

## Lisztharmat indukálta génexpresszió szőlőben

OTKA K 77867

Dr. Kiss Erzsébet

A jelentésben összefoglalt eredményekből két angol nyelvű impakt faktoros cikk és Tóth Zsófia magyar nyelvű PhD értekezése van készülőben.

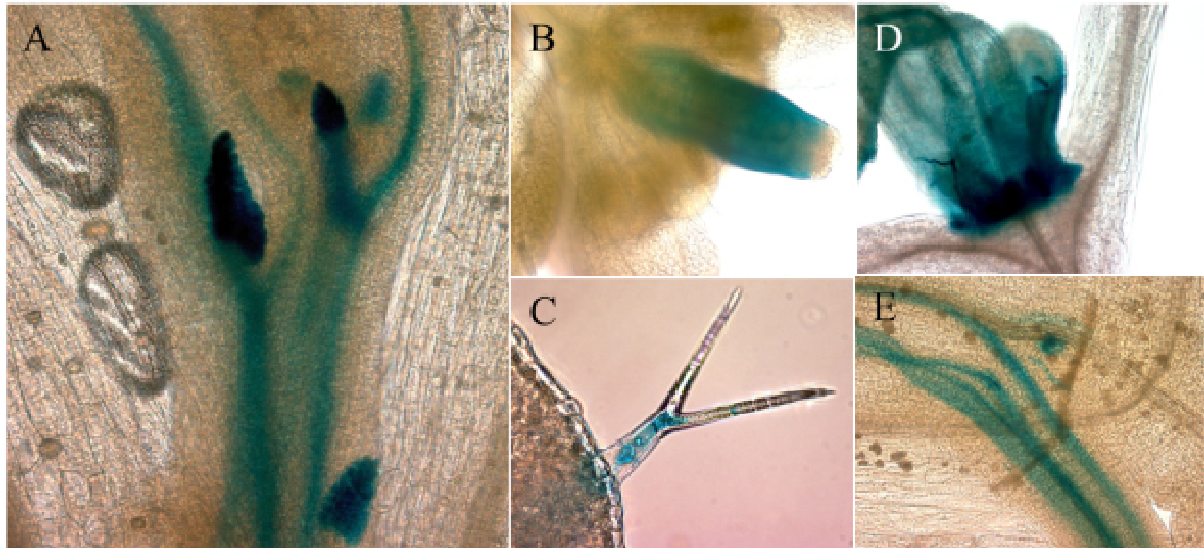
A kutatás fő célja a lisztharmatfertőzés hatásra bekövetkező génexpressziós változások szabályozásának tanulmányozása volt szőlőben. Microarray kísérlet eredményei bizonyították, hogy a lisztharmatfertőzés sok gén expresszióját módosította a Cabernet sauvignon fajtában (*Vitis vinifera* L.) és egyidejűleg megnövelte a szalicilsav szintjét a levelekben (Fung et al. 2008, Winterhagen et al. 2008). Az is megfigyelhető volt, hogy a lisztharmatra reagáló gének egy része a patogén nélkül, szalicilsavval is indukálható (Szabó et al. 2007), ami arra utalt, hogy a fogékony Cabernet sauvignon szőlő szalicilsav közvetítésével védekezik a lisztharmat-fertőzés ellen. Ugyanakkor a lisztharmatfertőzésre aktiválódó gének egy része nem indukálódott *csak szalicilsavra*, amiből arra lehet következtetni, hogy a lisztharmat szalicilsavtól független jelátviteli rendszert is aktivál. A microarray adatok alapján azonosított, a lisztharmatra *nem szalicilsavas* szignál átviteli úton reagáló gének között általános stressz gének pl.: sztilbén-szintáz, chalkon-flavonon izomeráz, ferulát-5-hidroziláz mellett rezisztenciával kapcsolatos receptorkináz és transzkripciós faktor gének (*WRKY71*, *NAM*) is voltak. A *NAM* fehérjét kódoló gén nagy hasonlóságot mutatott az *Arabidopsis ATAF1* génnel, amely sok stresszel kapcsolatos transzkripciós faktornak fő regulátora (Lu et al. 2007). Azt is bizonyították, hogy a lisztharmat-penetranciával szembeni rezisztenciában is szerepe van (Jensen et al. 2007).

A továbbiakban *NAC*-nak nevezett transzkripciós faktor gén expressziójának vizsgálata volt a K 77867 jelű OTKA kutatás célja.

A *NAM*, *ATAF* és *CUC* néven is említett *NAC* gének 100-nál több tagot számláló szuperfamilát alkotnak a különböző növényfajokban és a patogén/stressz-válaszok mellett (Collinge és Boller 2001; Hegedus et al. 2003; Tran et al. 2004; Selth et al. 2005); bizonyították a szerepüket a hajtásmerisztéma (Weir et al. 2004), virágprimordium (Sablowski és Meyerowitz 1998), embriófejlődés (Duval et al. 2002), a levélöregedés (Guo et al. 2006) szabályozásában. Kutatásunk célja az volt, hogy megismerjük a *NAC* transzkripciós faktor gén lisztharmat elleni védekezésben betöltött szerepét, működésének hátterét. Ehhez a következő négy kérdés megválaszolására törekedtünk:

1. A szalicilsav (SA) jelenléte, a szalicilsavas jelátviteli rendszer működése szükséges-e a *NAC* gén indukálásához lisztharmatfertőzés során?
2. Mely regulátor elemek lehetnek felelősek az indukcióért a *NAC* promóterben?
3. Az *Arabidopsis anac042* mutánsban komplementálható-e a gén funkciója a *Vitis NAC* génnel (az *ANAC* a *Vitis NAC* ortológja)?
4. A *NAC* gén túlexpresszáltatása vagy elcsendesítése eredményez-e toleranciát vagy rezisztenciát a *Vitis vinifera* cv. Chardonnay szőlőben?

Hogy meghatározzuk, hogy a *NAC* gén lisztharmat hatására bekövetkező indukciója függ-e a szalicilsavtól, a gén promóterét izoláltuk. A microarray-ben megfigyelt Affymetrix kód (1613141\_at) alapján azonosított *VvNAC* mRNS szekvenciáját a Grape Genome Browser-Genoscope adatbázisába illesztettük, ahol a BLAST eredménye a GSVIVT00018864001 kódú *NAC* transzkripció faktor gént azonosította. A Grape Genome Browser szekvenca alapján a gén 'ATG' start kódja előtti régióra tervezett *Vv3989 F 5'-CACCTCAATCACACTCAAAAACCA-3'* és a *Vv\_24 R 5'-AGTGCTAGTCTTCTCCA-CCTCCAT-3'* primerekkel egy ~4000 bp hosszú DNS fragmentumot szaporítottunk fel *Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon* fajtából. A DNS szakaszt Gateway® technológiával (Invitrogen) a *bar* (bialaphos rezisztencia) szelekciós markert és GUS riportergént tartalmazó pGWB633 bináris vektorba (Nakamura et al. 2010) klónoztuk. A vektort *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pMP90-es törzsébe juttatva egy Wassilewskija (WS) ökotípusú vad és két szalicilsav-jelátvitelben gátolt (*WS-nim1-1* szalicilsav-jelátvitel blokkolt mutáns; *WS-nahG* szalicilát-hidroxiláz enzimet kódoló gént tartalmazó transzgenikus) (Ryals et al. 1997; Gaffney et al. 1993) *Arabidopsis* vonalat transzformáltunk, amihez a „floral dip” (Clough és Bent 1998) módszert alkalmaztuk, amellyel megfelelő hatékonysággal, szövettenyésztés nélkül lehet transzgenikus magokat kapni. A magokat Petri csészében, nedves COMPO SANA földbe vetettük és jarovizáció céljából 2 napon át sötétben, 4°C-on tartottuk. A kicsírázott növényeket 100 lux fehér fény alatt, hosszú nappalos megvilágítás mellett 22°C-on neveltük. A 7 napos csíranövényeket glüfozinát tartalmú Finale vegyszerrel permeteztük. A bialaphos rezisztenciagénnek köszönhetően a transzgenikus növények túléltek a permetezést, így a pozitív transzformánsokat kiválogattuk. Átültetést követően PCR-rel teszteltük a transzgen jelenlétét pozitív és negatív kontrollok jelenlétében. A PCR-rel is igazolt pozitív transzformánsokat felneveltük, és magot gyűjtöttünk róluk. A következő generáció permetezését követően igazolható, hogy vannak-e olyan transzformánsok, melyek egy kópiában tartalmazzák a transzgent. A következő generációt lepermeteztük, és ha 3:1 arányban túléltek és elpusztultak a növények, akkor a túlélők biztosan egy kópiában tartalmazzák a transzgent. A túlélőket kiválogattuk, átültettük és felneveltük. Ezek utódainak a lepermetezését követően megállapítható volt, hogy mely növények homo- és melyek heterozigóták a transzgenre. A homozigóta transzformánsokat kiválogattuk és felneveltük. Vizsgálatainkhoz a T4-es generációt használtuk. Előzetes vizsgálataink során mindhárom típusú transzgenikus növényben környezeti hatásoktól mentes alapexpressziót azonosítottunk, amihez hisztokémiai GUS festés módszerét használtuk (Jefferson et al. 1987). A mikroszkópos vizsgálatok során megfigyeltük, hogy mindhárom típusú növény mindhárom vonala alapszinten expresszálja a GUS-t, a GUS kifejeződése leginkább a vaszkuláris szövetekben, a levélszőrökben, a fejlődő/ fiatal levelekben, becőkben és merisztémákban volt azonosítható (1. ábra).



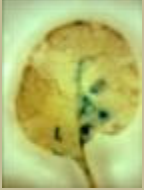




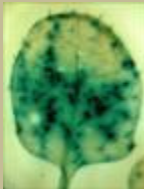
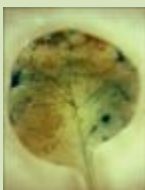
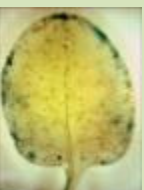
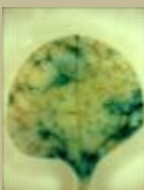
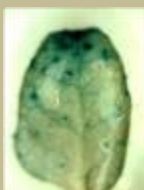
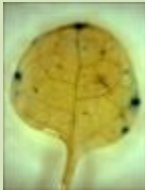

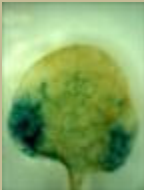



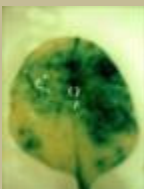







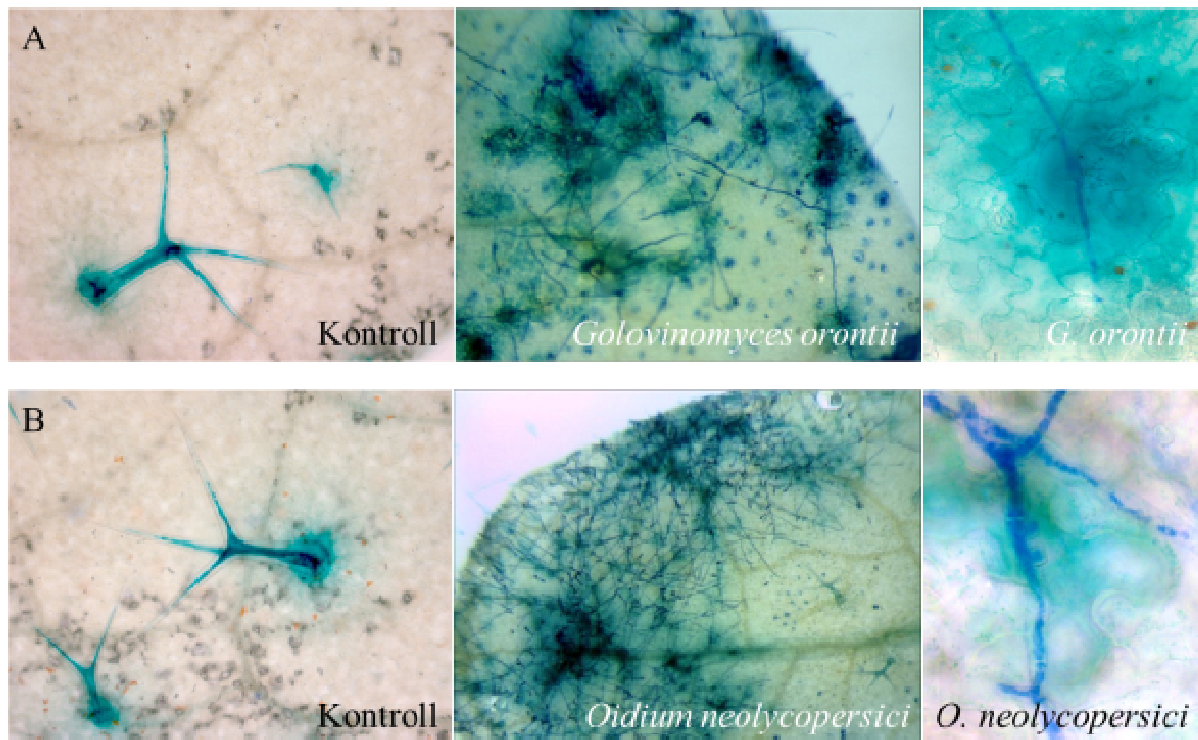
**1. ábra** GUS alap-kifejeződése a transzformáns növényekben. A) merisztémák B) fiatal becő C) levélszőr D) fiatal fejlődő hajtás E) vaszkuláris szövet.

Az eredmények alapján - irodalmi adatokkal összhangban - feltételezhető, hogy a NAC transzkripciós faktor valamely más alap-metabolikus funkciót is ellát a növényben, amihez sem a szalicilsav jelenlétére, sem pedig a szalicilsavas jelátviteli rendszer működésére nincsen szükség (1. táblázat). A lisztharmat elleni védekezésben betöltött szerepét viszont gombával való fertőzést követően bizonyítottuk. Négy hetes T4-es növényeket kétféle lisztharmattal (dohány lisztharmat, *Golovinomyces orontii*; paradicsom lisztharmat, *Oidium neolycopersici*) fertőztük, melyeket 11 nap után hisztokémiai GUS festéssel vizsgáltunk. Mikroszkópos megfigyeléseink során a megnövekedett GUS expressziót leginkább a növénynek azokon a területein figyeltük meg, ahol a növény érintkezett a gombával (2. ábra). A 2. ábrán a GUS-színétől eltérő árnyalatú kék szín a gyapot-kék festékkel megfestett hausztóriumokat mutatja. Jelentős a GUS kifejeződése a gomba által fejlesztett hausztóriumokat körülölelő növényi sejtekben (2. ábra). Mivel ezt a jelenséget mindhárom típusú transzgenikus növényben azonosítottuk, arra következtethetünk, hogy a szalicilsav jelenléte, sem a szalicilsavas jelátviteli rendszer működése nem szükséges a gomba és a NAC transzkripciós faktor közti kapcsolat kialakulásához (1. táblázat). Az indukcióhoz valamely más jelátviteli rendszer, vagy jelmolekula a felelős.

A szőlőből származó *VvNAC* transzkripciós faktor mellett az *Arabidopsis* saját *ANAC042* (AT2G43000) gén promóterét is megvizsgáltuk. A gén 'ATG' start kódja előtt régióból a At3824 F 5'CACCTTACAGCGAGGGAGATAATGA3' és At\_10 R 5'TCGATCTCTTTAGAACACCAATCA3' primerekkel (TAIR adatbázis alapján tervezett) egy közel 4000 bp fragmentumot szaporítottunk fel. A DNS-t az előbbieken említett módon klónoztuk, majd transzformáltuk a már említett három típusú (WS-0, WS-*nim1-1*, WS-*nahG*) *Arabidopsis*-t.

**1. táblázat** Hisztokémiai festéssel azonosított GUS expresszió két különböző stádiumú levélben álfertőzést és fertőzést követően *Arabidopsis*-ban (*vad*/WS-0, *WS-nim1-1* és *WS-nahG* mutánsok).

11 nappal a fertőzést követően		Álfertőzés		Lisztharmat-fertőzés	
		Tőlevélrózsa levél '2'	Tőlevélrózsa levél '4'	Tőlevélrózsa levél '2'	Tőlevélrózsa levél '4'
<i>Golovinomyces orontii</i>	VNAC 3989 WS-0				
	VNAC 3989 WS- <i>nim1-1</i>				
	VNAC 3989 WS- <i>nahG</i>				
<i>Oidium neolycopersici</i>	VNAC 3989 WS-0				
	VNAC 3989 WS- <i>nim1-1</i>				
	VNAC 3989 WS- <i>nahG</i>				



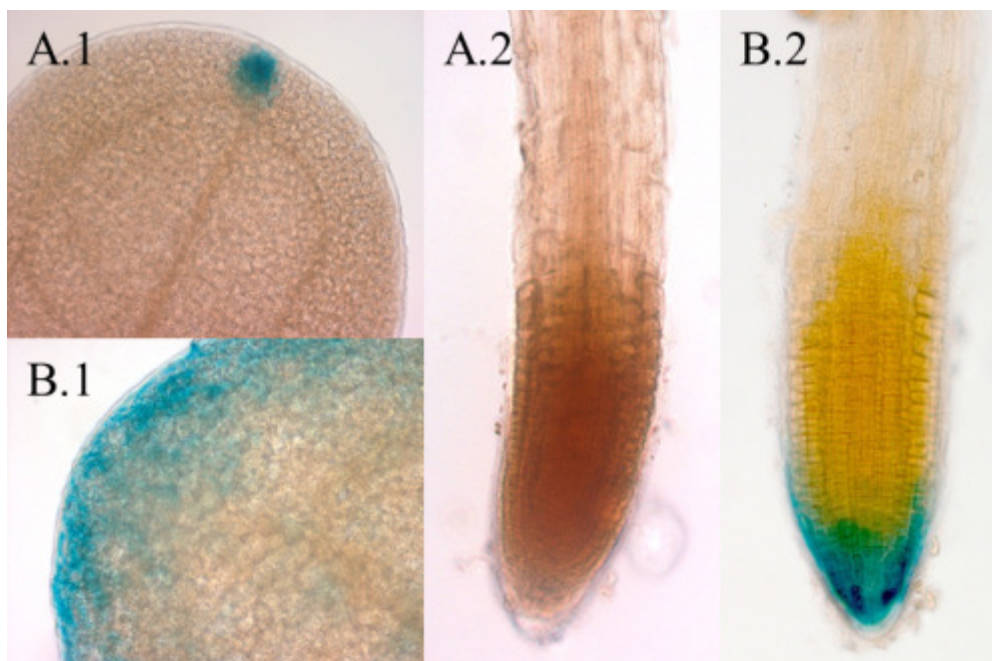
**2. ábra** GUS megnövekedett expressziója a fertőzött növényekben. *Golovinomyces orontii*-vel (A) *Oidium neolycopersici*-vel (B) fertőzött transzgenikus levelek és mikroszkópos ábrák a fertőzés helyéről.

T4-es transzgenikus növényeket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy mindhárom típusú növény expresszálja a GUS-t, ami azt jelenti, hogy az *ANAC042* gén alapexpressziójához nem szükséges sem a szalicilsav jelenléte, sem a SA jelátviteli rendszer működése. Az eredmény összhangban áll Saga et al. (2010) megfigyeléseivel, amelyek szerint a NAC transzkripciós faktor működése nem csökkent a szalicilsav-mentes mutáns növényben. A GUS kifejeződése viszont némiképp eltért a *Vitis* NAC promóter által irányított expressziótól, mert az *ANAC042::GUS* transzformánsok a levélszáron összefüggően expresszálják a GUS-t a *VvNAC::GUS* csak a levélcsúcsokon (3. ábra). A gyökerek festődésében is tapasztaltunk különbséget. Az *ANAC042::GUS* a gyökércsúcsokban is működött, míg a *VNAC::GUS* nem (3. ábra).

Az *ANAC042* promótert tartalmazó transzformánsok fertőzését követően a szőlőből származó *VvNAC* promóter indukciójához hasonló reakciót tapasztaltunk mindhárom típusú növényben. A transzformánsok GUS expressziós növekedése leginkább a gombatelepekkel érintkező területeken volt kimutatható. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a szalicilsav és a jelátviteli rendszer szintén nem szükséges az *ANAC042* gén és lisztharmat közötti kapcsolat létrejöttéhez.

Mindkét fajból származó promóter esetében kontroll növényként olyan transzgenikus növényeket is előállítottunk, amelyeket promóter-mentes pGWB633 vektorral transzformáltunk. A promóter helyén egy 23 bp hosszú oligó található a GUS előtt, így a kontroll a promótereket tartalmazó növényektől mindössze a vizsgált promóter hatásában különbözik.





**3. ábra** A *Vitis NAC* promóter és *Arabidopsis ANAC042* promóter által irányított GUS megnyilvánulás közti különbség a levélben (A.1) *Vitis NAC* promóter+GUS (B.1) *Arabidopsis ANAC042* promóter+GUS, és gyökérben (A.2) *Vitis NAC* promóter+GUS (B.2) *Arabidopsis ANAC042* promóter+GUS.

A *NAC* transzkripciós faktor gén specifikus expressziós növekedése a fertőzés helyén és annak a felfedezésnek az alapján, amelyben bizonyították, hogy több patogén-függő, védekezésben szerepet játszó gén expressziója leginkább a fertőzés helyén azonosítható (Chandran et al. 2010), következtethetünk arra, hogy ez a *NAC* transzkripciós faktor is vagy a növény védelméért felelős, vagy a fertőzés helyén kialakuló endoreduplikációban lehet funkciója (Chandran et al. 2013).

A felelős regulátor-elemek meghatározásához olyan primereket terveztünk, amelyek rövidebb és rövidebb szakaszokat szaporítanak fel a ~4000 bp hosszú promóterből. A szakaszok egyre kevesebb felelős *cis*-elemet tartalmaznak. A deléciókat egyesével GUS riportergénhez (pGWB633 bináris vektor) kapcsoltunk és mindegyikkel Wassilewskija vad/WS-0 típusú *Arabidopsis*-t transzformáltunk. A növényeket az előző részben említett módon szelektáltuk és a T4-es növényeket vizsgáltuk. Hisztokémiai festést követően a növények környezeti hatástól függetlenül alapexpressziót mutattak, mindegyik deléció működtette a GUS-t, kivéve a 257 bp hosszú fragmentumot, amely már nem tartalmazza az alap-expresszióért felelős elemet. Az eredményekből arra következtettünk, hogy a minimális promóterhosszúság 1175 bp. A *NAC* promóter szekvenciáját (Grape Genome Browser-Genoscope szekvencia) a PLACE adatbázis segítségével elemeztük, a már publikált *cis*-elemeket azonosítottuk (Higo et al. 1999, (Fujita et al 2004, Saga et al. 2010) (2. táblázat). Tervünk, hogy a deléciós vonalakat tartalmazó transzgenikus növényeket is fertőzzük, és az indukciót vizsgáljuk. Emellett mindegyik transzgenikus növény GUS enzim aktivitását mérjük (PNPG, spektrofotometriás mérés) és a teljes fehérje tartalmat meghatározzuk Bradford teszttel.

A komplementációs teszthez a transzgenikus növények előállítását folyamatban van.

2. táblázat Azonosított cis-elemek a NAC promóter szekvenciájában

	Cis-elem	Indukció	Cis-elem helye bp-ban az 'ATG' start kodtól számítva
Biotikus stressz	'TTGACC'	Gomba-elicitor	99, 967, 1722, 3360
	'TTGAC'	Szalicilsav indukált WRKY-kötő	100, 485, 761, 968, 1317, 1599, 1723, 2752, 2934, 3360, 3708
	'CTGACY'	Elicitor	2595, 3901
	'YTGTCWC'	Silencing-elem	2009, 3663
	'GCCGCC'	Patogén/ERF <sup>1</sup> *-kötő	1297
	'GAAAAA'	Patogén/só	442, 666, 1258, 1565, 1866, 1985, 2017, 2456, 2830, 3771, 3812
Abiotikus stressz/hormon	'TGACG'	Auxin / szalicilsav	270, 1751, 2751, 2927
	ACTTAA	Auxin	2393
	'TGTCTC'	ARF <sup>2</sup> *-kötő	2009, 3101, 3664
	'ACACNNG'	Abszcizinsav	844
	'AWTTCAAA'	Etilén	493, 1015, 1423, 2656, 3052, 3537
	'CCGAAA'	Hideg stressz	3090
	'AAACAAA'	Anaerob stressz	569, 897, 1575, 2273, 2586, 3492
	'ACGTG'	Fényhiány stressz	1756, 2929

A pályázat során a Budapesti Corvinus Egyetem, Genetika és növénynevelés tanszékén korábban már transzformált sejtenyészetek előállítására kidolgozott regenerációs, szelekciós rendszert alkalmaztuk. Előzetesen portokból indítottuk az embriogén kultúrákat, a portokokat üvegházban hajtattott dugványokon lévő virágrügyekből gyűjtöttük a virágzás előtt. A közel azonos fenofázisban lévő virágzatokat 1-3 napig 4°C-on hűtőben tároltuk. A virágbimbókat nátrium-hipoklorit oldatban (Chlorox 15 %) 10 percig fertőtlenítettük, majd háromszor 10 percre desztillált vízbe merítettük, majd lándzsátű és csipesz segítségével sztereomikroszkóp alatt bontottuk szét. A kipreparált portokokat a portoknyéllel együtt táptalajra helyeztük (Petri csészénként 50-et). Az embriogén kallusz indukálásához az MSE (Mozsár és Süle 1994) és MST (Oláh et al. 2003) jelölésű táptalajokat használtunk. Az MSE táptalaj a Murashige és Skoog (1962) által leírt komponensek mellett 20 g/l szacharózt, 70 mg/l Fe-EDTA-t, 1,1 mg/l

2,4-D-t (2,4-diklórfenoxi-ecetsav) és 8 g/l Oxoid agart tartalmazott (pH 5,8), amelyet az MSE táptalajnál 0,1 mg/l BAP-al (6-benzilaminopurin) az MST táptalajnál 0,05 mg/l TDZ-vel (thidiazuron {1-phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)-urea}) egészítettünk ki.

A tenyészeteket indítás után két hónapig 26°C-on sötétben inkubáltuk és a portokokon fejlődő kalluszt havonta értékeltük. 6 hónap elteltével sikeresen izoláltunk embriogén kalluszt a vizsgált fajtákból. A kísérletekhez szükséges megfelelő minőségű és mennyiségű embriogén kallusz biztosításához a portokon nyert embriogén tenyészetek homogenizálását és gyors felszaporítását naftoxi-ecetsav (5 µM) tartalmú folyékony táptalaj alkalmazásával végeztük. A kísérletben felhasznált folyékony fél mennyiségű makroelemet tartalmazó MS táptalaj a Mauro et al. által 1995-ben leírt mennyiségű maltózt és glicerint tartalmazta. Az embriogén tenyészetek további szaporítása és fenntartása MSE táptalajon, sötétben, 24°C-on, havonkénti passzálassal történt.

A *Vitis*-ből származó *NAC* gént cDNS formájában egy csendesítő és egy túlexpresszázó plazmidba építettük, amihez a pHELLSGATE12 (hairpin; csendesítő) és pMDC32 (35S promótert tartalmaz; túlexpresszázó) bináris vektorokat használtuk. A plazmidokat EHA105 *Agrobacterium tumefaciens* törzsbe juttattuk, majd 'Chardonnay' és 'Richter 110' szőlő fajta embriogén tenyészeteket transzformáltunk. A kokultivációs idő (két nap) után az agrobaktériumot carbenicillin és cefotaxim antibiotikumok felhasználásával elimináltuk és a tenyészeteket MS táptalajra helyeztük, amely fenolkötő anyagot, antioxidánst és szenet tartalmazott. A szelekcióhoz a génkonstrukcióknak megfelelően kanamicint és higromicint használtunk. Szomatikus embriogenezis indukálásához félmennyiségű makroelemet tartalmazó MS táptalajt alkalmaztunk, 10 g/l szacharózzal és 6 g/l agarral kiegészítve. Az embriogenezis indítását követően 2 hét után kezdtük el az embriogén tenyészetekkel a transzformációs kísérleteket. A kalluszkok felszínére agrobaktérium szuszpenziót juttatunk pipettával, majd 2 nap együtt-tenyésztést követően 200 mg/l carbenicillinnel és 300 mg/l cefotaximmal, fenol-kötő vegyülettel és szelekciós ágenssel kiegészített hormonmentes fél MS táptalajra helyeztük, majd havonta friss táptalajra passzáltuk. 4-10 hónap elteltével a folyamatosan regenerálódó tenyészeteket fényre helyeztük. Néhány tenyészetnél aktív szén használatával sikerült indukálni az embriófejlődést. Esetenként a regeneráció során problémát jelentett az agrobaktériummal történő visszafertőződés. Megoldásként emeltük a felhasznált két antibiotikum koncentrációját a táptalajban, illetve kiegészítésként timentint is alkalmaztunk, és szükség esetén hasonló összetételű folyékony táptalajban kezeltük a növényanyagot.





4. ábra. Transzformált embriók fejlődése sötétben, aktív szén-tartalmú táptalajon.



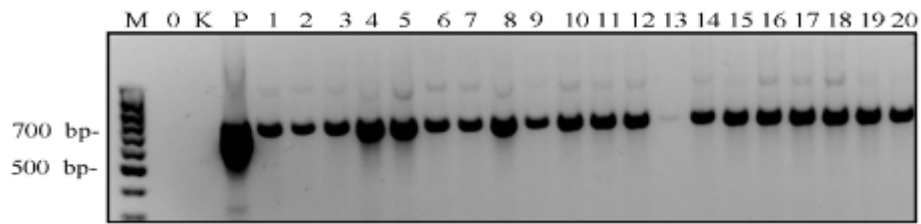
5. ábra. Transzformált növények regenerációja fényen.

Az egyes transzformációs eseményekből változó számban (5-15) regeneráltunk növény vonalakat (4. és 5. ábra). A növények fenntartása során a NAC túlermelő konstrukcióval transzformált 'Richter 110' növények esetében hajtáscsúcs elhalás jelentkezett, illetve a rendellenes növekedésű, 'törpe' növények is megjelentek, így ezeket a kísérletekből kizártuk (6. ábra). Ugyanezzel a konstrukcióval transzformált 'Chardonnay' növények szintén lassúbb regenerációt és gyengébb fejlődést mutattak.

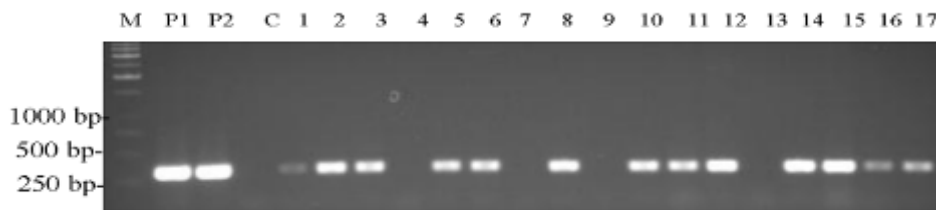


6. ábra. Rendellenes fejlődésű NAC túlermelő konstrukcióval transzformált 'Richter 110' növény.

A fenntartott vonalak leveleiből DNS-t izoláltunk Zenogene DNS izoláló kit felhasználásával. A DNS koncentrációt Nanodroppal ellenőriztük. A DNS szakaszok beépülését specifikus primerek felhasználásával PCR reakcióval ellenőriztük. Az *Agrobacterium* vektor jelenlétét illetve sikeres eliminációját a transzformált növényekben agrobaktérium specifikus primerekkel ellenőriztük (Sawada et al. 1995). A reakciót követően 1% -os agaróz gélen futtattuk meg a PCR termékeket (7-8. ábrák).



7. ábra. *NptII* szelektációs marker gén 700 bp-os szakaszának amplifikációja a regenerált szőlő növények DNS-éből. (M: marker, 0: DNS mentes negatív kontroll. K: nem transzformált 'Richter 110' növény, P: klónozó plazmid, 1-20: független regenerált szőlő vonalak).



8. ábra. NAC csendesítő génkonstrukció 321 bp hosszúságú szakaszának felszaporítása a regenerált növények DNS-éből. (M: marker, P1, P2: pozitív kontroll, plazmid, C: nem transzformált 'Chardonnay' növény. 1-17: független regenerált növényi vonalak).

Az eredmények által bizonyított pozitív transzformánsokból kétrügyes hajtásokat szaporítottunk fel hormonmentes fél mennyiségű makroelemeket tartalmazó MS táptalajon. Az akklimatizáció során steril, csapvízzel (pH: 5,8) nedvesített 1-1,5 cm magasságig perlittel töltött tenyészedényekbe helyeztük a hajtáscsúcsokat, majd egyrétegű fóliával lefedtük (9. ábra). A gyökereztetés fényszobában történt, ahol hetente a fólia fokozatos megnyitásával kezdtük meg a növények edzését. Gyökerezés után a megfelelő hajtáshossz eléréséig tápoldatot használtuk, majd perlit és föld 1:1 arányú keverékébe ültettük (10. ábra).



9. ábra. Transzformált növények akklimatizációjának első szakasza perlitben.



10. ábra. Transzformált növények akklimatizációja üvegházban.

A jól fejlődő, több hajtással rendelkező egyedeket fertőztük *Erysiphe necator* szőlő lisztharmattal. A 10 napos fertőzés alatt random mintákon a gomba micélium levélfelszínen történő megjelenését és a spórázás mértékét vizsgáltuk mikroszkóp alatt (11. ábra). 10 napos fertőzést követően értékeltük a transzformáns növények tüneteit a kontrollhoz képest. A vizsgálatok alapján a kontroll és transzformált növények fenotípusosan nem mutattak statisztikailag is értékelhető különbségeket.



11. ábra. Mesterséges fertőzés hatására a lisztharmatfertőzés tünetei megjelentek a vizsgált növények levelein

## Irodalom

- Chandran, D., Inada, N., Hather, G., Kleindt, C. K., Wildermuth, M. C. (2010) Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **107**, 460-465.
- Chandran, D., Rickert, J., Cherk, C., Dotson, B. R., Wildermuth, M. C. (2013) Host cell ploidy underlying the fungal feeding site is a determinant of powdery mildew growth and reproduction. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **26**, 537-545.
- Clough, S. J., Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735-743.

- Collinge, M., Boller, T. (2001) Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol. Biol.* **46**, 521–529.
- Duval, M., Hsieh, T. F., Kim, S. Y., Thomas, T. L. (2002) Molecular characterization of *AtNAM*: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily. *Plant Mol. Biol.* **50**, 237–248.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L. S. P., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal* **39**, 863-876
- Fung, R. W. M., Gonzalo, M., Fekete, C., Kovács, L. G., He, Y., Marsh, E., MyIntyre, L. M., Schachzman, D. P., Qiu, W. (2008) Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiology* **146**, 236-249.
- 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.
- Hegedus, D., Yu, M., Baldwin, D., Gruber, M., Sharpe, A., Parkin, I., Whitwill, S., Lydiate, D. (2003) Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Mol. Biol.* **53**, 383–397.
- Higo, K., Ugava, Y., Iwamoto, M., Korenaga, T. (1999) Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research* **27**, 297-300.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W. (1987) *GUS* fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **6**, 3901-3907.
- Jensen, M. K., Rung, J. H., Gregersen, P. L., Gjetting, T., Fuglsang, A. T., Hansen, M., Joehnk, N., Lyngkjaer, M. F., Collinge, D. B. (2007) The *HvNAC6* transcription factor: a positive regulator of penetration resistance in barley and *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **65**, 137–150.
- Lu, P. L., Chen, N. Z., An, R., Su, Z., Qi, B. S., Ren, F., Chen, J., Wang, X. C. (2007) A novel drought-inducible gene, *ATAF1*, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **63**(2), 289–305.
- Mauro, M. C., Toutain, S., Walter, B., Pinck, L., Otten, L., Coutos-Thevenot, P., Deloire, A., and Barbier, P. (1995) High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Sci.* **112**, 97-106.
- Mozsár, J., Viczián, O. and Süle, S. (1998) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of an interspecific grapevine. *Vitis* **3**, 127-130.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **155**, 473-497.
- Nakamura, S., Mano, S., Tanaka, Y., Ohnishi, M., Nakamori, C. (2010) Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, *bar*, as a selection marker for plant transformation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**, 100184-100181-100185.
- Oláh, R., Szegedi, E., Ruthner, S., Korbuly, J. (2003) Thidiazuron-induced regeneration and genetic transformation of grapevine rootstock varieties. *Vitis* **42**, 133-136.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H. Y., Johnson, J., Delaney, T. P., Jesse, T., Vos, P., Uknes, S. (1997) The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IκB. *The Plant Cell Online* **9**, 425-439.
- Sablowski, R. W. M., Meyerowitz, E. M. (1998) A homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell* **92**, 93–103.
- Saga, H., Ogawa, T., Kai, K., Suzuki, H., Ogata, Y., Sakurai, N., Shibata, D., Ohta, D. (2012) Identification and characterization of *ANAC042*, a transcription factor family gene involved in the regulation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 684-696.

- Sawada, H., Ieki, H., Matsuda, I. (1995) Pcr detection of TI and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and environmental microbiology*. **61**, 828-831.
- Selth, L. A., Dogra, S. C., Rasheed, M. S., Healy, H., Randles, J. W., Rezaian, M. A. (2005) A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell* **17**, 311–325.
- Szabó, Z., Winterhagen, P., Li, N., Kovacs, L., Qiu, W. (2007) Powdery mildew-induced changes in salicylic acid levels and related gene expression in grapevine. Abstract P54007. *Plant Biology and Botany 2007 Joint Congress*, Chicago. July 7-11, 2007.
- Tóth Zs., Winterhagen, P., Szabó Z., Higgins, A., Szőke A., Kiss E., Kovács L. 2012. Transcriptional regulation of a powdery mildew inducible gene in grapevine. 19th EUCARPIA General Congress, 21-24 May 2012 Budapest, Hungary. Conference Abstract, p. 411. ISBN: 978-963-8351-39-5.
- Tran, L. S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* **16**, 2481–2498.
- Weir, I., Lu, J., Cook, H., Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., Davies, B. (2004) CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* **131**, 915–922.
- Winterhagen, P., Toth, Zs., Higgins, A., Szabo, Z., Kiss, E., Li N., Howard, S., Su, Y., Qiu, W., Kovacs, L. (2008). Powdery mildew- and salicylic acid-induced gene regulation in a susceptible grapevine. Eighth International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Adelaide, Australia, 2008. november 23-28.