását tanulmányozni. Különösen indokolt lehet ez a jövő termesztési gyakorlata szempontjából, figyelembe véve a fenilamidokkal szembeni érzékenység csökkenés/vesztés térbeli terjedését és ezzel szinte párhuzamosan a kórokozó virulencia változásait.

5.2. A szöveti szinten megfigyelt változások jelentősége

A BTH mellett a BABA és INA által indukált rezisztencia hatása a szövettani vizsgálatok eredményeiben is megmutatkozott: a kezelt és fertőzött, genetikailag fogékony növények szárkeresztmetszeteiben szignifikánsan kevesebb hífát és hausztóriumot találtunk, mint a csak fertőzöttekben. Emellett ezek az induktorok a kezelt növényekben ugyanolyan szöveti reakciót (sejtnekrózis a hifák közelében) váltottak ki, mint amilyet a peronoszpórával szemben genetikailag rezisztens, *Pl* géneket hordozó napraforgó fajtáknál lehetett tapasztalni (Mouzeyar et al., 1993; Gulya et al., 1996). A sejtnekrózisok a BTH-val és INA-val kezelt növényekben erőteljesebben jelentkeztek, mint a BABA-val kezeltekben, ami az induktorok eltérő hatásmechanizmusára utalhat.

A részlegesen rezisztens RHA-340-es napraforgó genotípusban mind a BTH-val, mind az INA-val kezelt növényekben kevesebb nekrózis alakult ki a fertőzés hatására, mint a nem kezeltekben. A BTH-val kapcsolatos eredményeink megegyeznek a Bán és munkatársai (2004) által korábban közölt adatokkal. Mind a nem várt növénymagasság változások, mind pedig az eltérő szöveti válaszok alapján jogosan felvetődhet a kérdés, hogy vajon a részleges rezisztenciával rendelkező RHA-340 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 szövetekben, mint a kezeletlenekben, tehát a gyengébb nekrózisképzés ellenére ezekben a növényekben kevésbé tudott terjedni a kórokozó.

5.3. Az *in vitro* gátló hatás jelentősége

Tekintettel arra, hogy a legtöbb növényi aktivátorral foglalkozó forrásmunka szerint ezeknek a vegyületeknek nincs közvetlen gomba gátló hatása, azonban ennek ellenkezőjére is található példa, ezért *in vitro* csíráztatási kísérletekben kívántunk ellenőrizni e vélemények valóságtartalmát a *P. halstedii* vonatkozásában. Megállapítottuk, hogy bizonyos mértékig mind a három aktivátor gátolta a rajzóspórák kiszabadulását. A BTH kapcsán elért eredményünk ellentmond Pajot és munkatársai (2001) saláta peronoszpórával kapcsolatos eredményeinek, illetve a BTH-t hatóanyagként tartalmazó Bion 50 WG növényi aktivátor engedélyezését megelőző széleskörű, a vegyület gombákra gyakorolt közvetlen hatását kizáró eredményeknek (Kessmann et al., 1996). Másrészt hozzánk hasonlóan más szerzők is tapasztalták a BTH *in vitro* kórokozó (*Venturia inaequalis*, *Rhizoctonia solani*) gátló hatását (Bengtsson et al., 2006; Meyer et al., 2006). A BABA esetében is ellentmondásos eredményeket találunk a szakirodalomban. Cohen és munkatársai (Cohen et al., 1994 a; Cohen et al., 1999) nem tapasztalták oomicéták esetében ezen aktivátor

sporangium csírázásra vagy a micélium növekedésére kifejtett gátló hatását, viszont Jeun és munkatársai (2004) a BABA *Colletotrichum orbiculare* spóracsírázását és appresszórium kialakulását gátló hatásáról számoltak be uborkán. Az INA-ról viszont jóval kevesebb ilyen jellegű információt lehet találni a szakirodalomban. Lopez és munkatársai (2002) az INA *Colletotrichum gloeosporioides* konídiumokra gyakorolt gátló hatásáról számoltak be.

Mindenesetre a növényi aktivátorok *in vitro* gátló hatására vonatkozó eredményeink értékelésénél figyelembe kell venni, hogy ezek az anyagok használatuk esetén nem kerülhettek közvetlenül kapcsolatba a kórokozó sporangiumaival, hiszen a kezelést követően a vegyület felszívódott a növénybe, és a kórokozó spórái csak később jutottak a csíranövény felületére.

5.4. A vizsgált enzimek szerepe a rezisztenciában

Az enzimek aktivitásvizsgálata csak a BTH hatására terjedt ki mindhárom gazda – parazita kapcsolatban (fogékony, HLI típusú részlegesen rezisztens, és teljes rezisztenciával rendelkező növényekben). Kompatibilis kapcsolatban a várakozásnak megfelelő eredményeket kaptuk, vagyis a fogékony növényekben az aktivátoros kezelés valamint a fertőzés hatására egyaránt megnövekedett mind a POX, mind a PPO aktivitása. Kísérleteinkben az enzimek aktivitása a fogékony, fertőzött és kezelt (KF) növényekben megközelítette a rezisztens, fertőzött nem kezelt (NKF) növényekben mérhető aktivitást, tehát a BTH kezelés hatására a fogékony növények enzimaktivitásban mutatott válaszai a fertőzésre a rezisztensekéhez hasonlóvá vált.

Kísérleteinkben tapasztalt megnövekedett enzimaktivitásról több szerző beszámolója is ismert, akik különböző gazdanövény – kórokozó kapcsolatok (búza – *Fusarium graminearum*, paradicsom – *Oidium neolycopersici*, tök – cukkini sárga mozaik vírus, saláta – *Bremia lactucae*, árpa – *Blumeria graminis f. sp. hordei*) vizsgálata során tapasztalták ezt az aktivitás növekedést (Mohammadi et al., 2002; Mlickova et al., 2004; Radwan et al., 2007; Sedlarova et al., 2007; Harrach et al., 2008). Kifejezetten a BTH kezelésben részesített növényekben tapasztalható POX aktivitás növekedésről Cools és munkatársai (2002), Liu és munkatársai (2005), Calvacanti és munkatársai (2006), valamint Yong-hong és munkatársai (2008) számoltak be. Ami a napraforgó-peronoszpóra rendszerben a fertőzés és induktoros kezelés hatására bekövetkező enzimaktivitás változásokat illeti, két kutatócsoport közelmúltbeli eredményei is megerősítik a saját tapasztalatainkat. Nandeshkumar és munkatársai (2008) kitozán kezeléssel valamint fertőzéssel idéztek elő peroxidáz és polifenoloxidáz aktivitás emelkedést napraforgóban, míg Serráno és munkatársai (2007) kitináz és peroxidáz enzimaktivitás növekedésről számoltak be BTH-val kezelt napraforgók hipokotil szöveteiben. Utóbbi szerzők azt találták, hogy – hasonlóan a mi eredményeinkhez – a fertőzés után 9 nappal megemelkedett a POX aktvitása a fertőzött

napraforgóban és ugyanez történt a BTH kezelés hatására is. Ezek a szerzők azonban csak egy mintavételi időpontban és két gazda-parazita kapcsolatban (fogékony és teljesen rezisztens kapcsolatban) vizsgálták a POX aktivitását. Ebben a két gazda – parazita kapcsolatban eredményeink megegyeznek az általuk is tapasztaltakkal, ugyanakkor saját vizsgálataink a részleges (HLI típusú) rezisztenciával rendelkező napraforgó genotípus esetében a szöveti vizsgálatokhoz hasonlóan a fogékony növények válaszaihoz képest eltérő változásokat tapasztaltuk, azaz a BTH a nem fertőzött növényekben megemelte a két vizsgált enzim aktivitását, viszont a fertőzött növényekben csökkentette azt. Ilyen típusú rezisztenciával rendelkező növényekkel végzett kísérletekről nincs tudomásunk a szakirodalomból, ezért a jelenség további vizsgálata mindenképpen indokolt. Feltétlenül szükség lenne több részlegesen rezisztens reakciót mutató vonalat bevonni a vizsgálatokba és keresni azt a faktort vagy faktorokat, amelyek ezekben a növényekben a genetikai és indukált rezisztencia egymásra hatásáért vagy éppen egymás hatásának csökkentéséért felelősek.

A fogékony és rezisztens napraforgó növények eredményeit összehasonlítva megállapítottuk, hogy a rezisztens növényekben hamarabb kezd el növekedni és magasabb értéket ér el a két vizsgált enzim aktivitása. Ennek az eredményünknek ellentmond Harrach és munkatársainak (2008) tapasztalata. Munkájukban ugyanis lisztharmatfertőzés után fogékony árpa növényekben magasabb POX aktivitást észleltek, mint a rezisztens növényekben. Sedlarova és munkatársai (2007) viszont saláta peronoszpórával végzett kísérleteikben nem kaptak egyértelmű választ arra, hogy a fogékony vagy a rezisztens növények rendelkeznek-e nagyobb enzimaktivitással a fertőzést követően.

5.5. A rezisztens állapottal összefüggésbe hozható gének

Molekuláris genetikai kísérleteinkben mindhárom növényi aktivátor (BTH, BABA, INA) hatását vizsgáltuk az indukált rezisztenciával kapcsolatba hozható gének kifejeződése szempontjából. Általánosságban elmondható, hogy a rezisztens állapottal összefüggésbe hozható gének közül az általunk vizsgált 3 gén (glutation-S-transzferáz, kataláz, defenzin) átírása valamennyi napraforgó genotípusban megnövekedett a *P. halstedii* fertőzés hatására. Másrészt ez a fokozódó aktivitás a genetikailag rezisztens napraforgókban minden esetben hamarabb és összességében nagyobb mértékben jelentkezett, mint a fogékony növényekben. Ettől eltérő eredményt a kataláz esetében találtunk fogékony napraforgók esetében.

A szakirodalomban több szerző is beszámolt fertőzött növényekben bekövetkező GST és CAT aktivitás változásról, amelyek egy része ellentmond eredményeinknek, míg mások megerősítik azokat. Így például El-Zahaby és munkatársai (1995) lisztharmattal fertőzött fogékony árpa

növényekben magasabb GST aktivitást tapasztaltak, mint a rezisztens növényekben, amelyet valószínűleg a növény és a gomba együttes megemelkedett GST aktivitása hozott létre. Ugyanakkor Radwan és munkatársai (2005) hozzánk hasonlóan azt tapasztalták, hogy a rezisztens napraforgókban magasabb volt a GST aktivitás peronoszpóra fertőzés hatására, mint a fogékony növényekben. Eredményeinkhez hasonlóan Arias és munkatársai (2005) a napraforgó klorotikus foltosság vírussal fertőzött növényekben megemelkedett kataláz aktivitásról számolt be, míg mások lényegében változatlan aktivitást észleltek búzában és árpában lisztharmatfertőzés esetén (Merlier et al., 2007; Harrach et al., 2008). Az általunk tanulmányozott harmadik gén a defenzin vonatkozásában Radwan és munkatársai (2005) szintén fokozottabb aktivitásról számoltak be kísérleteikben a peronoszpórával fertőzött rezisztens napraforgókban. Úgy tűnik tehát, hogy a növények védelmi rendszerével kapcsolatos, általunk vizsgált géntermékek szerepe és hatása eltérő az egyes növény – kórokozó rendszerekben. A napraforgó esetében viszont eredményeink megegyeznek más szerzők tapasztalatával.

Az aktivátoros kezelések, a fertőzéstől eltérően, önmagukban nem okoztak változást a vizsgált gének aktivitásában. Ez alól kivételt csak az aktivátorral kezelt fogékony napraforgóban találtunk, ahol kis mértékben nőtt a GST gén kifejeződése. A kezelések és fertőzés együttes hatása viszont a várakozásunknak megfelelően alakult, hiszen az aktivátorral is kezelt és fertőzött fogékony növényekben megnövekedett a kimutatható géntermékek mennyisége és ez minden esetben meghaladta a csak fertőzés által kiváltott értékeket. Ettől valamelyest eltért a rezisztens napraforgók viselkedése. A teljesen rezisztens növényekben a kezelés és fertőzés együttesen nem fokozta a génkifejeződés mértékét a csak fertőzéshez képest, ugyanakkor a részleges rezisztenciával rendelkező genotípusban a kezelés visszaszorította a génaktivitást a csak fertőzött növényekhez képest. A génaktivitási vizsgálatok során kapott eredményünk egyik lehetséges magyarázata az, hogy a gének kifejeződése az aktivátorral kezelt növényekben nem a rezisztencia fokával, hanem sokkal inkább a megjelenő nekrózisok mennyiségével állhat kapcsolatban. A HLI-típusú részleges rezisztencia ténye már régóta ismert. Megítélésében eltérőek a vélemények, hátterére, kialakulására és genetikai szabályozására vonatkozóan azonban máig sincs megnyugtató magyarázat. Kísérleteink megerősítették azt a véleményünket, hogy ez a speciális részleges rezisztencia a napraforgó – peronoszpóra kapcsolat sajátja és további tanulmányozása mind elméleti (rezisztencia biológiai), mind gyakorlati (nemesítési) szempontból kívánatos és fontos lenne. Az indukált rezisztenciával kapcsolatba hozható génekkel kapott eredményeink bizonyítják, hogy a növényi aktivátoros kezelés fogékony napraforgókban is a genetikai rezisztenciához hasonló választ indukál, melynek mértéke és hatása megközelítheti a HLI típusú rezisztenciával rendelkező növényeknél tapasztaltakat.

Kísérleteinkben a három aktivátor közül általában a BTH, illetve egyes esetekben az INA mutatta a legjobb eredményt. Ugyanakkor ezeknek a vegyületeknek a GST és CAT aktivitására

gyakorolt hatása több esetben még nem egyértelmű. Ilyen szempontból a legtöbbet tanulmányozott rezisztenciát kiváltó anyag, a szalicilsav (SA) hatásához tudjuk leginkább hasonlítani az eredményeinket. Fokozott CAT aktivitást eredményezett az SA árpában (Ananieva et al. 2004), illetve a BTH kezelés paradicsomban (Calvacanti et al. 2006). A GST aktivitását növelte az SA kezelés dohányban (Fodor et al., 1997), illetve napraforgóban (Radwan et al., 2005) is. Kísérleteinkben a rezisztens állapottal összefüggésbe hozható gének kezelés hatására történt aktivitásnövekedését a napraforgó védekező rendszerének hatékonyabb működésével hozzuk kapcsolatba. Az így kezelt növények ugyanis képessé váltak arra, hogy bizonyos szinten ellenálljanak a kórokozó 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 azok a nem várt eredményeink is, amelyeket a részleges rezisztenciát mutató *P. halstedii* 700 – RHA 340-es napraforgó vonal kapcsolatának vizsgálata során kaptunk. Mind a SAR alaposabb megértése, mind a genetikai és indukált rezisztencia kapcsolatának tisztázása végett szükségesnek tartanánk e kutatások folytatását és ennek során egyrészt minél több, eltérő rezisztencia szintű napraforgó genotípus, másrészt további biokémiai és genetikai markerek bevonását a vizsgálatokba.

A dolgozatban ismertetett eredmények egyelőre jórészt elméleti jelentőségűek, amelyek reményeink szerint hozzájárulnak az indukált rezisztencia hátterének egyre jobb megismeréséhez. Ugyanakkor további, szélesebb körű kísérletekre volna szükség a napraforgó növények védelmi rendszerében betöltött szerepük tisztázására és ezt követően gyakorlati alkalmazhatóságuk elbírálására. Eredményeink és irodalmi források alapján úgy véljük, hogy ennek a gyakorlati felhasználásnak elsősorban a részleges rezisztenciával, valamint az ún. kvantitatív ellenállósággal (Tourvieille, 2008) rendelkező napraforgó típusoknál lenne jelentősége.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A napraforgó-peronoszpóra (kórokozó: *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berlese et de Toni) jelentős károkat okozó, nehezen leküzdhető betegség, melynek oka a kórokozó változékonysága és kitűnő alkalmazkodóképessége. A betegség elleni hatékony védekezés a helyes agrotechnika alkalmazása (vetésváltás) mellett elsősorban a fungicides vetőmagcsávázáson és a rezisztens fajták (hibridek) termesztésén alapul. Ez a kettős védelem sokáig elegendőnek bizonyult, azonban az ellenálló fajtákkal szemben a kórokozónak újabb patotípusai (rasszai) alakulnak ki, az alkalmazott fungiciddel szemben pedig jelentős érzékenység csökkenés következik be. A kórokozó változékonysága miatt tehát a korábban biztosnak vélt védekezési módszerek továbbfejlesztésére van szükség (újabb génforrások keresése, újabb fungicid hatóanyagok keresése), valamint ezek mellett új, alternatív, kiegészítő védekezési módszerekre is szükség lehet. Ide sorolható ígéretes lehetőség a növény saját védekező rendszerének kémiai úton történő aktiválása, azaz a szisztemikusan indukált rezisztencia (SAR) használata.

Vizsgálataink során három különböző (fogékony, részlegesen rezisztens, teljesen rezisztens) *P. halstedii* gazda – parazita kapcsolatban tanulmányoztuk a ß-aminovajsav és az izonikotinsav növényi aktivátorok (rezisztencia induktorok) betegség visszaszorító hatását laboratóriumi, üvegházi és szántóföldi körülmények között, összehasonlítva a már hatékonynak bizonyult benzotiadiazollal. Célul tűztük ki továbbá az indukált rezisztencia biokémiai és molekuláris genetikai hátterének vizsgálatát a rezisztenciával kapcsolatba hozható enzimek, illetve gének kifejeződésének nyomon követésével.

A napraforgó csíranövényeket a fent említett aktivátorok különböző töménységű oldataival kezeltük, majd másnap fertőztük a *P. halstedii* sporangium szuszpenziójával. Az üvegházban nevelt növényeken tüneti értékelést végeztünk és a vizuális felvételezéseket meghatározott időnként vett növényminták szövettani (mikroszkópos) vizsgálatával egészítettük ki. Ehhez Olympus BX 50 fluoreszcens mikroszkópot használtunk a jelenlévő kórokozó képletek, valamint szöveti nekrózisok mennyiségi értékelésére.

Üvegházi kísérleteink alapján általánosságban elmondható, hogy az általunk vizsgált fogékony gazda-parazita kapcsolatban a már ismert hatású BTH mellett az INA és a BABA is szignifikánsan csökkentette a kórokozó által okozott tüneteket. Az induktorok hatására a fogékony növények szöveteiben a genetikai rezisztens napraforgókra jellemző sejt- és szövetelhalások jelentkeztek. A kísérletek alapján tehát úgy tűnik, hogy az indukált rezisztencia szöveti megnyilvánulása hasonló a genetikai rezisztenciáéhoz.

Az induktorok tünet visszaszorító hatását szabadföldi kisparcellás kísérletekben is ellenőriztük a növénymagasság és tányérátmérő mérésével. Ebben az esetben a kezelt és/vagy

fertőzött csíranövényeket egy hétig üvegházban neveltük, majd kiültettük szabadföldre. Szántóföldi körülmények között az alkalmazott növényi induktorok szignifikánsan csökkentették a peronoszpóra törpüléses tünetét, valamint a kezelt és fertőzött növények nagyobb tányért képeztek a csak fertőzött egyedeknél. Meg kell jegyezni azonban, hogy ezeket az eredményeket csak fenntartásokkal szabad kezelni, hiszen a kísérleti növényállomány egy része a rossz időjárási körülmények miatt nem volt értékelhető.

In vitro sporangium csíráztatási kísérletet is végeztünk annak megállapítására, hogy az induktoroknak van-e közvetlen gátló hatásuk a kórokozóra. A szakirodalomban található véleményektől eltérően azt találtuk, hogy ezek a vegyületek kismértékben gátolták a kórokozó sporangiumainak a csírázását. Ez a hatás azonban esetünkben azért nem jelenthet problémát, mert az induktorok a kezelés során nem kerülhetnek közvetlen kapcsolatba a kórokozóval.

Az üvegházban nevelt és a korábbiakban már leírt, kezelt és/vagy fertőzött napraforgó növényekből 0-tól 17 napig terjedő időszakban vett mintákból enzimaktivitás és génkifejeződés vizsgálatokat végeztünk az indukált rezisztencia jobb megismerése céljából. Az ellenállással kapcsolatos enzimek, polifenol oxidáz (PPO) és gvajakol-peroxidáz (POX) méréséhez a mintákat a fertőzés utáni 0., 3., 9., 13. és 17. napon vettük. Ez a vizsgálatsorozat csak a BTH-val (160 mg/l dózissal) kezelt növényekre terjedt ki. Az enzimmérésekhez 0–4 °C közötti hőmérsékleten szuszpenziót készítettünk a napraforgó növények hipokotil részéből, növényenként 0,5 g tömegű mintákat véve. A vizsgált két enzim aktivitásának változásaiból arra a következtetésre jutottunk, hogy a BTH fokozza ennek a két enzimnek az aktivitását a fogékony és a teljesen rezisztens növényekben, azonban hatása a részleges rezisztenciával rendelkező növényekben nem egyértelmű. Ebben az esetben ugyanis a nem fertőzött növényekben megemelte a BTH az aktivitást, a fertőzöttekben viszont csökkentette azt. A nem kezelt növényekben a fertőzés mindhárom genotípusban megemelte az enzimaktivitást. Fontos kiemelni, hogy a szakirodalomban nem található adat a részleges rezisztenciával rendelkező *P. halstedii* – napraforgó kapcsolatra vonatkozóan.

A rezisztenciával összefüggésbe hozható gének, géntermékek vizsgálatára a glutation-S-transzferázt (GST), a katalázt (CAT) és a defenzint (PDF) választottuk. A mintákat a fertőzés utáni 0., 3., 9., 13. és 17. napon vettük, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Az RNS kivonást és tisztítást követően meghatároztuk a kivont RNS mennyiségét és koncentrációját. A keresett transzkriptumok kimutatásához fél-kvantitatív PCR módszert használtunk. Fertőzés hatására valamennyi napraforgó genotípusban intenzívebbé vált a vizsgált transzkriptumok megjelenése, azaz a gének kifejeződése. A fokozódó aktivitás a genetikailag rezisztens napraforgókban hamarabb és összességében nagyobb mértékben jelentkezett, mint a fogékony növényekben. Másrészt a fogékony, induktorral kezelt és fertőzött növényekben jelentősebb volt a génkifejeződés, mint a

csak fertőzött napraforgókban. A részlegesen rezisztens növényekben az enzimvizsgálatokhoz hasonló eredményt kaptuk, vagyis a részlegesen rezisztens fertőzött növényekben az induktoros kezelés nyomán, elsősorban a GST esetében csökkent a transzkriptumok felhalmozódása. A növényekben megjelenő *P. halstedii* mennyiségének kimutatására és a kezelések hatékonyságának összehasonlítására a napraforgó-peronoszpóra elongációs faktorára tervezett indító szekvenciát használtunk (*Ph*-TEF1). A *Ph*-TEF-1 alkalmazása igazolta a korábban szövettani vizsgálatokkal kapott eredményeinket, vagyis a kórokozó gazdanövényen belüli mennyiségének kezeléstől függő változását.

A dolgozatban ismertetett eredmények elsősorban elméleti jellegűek, amelyekkel – reményeink szerint – hozzájárulunk az indukált rezisztencia hátterének egyre jobb megismeréséhez. További kísérletekre volna szükség, elsősorban a részleges rezisztenciával rendelkező genotípusok eltérő viselkedési okainak tisztázására, valamint az indukált rezisztenciának a napraforgó növények védelmi rendszerében betölthető szerepének megállapítására.

7. SUMMARY

The downy mildew (*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berlese *et* de Toni) is one of the most destructive diseases of the cultivated sunflower. At present, the disease can effectively be controlled by using resistant cultivars and fungicidal seed treatment. However, due to the high genetic variability of this oomycete plant pathogen, new virulent pathotypes, as well as fungal strains with tolerance to fungicide appear. Thus, beside the traditional control strategies there is a need of looking for alternative methods to improve the efficacy of disease management. A novel approach could be the activation of the natural defense system of plants by using chemical resistance inductors, in other words, the application of the systemic induced resistance (SAR).

The aim of our study was to evaluate the efficacy of INA and BABA in comparison to BTH against *P. halstedii* infection under laboratory, glasshouse and field conditions, as well as to elucidate the biochemical and genetic background of induced resistance in host plants including susceptible, partially and totally resistant sunflower genotypes.

Pre-germinated seeds were soaked in an aqueous solution of resistance inductors followed by the inoculation with *P. halstedii* sporangia next day. The sunflowers grown in the greenhouse were assessed twice for disease symptom appearance, first by recording the frequency and intensity of fungal sporulation on cotyledon leaves and second by recording the number of plants per treatment with typical symptoms of systemic downy mildew such as leaf chlorosis, stunting and damping off. Histological examinations were undertaken on young sunflower seedlings taken at to detect pathogen structures and cell death by fluorescence microscopy.

Similarly to BTH, the other two inductors (BABA, INA) significantly reduced the appearance of disease symptoms and the colonization of sunflower tissues by the pathogen. Furthermore, cell necrosis and secondary cell division around infection sites were found to be associated with treated plants, and these necroses closely resembled those detected earlier in sunflower plants carrying resistance genes to *P. halstedii*.

We also made field experiments with the resistance inductors to see whether these chemicals are able to hinder disease symptom appearance. The treated and/or inoculated seedlings were grown in the greenhouse for one week before being planted in the field. Treatments by any inductor significantly counteracted with the stunting, and increased head diameters of sunflowers so considerable protection against downy mildew was demonstrated under field conditions as well. However, the results obtained under field condition should be considered preliminary since the unfavorable weather conditions existing during the season caused some damage in the experimental plots.

In an *in vitro* test we examined whether the inductors have direct effect on the sporangial germination. Each activator solution was mixed in a 1:1 ratio with a sporangial suspension and the number of empty sporangia per treatment was recorded. Our finding contradicts with the results reported by other workers. We found that each activator inhibited to some extent the germination of these spores.

For enzyme activity assay, samples were taken 0, 3, 9, 13 and 17 d after inoculation (dpi). This assay was performed only with BTH pretreated plants. Enzyme activities were analyzed using spectrophotometric methods. For detection of antioxidant enzyme activities, 0.5 g hypocotyl tissue was homogenized at 0-4°C. BTH enhanced the activities of polyphenoloxidase (PPO) and guaiacol-peroxidase POX) in the susceptible and the completely resistant plants, but in case of partially resistant plants its effect was contradictory. Namely, BTH treatment increased enzyme activity in the uninfected, but decreased in the infected partially resistant plants as compared to the untreated noninfected and untreated infected plants, respectively. It is worth mentioning that there is no information in the literature about any response of partially resistant sunflowers to *P. halstedii* infection and/or resistance inductors treatment.

For studying the expression of resistance related genes and gene products, we selected glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and defensin (PDF) for analyses. Plant samples were taken at intervals between 0 and 17 dpi, frozen in liquid nitrogen and RNA extraction made using conventional methods. The extracted RNA was measured with a spectrophotometer. Primers for PCR amplification were designed based on corresponding literary data. The levels of the transcripts were detected by semi-quantitative RT-PCR. In order to quantify pathogen development in the host tissues, the *Ph*-TEF-1 elongation factor was used. *P. halstedii* infection enhanced the activity of resistance related genes (GST, PDF, and CAT) in all tested genotypes. The transcripts accumulation was induced earlier and at higher levels in the resistant plants than in the susceptible ones. In case of susceptible sunflowers, we consequently measured higher transcript accumulation in the inductor-treated plants, as compared to the untreated ones. In case of partially resistant plants – similarly to the results with enzyme activities – transcript accumulation increased in the untreated infected plants, as compared to the treated, infected ones.

These results are largely theoretical, with which we hoped to contribute to the understanding of the mechanism of induced resistance in sunflower. However, future investigations are required, particularly to elucidate the cause of different host responses to *P. halstedii* infection and/or resistance inductors treatment in partially resistant sunflower genotypes. Furthermore, it might be of interest to find out the practical aspects of these chemical inductors in sunflower production.

8. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

ÁDÁM, A., FARKAS T., SOMLYAI, G., HEVESI, M., KIRÁLY, Z (1989): Consequence of O2-generation during a baterially induced hypersensitive reaction in tobacco. Physiological and Molecular Plant Pathology, 34:13-26.

AGRIOS G. N. (1988): Plant Pathology (San Diego, USA, CA: Academic Press Inc.)

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.

ALFENITO M. R., SOUER E., GOODMAN C. D., BUELL R., MOL J., KOES R., WALBOT V. (1998): Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. Plant Cell 10: 1135–1149.

ALI Z., SMITH I., GUEST D.I. (2000): Combinations of potassium phosphonate and Bion (acibenzolar-S-methyl) reduce root infection and dieback of *Pinus radiata*, *Banksia integrifolia* and *Isopogon cuneatus* caused by *Phytophthora cinnamomi*. Australasian Plant Pathology 29: 59–63.

ALLEN P.J. (1959): Physiology and biochemistry of defense. In: Horsfall JG, Dimond AE eds. Plant Pathology, an Advanced Treatise Vol.1. New York: Academic Press, pp. 435-467.

ANANIEVA E.A., CHRISTOV K.N, POPOVA L.P. (2004): Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. Journal of Plant Physiology, 161: 319-328.

ANFOKA G.H. (2000): Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Vollendung) to cucumber mosaic virus. Crop Protection 19: 401-405.

ARIAS M.C., LUNA C., RODRÍGUEZ M., LENARDON S., AND TALEISNIK E. (2005): Sunflower chlorotic mottle virus in compatible interactions with sunflower: ROS generation and antioxidant response. European Journal of Plant Pathology, 113: 223-232.

ARNON D.I. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24: 1-15.

ASADA K. (1992): Ascorbate peroxidase − a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiologia Plantarum, 85: 235–241.

AZPILICUETA E. C., BENAVIDES P. M., TOMARO L. M., GALLEGO S. M. (2007): Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves. Plant Physiology and Biochemistry 45: 589-595.

BAIDER A., COHEN Y. (2003): Synergistic interaction between BABA and mancozeb in controlling *Phytophthora infestans* in potato and tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber. Phytoparasitica 31: 399-409.

BAKER C.J., ORLANDI E. W. (1995): Active oxigen in plant pathogenesis. Annual Review of Phytopathology 33: 299-321.

BÁN R., VIRÁNYI F., KÖRÖSI K., NAGY S. (2004a): Indukált rezisztencia a napraforgó-peronoszpórával szemben. Növényvédelem, 40: 545–550.

BÁN R., VIRÁNYI F., KOMJÁTI H. (2004b): Benzothiadiazole-induced resistance to *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. Et de Toni in sunflower. P. Spencer-Phillips and M. Jeger (eds.): Advances in Downy Mildew Research, Vol. 2, pp. 265-273. Kluwer Academic Publishers.

BARTLING D., RADZIO R., STEINER U., WEILER E. W. (1993): A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. European Journal of Biochemistry, 216: 579–586.

BAYSAL Ö., GÜRSOY Y.Z., ÖRNEK H., DURU A. (2005): Induction of oxidants in tomato leaves treated with DL-ß-amino butyric acid (BABA) and infected with *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis*. European Journal of Plant Pathology, 112: 361-369.

BAYSAL Ö, ZELLER W. (2004): Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to acibenzolar-S-methyl against fire blight (*Erwinia amylovora*). Physiological and Molecular Plant Pathology, 65: 305–315.

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.

BOVIE C., ONGENA M., THONART P., DOMMES J. (2004): Cloning and expression analysis of cDNAs corresponding to genes activated in cucumber showing systemic acquired resistance after BTH treatment. BMC Plant Biology, 4, 15.

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.

BUTT V.S. (1980): In: The Biochemistry of plant. Vol. 2. eds. Davies D.D. Academic Press, San Diego. pp. 81-123.

BUZI A., CHILOSI G., DE SILLO D., MAGRO P. (2004): Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. Journal of Phytopathology, 152: 34-42.

CALVACANTI F.R., RESENDE M.L.V., LIMA J.P.M.S., SILVEIRA J.A.G., OLIVERAC J. T. A. (2006): Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 68: 198–208.

CAO H., BOWLING S., GORDON A., DONG X. (1994): Characterization of an Arabidopsis mutant that is non-responsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cell, 6: 1583-1592.

CAO H., GLAZEBROOK J., CLARKE J., VOLKO S., DONG X. (1997): The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. Cell, 88: 57-63.

CHAMNONGPOL S., WILLEKENS H., LANGEBARTELS C., VAN MONTAGU M., INZE D., VAN CAMP W. (1996): Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. Plant Journal, 10: 491-503.

CHESTER KS (1933): The problem of acquired physiological immunity in plants. Quartely Review of Biology, 8: 129-154.

CIPOLLINI D.F. (2002): Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*? A manipulative approach. Oecologia, 131:514–520.

COHEN Y. (1994a): Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acids. Phytopathology, 84: 55-59.

COHEN Y. (1994 b): 3-Aminobutyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 44: 273-288.

COHEN Y. (2002): b-aminobutyric acid-induces resistance against pathogen. Plant Disease, 86: 448-457.

COHEN Y., NIDERMAN T., MÖSINGER E., FLUHR E. (1994): ß-Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. Plant Physiology, 104: 59-66.

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.

COHEN Y., SACKSTON W.E. (1973): Factros affecting infections of sunflowers by *Plasmopara halstedii*. Canadian Journal of Botany, 52: 15–22.

COHN J, SEESSA G, MARTIN GB (2001): Innate immunity in plants. Current Opinion in Immunology, 13: 55-62.

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.

CONRATH U., PIETERSE C.M.J., MAUCH-MANI B. (2002): Priming in plant-pathogen interactions. Trends in Plant Science, 7: 210-216.

COOLS H.J., ISHII H. (2002): Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenilalanine ammonia lyase gene (PAL1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. Physiological and Molecular Plant Pathology, 61: 273-280.

COSTA H., GALLEGO S.M., TOMARO M. (2002): Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. Plant Science, 162: 939-945.

CSINOS A. S., PAPPU H. R., MCPHERSON R. M, STEPHENSON M.G. (2001): Management of tomato spotted wilt virus in flue-cured tobacco with acibenzolar-S-methyl and imidacloprid. Plant Disease, 85: 292-296.

DANN E., CRIERS B., BYRUM J., HAMMERSCHMIDT R. (1998): Effect os soybean with 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in field and greenhouse studies. European Journal of Plant Pathology, 104: 271-278.

DELANEY T.P., FRIEDRICH L., RYALS J.A. (1995): Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 6602-6606.

DELANEY T.P., UKNES S., VERNOOIJ B., FRIEDRICH L., WEYMANN K., NEGROTTO D., GAFFNEY T., GUT-RELLA M., KESSMANN H., WARD E., RYALS J. (1994): A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science, 266: 1247-1250.

DÉLANO-FRIER J.P., MARTINEZ-GALLARDO N.A., MARTINEZ-DE LA VEGA O., SALAS-ARAIZA M.D., BARBOSA-JARAMILLO E.R., TORRES A., VARGAS P., BORODANENKO A. (2004): The effect of exogenous jasmonic acid on induced resistance and productivity in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is influenced by environmental conditions. Journals of Chemical Ecology, 30: 1001-1034.

DEN HOND F. (1998): Systemic acquired resistance: A case of innovation in crop protection. Pesticide Outlook, 9: 18-23.

DE VOS M., VAN OOSTEN V.R., VAN POECKE R.M.P., VAN PELT J.A., POZO M.J., MUELLER M.J., BUCHALA A.J., MÉTRAUX J.-P., VAN LOON L.C., DICKE M,. PIETERSE C.M.J. (2005): Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. Molecular Plant-Microbe Interactions, 18: 923-937.

DOKE N. (1983): Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. Physiological Plant Pathology, 23: 359-367.

DOKEN M.T. (1986): The nature of systemic invasion of stem and leaves of sunflowers by *Plasmopara helianthi* Novot. var. *helianthi* with mechanism of sporulation and zoospore release. Journal of Phytopathology, 117: 270-275.

DOREY S., KOPP M., GEOFFROY P., FRITIG B., KAUFFMANN S. (1999): Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitin. Plant Physiology, 121: 163-171.

DURRANT W.E. DONG X. (2004): Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology, 42:185–209.

EL-ZAHABY H.M., GULLNER G., KIRÁLY Z. (1995): Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in different host-pathogen interactions. Phytopathology, 85: 1225- 1230.

ÉRSEK T., HORNOK L. (1985): Kórokozók és a fertőzött növény. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 35.

FEHRMANN H., DIMOND A.E. (1967): Peroxidase activity and phytophthora resistance in different organs of the potato plant. Phytopathology, 57: 69-72.

FODOR J. (1998): Az oxigén szabadgyökök, illetve antioxidánsok szerepe a szisztemikus növényi betegségrezisztenciában. Doktori értekezés, Gödöllő.

FODOR J., GULLNER G., ÁDÁM A. L., BARNA B., KŐMÍVES T., KIRÁLY Z. (1997): Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco: Role in systemic acquired resistance. Plant Physiology, 114: 1443–1451.

FOYER, C. H., HALLIWELL, B. (1976): Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta, 133: 21-25.

FRIEDRICH L., LAWTON K., RUESS W., MASNER P., SPECKER N., GUT RELLA M., MEIER B., DINCHER S., STAUB T., UKNES S., METRAUX J.-P., KESSMANN H.,

RYALS J. (1993): A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. The Plant Journal, 10: 61-70.

GAFFNEY T., FRIEDRICH L., VERNOOIJ B., NEGROTTO D., NYE 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.

GLAZEBROOK J. (2001): Genes controlling expression of defense response in Arabidopsis-2001 status. Current Opinion in Plant Biology, 4: 301-308.

GLAZEBROOK, J., CHEN, W., ESTES, B., CHANG, H-S., NAWRATH, C., MÉTRAUX, J-P., ZHU, T., KATAGIRI, F. (2003): Topology of the networking interating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. The Plant Journal, 34: 217-228.

GODARD J.F., ZIADI S., MONOT C., LE CORRE D., SILUÉ D. (1999): Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. Crop Protection, 18: 397-405.

GOODMAN RM., ROBERT N. KIRÁLY Z.,. WOOD. K.R (1991): A beteg növény biokémiája és élettana. Akadémia Kiadó, Budapest, pp 1-829.

GOOSSEN P.G., SACKSTON W.E. (1968): Transmission and biology of sunflower downy mildew. Canadian Journal of Botany, 46: 5-10.

GOVRIN E.M., LEVINE A. (2000): The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. Current Biology, 10: 751-757.

GÖRLACH J., VOLRATH S., KNAUF-BEITE G., HENGYG., BECKHOVE U., KOGEL K.H., OOSTENDORP M., STAUB T., WARD E., KESSMANN H., RYALS J. (1996): Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell, 8: 629-643.

GRANT J.J., LOAKE G.J. (2000): Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. Plant Physiology, 124: 21-30.

GROSS G. G. (1978): Biosynthesis of lignin and related monomers. Recent Advances in Phytochemistry, 11: 141–184.

GULYA T. (1995): Proposal for a revised system of classifying races of sunflower downy mildew. Proc. 17th Sunflower Research Workshop. NSA, Fargo, ND, USA, 76-78.

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.

GULYA, T., SACKSTON, W.E., VIRÁNYI, F., MASIREVIC, S., RASHID, K.Y. (1996): New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. Journal of Phytopathology, 132: 303-311.

GULYA T., TOURVIEILLE DE LABROUHE D., MASIREVIC S., PENAUD A., RASHID K., VIRÁNYI F. (1998): Proposal for standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: USA Symposium III Sunflower Downy Mildew, Fargo (ND, USA) 13-14 January, pp. 130-136.

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.

HAMMERSCHMIDT R. (1999): Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? Phisiological and Molecular Plant Pathology, 55: 77-84.

HAMMERSCHMIDT R., NICHOLSON R.L. (1999): A survey of plant defense responses to pathogens. In: A.A. Agrawal and S. Tuzun, Editors, A survey of plant defense responses to pathogens, APS Press, St Paul, pp. 55–71.

HEGEDŰS A., ERDEI S., HORVÁTH G. (1997): Is colchicine a stress-factor? Horticultural Science, 29: 53–57.

HEIDEL A.J., BALDWIN I.T. (2004): Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid signalling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. Plant, Cell and Environment, 27: 1362-1373.

HEIL M. (2002): Ecological costs of induced resistance. Current Opinion in Plant Biology, 5: 345-350.

HEIL M. (2007): Trade-offs associated with induced resistance. In: Induced resistance for plant defence A sustainable approach to crop protection. Edited by WALTERS D, NEWTON A., LYON G. Blackwell Publising, pp. 157-177.

HEIL M., BALDWIN I.T. (2002): Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. Trends in Plant Science, 7: 61-67.

HEIL M., HILPERT A., KAISER W., LINSENMAIR K.E. (2000): Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? Journal of Ecology, 88: 645-654.

HIJWEGEN T. (1963): Lignification, a possible mechanism of activate resistance against pathogens. European Journal of Plant Pathology, 69: 314-317.

HIRASAWA K.-I., AMANO T., SHIOI Y. (2005): Effects of scavengers for active oxygen species on cell death by cryptogein. Phytochemistry, 66: 463–468.

HORVÁTH, J. (szerk.) (1995): A szántóföldi növények betegségei. Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp 110.

HWANG B.K., SUNWOO J.Y., KIM Y. J., KIM B.S. (1997): Accumulation of b-1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL-ß-amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 51: 305-322.

IRVING H. R., KUC J. A (1990): Local and systemic induction of peroxidase chitinase and resistance in cucumber plants by K_2HPO_4. Physiological and Molecular Plant Pathology, 37: 355-366.

ISHII H., TOMITA Y., HORIO T., NARUSAKA Y., NAKAZAWA Y., NISHIMURA K., IWAMOTO S. (1999): Induced resistance of acibenzolar-S-methyl (CGA 245704) to cucumber and japanese pear diseases. European Journal of Plant Pathology, 105: 77-85.

JAKAB G., COTTIER V., TOQUIN V., RIGOLI G., ZIMMERLI L., MÉTRAUX J.-P., MAUCH-MANI B. (2001): ß-Aminobutyric acid-induced resistance in plants. European Journal of Plant Pathology, 107: 29–37.

JAKAB G., TON J., FLORS V., ZIMMERLI L., MÉTRAUX J.-P., MAUCH-MANI B. (2005): Enhancing Arabidopsis salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. Plant Physiology, 139: 267-274.

JAMENSON P.E. (2000): Cytokinins and auxins in plant-pathogen interaction- An overview. Journal of Plant Growth Regulation, 32: 369-380.

JAYARAJ J., WAN A., RAHMAN M., PUNJA Z.K. (2008): Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. Crop Protection, 27: 1360– 1366.

JEUN Y.C., PARK K.S., KIM C.H., FOWLER W.D., KLOEPPER J.W. (2004): Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. Biological Control, 29: 34–42.

JORGENSEN L.N., JENSEN B., SMEDEGAARD-PETERSEN V. (1997): Bion- A compound for disease control in cereal based on induced resistance. Proceedings of 14th Danish Plant Protection Conference, 8: 35-48.

KACHROO P., YOSHIOKA K., SHAH J., DOONER H.K., KLESSIG D.F. (2000): Resistance to turnip crinkle virus in Arabidopsis is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. Plant Cell, 12: 677-690.

KAGALE S., MARIMUTHU T., THAYUMANAVAN B., NANDAKUMAR R., SAMIYAPPAN R. (2004): Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of

Datura metel against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae pv. oryza*e. Physiological and Molecular Plant Pathology, 65: 91–100.

KARBAN R. AGRAWAL A.A., MANGEL M.(1997): The benefits of induced defenses against herbivores. Ecology, 78: 1351–1355.

KARBAN R., KUC J. (1999): Induced resistance against pathogens and herbivores: an overview. In: Agrawal aa, Tuzun S, Bent E eds. Induced plant defenses against pathogens and herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture. St. Paul, MN: APS Press, pp. 1-16.

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.

KESSMANN H., STAUB T., HOFFMANN C., MAETZKE T., HERZOG J., WARD E., UKNES S., RYALS J. (1994): Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annual Review of Phytopathology 32, 439-459.

KIRÁLY Z., ÉRSEK T, BARNA B, ÁDÁM A, GULLNER G. (1991): Pathophysiological aspects of plant disease resistance. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 26: 233-250.

KORMÁNY A., VIRÁNYI, F. (1997): Studies on the virulence and agressiveness of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) in Hungary. Med. Fac Lanbouww. Univ. Gent 62/3b: 911-915.

KÖRÖSI K., LÁZÁR N., VIRÁNYI F (2009): Resistance to downy mildew in sunflower induced by chemical activators. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 44: 1–9.

KUC J. (1957): A biochemical study of resistance of potato tuber tissue to attack by various fungi. Phytopathology, 47: 676-680.

KUC J. (1982): Induced immunity to plant disease. BioScience, 32: 854-860.

KWON, H.Y., WELLS, K.S. ÉS HOCH, H.C. (1993): Fluorescence confocal microscopy: applications in fungal cytology. Mycologia, 85: 721-733.

LA MONDIA J.A. (2009): Efficacy of fungicides and a systemic acquired resistance activator (acibenzolar-S-methyl) against tobacco blue mould. Crop Protection, 28: 72–76.

LATUNDE-DADA A.O., LUCAS J.A. (2001): The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. Physiological and Molecular Plant Pathology, 58: 199-208.

LAWTON K.A., FRIEDRICH L., HUNT M., WEYMANN K., DELANEY T., KESSMANN H., STAUB T., RYALS J. (1996): Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant Journal, 10: 71-82.

LEMAY A.V., BAILEY J.E., SHEW B.B. (2002): Resistance of peanut to sclerotinia blight and the effect of acibenzolar-S-methyl and fluazinam on disease incidence. Plant Disease, 86: 1315-1317.

LEVINE A., PENNELL R.I., ALVAREZ M.E., PALMER R., LAMB C. (1996): Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. Current Biology, 6: 427-437.

LESKOVAR D.I., KOLENDA K. (2002): Strobilurin + acibenzolar-S-methyl controls white rust without inducing leaf chlorosis in spinach. Annals of Applied Biology, 140: 171-175.

LIAN B., ZHOU X., MIRANSARI M., SMITH D. L. (2000): Effects of salicylic acid on the development and root nodulation of soybean seedlings. Journal of Agronomy and Crop Sciences, 185: 187-192.

LIU H., JIANGA W., BIB Y., LUOA Y. (2005): Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. Postharvest Biology and Technology, 35: 263–269.

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.

LOUWS F.J., WILSON M., CAMPBELL H.L., CUPPELS D.A., JONES J.B., SHOEMAKER P.B., SAHIN F., MILLER S.A. (2001): Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. Plant Disease, 85: 481-488.

LOGEMANN E., WU S.C., SCHRÖDER J., SCHMELZER E., SOMOSSCH I.E., HAHLBROCK K. (1995): Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselium crispum* is correlated with repression of cell-cycle-related genes. The Plant Journal, 8: 865-876.

LOW P.S., MERIDA J.R. (1996): The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. Physiol. Plantarum, 96:532-542.

LUKÁCSY GY. (2006): A fürtritkítás idejének és mértékének hatása a „furmint” és „hárslevelű” fajták vegetatív és generatív teljesítményére Tokaj-Hegyalján. Doktori értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Növénytermesztési és kertészeti tudományok.

LYON D.G., NEWTON A.C. (1999): Implementation of elicitor mediated induced resistance in agriculture. In: Agrawal aa, Tuzun S, Bent E eds. Induced plant defenses against pathogens and herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture. St. Paul, MN: APS Press, pp. 299-318.

MALAMY J., CARR J. P., KLESSIG D. F., RASKIN I. (1990): Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science, 250: 1002-1004.

MALECK K., LEVINE A., EULGEM T., MORGAN A., SCHMIDT J., LAWTON K.A., DANG J.L., DIETRICH R.A. (2000): The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. Nature Genetics, 26: 403-410.

MANNERVIK B., DANIELSON U.H., KETTERER B. (1988): Glutathione transferases—structure and catalytic activity. CRC Critical Reviews in Biochemistry, 23: 283–337.

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.

MATTA A. (1971): Microbial penetration and immunization of noncongenial host plants. Annual Review of Phytopathology, 9: 387-410.

MAUCH-MANI B., MAUCH F. (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. Current Opinion in Plant Biology, 8: 409-414.

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.

MAYER A.M., HAREL E. (1979): Polyphenol oxidase in plants. Phytochemistry, 18: 193-215.

MAZEYRAT, F., MOUZEYAR, S., COURBOU, I., BADAOUI, S., ROECKEL-DREVET, P., LABROUHE, D.T. ÉS LEDOIGT, G. (1999): Accumulation of defense related transcripts in sunflower hypocotyls (*Helianthus annuus* L.) infected with *Plasmopara halstedii*. European Journal of Plant Pathology, 105: 333-340.

MCDOWELL J.M., DANGL J.L. (2000): Signal transduction in the plant immune response. Trends in Biochemical Sciences, 25: 79-82.

MERLIER D., RANDOUX B., NOWAK E., FARCY F., DURAND R., REIGNAULT P. (2007): Iodus 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. Phytochemistry, 68: 1156–1164.

MÉTRAUX J.-P., AHL GOY P., STAUB T., SPEICH J., STEINEMANN A., RYALS J., WARD E. (1991): Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloro-isonicotinic acid and pathogens. Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions 1. Dodrecht- Kluwer Academic, pp. 432-439.

MÉTRAUX J. -P., SIGNER H., RYALS J., WARD E., WYSS-BENZ M., GAUDIN J., RASCHDORF K., SCHMID E., BLUM W., INVERARDI B. (1990): Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. Science, 250: 1004-1006.

MEYER M.C., BUENO C.J., DE SOUZA N.L., YORINORI J.T. (2006): Effect of doses of fungicides and plant resistance activators ont he control of rhizoctonia foliar blight of

soybean, and on *Rhizoczonia solani* AG1-IA in vitro development. Crop Protection, 25: 848-854.

MILES A.K., WILLINGHAM S.L., COOKE A.W. (2004): Field evaluation of strobilurins and a plant activator for the control of citrus black spot. Australian Plant Pathology, 33: 371-378.

MLICKOVA K, LUHOVA L., LEBEDA A., MIESLEROVA A., PEC P. (2004): Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. Plant Physiology and Biochemistry, 42: 753–761.

MOHAMMADI M., KAZEMI H. (2002): Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Science, 162: 491-498.

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.

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.

MOUZEYAR, S., VEAR, F., LABROUHE, D.T. (1995): Microscopical studies of the effect of metalaxyl on the interaction between sunflower, *Helianthus annuus* L. and downy mildew, *Plasmopara halstedii*. European Journal of Plant Pathology, 101: 399-404.

MÜLLER K.O. (1959): Hypesensitivity. In: Horsfall JG, Dimond AE eds. Plant Pathology, an Advanced Treatise Vol.1. New York: Academic Press, pp. 459-519.

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.

NARUSAKA Y., NARUSAKA M., HORIO T., ISHII H. (1999): Comparison of local and systemic induction of acquired disease resistance in cucumber plants treated with benzothiadiazoles and salicylic acid. Plant Cell Physiology, 40: 388-395.

OKA Y., COHEN Y. (2001): Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL-ß-amino-n-butyric acid. European Journal of Plant Pathology, 107: 219-227.

OROS G., VIRÁNYI F. (1987): Glasshouse evaluation of fungicides for the control of sunflower downy mildew *(Plasmopara halstedii*). Annals os Applied Biology, 110: 53–63.

ORTEGA F., STEINER U., DEHNE H.W. (1998): Induced resistance: a tool for fungicide resistance management. Pesticide Science, 53: 193-196.

OVADIA A., BITON R., COHEN Y. (2000): Induced resistance to downy mildew and Fusarium wilt in cucurbits. Acta Horticulturae (ISHS), 510: 55-60.

PAJOT E., LE CORRE D., SILUÉ D. (2001): Phytogard and DL-ß-amino butiryc acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L). European Journal of Plant Pathology, 107: 861-869.

PANTER S.N., JONES D.A. (2002): Age related resistance top lant pathogens. Advances in Botanical Research, 38: 251-280.

PAPAVIZAS G. C., DAVEY C. B., (1963): Effect of sulphur-containing amino compounds and related substances on *Aphanomyces* root rot of peas. Phytopathology, 53 : 109-115.

PENNINCKX I.A.M.A., EGGERMONT K., TERRAS F.R.G., THOMMA B.P.H.J., DE SAMBLANX G.W.,BUCHALA A.,METRAUX J.P., MANNERS J.M., BROEKAERT W.F. (1996): Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. Plant Cell, 8: 2309-2323.

PEREZ L., RODRIGUEZ M.E., RODRIGUEZ F., ROSON C. (2003): Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyami f. sp. tabacina*. Crop Protection, 22: 405-413.

PIETERSE CMJ, VAN LOON LC (1999): Salicylic acid-independent plant defence pathways. Trends in Plant Science, 4: 52-58.

PODHRADSZKY J. (1954): A napraforgó új betegsége, a napraforgó-peronoszpóra (*Plasmopara halstedii* (Farl.)Berl. Et de Toni) Magyarországon. Növénytermelés, 3: 129-134.

PRADHANANG P. M., JI P., MOMOL M. T, OLSON S. M., MAYFIELD J. L., JONES J. B. (2005): Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. Plant Disease, 89: 989-993.

PRATS E., RUBIALES D., JORRIN J. (2002): Acibenzolar- S -methyl-induced resistance to sunflower rust (*Puccinia helianthi*) is associated with an enhancement of coumarins on foliar surface. Physiological and Molecular Plant Pathology, 60: 155-162.

PURRINGTON C.B. (2000): Costs of resistance. Current Opinion of Plant Biology, 3: 305-308.

RABE R., KREEB K. H. (1979): Enzyme-activities and chlorophyll and protein-content in plants as indicators of air-pollution. Environmental Pollution, 19: 119–137.

RÁCZ, I. (1996): Bion 50 WG Növényaktivátor. Növényvédelem, 32: 644-646.

RADWAN D.E.M., FAYEZ K.A., MAHMOUD S.Y., HAMAD A., LU G. (2007): Physiological and metabolic changes of *Cucurbita pepo* leaves in response to zucchini yellow mosaic virus

(ZYMV) infection and salicylic acid treatments. Plant Physiology and Biochemistry, 45: 480-489.

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.

RASMUSSEN J. B., HAMMERSCHMIDT R., ZOOK M.N. (1991): Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae pv syringae*. Plant Physiology, 97:1342-1347.

RATHMELL W. G., SEQUEIRA L. (1974): Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. Plant Physiology, 53: 317-318.

REGLINSKI T., LYON G.D., NEWTON A.C. (1994): Assessment of the ability of yeast-derived elicitors to control barley powdery mildew in the field. Journal of Plant Disease and Protection, 101: 1-10.

REGLINSKI T., DANN E., DEVERALL B. (2007): Integration of induced resistance in crop production. In: Induced resistance for plant defence. Eds. Walters D., Newton A., Lyon G. Blackwell Publishing. pp. 201-228.

REUVENI M., ZAHAVI T., COHEN Y. (2001): Controlling downy mildew (*Plasmopara viticola*) in field-grown grapevine with ß-aminobutyric acid (BABA). Phytoparasitica, 29: 125-133.

REYMOND P., BODENHAUSEN N., VAN POECKE R.M.P., KRISHNAMURTHY V., DICKE M., FARMER E.E. (2004): A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. Plant Cell, 16: 3132–3147.

REYMOND P., FARMER E.E. (1998): Jasmonate and salicylate as a global signal for defense gene expression. Current Opinion in Plant Biology, 1: 404-411.

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.

ROJO E, SOLANO R., SÁNCHEZ-SERRANO J.J. (2003): Interactions between singanlling compounds involved in plant defense. Journal of Plant Growth Regulation, 22: 82-98.

ROMERO A. M, RITCHIE D. F. (2001): Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. Plant Disease, 85: 189-194.

ROSENTHAL J.P., DIRZO R. (1997): Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects: Evidence from maizes and wild relatives. Evolutionary Ecology, 11: 337-355.

RUESS W., MUELLER K., KNAUF-BEITER G.; KUNZ W., STAUB T. (1996): Plant activator CGA 245704: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. Brighton Crop Protection Conference- Pest and Diseases, pp. 53-60.

RUPE J.C., GBUR J.E.E. (1995): Effect of plant age, maturity group, and the environment on disease progress of sudden death syndrome of soybean. Plant Disease, 79: 139-143.

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.

RYALS J., UKNES S., WARD E. (1994): Systemic acquired resistance. Plant Physiology, 104: 1109-1112.

SACKSTON W.E. (1981): The sunflower crop and disease: Progress, problems and prospects. Plant Disease, 65: 643-648.

SAGI M., FLUHR R. (2001): Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. Plant Physiology, 126: 1281-1290.

SALIN M. L. (1987): Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. Physiologia Plantarum, 72: 681–689.

SANDERMANN H., ERNST D., HELLER W., LANGEBARTELS C. (1998): Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. Trends in Plant Science, 3: 47-50.

SAUERBORN J., BUSCHMANN K., GHIASI K. G., KOGEL K.-H. (2002): Benzothiadiazole activates reisistance in sunflower (*Helianthus annuus*) to the root-parasitic weed *Orobance cumana*. Phytopathology, 92: 59-64.

SAVULESCU, T. (1941): Die auf Compositen parasitierende *Plasmopara* Arten. Bulletin de la Section Scientifique de l' Academie Roumaine. 24:1-23.

SCANDALIOS J. G. (1990): Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. Advances in Genetics, 28: 1–41.

SCHEIDELER M., SCHLAICH N.L., FELLENBERG.K., BEISSBARTH T., HAUSER N.C., VINGRON M., SLUSARENKO A.J., HOHEISEL J.D. (2002): Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. Journal of Biological Chemistry, 277: 10555-10561.

SCHENK P.M., KAZAN K., WILSON I., ANDERSON J.P., RICHMOND T., SOMERVILLE S.C., MANNERS J.M. (2000):Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97, pp.11655-11660.

SCHWEIZER P., SCHLAGENHAUF E., SCHAFFRATH U., DUDLER R. (1999): Different patterns of host genes are induced in rice by *Pseudomonas syringae*, a biological inducer of

resistance, and the chemical inducer benzothiadiazole (BTH). European Journal of Plant Pathology, 105: 659-665.

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.

SEQUEIRA L. (1983): Mechanisms of induced resistance in plants. Annual Review of Microbiology, 37: 51-79.

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.

SHAH J, TSUI F, KLESSIG DF. (1997): Characterization of a salicylic acidinsensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. Molecular Plant-Microbe Interactions 10: 69-78.

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.

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. Physiological and Molecular Plant Pathology, 56: 95-106.

SILUÉ D., PAJOT E., COHEN Y. (2002): Induction of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower by DL-β-amino-n-butanoic acid (BABA). Plant Pathology, 51: 97–102.

SIMMS E.L., FRITZ R.S. (1990): The ecology and evolution of host-plant resistance to insects. Trends in Ecology and Evolution, 5: 356-360.

ŠKORIĆ, D., (1992): Achievements and future directions of sunflower breeding. Field Crops Research 30(3-4): 231-371.

SOLIS J., MEDRANO G., GHISLAIN M. (2007): Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. Journal of Plant Physiology, 164: 1071-1082.

SOMSSICH I.E., HAHLBROCK K. (1998): Pathogen defence in plants — a paradigm of biological complexity. Trends in Plant Science, 3: 86-90.

SPRING, O. (2000): Homothallic sexual reproduction in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew of sunflower. Helia, 32: 19-26.

SPRING O., BENZ, A., FAUST V. (1991): Impact of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) infection on the development and metabolism of sunflower. Journal of Plant Diseases and Protection, 98: 597-604.

STADNIK M.J., BUCHENAUER H. (1999): Control of wheat diseases by a benzothiadiazole-derivative and modern fungicides. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection, 106: 466-475.

STADNIK M.J., BUCHENAUER H. (2000): Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase supresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis f.sp. tritici.* Physiological and Molecular Plant Pathology, 57: 25-34.

STICHER L.B., MAUCH-MANI B., MÉTRAUX J.P. (1997): Systemic acquired resistance. Annual review of Phytopathology, 35: 235-270.

STROBEL N.E., KUC J. (1995): Chemical and biological inducers of systemic resistance to pathogens protect cucumber and tobacco plants from damage caused by paraquat and cupric chlorid. Phytopathology, 85:1306-1310.

TEGELBERG R., JULKUNEN-TIITTO R., VARTIAINEN M., PAUNONEN R., ROUSI M., KELLOMAKI S. (2008): Exposures to elevated CO_2, 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.

THOMMA B.P.H.J., PENNINCKX I.A.M.A., BROEKAERT W.F., CAMMUE B.T.A. (2001): The complexity of disease signalling in Arabidopsis. Current Opinion in Immunology 13, 63-68.

TOLBERT N.E. (1973): Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. Plant Physiology, 51: 234-244.

TOLBERT N.E. (1981): Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. Annual Review of Biochemistry, 50: 133-157.

TON J., JAKAB G., TOQUIN V., FLORS V., IAVICOLI A., MAEDER M.N., MÉTRAUX J.-P., MAUCH-MANI B. (2005): Dissecting the ß-aminobutyric acid- induced priming phenomenon is Arabidopsis. Plant Cell, 17: 987-999.

TON J., MAUCH –MANI B. (2004): ß -amino-butiryc acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. Plant Journal, 38: 119-130.

TOSI L., LUIGETTI R., ZAZZERINI A. (1998): Induced resistance against *Plasmopara helianthi* in sunflower plants by DL-ß-amino-n-butyric acid. Journal of Phytopathology, 146: 295-299.

TOSI L., LUIGETTI R., ZAZZERINI A. (1999): Benzothiadiazole induces resistance to *Plasmopara helianthi* in sunflower plants. Journal of Phytopathology, 147: 365-370.

TOSI L., ZAZZERINI A. (2000): Interactions between *Plasmopara helianthi*, *Glomus mosseae* and two plant activators in sunflower plants. European Journal of Plant Pathology, 106: 735–744.

TOURVIEILLE (2008): Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). Euphytica, 164: 433-444.

TUZUN S., KLOEPPER J. (1995): Practical application and implementation of induced resistance. In: Hammerschmidt R, Kuc J, eds. Induced Resistance to Disease in Plants. Dodrecht: Kluwer Academic, 152-168.

URDANGARÍN M., NORERO N. S., BROEKAERT W. F., DE LA CANAL L. (2000): A defensin gene expressed in sunflower inflorescence. Plant Physiology and Biochemistry, 38: 253-258.

VALLAD G.E., GOODMAN R.M. (2004): Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. Crop Science, 44: 1920-1934.

VAN ASSCHE F., CLIJSTERS H. (1990): Effects of metals on enzyme-activity in plants. Plant, Cell and Environment, 13: 195–206.

VAN KUIJK, F.J.G.M., SEVANIAN, A., HANDELMAN, G.J., AND DRATZ, E.A. (1987): A new role for phospholipase A_2: protection of membranes from lipid peroxidation damage. Trends in Biochemical Science, 12: 31-34.

VAN LOON L.C. (1997): Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal of Plant Pathology, 103: 753-765.

VAN LOON L.C., BAKKER P.A.H.M., PIETERSE C.M.J. (1998): Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, 103: 753-765.

VAN WEES S.C.M., LUIJENDIJK M., SMOORENBURG. I., VAN LOON C.L., PIETERSE C.M.J. (1999): Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene Atvsp upon challenge. Plant Molecular Biology, 41: 537–549.

VERNOOIJ, B., FRIEDRICH, L., AHL GOY, P., STAUB, T., KESSMANN, H., RYALS, J. (1995): 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. Molecular Plant-Microbe Interaction, 8: 228-234.

VIRÁNYI, F. (1979): A napraforgó-peronoszpóra szisztémikus fertőzésének a mechanizmusa fogékony és rezisztens fajtákon. Kandidátusi értekezés, Budapest. pp 45.

VIRÁNYI, F. (1999a): Mit kell tudni a napraforgó-peronoszpóráról? Agrofórum 10: 23-25.

VIRÁNYI, F. (1999b): Miért kell ismét beszélni a napraforgó-peronoszpóráról? Agrofórum, 4: 64-67.

VIRÁNYI, F., GULYA, T. (1995): Inter-isolate variation for virulence in *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) from Hungary. Plant Pathology, 44: 619-624.

VIRÁNYI F., GULYA T. (1996): Expression of resistance in the *Plasmopara halstedii*-sunflower pathosystem. ISA Symposium I. Disease Tolerance in Sunflower, Bejing, 13 June 1996, pp. 14–21.

WALCZ I., BOGÁR K., VIRÁNYI F. (2000): Study onan Ambrosia isolate of *Plasmopara halstedii*. Helia, 23: 19–24.

WARD E.R., UKNES S.J., WILLIAMS S.C., DINCHER S.S., RYALS, J.A. (1991): Coordinate gene activity in response to against that induce systemic acquired resistance. Plant Cell, 3: 1085-1094.

WHITE R. F (1979): Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology, 99: 410-412.

WILLINGHAM S.L., PEGG K.G., LANGDON W.B., COOKE A.W., PEASLEY D., MCLENNAN R. (2002): Combinations of strobilurin fungicides and acibenzolar (Bion) to reduce scab on passionfruit caused by *Cladosporium oxysporum*. Australian Plant Pathology, 31: 333-336.

WILLEKENS H., CHAMNONGPOL S., DAVEY M., SCHRAUDNER M., LANGEBARTELS C., VAN MONTAGU M., INZÉ D., VAN CAMP W. (1997): Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C_3 plants. EMBO Journal, 16: 4806–4816.

WILLEKENS H., INZÉ D., VAN MONTAGU M., VAN CAMP W. (1995): Catalases in plants. Molecular Breeding, 1: 207–228.

WILLIAMS E. B., KUC J. (1969): Resistance in malus to *Venturia inequalis*. Annual Review of Phytopathology, 7: 223-246.

YONG-HONG G.E., YANG B.I., XUAN L.I., MEI L.I. (2008): Induces resistance against fusarium and pink rots by acibenzolar-S-methyl in harvested muskmelon (cv. Yindi). Agricultural Sciences in China, 7: 58-64.

YU G.Y., MUEHLBAUER G.J. (2001): Benzothiadiazole-induced gene expression in wheat spikes does not provide resistance to fusarium head blight. Physiological and Molecular Plant Pathology, 59: 129-136.

ZHANG S., REDDY M.S., KOKALIS-BURELLE N., WELLS L.W., NIGHTENGALE S.P., KLOEPPER J.W. (2001): Lack of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth promoting rhizobacteria and chemical elicitors. Plant Disease, 85: 879-884.

ZIADI S., BARBEDETTE S., GODARD J.F., MONOT C., LE CORRE D., SILUE D. (2001): Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea var. botrytis*)-downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. Plant Pathology, 50:579-586.

ZIMMERLI L., JAKAB G., MÉTRAUX J.-P, MAUCH-MANI B. (2000): Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by ß-aminobutyric acid. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 97, 12920-12925.

M2. Az RNeasy Mini Kit (Qiagen) leírása

Protokoll növényi sejtekhez, szövetekhez és gombákhoz:

1. A sejtek feltárásához 0,1 gramm növényi szövetet porítsunk el folyékony nitrogénben.
2. Helyezzük a mintákat 2 ml-es Eppendorf-csövekbe, adjunk hozzá 450 µl RLT puffert és vortexeljük.
3. A sejt bomlásterméket a QIAshredder csőbe helyezzük és centrifugáljuk 2 percig teljes sebességgel. A felülúszót egy új Eppendorf-csőbe helyezzük a keletkezett pellet megsértése nélkül. Ezt a felülúszót használjuk a további lépésekben.
4. Adjunk hozzá 0,5 térfogatnyi (96-100% -os) etanolt, és keverjük össze pipetta segítségével.
5. Helyezzük át a mintát (az esetlegesen az etanol hatására keletkezett csapadékkal együtt az RNeasy spin oszlopra, amely alá már bekészítettük a 2 ml-es gyűjtőcsövet. Csukjuk be óvatosan a fedelét, majd centrifugáljuk 12 másodpercig 8000 x g-vel (10 000 rpm). Dobjuk ki a felülúszót.
6. Mérjünk 700 µl RW1 puffert az RNeasy spin oszlopra. Óvatosan csukjuk le a fedelét és centrifugáljuk 15 másodpercig 8000x g-vel (10 000 rpm), hogy lemossuk a spin oszlop membránját. Dobjuk ki a felülúszót.
7. Adjunk 500 µl PRE puffert az RNeasy spin oszlopra, csukjuk le óvatosan a fedelét és centrifugáljuk 15 másodpercig 8000x g-vel (10 000 rpm), hogy lemossuk a spin oszlop membránját. Dobjuk ki a felülúszót.
8. Adjunk újabb 500 µl PRE puffert az RNeasy spin oszlopra, csukjuk le óvatosan a fedelét és centrifugáljuk 15 másodpercig 8000x g-vel (10 000 rpm), hogy lemossuk a spin oszlop membránját. Dobjuk ki a felülúszót.
9. Rakjuk az RNeasy spin oszlopot egy új 2 ml-es Eppendorf-csőbe, és centrifugáljuk teljes sebességen 1 percig.
10. Helyezzük az RNeasy spin oszlopot egy új 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe. Mérjünk 30-50 µl RNáz-mentes vizet közvetlenül az oszlop membránjára. Csukjuk le óvatosan a fedelét és centrifugáljuk 1 percig 8000x g-vel (10 000 rpm), hogy kinyerjük az RNS-t.
11. Az előző lépést meg lehet ismételni újabb 30-50 µl RNáz-mentes vízzel. Az előző lépésben kinyert vizet is fel lehet használni, ha magas RNS koncentrációt szeretnénk elérni.

M3. Az iScript cDNS szintézis kit (BioRad) leírása

Összetevők	**1 reakcióra vonatkoztatott mennyiség**
5x iScript Reakció Mix	4 µl
iScript Reverz Transzkriptáz	1 µl
Nukleáz mentes víz	x µl
RNS minta (100fg-tól 1 µg totál RNS)	x µl
Teljes mennyiség	20 µl

Reakció protokoll

Inkubáljuk a teljes reakció keveréket:

5 percig 25 °C-on
30 percig 42 °C-on
5 percig 85 °C-on
Tartsuk ezután 4°C-on

M4. Taq DNS polimeráz protokoll (Fermentas) PCR vizsgálathoz

Összetevők	**Végső koncentráció**
Nukleáz mentes víz	-
10x Taq puffer	1x
2mM dNTP mix	0,2 mM/5 µl
Primer I.	0,1-1 µM
Primer II.	0,1-1 µM
Taq DNS polimeráz	1,25u/50 µl
25mM $MgCl_2$	1-4 mM
DNS minta	10pg-1 µg/50 µl

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani dr. Virányi Ferenc tanár úrnak, témavezetőmnek, hogy munkámban mindig segítségemre volt, támogatott. Köszönetemet szeretném kifejezni dr. Barna Balázsnak, társ-témavezetőmnek, az eredmények értékelésben és közlésében nyújtott nélkülözhetetlen szakmai segítséget. Szeretnék továbbá köszönetet mondani dr. Kiss József tanár úrnak, hogy lehetővé tette, hogy doktori munkámat a Szent István Egyetem Növényvédelmi Intézetében végezhettem, valamint a Növényvédelmi Intézet minden dolgozójának az emberi, szakmai segítségért. Külön szeretném köszönetemet kifejezni dr. Turóczi Györgynek, aki lehetővé tette, hogy a disszertációmat be tudjam fejezni a munkám mellett.

Szeretném megköszönni Komjáti Hedvignek és dr. Fodor Józsefnek mindazt a segítséget és időt, melyet arra szántak, hogy megtanítsák a molekuláris genetikai valamint az enzimmérés módszereinek ismereteit.

Szeretném köszönetemet kifejezni Lázár Nellinek, aki a metszetkészítésben és a mikroszkópos értékelésben nagy segítségemre volt. Köszönöm Bodzsár Nórának a sok szakmai és lelki segítséget, amellyel előremozdította munkámat.

Doktori munkám nem jött volna létre, ha nem áll mögöttem a családom; szüleim és Márti, akik mindig jó szóval, lelkesedéssel támogattak, valamint Krisztián, aki nyugodt és biztos hátteret termetett a munkámhoz.