

A jelentett pályázat címe:

A reaktív oxigénfajták szerepe vírus és gomba kórokozók limitálásában rezisztens növényekben

Bevezetés

A betegség-rezisztens növényekben a fertőző vírusok, baktériumok és gombák gátlást szenvednek vagy elpusztulnak. Ez akkor következik be, ha a kórokozó effektora és a rezisztens növény receptora inkompatibilis kölcsönhatásba lép egymással. A korábbi években több teória látott napvilágot, amelyek az ellenállóság mechanizmusára kíséreltek meg magyarázatot adni (cf. Király et al., 2013a). Legismertebbek a hiperszenzitív reakció (HR), fitoalexinek gátló hatása, sejtfalmódosulások, reaktív oxigén fajták (ROS) gombaölő, baktériumölő hatása. A kórokozó és növény kölcsönhatásának genetikai szempontjait igen sikeresen dolgozták ki a kutatók (cf. Schulze-Lefert és Bieri, 2005, Maekewa et al., 2011), de azok a bizonyítékok, amelyek közvetlenül adtak volna magyarázatot a kórokozók előlésének mechanizmusára a rezisztens növényben, hiányoztak és jelenleg is hiányoznak. Újabbban a kutatás homlokterébe került a reaktív oxigénfajták (ROS) szerepének tisztázása mind az állati, mind a növényi immunitással kapcsolatban. Ennek egyik oka az, hogy a humán vagy állati fagocitózis mechanizmusa és a ROS-felhalmozódás között ok-okozati összefüggést mutattak ki (Morel et al., 1991). Továbbá néhány növényi immunitási folyamatban bizonyíthatóan felhalmozódott valamelyik ROS (szuperoxid, hidrogén-peroxid, hidroxil gyök) (cf. Doke, 1983, Ádám et al., 1989, Baker és Orlandi, 1995, Torres et al., 2006, Shang et al., 2010). Az is kiderült, hogy a felhalmozódó ROS megvédheti a növényeket egy később bekövetkező fertőzéstől. Így lehetségessé vált az, hogy külső ROS-kezelésekkel megvédjük a növényeket egy később bekövetkező fertőzéstől (Hafez és Király, 2003, El-Zahaby et al., 2004). Arra is felhívtuk a figyelmet, hogy igen enyhe ROS-kezelésekkel immunizálhatjuk a növényeket olyan betegségek ellen, amelyeknek tünetei szöveti nekrozisokkal járnak együtt (Hafez et al., 2012). Úgy tűnik tehát, hogy az állati fagocitózis és a növényi immunitás analóg folyamatok.

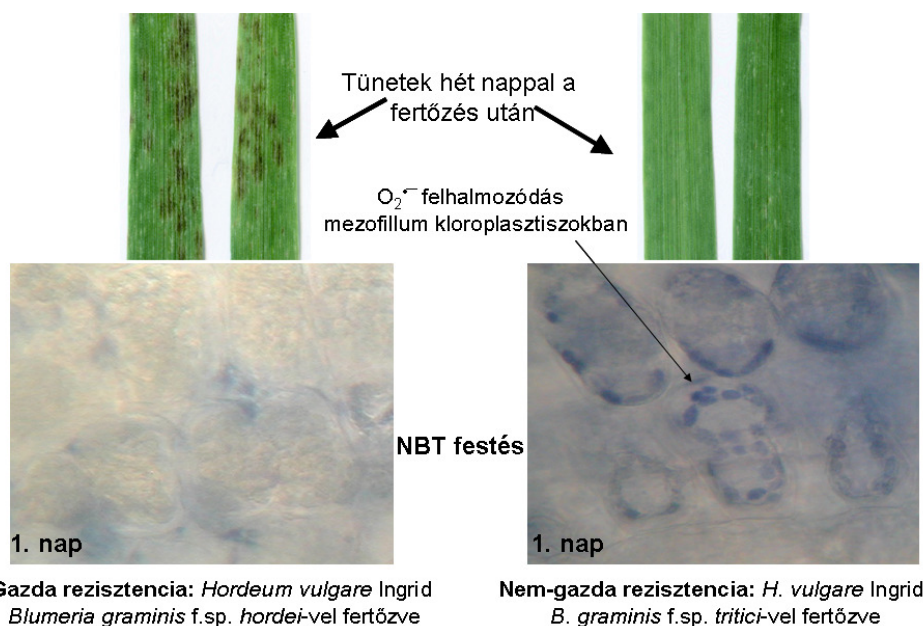
Jelen pályázatunkban arra vállalkoztunk, hogy újabb rezisztencia-típusok elemzésével tisztázzuk azt, hogy ezekben az esetekben a kórokozók gátlása vagy előlése ok-okozati összefüggésben van-e a reaktív oxigénfajták káros hatásával.

Különböző típusú reaktív oxigénfajták felhalmozódása a rezisztens növényekben

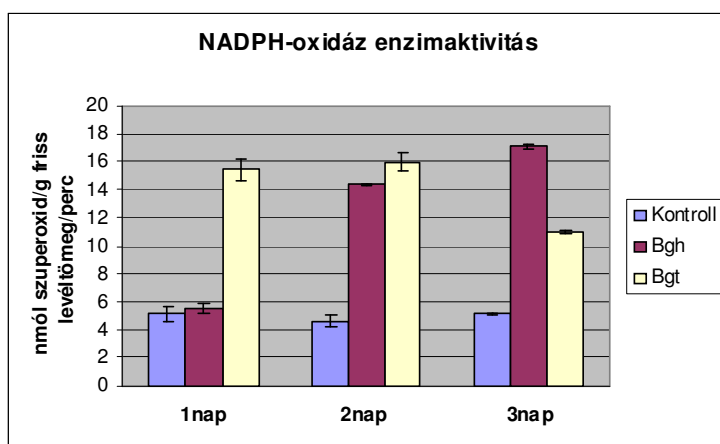
Egy korábbi OTKA projekt (AT048866) keretében felismertük, valamint egy újabb publikációban (Király et al., 2013a) közzeltük azt a törvényszerű jelenséget, hogy a liztharmat-rezisztens gazdanövényekben a fertőzés után szuperoxid (O_2^-) halmozódik fel, a liztharmat-rezisztens nem-gazda árpa növényben a O_2^- igen korán akkumulálódik, a fogékonyakban azonban nincs O_2^- -felhalmozódás. Ennek az oxigén szabadgyököknek a jelenlétét NBT (nitroblue tetrazolium klorid) festéssel határoztuk meg az árpalevelekben.

Az újabb, fénymikroszkópos vizsgálataink azt mutatták, hogy az általában tünetmentes nem-gazda rezisztencia esetében a O_2^- nem az inkompatibilis kórokozó liztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) behatolási helyén, az epidermiszben akkumulálódik, hanem a mezofillum sejtszövetének kloroplastjaiban. Ha azonban a liztharmat-rezisztens árpát saját liztharmat gombájával (*B. graminis* f. sp. *hordei*) fertőzzük (HR-típusú lokális nekrotikus

tünetek), a mezofillum sejtekben nincs, vagy alig van O_2^- akkumuláció (**1. ábra**). Érdekes, hogy eredményeink szerint a O_2^- termelésért felelős egyik legfontosabb enzim, a NADPH-oxidáz aktivitása jól korrelál a nem-gazda rezisztencia során megfigyelt korai O_2^- felhalmozódással (**2. ábra**).

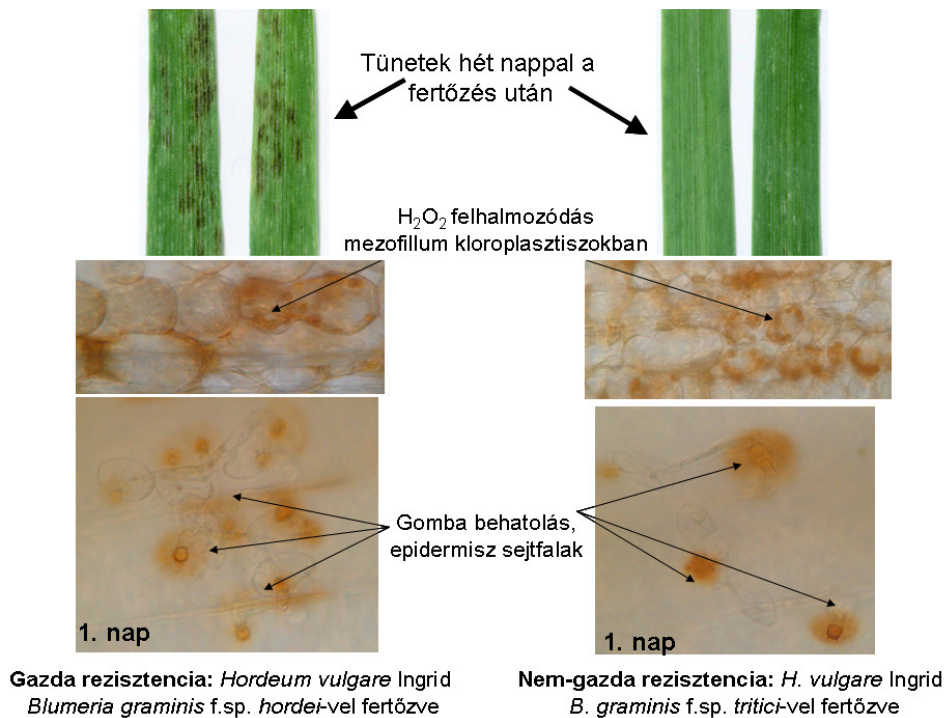


1. ábra. Korai szuperoxid (O_2^-) felhalmozódás nem-gazda rezisztencia során, lisztharmattal fertőzött árpa (*Hordeum vulgare* cv. Ingrid *Mla*) levelekben, a mezofillum sejtek kloroplasztisaiban. A szuperoxidot NBT (nitroblue tetrazolium klorid) festéssel detektáltuk.



2. ábra. A szuperoxid (O_2^-) termelésért felelős egyik legfontosabb enzim, a NADPH-oxidáz aktivitása jól korrelál a nem-gazda rezisztencia során megfigyelt korai O_2^- felhalmozódással (enzimaktivitások a lisztharmat-fertőzést követő három napon). Kontroll = fertőzetlen árpa (cv. Ingrid *Mla*). Bgh = árpa (cv. Ingrid *Mla*) árpalisztharmattal (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzve (gazda rezisztencia). Bgt = árpa (cv. Ingrid *Mla*) búzalisztharmattal (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, magyar izolátum) fertőzve (nem-gazda rezisztencia).

Jelen projekt keretében az említett növény/kórokozó kapcsolatokban egy másik ROS, a hidrogén-peroxid (H_2O_2) felhalmozódását is figyelemmel kísértük diamino-benzidines (DAB) festés segítségével. Ezek szerint a H_2O_2 akkumulációja mindkét esetben (gazda rezisztencia és nem-gazda rezisztencia) a fertőzés után egy nappal a mezofillum kloroplasztiszokban és az epidermiszben a gomba behatolás pontjain valamint az epidermisz sejtfalakban is jól látszik. Az intenzívebb H_2O_2 felhalmozódás azonban a gazda rezisztenciánál, és nem a nem-gazda rezisztenciánál észlelhető (**3. ábra**).



3. ábra. Korai hidrogén-peroxid (H_2O_2) felhalmozódás gazda rezisztencia során, lisztharmattal fertőzött árpa (*Hordeum vulgare* cv. Ingrid Mla) levelekben, a mezofillum sejtek kloroplasztiszaiban és az epidermiszben a gomba behatolás pontjain, valamint az epidermisz sejtfaalakban. A hidrogén-peroxidot DAB (diamino-benzidin) festéssel detektáltuk.

Összefoglalva, az árpa mezofillum kloroplasztiszokban detektálható korai O_2^- -felhalmozódás a búza lisztharmattal szembeni tünetmentes nem-gazda rezisztencia markere, míg az epidermiszben felhalmozódó H_2O_2 a gazda rezisztenciát jelzi, HR (lokális nekrotízis) tünetekkel (Künstler et al., 2012).

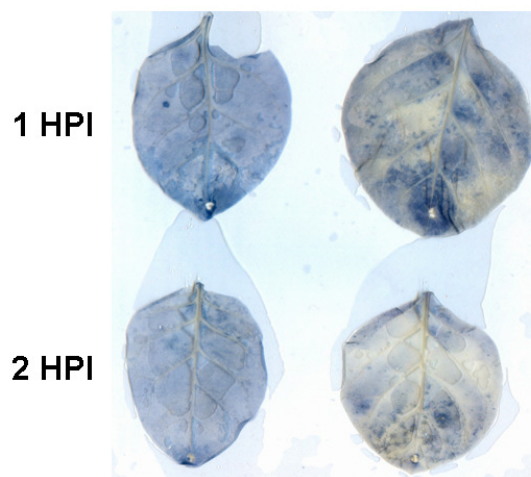
Az extrém rezisztenciát kódoló *Rx1* gén hatása a O_2^- akkumulációra

A burgonyában a burgonya X vírus (*Potato virus X*) elleni extrém ellenállóságot az *Rx* gének (*Rx1* és *Rx2*) biztosítják. Ez az ellenálló képesség olyan hatásos, hogy a szokványos rezisztenciára jellemző HR típusú nekrotikus foltok sem jelennek meg a fertőzött rezisztens leveleken, vagyis a növény tünetmentes. Bendahmane et al. (1999) feltételezte, hogy a HR nekrotikus foltok azért nem jelennek meg az extrém rezisztencia esetében, mert az *Rx* gének hatására a kórokozó vírust a növény igen korán gátolja, ill. előli, emiatt korai tünetmentesség áll elő.

A kérdés megvilágítása érdekében a következő kísérletet végeztük el. Olyan transzgenikus Samsun dohányfajtát alkalmaztunk, amely a burgonyából származó *Rx1* gént is tartalmazta. Ezt a genotípust összehasonlítottuk az *Rx1* gént nem hordozó kontroll genotípussal. Mindkét genotípust megfertőztük a burgonya X vírussal, és vizsgáltuk a O_2^- akkumulációjának időpontját és intenzitását. Előzetes kísérletek szerint az extrém rezisztencia-gént kifejező genotípusban PVX fertőzés után már pár órával a O_2^- akkumulációja intenzívebb, mint a kontroll genotípusban (**4. ábra**). A O_2^- -akkumuláció és a korai vírus-gátlás, ill. tünetmentesség közötti korreláció indokolhatja azt, hogy az intenzív O_2^- -akkumulációval magyarázzuk az extrém rezisztencia mechanizmusát.

cv. Samsun NN Rx1

cv. Samsun NN



4. ábra. Szuperoxid (O_2^-) felhalmozódása az *Rx1* extrém rezisztencia-gént kifejező dohány genotípusban (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN *Rx1*) és a kontroll növényekben (*N. tabacum* cv. Samsun NN) a burgonya X vírus (PVX) Ny törzsével történő mechanikai fertőzés után egy és két órával. A szuperoxidot NBT (nitroblue tetrazolium klorid) festéssel detektáltuk.

A keszthelyi burgonyafajtákra jellemző, burgonya X vírus ellen ható rezisztenciagén azonosítása

A keszthelyi Burgonyakutatási Központban folyó több évtizedes nemesítési munka eredményeként számos kiváló beltartalmi értékekkel és kiemelkedő rezisztencia tulajdonságokkal rendelkező fajtát állítottak elő. A rezisztenciagének többsége vad *Solanum* fajokból származik. A burgonyatermesztésben jelentős károkat okozó burgonya X vírus (PVX) elleni extrém rezisztencia kialakítására az *Rx2* extrém rezisztencia gént hordozó *Solanum acaule* és az *Rx1* gént hordozó *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* fajokat használták. Az azonban nem volt ismeretes, hogy a minősített fajták melyik vad fajból származó rezisztencia gént hordozzák. Ennek ismerete ugyanakkor szükséges lenne a nemesítési, valamint az annak hatékonyságát növelő marker alapú szelekciós munkákhoz.

Mindezek tükrében a jelen kutatási program célja egyrészt a Keszthelyen nemesített burgonya fajtákban jelen lévő, a PVX-el szemben extrém rezisztenciát biztosító gén eredetének faj szintű meghatározása, másrészt a rezisztencia működésének jellemzése volt.

1. Burgonya genotípusok burgonya X-vírussal (PVX) szembeni rezisztenciájának vizsgálata

A kísérletben a rezisztencia forrásának, illetve mechanizmusának vizsgálata szempontjából potenciálisan számba vehető genotípusokat vizsgáltuk mesterséges mechanikai fertőzéssel, illetve a második fázisban kertészeti oltással.

1.1 A rezisztencia vizsgálata mechanikai inokulációval

A rezisztencia meghatározásához a burgonya X-vírus burgonyából származó Ny izolátumát használtuk (az izolátumot dr. Salamon Pál bocsátotta rendelkezésünkre). A vírust *Nicotiana tabacum* Xanthi-nc növényekben felszaporítottuk. A kísérletben genotípusonként 10 növényt inokuláltunk foszfát puffer (pH 7,0) /üvegspatula/karborundum por módszerrel. A fertőzést követően 4 hét után ELISA módszerrel (Loewe Biochemica GmbH poliklonális antitestet alkalmazva) ellenőriztük a növények vírusfertőzöttségét.

A vizsgálatban egyértelműen fogékonynak bizonyult a Démon, a 06.325 (Botond) és a Somogyi kifli (1. táblázat). Rezisztensnek, illetve az eredmények megerősítése érdekében kertészeti oltással vizsgálandónak bizonyult a White Lady, Luca, Lorett, Balatoni rózsza, Katica és Hópehely fajta. Oltással vizsgáltuk továbbá az *Rx1* gént tartalmazó Cara burgonyafajtát.

1. táblázat. A Démon, Botond, Somogyi kifli fajták fogékonysága és a White Lady rezisztenciája PVX Ny ellen a mechanikai inokulációt követő ELISA-vizsgálatban.

Növény	ELISA extinkciós érték fajtánként és növényenként			
	Démon	Botond	Somogyi kifli	White Lady
1	2,549	1,235	0,962	0,007
2	2,162	1,068	1,125	0,007
3	1,298	1,272	0,204	0,008
4	1,199	1,623	1,235	0,024
5	0,066	1,136	1,464	0,019
6	1,449	1,478	1,879	0,00065
7	0,907	1,425	1,15	0,001
8	1,137	1,712	1,194	0,002
9	1,073	1,265	1,095	-0,00065
10	2,03	0,011	0,965	-0,003
Átlag	1,387	1,2225	1,1273	0,0065
Fertőzési határérték	0,027			

1.2 A rezisztencia vizsgálata kertészeti oltással

A kísérletben *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers növényeket fertőztünk a PVX Ny vírus izolátummal, majd a fertőzést követő második héten a fertőzött növényekre vírusmentes burgonya növények oltóágát illetve a paradicsom növények oltóágát vírusmentes burgonya növényekre oltottuk. Az oltást követő ötödik héten ELISA módszerrel (Loewe Biochemica GmbH poliklonális antitest) vizsgáltuk a vírusfertőzöttséget az alanyokban és az oltóágakban. Az oltáshoz végzett inokulációt követően a paradicsom növények tipikus mozaikos tüneteket mutattak.

1.2.1 Keszthelyi nemesítésű burgonyafajták vizsgálata

A vizsgálatban a Luca, Lorett és Hópehely fajták rezisztensnek, a Balatoni rózsza és Katica fajták eltérő mértékben ugyan, de fogékonynak bizonyultak (2. táblázat).

2. táblázat. A fajták fogékonysága, illetve rezisztenciája a kertészeti oltást követő ELISA-vizsgálatban.

Vizsgált fajta	Növény	ELISA Extinkciós érték			
		Átlag	Minimum	Maximum	Fertőzési határ
Luca	Paradicsom	2,35	1,87	2,9	0,09
	Burgonya	0,04	0,01	0,08	
Lorett	Paradicsom	1,96	1,71	2,36	0,09
	Burgonya	0,04	0,01	0,07	

Hópehely	Paradicsom	1,32	0,68	2,03	0,1
	Burgonya	0,08	0,01	0,22	
Balatoni rózsa	Paradicsom	1,3	0,9	1,7	0,186
	Burgonya	0,82	0,06	1,44	
Katica	Paradicsom	1,99	1,62	2,35	0,09
	Burgonya	1,55	0,78	2,63	

1.2.2 A készthelyi nemesítésű White Lady burgonyafajta vizsgálata

Az ELISA-vizsgálatban Neogen (Adgen) Ltd monoklonális antitestét, valamint a biotesztben lokálléziós gazdaként *Gomphrena globosa* tesztnövény leválasztott leveleit használtuk.

A vizsgálatban a paradicsom oltóágakból és alanyokból ELISA módszerrel és bioteszttel (egy kivétellel) minden esetben, a White Lady fajtánál egyik esetben sem tudtuk a vírust kimutatni (3. táblázat).

3. táblázat. A White Lady burgonyafajta rezisztenciája PVX Ny ellen (ELISA és bioteszt vizsgálatok eredménye)

A vizsgált növényi rész	ELISA extinkciós érték	Bioteszt
	Neogen Mab	Léziószám db/ 8 cm ²
1. White Lady alany	0,0115	0
Paradicsom oltóág	1,09	16
Paradicsom alany	1,1735	16,5
White Lady oltóág	0,0245	0
2. White Lady alany	<0	0
Paradicsom oltóág	1,03	18
Paradicsom alany	1,561	12
White Lady oltóág	0,0125	0
3. White Lady alany	0,002	0
Paradicsom oltóág	1,241	0
Paradicsom alany	1,395	6
White Lady oltóág	0,038	0
4. White Lady alany	<0	0
Paradicsom oltóág	1,1135	12
Paradicsom alany	1,3085	8,5
White Lady oltóág	0,007	0
5. White Lady alany	<0	0
Paradicsom oltóág	1,547	8,5
Paradicsom alany	1,2305	16,5
White Lady oltóág	0,0275	0
Fertőzési határ	0,3238	

A vizsgálatok alapján a White Lady burgonyafajta burgonya X-vírussal szembeni extrém rezisztenciája igazoltnak tekinthető.

1.2.3 A Cara burgonyafajta rezisztenciájának vizsgálata

Solanum lycopersicum cv. Rutgers növényeket fertőztünk a PVX Ny vírus izolátummal, majd a fertőzést követő második héten a fertőzött növényekre Cara burgonya növények oltóágát, illetve a paradicsom növények oltóágát Cara növényekre oltottuk. Az oltást követő ötödik héten ELISA módszerrel (Loewe Biochemica GmbH poliklonális antitest) vizsgáltuk a vírusszennyeződést az alanyokban és az oltóágokban.

Az oltáshoz végzett inokulációt követően a paradicsom növények tipikus mozaikos tüneteket mutattak. A vizsgálatban a paradicsom oltóágakból és alanyokból ELISA módszerrel minden esetben, a Cara fajtánál egyik esetben sem tudtuk a vírust kimutatni (4. táblázat).

4. táblázat. A Cara burgonyafajta rezisztenciája PVX Ny ellen (ELISA eredmények)

A vizsgált növényi rész	ELISA extinkciós érték
Par. alany	1,789
Cara oltóág	0,048
Cara alany	0,101
Par. oltóág	1,789
Par alany	1,789
Cara oltóág	0,273
Cara alany	0,171
Par. oltóág	1,649
Par. alany	1,68
Cara oltóág	0,068
Cara alany	0,104
Par. oltóág	1,768
Par. alany	1,789
Cara oltóág	0,099
Cara alany	0,052
Par. oltóág	1,742
Par. alany	1,732
Cara oltóág	0,11
Cara alany	0,054
Par. oltóág	1,789
Fertőzési határ	0,1785

A rezisztenciavizsgálattal párhuzamosan szövettenyésztés, hőterápia és kemoterápia egyidejű alkalmazásával sikeresen elvégeztük a Cara burgonyafajta vírusmentesítését burgonya Y- és S-vírusokra. Az eredményeket az 5. táblázat tartalmazza. A további vizsgálatokhoz vírusmentes vonalak állnak rendelkezésre.

5. táblázat. A Cara burgonyafajta vírusmentesítésének eredménye

Növény	ELISA extinkciós érték	
	PVY	PVS
1.	0,024	0,079
2.	0	0,068

3.	0,013	0,091
4.	0,057	0,052
5.	0,045	0,067
6.	0,01	0,05
7.	0,044	0,06
8.	0,003	0,057
Pozitív kontroll	1,786	1,794
Fertőzési határ	0,192	0,2135

1.2.4 A White Lady és Katica burgonyafajták kölcsönhatása PVX-fertőzés esetén

A korábbiakban végzett vizsgálatok alapján extrém rezisztenciával rendelkező White Lady és a fogékony Katica fajta felhasználásával előkíséreltben vizsgáltuk a rezisztens és fogékony genotípus kölcsönhatását kertészeti oltással.

A White Lady burgonyafajta 5 növényét közvetlenül a kertészeti oltás elvégzése előtt PVX Ny izolátummal fertőztünk, 5 növényt pedig fertőzés nélkül oltottunk. A fogékony Katica burgonyafajta oltóágát a White Lady alanyokra, a White Lady növények oltóágát a Katica alanyokra oltottuk.

12 nappal az oltás után valamennyi Katica alanyt és oltóágát a vírus Ny izolátumával mechanikailag felülfertőztük. Az eredményeket a 6. táblázat tartalmazza. Az eredmények alapján a két fajta alkalmas a PVX-el szembeni szisztémikus szerzett rezisztencia működési mechanizmusának vizsgálatára.

6. táblázat. A White Lady és Katica fajták egymásra hatása mesterséges PVX fertőzés esetén.

	ELISA extinkciós érték növényenként					Fertőzött/vizsgált minta
	1	2	3	4	5	
<i>Inokulált White Lady</i>						
White Lady alany	-0,008	-0,003	0,0004	0,01	-0,016	0/5
Katica oltóág	-0,014	2,388	-0,014	2,535	2,102	3/5
Katica alany	-0,011	0,021	n. a.	0,102	2,74	1/4
White Lady	-0,004	-0,007	n. a.	-0,009	0,057	0/4
<i>Nem inokulált</i>						
White Lady alany	-0,001	-0,015	-0,016	-0,015	-0,008	0/5
Katica oltóág	-0,011	2,687	2,865	2,426	2,788	4/5
Katica alany	-0,015	0,136	0,337	n. a.	0,017	1/4
White Lady	-0,011	-0,013	-0,011	n. a.	0,007	0/4

2. A keszthelyi fajtákra jellemző burgonya X vírus rezisztenciagén azonosítása - molekuláris genetikai vizsgálatok

Vizsgálataink során több keszthelyi és külföldi fajtát (pl.: White Lady (WL), Luca XL, Cara, Bzura, Hermes) használtunk fel. A lengyel Bzura fajta bizonyítottan a *S. acaule* eredetű *Rx2* PVX rezisztencia gént, míg a skót Cara a *S. tuberosum ssp. andigena* vad alfajból eredő *Rx1* PVX rezisztencia gént hordozza, így ezeket mint referencia fajtákat használtuk fel vizsgálatainkban. A Hermes fajta fogékony, míg a két keszthelyi nemesítésű fajta a WL, és a Luca XL rezisztens a burgonya X vírussal szemben.

A *S. acaule* vad fajból származó *Rx2* PVX rezisztencia gén kimutatásához az irodalomból ismert a GP21, TG432 (DeJong et al., 1997) és AC15 (Bendahmane et al. 2000) markereket használtuk. A molekuláris vizsgálatok során kapott eredmények azonban nem jelezték egyértelműen az *Rx2* gén jelenlétét vagy hiányát a keszthelyi fajtákban, ugyanis a várt méretű fragmentum a PVX rezisztens genotípusok mellett kimutatható volt a PVX fogékony és az *Rx2* gént hordozó fajtákból is.

A *S. tuberosum ssp. andigena* eredetű *Rx1* rezisztencia gén kimutatásához nyolc, a génnel kapcsolt CAPS markert 77L, 77R, 221R, IPM3, IPM4 (Kanyuka et al., 1999), CP60, GP34 (Bendahmane et al., 1997) használtunk.

Egyes, az *Rx1* génnel kapcsolt markerek alkalmazása során a keszthelyi fajtákban kapott mintázat eltért a Cara fajtában kapott mintázattól, míg más markerek esetén igen komplex mintázatot kaptunk. Ezek az eredmények hasonlóan az *Rx2* gén esetén kapott eredményekhez, nem jelezték egyértelműen az *Rx1* gén jelenlétét vagy hiányát a keszthelyi nemesítési alapanyagban.

Noha az *Rx1* és *Rx2* gének különböző vad burgonya fajokból származnak, mégis 98%-os szekvencia hasonlóságot mutatnak egymással, amely nehezíti megkülönböztetésüket. Elkülönítésükhöz egyik stratégia a PCR-RFLP lehet, ahol a PCR-terméket specifikus restrikciós enzimekkel emésztve tudjuk a két gén közötti néhány nukleotid eltérést kimutatni. Ez a megközelítés azonban költség- és munkaigényes. Olcsóbb és egyszerűbb módszer, ha a különbségeket specifikus primerek tervezésével egyetlen PCR-el azonosíthatjuk.

További munkánk során ezért az *Rx1* (NCBI Acc. No. AJ011801) és *Rx2* (NCBI Acc. No. AJ249448) gének szekvenciája alapján 11 specifikus primer párt terveztünk (8 primer pár az *Rx1* míg 3 primer pár az *Rx2* gén amplifikálásához). Ezeket a primereket teszteltük a referencia és a keszthelyi nemesítésű fajtákon.

Az *Rx1* gén esetében két primer pár (1Rx1 5Rx1) amplifikálta a várt 974 bp és 186 bp hosszúságú fragmentumokat a Cara illetve az *Rx1* gént hordozó fajtákban. Ugyanakkor ezek a fragmentumok nem voltak jelen a Bzura és a keszthelyi nemesítésű fajtákban, valamint hiányoztak az egyéb *Rx2* gént hordozó fajtákból valamint a PVX fogékony fajtákból is.

A PCR során kapott termékeket klónozva és szekvenálva megállapítottuk, hogy a kapott fragmentumok 100%-os egyezőséget mutatnak az *Rx1* gén azon régiójával, amelyekre a primereket terveztük.

Az *Rx2* gén szekvenciája alapján tervezett specifikus primer párok (10Rx2 és a 11Rx2) szintén a megfelelő méretű DNS szakaszt amplifikálták a Bzura és a keszthelyi fajtákban egyaránt, de nem kaptunk terméket a Cara és a fogékony Hermes fajták esetében.

Az eredmények megerősítése érdekében a Bzura és White Lady fajtákban azonosított fragmentumokat klónoztuk és szekvenáltattuk. A szekvenálás eredményei azt mutatták, hogy a primerek által amplifikált fragmentum 100 %-os egyezőséget mutat az *Rx2* génnel. Ez arra enged következtetni, hogy a keszthelyi PVX rezisztens fajták a *S. acaule* vad fajból származó *Rx2* gént hordozzák.

A klónozott szekvencia alapján újabb primereket terveztünk a marker alapú szelekció gyakorlati megvalósítása céljából, amelyeket a Luca XL x W1100 keresztezés 96 F₁, valamint a WL x Kuroda keresztezés 75 F₁ genotípusán teszteltünk le. A molekuláris vizsgálatok során kapott eredmények teljes egyezőséget mutattak a mesterséges fertőzési tesztek ELISA

eredményeivel. A várt termék jelen van minden genotípusban, amelyet a szerológiai tesztek során is rezisztensnek azonosítottunk, és hiányzik minden olyan genotípusból, amely fogékonyak mutatkozott az ELISA tesztek során.

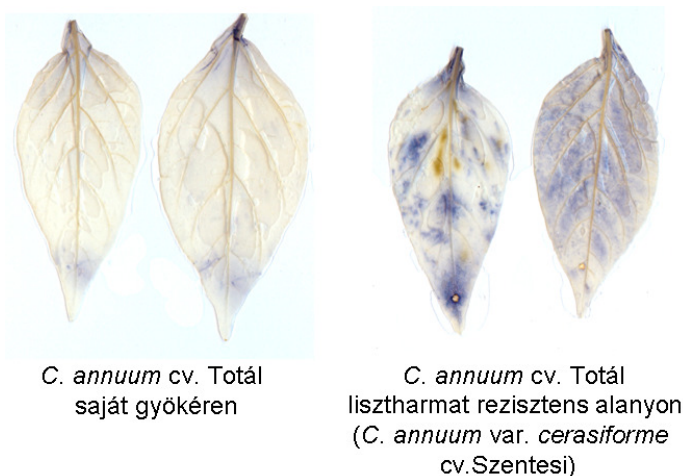
Ezek az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a fejlesztett marker egyrészt alkalmas az *Rx2* gén azonosítására, másrészt hasadó populációkban alkalmas a rezisztenciagén szelekciójára is.

Összefoglalva, noha a rendelkezésünkre álló pedigre információkból arra következtettünk, hogy a keszthelyi nemesítési anyagok a *S. tuberosum* ssp. *andigena* vad alfajból származó *Rx1* extrém rezisztencia gént is hordozhatják, azonban molekuláris vizsgálatokkal egyértelműen sikerült bizonyítanunk, hogy a fajták PVX extrém rezisztenciáját a *S. acaule* vad fajból származó *Rx2* gén biztosítja. Ezen túl kidolgoztunk egy olyan DNS alapú markerszelekciós eljárást, amellyel a nemesítési program megnövelt áteresztő képessége következtében költséghatékonyabbá tehetjük a rezisztencia nemesítés folyamatát.

A rezisztens paprika alanyról a fogékony oltóágra (oltványra) átvitt lisztharmat-rezisztencia egyik meghatározó faktora a O_2^- - felhalmozódás

Kutatási témánk központi kérdése az, hogy a rezisztens növényben mi gátolja vagy öli el a fertőző kórokozót? A reaktív oxigén fajták (ROS) szerepének fontosságára újabb bizonyítékot szolgáltatott egy megfigyelés, amely szerint az ellenálló képesség oltás útján átvihető az ellenálló alanyból a ráoltott fogékony növénybe.

A Szegedi Egyetem Mezőgazdasági Karán (Hódmezővásárhely) kutatási partnerünk, Dr. Lantos Ferenc észlelése alapján a következő kérdés vetődött fel: az étkezési paprika (*Capsicum annuum*), amely fogékony a lisztharmattal (*Leveillula taurica*) szemben, rezisztenssé válik, ha a lisztharmat rezisztens cseresznyepaprikára (*C. annuum* var. *cerasiforme*) oltjuk. Kérdés, hogy ez a rezisztencia milyen mechanizmus szerint valósul meg? Az előzetes kísérletek azt igazolták, hogy ebben az esetben is a kertészeti oltással átvitt valamilyen jel hatására O_2^- halmozódik fel a rezisztens alanyra oltott fogékony oltó-részben, amely ellenállóvá válik (**5. ábra**). A O_2^- -ot NBT festéssel mutattuk ki, amelyet előző kísérleteinkben is alkalmaztunk. Kísérleteinkben az alany a Szentesi Cseresznyepaprika, a ráoltott fogékony étkezési paprika a Szentesi Totál és egy fajta hibrid, a Hó F₁ volt.



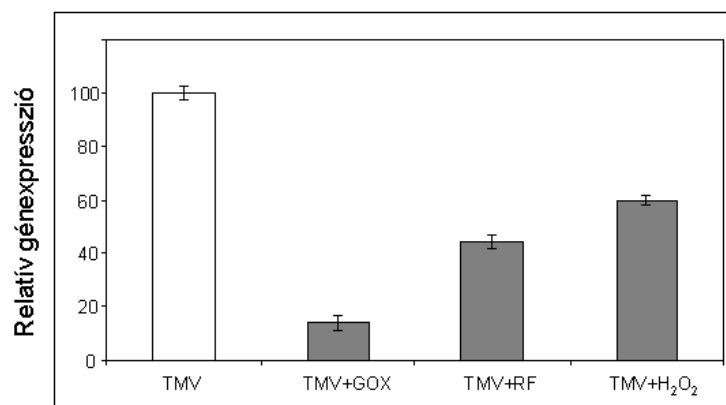
5. ábra. Szuperoxid (O_2^-) felhalmozódása kertészeti oltás hatására a lisztharmatra (*Leveillula taurica*) rezisztens cseresznyepaprika (*C. annuum* var. *cerasiforme* cv. Szentesi) alanyra oltott fogékony étkezési paprikában (*C. annuum* cv. Totál), amely lisztharmat-rezisztenssé válik. A szuperoxidot NBT (nitroblue tetrazolium klorid) festéssel detektáltuk.

Ez a jelenség két szempontból jelentős: egyrészt az oltással átvitt betegség-ellenállóság közvetlen biokémiai oka feltehetően itt is a mikroba-károsító O_2^- , ill. a belőle képződő egyéb reaktív oxigénformák voltak. Továbbá azért is érdekes ez a megfigyelés, mert tudomásunk szerint egyetlen kutatócsoport foglalkozott az immunmemória képesség oltásos átvitelével (Vernooij et al., 1994; Park et al., 2007). Egy másik kutató csoport (Šutić, 1965, Vulić et al., 2013) viszont egy vírus-rezisztencia oltásos átviteléről számolt be. Egyik esetben sem vizsgálták a rezisztencia átvitelének mechanizmusát. A mi esetünkben azt kívánjuk a jövőben kideríteni, hogy milyen transzlokálódó faktor indukálja a O_2^- felhalmozódását az oltványban?

A külsőleg alkalmazott H_2O_2 vagy a különböző ROS-képző vegyületek hatása a rezisztencia fokozására

Előző kísérleteinkben már felhívtuk a figyelmet arra, hogy fogékony árpa növényekben lisztharman rezisztenciát lehet indukálni, ha külsőleg 50 mM-os hidrogén-peroxid (H_2O_2) oldattal kezeljük a leveleket. Azt is kimutattuk, hogy ha a leveleket fertőzés előtt ROS-képző kemikáliákkal kezeljük (pl. riboflavin-metionin vagy xanthin-xanthinoxidáz), a fertőzés után nem jelennek meg a fogékonysági betegségektől, hanem HR típusú nekrozisok képződnek, amelyek a rezisztenciára jellemzőek. Ezt az indukált rezisztenciát antioxidánsokkal (szuperoxid-dizmutáz, kataláz) vissza lehet fordítani, mert az antioxidánsok „neutralizálják” a ROS-hatást, így a növény fogékony marad. Ezek a kísérletek bizonyították, hogy a növényben akkumulálódó ROS-nak valóban rezisztenciát előidéző hatása van (Hafez és Király, 2003, El-Zahaby et al., 2004).

Ezt a koncepciót továbbvittük, és a jelen projekt keretében a fogékony *Arabidopsis thaliana*-t egy baktériummal (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) fertőztük és H_2O_2 -vel ill. különböző ROS-képző vegyületekkel kezeltük. A ROS-hatás következtében a baktériumszám a levelekben szignifikánsan csökkent, azaz a rezisztencia fokozódott. További kísérleteinkben azt is igazoltuk, hogy a külsőleg alkalmazott H_2O_2 ill. a különböző ROS-képző vegyületek gátolják a dohány mozaik vírus (TMV) replikációját a vírus-fogékony Samsun *nn* dohány növényben (**6. ábra**). Az eredetileg vírus-rezisztens Samsun *NN* leveleiben a ROS hatása csökkentette a HR típusú nekrozisokat, vagyis mindkét esetben fokozta a rezisztenciát (Bacsó et al., 2011). A Samsun *nn*-ben teljes rezisztenciáról, a Samsun *NN* esetében tüneti rezisztenciáról van szó.



6. ábra. A külsőleg alkalmazott hidrogén-peroxid (H_2O_2 , 20 mM), ill. ROS-képző vegyületek (GOX=200 U ml⁻¹ glükóz-oxidáz és 2 mM glükóz, RF=266 μM riboflavin és 10 mM L-metionin) gátolják a dohány mozaik vírus (TMV) replikációját vírus-fogékony dohányban (*N. tabacum* cv. Samsun *nn*). A TMV köpenyfehérje gén expressziója kvantitatív, valós idejű RT-PCR-rel mérve a TMV-fertőzés után 8 nappal.

A O_2^- és a H_2O_2 képződésének gátlása fogékonyá teszi a növényt

Két különböző típusú kísérletben analizáltuk a ROS-felhalmozódás gátlásának hatását a növényi rezisztenciára. Az egyik kísérletben, amelyet egy előző OTKA-projektben bonyolítottunk le, a dohány és árpa rezisztencia-változásokat vizsgáltuk akkor, amikor a O_2^- akkumulációját hőhatással gátoltuk. Jelen kísérletben a visszaszorított ROS-produkció hatását elemeztük az *Arabidopsis thaliana* egy NADPH-oxidáz mutánsának rezisztenciájára.

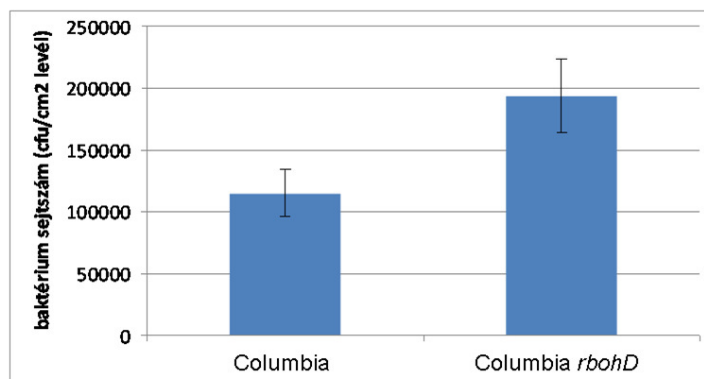
Az a tény már meglehetősen régen ismert, hogy ha a TMV-fertőzött rezisztens dohányt viszonylag magas hőmérsékleten (30°C) tartjuk, a nekrotikus tünetek (HR) visszaszorulnak vagy eltűnnek, és ennek következtében a vírus replikáció felszabadul a gátlás alól az *N* génnel rendelkező, eredetileg rezisztens dohányban (Samuel, 1931). Kimutattuk (Király et al., 2008), hogy a magas, 30°C -os hőmérséklet nemcsak a rezisztenciára jellemző HR léziókat tünteti el, hanem a O_2^- - produkciót is gátolja, és a NADPH-oxidáz aktivitására is gátlólag hat. Ezen kívül a NADPH-oxidáz enzimet kódoló gén expressziója is gátlást szenved. Mindezek a változások központi szerepet visznek a rezisztenciával kapcsolatos O_2^- - képzésben (Doke és Ohashi, 1988, Torres és Dangl, 2005, Proels et al., 2010, Marino et al., 2012). Ezen kívül a dehidro-aszkorbát redukáz antioxidáns enzim aktivitása is fokozódik az *N* gént kifejező dohányban, amelyet 30°C -on tartottunk, jelezve azt, hogy az antioxidáns-hatás miatt a ROS fokozottan neutralizálódott (Király et al., 2008). Mindennek következtében a vírus-rezisztencia a fogékonyság irányában változott, és a TMV replikációja fokozódott. Viszont érdekes az az újabb vizsgálati eredményünk, amely szerint, ha a dohányleveleket korán, kb. 2 órával a vírusfertőzés után H_2O_2 -vel vagy ROS-képző kemikáliákkal kezeljük, a vírus-rezisztencia fokozódik (Bacsó et al., 2011). Ezekből az eredményekből arra lehet következtetni, hogy a dohánylevelekben a magas hőmérsékletnek a vírus-fogékonyságot előidéző hatása ok-okozati összefüggésben van a O_2^- képződésének csökkentésével.

Egy másik kísérlet-sorozatban, amelyet az OTKA AT04 8866 sz. projekt keretében végeztünk, árpa leveleket 30 perc időtartamra 49°C -os meleg vízbe helyeztünk, és 2 órával később a leveleket egy biotróf kórokozóval, a búza lisztharmattal (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) megfertőztük. Ennek a rövid hőkezelésnek hatására a O_2^- szintje szignifikánsan csökkent a fertőzött levelekben, és ez a nem-gazda rezisztens árpa részben fogékonyá vált a számára nem kompatibilis búza lisztharmattal szemben.

Jelen projekt kidolgozása során azt is kimutattuk, hogy hasonló jelenség játszódik le, ha a hőkezelt árpát a hemibiotróf (nekrotrof) *Bipolaris sorokiniana* gombával fertőzzük. Ez a kórokozó életciklusának végén nekrotikus tüneteket okoz a fogékony gazdanövények levelein. A hőkezelt árpában a *B. sorokiniana* szaporodása fokozódott, és a szöveti nekrotikus tünetek a hőkezelt árpában kifejezettebbek voltak. Ebben az esetben a stimulált fogékonyság fokozódó O_2^- -produkcióval párosult, amely a nekrotizálódás korai szignálja. Feltételezhető, hogy a hőkezelés következtében redukálódó szuperoxid-képződést ellensúlyozza, ill. elfedi a növényi szövetek nekrotizálódásával párosuló fokozott szuperoxid-képződés (Király et al., 2013b).

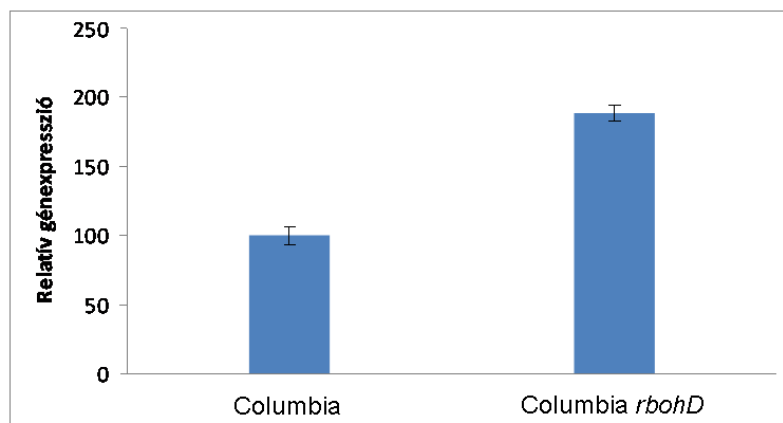
Más kísérleti megközelítésekkel is vizsgáltuk a gátolt O_2^- és H_2O_2 fogékonyságot fokozó hatását. Egy NADPH-oxidáz mutáns *Arabidopsis thaliana*-t fertőztünk vírus és baktérium kórokozókval. Az *rbohD* „knock out” mutánsban a O_2^- és H_2O_2 képződése gátlást szenved, hiszen a NADPH-oxidáz nem működik, vagy alig működik. Újabb vizsgálataink szerint ez a mutáns *Arabidopsis*, amelyben tehát a NADPH enzim aktivitása és a ROS képződése is gátolva van, fogékonyabbá vált mind vírus-, mind baktérium kórokozókval szemben. A baktériumos (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) fertőzésnél az *Arabidopsis* mutáns 10^6 cfu/ml inokulum koncentrációnál 48 órával a fertőzés után, míg 10^7 cfu/ml inokulum koncentrációnál már 24 órával a fertőzés után jóval súlyosabb tüneteket (nekrózisok)

mutatott, mint a vad típus, a baktérium-szaporodás viszont mindkét gazda genotípusban közel azonos volt. Érdekes viszont, hogy a fertőzés után 6 órával a mutánsban a baktérium-szám kb. kétszerese volt a vad típusban mértnek. A rezisztencia csökkenés tehát viszonylag korán következik be (7. ábra).



7. ábra. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 baktérium fertőzésével szembeni rezisztencia csökkenése a fertőzés után 6 órával, ROS-képződésben gátolt *Arabidopsis thaliana* mutánsban (Columbia *rbohD*), a vad típusú (Columbia) növényekhez képest. Az inokulum koncentrációja 10⁶ cfu/ml volt.

Összefoglalva, egy ROS szabadgyök, azaz a szuperoxid hiánya jelentősen csökkenti a növény baktériumos fertőzéssel szembeni ellenálló képességét, emiatt a baktérium-szám magasabb lesz már a patogenezis korai szakaszában is. A O₂⁻ képződésének gátlása a vírus-ellenállóságot is csökkentette. A NADPH-oxidáz mutáns (*rbohD*) *Arabidopsis thaliana*, ahol a ROS-képzés gátlást szenved, fogékonyabbá vált a TNV-vel (dohány nekrosis vírussal) szemben (8. ábra). Előzetes kísérletek azt is érzékeltették, hogy a mutáns *Arabidopsis* visszanyerte rezisztenciáját, ha a növény leveleit külsőleg kezeltük H₂O₂-vel vagy ROS-képző kemikáliákkal (pl. riboflavin/metionin és glukóz/glukóz-oxidáz).



8. ábra. Dohány nekrosis vírus (TNV) fertőzésével szembeni rezisztencia csökkenése a fertőzés után 7 nappal, ROS-képződésben gátolt *Arabidopsis thaliana* mutánsban (Columbia *rbohD*), a vad típusú (Columbia) növényekhez képest. A TNV köpenyfehérje gén expressziója kvantitatív, valós idejű RT-PCR-rel mérve.

A fokozott antioxidáns-hatás szerepe a tüneti rezisztenciában

Előző kísérletekből ismeretes az, hogy a növény intenzív antioxidáns kapacitása fokozhatja a nekrotrof patogénnel szembeni tüneti ellenállóképességet (Waller et al., 2005, Barna et al., 2012, Harrach et al., 2013). A tüneti rezisztencia azt jelenti, hogy az ellenálló növényben a tünetek csökkennek vagy meg sem jelennek, de a kórokozók nem gátlódnak. Tehát nincs szó teljes rezisztenciáról, ahol a kórokozók és a szimptómák is gátolva vannak. A tüneti

rezisztencia gyakorlati szempontból mégis fontos, mert a termés nem károsodik. A jelen projekt keretében végzett kísérleteink bizonyították, hogy a növény enyhe károsítása valamely ROS szabad gyökkel („immunizálással”) tüneti rezisztenciát indukálhat nekrotrof kórokozók szemben (Hafez et al., 2012). Azt a tényt, hogy enyhe ROS-kezelés fokozhatja a válaszként képzett antioxidáns kapacitást, Halliwell és Gutteridge (1999) ismertette. Mi most azt mutattuk ki, hogy az ilyen módon stimulált antioxidáns kapacitás csökkentheti vagy gátolhatja azokat a ROS-indukálta nekrotikus tüneteket, amelyeket vírus-, baktérium- és gomba-kórokozók szokványosan előidéznak. Eredményeink azt is igazolták, hogy az „immunizálással” megvédett növényekben a kórokozók valóban nem szenvedtek gátlást. Korábban kimutattuk, hogy ha ROS rezisztenciára *in vitro* szelektált dohánysejtek kalluszszövet képzésre való serkentés után, ill. egész növényé váló regenerálás után patogénekkal fertőződnek vagy toxinokkal károsodnak, a növény levelei tüneti szinten rezisztensek lesznek (Barna et al., 1993). A ROS rezisztenciára szelektált kukorica dupla haploidok is rezisztenciára, ill. toleranciára tesznek szert biotikus és abiotikus stresszekkel szemben (Darkó et al., 2009, 2011). A termesztett növények tüneti (nekrozis) rezisztenciára történő nemesítése *in vitro* szelekcióval gyakorlati szempontból hasznos eljárássá válhat a jövőben.

Pályázati eredményeinkkel igazoltuk, hogy az ellenálló növényben a reaktív oxigénfajták (ROS) patogén-gátló, ill. ölü hatása idézi elő azt, hogy a növény nem betegszik meg, vagy csak enyhén károsodik. Ugyanakkor a növények enyhe károsítása valamely ROS vegyülettel („immunizálás”) tüneti rezisztenciát okozhat, mert antioxidánsok indukálódnak a fertőzött növényekben, amelyek a nekrotikus betegsőtüneteket gátolják.

Idézett irodalom

Ádám, A.L., Farkas, T., Somlyai, G., Hevesi, M., Király, Z. 1989. Consequence of O_2^- generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 34, 13-26.

Bacsó, R., Hafez, Y.M., Király, Z., Király, L. 2011. Inhibition of virus replication and symptom expression by reactive oxygen species in tobacco infected with *Tobacco mosaic virus*. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 46, 1-10.

Baker, C.J., Orlandi, E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 299-321.

Barna, B., Ádám, A., Király, Z. 1993. Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* 80, 420-422.

Barna, B., Fodor, J., Harrach, B., Pogány, M., Király, Z. 2012. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 59, 37-43.

Bendahmane, A., Kanyuka, K., Baulcombe, D.C. 1997. High-resolution genetical and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theor. Appl. Genet.* 95, 153-162.

Bendahmane, A., Kanyuka, K., Baulcombe, D.C. 1999. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11, 781-791.

Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K., Baulcombe, D.C. 2000. *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J.* 21, 73-81.

Darkó, É., Ambrus, H., Szabó, I., Fodor, J., Király, Z., Barnabás, B. 2009. Enhanced tolerance to oxidative stress with elevated antioxidant capacity in doubled haploid maize derived from microspores exposed to paraquat. *Crop Sci.* 49, 628-636.

- Darkó, É., Fodor, J., Dulai, S., Ambrus, H., Szenzenstein, A., Király, Z., Barnabás, B. 2011. Improved cold and drought tolerance of doubled haploid maize plants selected for resistance to prooxidant tert-butyl hydroperoxide. *J. Agron. Crop Sci.* 197, 454-465.
- DeJong, W., Forsyth, A., Leister, D., Gebhardt, C., Baulcombe, D.C. 1997. A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theor. Appl. Genet.* 95, 246-252.
- Doke, N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23, 345-357.
- Doke, N., Ohashi, Y. 1988. Involvement in an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* 32, 163-175.
- El-Zahaby, H.M., Hafez, Y.M., Király, Z. 2004. Effect of reactive oxygen species on plant pathogens *in planta* and on disease symptoms. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 39, 325-345.
- Harrach, B.D., Baltruschat, H., Barna, B., Fodor, J., Kogel, K.H. 2013. The mutualistic fungus *Piriformospora indica* protects barley roots from a loss of antioxidant capacity caused by the necrotrophic pathogen *Fusarium culmorum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26, 599-605.
- Hafez, Y.M., Bacsó, R., Király, Z., Künstler, A., Király, L. 2012. Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of H₂O₂ suppresses necrotic disease symptoms. *Phytopathology*, 102, 848-856.
- Hafez, Y.M., Király, Z. 2003. Role of hydrogen peroxide in symptom expression of barley susceptible and resistant to powdery mildew. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 38, 227-236.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Inc., New York.
- Kanyuka, K.B., Bendahmane, A., van der Voort, J.N. van der Vossen, E.A. 1999. Mapping of intra locus duplications and introgressed DNA: aids to map-based cloning of genes from complex genomes illustrated by physical analysis of the *Rx* locus in tetraploid potato. *Theor. Appl. Genet.* 98, 679-689.
- Király, L., Hafez, Y.M., Fodor, J., Király, Z. 2008. Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotisation in tobacco at high temperature is associated with down-regulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase. *J. Gen. Virol.* 89, 799-808.
- Király, L., Künstler, A., Bacsó, R., Hafez, Y.M., Király, Z. 2013a. Similarities and differences in plant and animal immune systems – What is inhibiting pathogens? *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 48, 187-205.
- Király, L., Künstler, A., Hafez, Y.M., Király, Z., Bacsó, R. 2013b. Heat-induced susceptibility of barley to a biotrophic and a hemibiotrophic pathogen – differential changes in superoxide levels. 11th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, Warsaw, Poland. *Abstract. BioTechnologia* 94, 179.
- Künstler, A., Hafez, Y.M., Pogány, M., Király, Z., Bacsó, R., Király, L. 2012. Early enhanced accumulation of superoxide in mesophyll chloroplasts during symptomless non-host resistance of barley to wheat powdery mildew. FESPB-EPSO Plant Biology Congress, Freiburg, Germany. *Abstract*, pp. 706-707, poster P-10-019.
- Maekawa, T., Kufer, T. A., Schulze-Lefert, P. 2011. NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nature Immunol.* 12, 818-826.

Marino D., Dunand C., Puppo A. and Pauly N. 2012. A burst of plant NADPH oxidases. Trends Plant Sci. 17, 9-15.

Morel, F., Doussiere, J., Vignais P. V. 1991. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. Eur. J. Biochem. 201, 523-546.

Park, S-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D.F. 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. Science 318, 113-116.

Proels, R.K., Oberhollenzer, K., Pathuri, I.P., Hensel, G., Kumlehn, J., Hückelhoven, R. 2010. RBOHF2 of barley is required for normal development of penetration resistance to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Molec. Plant- Microbe Interact. 23:1143-1150.

Samuel, G. 1931. Some experiments on inoculating methods with plant viruses and on local lesions. Ann. Appl. Biol. 18, 494-507.

Schulze-Lefert, P., Bieri, S. 2005. Recognition at a distance. Science 308, 506-508.

Shang, J., Xi, D.-H., Yuan, S., Xu, F., Xu, M.-Y., Qi, H.-L., Wang, S.-D., Huang, Q.-R., Wen, L., Lin, H.-H. 2010. Difference of physiological characters in dark green islands and yellow leaf tissue of *Cucumber mosaic virus* (CMV)-infected *Nicotiana tabacum* leaves. Z. Naturforsch. 65c, 73-78.

Šutić, D. 1965. Vegetative effect of some plants on the curing of plum infected with Sharka (Plum Pox) virus. Zastita bilja 88, 347-351.

Torres, M. A., Dangl, J. L. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. Curr. Opin. Plant Biol. 8, 397-403.

Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. Plant Physiol. 141, 373-378.

Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessman, H., Ryals, J.A. 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. Plant Cell 6, 959-965.

Vulić, T., Oparnica, C., Djordjević, B., Kuzmanović, S., Starović, M., Ford, E., Tosić, M. 2013. Plum sectorial resistance to *Plum pox virus* is graft transmissible. Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 48, 219-226.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J. et al. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 13386-13391.