



**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**Lisztharmat indukálta génexpresszió egy fogékony szőlő  
fajtában – egy új NAC transzkripciós faktor szerepe a  
fertőzésre adott válaszreakcióban**

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Makovecz-Tóth Zsófia**

**Gödöllő**

**2016**



A doktori iskola megnevezése:  
Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága:  
Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Vezetője  
Dr. Helyes Lajos  
Intézetigazgató, egyetemi tanár, az MTA doktora  
Szent István Egyetem,  
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar  
Kertészeti Technológia Intézet

Témavezető:  
Dr. Kiss Erzsébet  
Egyetemi tanár, a Mezőgazdasági tudomány kandidátusa  
Szent István Egyetem,  
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar  
Genetika és Biotechnológiai Intézet

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## 1. BEVEZETÉS

A szőlő gazdaságilag egyik legfontosabb betegsége a lisztharmat, amelynek kórokozója az *Erysiphe necator* Schw. [syn. *Uncinula necator* (Schw.)] Burr. Bár ma már számos kutatás bizonyított jelentős eredményeket a betegség genetikai és molekuláris hátteréről, a patogén még mindig súlyos problémákat okoz a szőlőtermesztők számára. A termesztők vegyszerrel védekeznek a gomba elterjedése ellen, ami számottevően megnöveli a termelés költségeit és környezeti terhelést is okoz. Ezért fontosak azok a kutatások, amelyek a növény védekezési mechanizmusának megismerésére és a fogékony fajta ellenállóságának növelésére irányulnak.

A növény-patogén kölcsönhatások bonyolult jelátvitelt foglalnak magukba, és négy fő végkimenetelük lehet: (i) A növény a patogén ismertetőjelei révén felismerheti támadóját, ami hatékony immunválaszt indít a gomba ellen. (ii) A patogén viszont effektor molekulái segítségével elfojthatja ezt a növényi reakciót így a növény fogékonnyá válhat. (iii) Ezzel szemben bizonyos fajták egy második védelmi rendszert alakítottak ki, amelynek során felismerik az effektorokat. Ezek a növények rezisztencia (*R*) gént tartalmaznak, amelyek nukleotidkötő, leucinban gazdag fehérjéket kódolnak. Ezek a fehérjék képesek felismerni az effektor molekulákat, és ez az interakció robosztus védekezési reakciót vált ki a növényben. (iv) Ha az *R* fehérje inkompatibilis a patogén effektorral, nem jön létre a felismerés és így elmarad az erőteljes immunreakció. Mindezeket túl a fertőzés kialakulása egy sokkal összetettebb folyamat, hiszen egyrészt az ellenállóság függhet a védekezésért felelős gének expressziójának mértékétől és időzítésétől, másrészt a növényi hormonok által közvetített jelátvitel is szerves része lehet a védekezés szabályozásának.

Korábbi kutatások kimutatták, hogy a fogékony *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet sauvignon' szőlőlevelek szalicilsav tartalma megnő *E. necator* fertőzés hatására. Ezzel szemben a lisztharmat-rezisztens *V. aestivalis* cv. 'Norton' állandó magas szalicilsav tartalmat mutatott fertőzéstől függetlenül, aminek alapján feltételezhető, hogy a szalicilsav a konstitutív rezisztenciáért felel a növényben (Fung *et al.*, 2008). Kutatásunk célja volt, hogy megvizsgáljuk az exogén szalicilsav-kezelés képes-e hasonló reakciót kiváltani, mint a lisztharmat fertőzés. További célunk volt egy lisztharmat-függő gén szabályozásának tanulmányozása.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

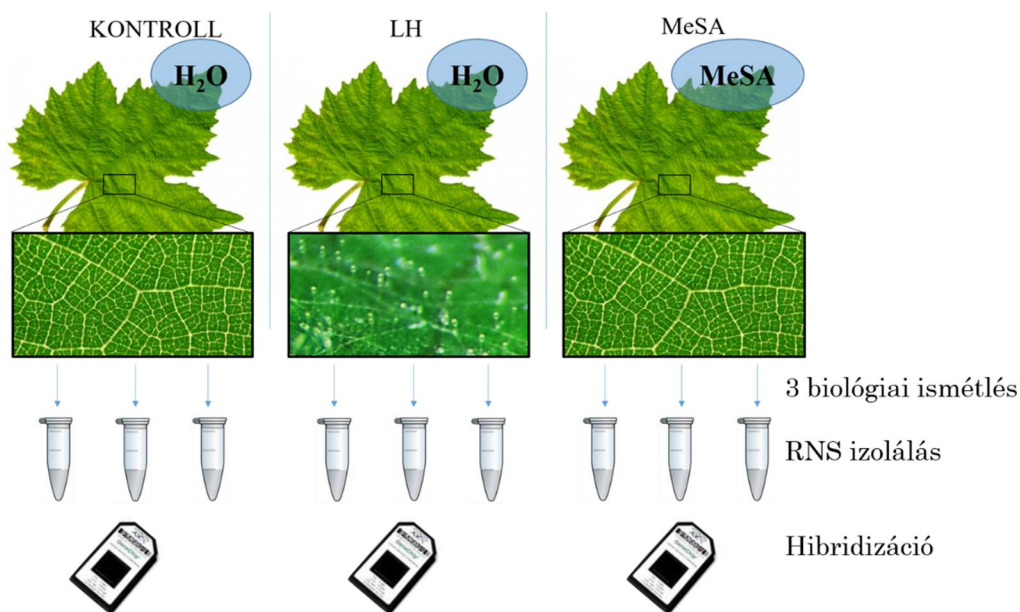
1. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk egy fogékony szőlőfajtának, a 'Cabernet sauvignon'-nak a lisztharmat fertőzésre adott válaszreakcióját génextpressziós szintek mérése alapján.
2. További célunk volt, hogy megfigyeljük a szalicilsav-kezelés képes-e az adott reagáló gének expresszióját hasonló mértékben befolyásolni, mint a lisztharmat fertőzés.
3. Az expressziós analízis alapján azonosított NAC transzkripciós faktor vizsgálatával azt a célt tűztük ki,
  - a. hogy igazoljuk a szalicilsav valóban nem szükséges, vagy ha szükséges, akkor önmagában nem elegendő a NAC indukciójához.
  - b. hogy deléciós analízissel és adatbázisok segítségével meghatározzuk a NAC promoter lehetséges szabályozó elemeit.
4. További célunk volt, hogy promoter-elemzéssel összehasonlítsuk a szőlő NAC és az *Arabidopsis*-ban azonosított ortológjának, a *JUB1*-nek a szabályozását.

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### Lisztharmat-fertőzött és szalicilsav-kezelt szőlő globális expressziós analízise

Szőlő növényanyag, növénynevelés, és lisztharmat-/szalicilsav-kezelés

Egyéves *V. vinifera* L. cv. ‘Cabernet sauvignon’ szőlő csemetékét álfertőztünk illetve *E. necator* konídiummal fertőztünk növényházi körülmények között (1. ábra). Három nappal a fertőzést követően áthelyeztük őket a növénynevelő kamrába. A lisztharmattal (LH) fertőzött növényeket további 8 napig neveltük a kamrában, majd a fertőzött leveleket leszedtük az RNS kivonásához. A szalicilsavval kezelendő növényeket álfertőztünk és 7 napig neveltük a kamrában. Ekkor 15  $\mu$ M metil-szaliciláttal (MeSA, szalicilsav analóg) párasítottuk el a kamrát további 24 óráig. Az inkubáció leteltével a szalicilsav-kezelt növények leveleit begyűjtöttük (11 napos inkubáció). A kontroll-kezeléshez a szőlőket álfertőztünk és azonos növénynevelő körülmények között tartottuk, a leveleket 11 napos inkubációt követően gyűjtöttük. Három mintát szedtünk mindhárom módon kezelt növényről.



1. ábra A microarray és a qPCR analízis mintáinak előkészítése

#### RNS izolálás

A levélmintákat folyékony nitrogénben porítottuk és extrakciós pufferben homogenizáltuk. Ismételt centrifugálást követően az RNS-t kicsaptuk, DNáz I-gyel kezeltük, és RNeasy MiniElute Cleanup rendszerrel tisztítottuk tovább.

## Microarray analízis

A lisztharmat fertőzés és szalicilsav-kezelés hatására bekövetkezett expressziós változás méréséhez az Affymetrix GeneChip *V. vinifera* (Grape) Genome Array-t alkalmaztuk. Az RNS-ről dupla-szálú cDNS-t szintetizáltunk, amelyről pedig biotinnal jelölt cRNS-t állítottunk elő. A jelölt cRNS-t daraboltuk mielőtt a GeneChip próbákhoz hibridizáltattuk volna. Az elkészült chip-et GSC3000 lézer szkennelével vizsgáltuk. A normalizált intenzitás értékeket, valamint a feldolgozatlan GeneChip képeket a GenBank Gene Expression Omnibus adatbázisába töltöttük fel (hivatkozási szám: GSE53824). Az Affymetrix *Vitis* GeneChip által szolgáltatott nyers adatokat statisztikailag elemeztük. Kiválogattuk azokat a géneket, amelyek legalább 1,5-szeres változást mutattak a kontrollhoz képest. A gének annotálásakor az Affymetrix azonosítókat az NCBI GenBank EST adatbázisához blasztoltuk.

## Reverz transzkripció és a *NAC042\_5* qPCR elemzése

A *NAC042\_5* microarray által mért expressziós szintjét qPCR technikával is igazoltuk. Ehhez a növény anyag előkészítése és a kísérlet beállítása a már előbb említett módon történt. A növények leveleiből szintén RNS-t izoláltunk és cDNS-t szintetizáltunk. Gén-specifikus primereket terveztünk a vizsgálandó *NAC042\_5* génre és az *ACTIN 1* referencia génre. A qPCR relatív mennyiségeit statisztikai szoftverekkel számoltuk. A kezelés indukálta reakció és a kontroll kezelés közti statisztikai különbségeket Student T-tesztjével állapítottuk meg.

## ***NAC042\_5* lisztharmat hatására bekövetkező szabályozásának elemzése *in vivo***

A *NAC042\_5* gén promoterének izolálása és a bináris vektorok előállítása

A *NAC042\_5* promotert *V. vinifera* L. cv. 'Cabernet sauvignon' DNS-ből izoláltuk génspecifikus primerek segítségével. A felszaporított fragmentumot a pGWB633-as bináris vektorba klónoztuk a Gateway® módszer alapján (Nakamura *et al.*, 2010). A pGWB633-ban a *NAC042\_5* promoter a *gusA* riporter génhez van kapcsolva. A pGWB633 T-DNS-e tartalmazza a *bar* rezisztencia gént is – glüfozinát-ammonium rezisztenciát kódol – amely a pozitív transzformánsok kiválogatásában segít. A rekombináns vektor multi-klónozó régióját szekvenáltuk és a szekvenciát az NCBI GenBank adatbázisba töltöttük fel (a promoter szekvencia GenBank-i hivatkozási száma: KU297673). A *NAC042\_5* promoter konstrukciót tartalmazó pGWB633 bináris vektorral *Agrobacterium tumefaciens*-t transzformáltunk.

A *NAC042\_5* promoter analízisét az izolált *NAC042\_5* fragmentum delécióival valósítottuk meg. A primereket úgy terveztük, hogy rövidebb és rövidebb szakaszokat szaporítsanak fel az eredeti promoterből. Ezeket a fragmentumokat

szintén a pGWB633 vektorba klónoztuk és a rekombináns plazmidot *Agrobacterium*-ba jutattuk.

### *Arabidopsis thaliana* transzformációja

A *NAC042\_5* promoter szabályozását három különböző *A. thaliana* vonalban vizsgáltuk: egy vad típus, egy szalicilsav jelátvitel-hibás (*nim1-1*), és egy szalicilsav-hidroláz gént tartalmazó transzgenikus vonalban (*nahG*). Transzformációhoz a virágmerítéses módszert alkalmaztuk. A módszer során az *Arabidopsis* virágokat a bináris vektort tartalmazó *Agrobacterium*-os szuszpenzióba mártottuk. Az ezekből a virágokból fejlődő magokat földben csíráztattuk. Tíz nappal a vetést követően a csíranövényeket glüfozinát-ammónium tartalmú gyomirtószerrel permetezzük (Nakamura *et al.*, 2010). A permetezést túlélő növényeket kiválogattuk és átültettük további nevelés céljából. A genetikailag is bizonyított transzgenikus növényeket használtuk a T<sub>2</sub>-es generáció előállítására, majd a növényeket a T<sub>3</sub>-as generációig neveltük. Azokat a vonalakat használtuk, melyek egy kópiában tartalmazták a transzgént. Legalább kettő ilyen vonalat választottuk mindhárom típusú genetikai háttérrel rendelkező növényből (vad, *nim1-1*, *nahG*).

### Transzgenikus növények vizsgálata

A növényeket normál körülmények között nevelve mindhárom *Arabidopsis* genotípusból legalább két vonalban vizsgáltuk a *gusA* alap- és lizsthermat indukálta génexpresszióját. Az alap-expressziót a transzgenikus növények fejlődése során figyeltük meg, a lizsthermat indukcióhoz a transzgenikus növényeket álfertőztük illetve *Oidium neolycopersici*-vel fertőztük.

### Spektrofotometriás mérés

Tizennégy nappal a fertőzést követően 6 mintát gyűjtöttünk be vonalanként a fertőzött és álfertőzött növényekről. A levélmintákat extrakciós pufferben homogenizáltuk és 4-nitrofenil  $\beta$ -D-glükuronid (*p*NPG) szubsztrát hozzáadása után inkubáltuk (Aich *et al.*, 2001; Gilmartin and Bowler, 2002). Spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg a  $\beta$ -glükuronidáz enzim katalizálta *p*NPG *para*-nitrofenollá való átalakítását. A *para*-nitrofenol abszorbanciáját 405 nm-en mértük Nanodrop 1000 spektrofotométerrel (Aich *et al.*, 2001), hogy meghatározzuk van-e különbség a  $\beta$ -glükuronidáz aktivitásban az álfertőzött és fertőzött minták között. A kapott abszorbancia értékeket logaritmikus értékekre alakítottuk át, és lineáris vegyes modell alapján elemeztük a SAS szoftverrel.



## *Hisztokémiai festés*

Tizenegy nappal a fertőzést követően a növényeket hisztokémiai GUS festésnek vetettük alá (Jefferson *et al.*, 1987). A leveleket egy éjszakán át X-Gluc (5-bromid-4-klorid-3-indolil- $\beta$ -D-glükuronsav, ciklohexilammónium só) szubsztrátot tartalmazó pufferben inkubáltuk. GUS festést követően a klorofillt 70%-os etanolos mosással távolítottuk el a levelekből. A gomba szövetet gyapotkéssel festettük, majd a fertőzött leveleket sztereo- és fénymikroszkópokkal vizsgáltuk.

A *NAC042\_5* promoter szekvencia bioinformatikai elemzése

A *NAC042\_5* promotert PLACE és PlantPAN 2.0 adatbázisokkal (Higo *et al.*, 1999; Chow *et al.*, 2016) elemeztük, hogy meghatározzuk a lehetséges szabályozó elemeket a szekvenciában.

## **Az *ANAC042/JUB1* lizstharmit általi szabályozásának vizsgálata *in vivo***

A *Vitis NAC042\_5* gén *A. thaliana*-ban azonosított legközelebbi ortológjának szabályozását is megvizsgáltuk, ezért az *ANAC042/JUB1* promoterét is izoláltuk. A fragmentumot a korábban említett módon klónoztuk a pGWB633-as bináris vektorba és szintén *Agrobacterium*-ba juttattuk. A módosított *Agrobacterium* törzset a már korábban tárgyalt *A. thaliana* vonalak (WT, *nim1-1*, *nahG*) transzformációjához használtuk fel. A transzgénikus *Arabidopsis* vonalakat szintén *O. neolycopersici*-vel fertőztük és az indukált *gusA* expressziót hisztokémiai próbával vizsgáltuk.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### Globális expressziós analízis

Hogy elkülönítsük a szalicilsav kezelés hatására bekövetkező expressziós változásokat az *E. necator* fertőzés kiváltotta módosulásoktól, két külön globális transzkriptum elemzést végeztünk Vitis Affymetrix GeneChip platformon (Toth et al. 2016). Az első kísérletben összehasonlítottuk a lizstharvat-fertőzött levelek transzkriptomát az álfertőzött levelekével és 373 gén esetében azonosítottunk legalább 1,5X-es változást lizstharvat hatására. A második kísérletben a metil-szaliciláttal kezelt növényeket hasonlítottuk a kontroll mintákhoz. 481 gén reagált legalább 1,5X-es expresszióval a kontrollhoz képest és ezek közül 179 gén működését a lizstharvat is befolyásolta. Az eredmény alapján feltételezhető, hogy az utóbbi lizstharvatra reagáló géneknek a szabályozásában a szalicilsav is részt vesz.

Gének, amelyek mind szalicilsavra, mind pedig lizstharvatra reagáltak

A mindkét kezelésre hasonlóképpen reagáló 179 gén között azonosítottunk védekezésért felelős géneket, amelyek tipikusan szalicilsavas jelátviteli rendszerben működnek már bizonyítottan más fajokban is. Ez a csoport magába foglalta receptor-típusú protein kináz, *EDSI*, *NIMINI*, *WRKY*, patogenezishez-kötött (PR) fehérjék, ATP-kötő kazetta transzporterek génjeit, továbbá olyan géneket, amelyek a redox státusz szabályozásában, jazmonát, lignin és flavonoidok bioszintézisében játszanak szerepet.

Gének, amelyek csak kizárólag lizstharvatra reagáltak

A lizstharvatra reagáló gének között 185 kizárólag a gomba fertőzésre növelte, vagy csökkentette expresszióját. A szalicilsav nem befolyásolta ezeknek a géneknek a működését, tehát önmagában nem elegendő ezeknek a géneknek a szabályozásához. Ez a csoport magába foglalt géneket, amelyek az elsődleges anyagcsere folyamatokban vesznek részt, szénhidrát-, fehérje- és zsírsav-metabolizmusokban játszanak szerepet. Azonosítottunk továbbá fotoszintézisben szabályozó, *AQUAPORIN TIP1\_3*, *PR-10* géneket is, valamint olyanokat, amelyek sztilbén szintáz, NAC transzkripciós faktort (*NAC042\_5*), citokróm P450-t, dirigent-típusú fehérjét, és lipid-transzfer fehérjét kódolnak. Ezek a gének valószínűleg függetlenek a szalicilsavas jelátviteltől, és feltehetően más szignál(ok) befolyásolja(k) a működésüket.

## Kvantitatív PCR

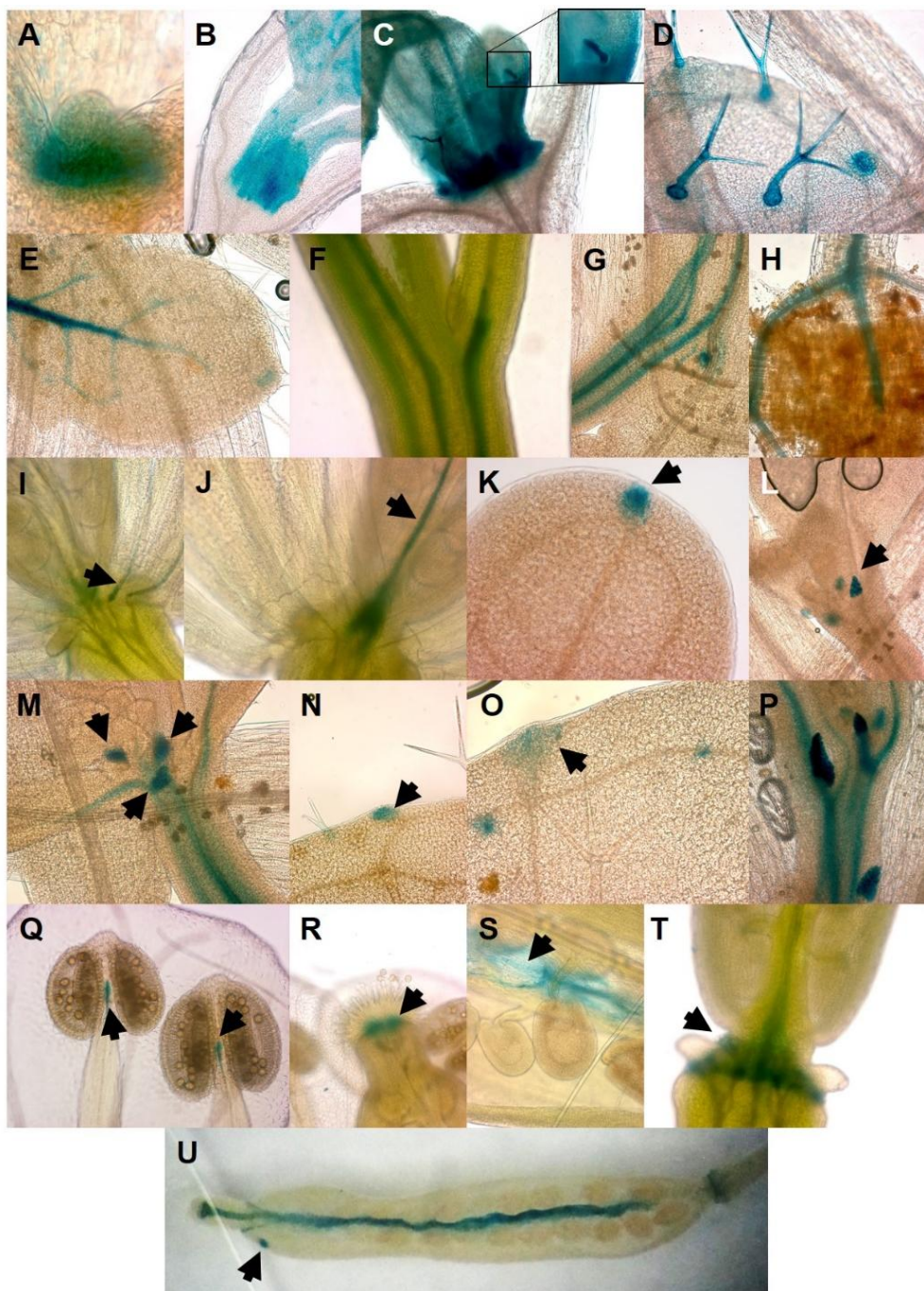
A qPCR megerősítette, hogy a *NAC042\_5* gén liztharmat fertőzés hatására megnövelte expresszióját, viszont szalicilsav-kezelésre nem reagált. A szignifikáns indukció közel azonos volt mindkét típusú (qPCR, microarray) technikával mérve.

## A *NAC042\_5* szabályozásának elemzése

Alap-expresszió vizsgálata a transzgénikus növényekben

A fertőzetlen homozigóta transzgénikus növények GUS festése kimutatta, hogy mindhárom típusú transzgénikus *Arabidopsis* (vad, *nim1-1*, *nahG*) hasonló *gusA* expressziót mutatott normál növénynevelési kondíciók mellett. A *NAC042\_5* szabályozása nem volt kifejezetten szövetspecifikus, viszont valószínűleg a szervek fejlődésében szerepet játszik. A promoter aktivitását az apikális merisztémában, fejlődő fiatal hajtásokban és levelekben, levélszőrökben, levél-, szár-, gyökér-, szírom-, és becő-edénynyalábokban, sziklevelek és fiatal levelek csúcsában, pálhalevélkezdeményekben, edénynyaláb-végződéseken, oldalhajtás rügyben, portoktartóban, bibecsatornában, szeptum szállítónyalábjában, és kocsánykoronában észleltük (2. ábra). Az ilyen sok szervben azonosított promoter működést a NAC általános transzkripciós szabályozó funkciójával magyarázhatjuk.

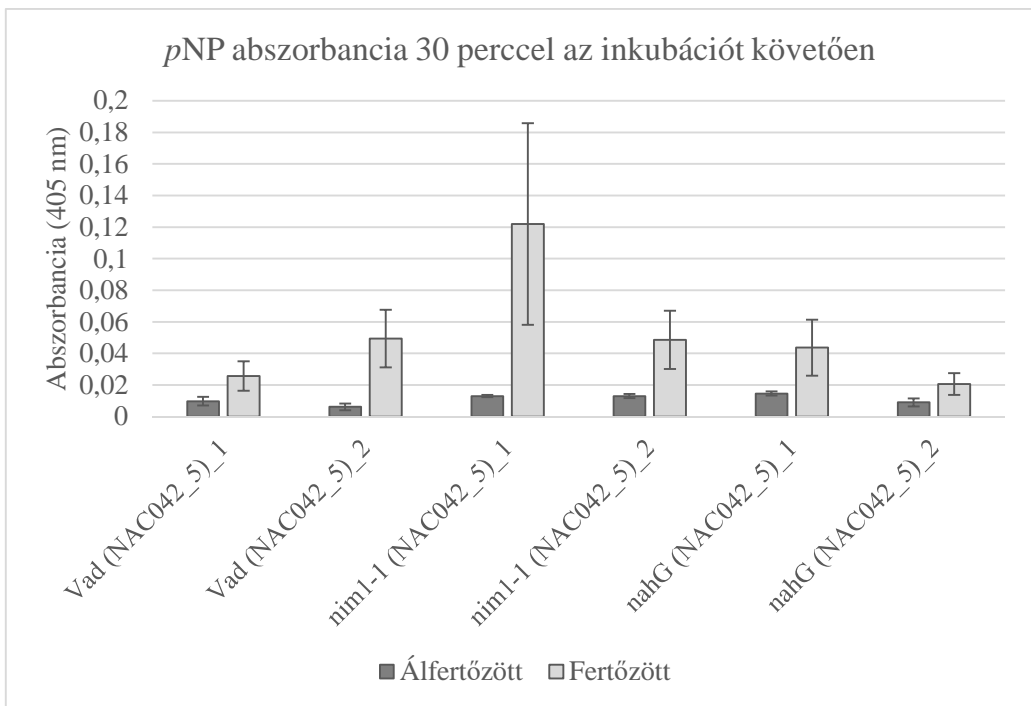
Összehasonlítva korábbi kutatások eredményeivel, a *NAC042\_5* promoter aktivitása hasonló expressziós mintázatot mutatott, mint a pektát-liáz-típusú gének promoterei (Sun és van Nocker, 2010), és a szintetikus – auxin jelenlétét mutató – *DR5::gus* konstrukció (Ulmasov *et al.*, 1997). A hasonló expressziós mintázat sejteti, hogy a *NAC042\_5* részt vehet az auxin jelátvitelben, és a növény fejlődését befolyásolja. A még nem publikált eredmény is ezt a hipotézist támogatja, amelyben a *NAC042\_5*-ot túlműködtető transzgénikus szülő növények törpék maradtak, és bizonyos idő elteltével elpusztultak. Ezzel szemben a *NAC042\_5*-elcsendesített növények a kontrollhoz hasonlóan normális növekedést mutattak.



2. ábra A NAC042\_5 promoter által szabályozott *gusA* expressziójának lokalizációja a transzgénikus *Arabidopsis* növényekben. (A) apikális merisztéma; (B) fiatal hajtás; (C) fejlődő levél (beillesztés: fejlődő levélszőr); (D) levélszőr; (E) edénnyaláb a levélben, (F, G) szárban, (H) gyökérben, (I) szíromban, (J) becőben; (K) sziklelevél-csúcs; (L, M) pálhalevélkezdemény; (N, O) edénnyaláb-végződés; (P) oldalhajtás-rügy; (Q) portoktartó; (R) bibecsatorna; (S) szeptum szállítónyalábja; (T) kocványkorona; (U) szeptum szállítónyalábja az érett becőben.

## Lisztharmat indukálta expresszió elemzése a transzgénikus növényekben

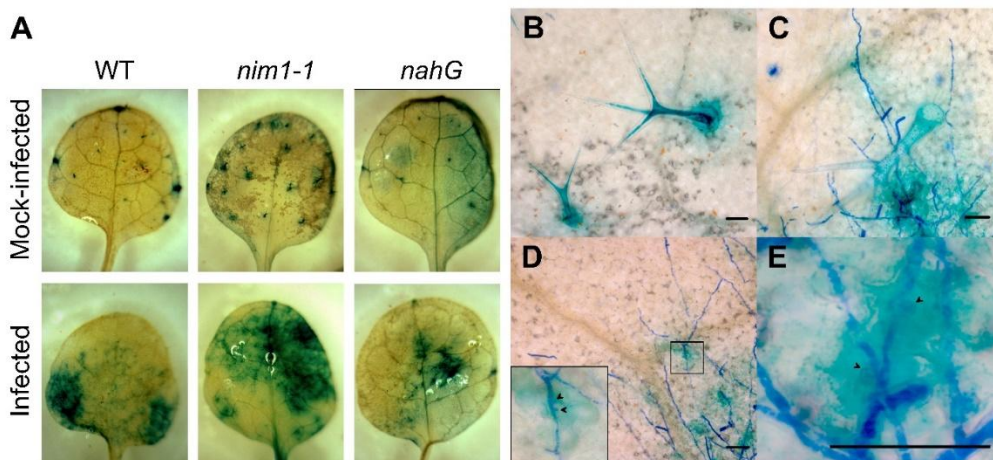
Tizennégy nappal a fertőzést követően teljesen kifejlődött, konídiumokat képző telepek keletkeztek mindhárom típusú transzgénikus növényen, az álfertőzött növények pedig lisztharmat-mentesek maradtak. A fertőzött és álfertőzött leveleket spektrofotometriás méréshez használtuk fel, hogy a *gusA* aktivitását vizsgáljuk. A kapott adatok statisztikai elemzését követően kimutattuk, hogy a kezelés és az inkubációs idő közti interakciós hatás szignifikáns ( $p < 0.0001$ ), és ez a szignifikancia a 30 perces inkubációs időnél volt azonosítható a fertőzött levelekben. A független vonalakban mért hasonló alap-expresszió és indukció a 3. ábrán látható. Mivel a szalicilsav jelátvitel a *nim1-1* és *nahG* vonalakban blokkolt, az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a *NAC042\_5* promoter reagál lisztharmatra és működése független a szalicilsavtól.



3. ábra *NAC042\_5* promoter indukciója lisztharmat fertőzés hatására a transzgénikus *Arabidopsis* növényben. *GUS* mennyiségi meghatározása a *pNAC042\_5::gusA* aktivitása alapján a 14 napos lisztharmat kolóniákkal borított vad, *nim1-1*, és *nahG* háttérű transzgénikus *Arabidopsis* vonalakban (az oszlopok független vonalakat ábrázolnak; mindegyik legalább hat ismétlést tartalmaz; a hibásávok a standard hibát mutatják).

A lisztharmat fertőzött, *pNAC042\_5::gusA* konstrukciót tartalmazó vonalakat hisztokémiai festést követően is vizsgáltuk: intenzív *gusA* indukciót mutattak a lisztharmat kolóniákkal fedett területeken (4. ábra/A). Az álfertőzött

növényekben a GUS-festődés főleg a levélszőrökben volt azonosítható (4. ábra/B). Hogy bizonyítsuk a GUS-festődés valóban az *O. neolycopersici* kolóniák növekedésével függ össze, a gombát gyapotkékkel festettük. Robosztus GUS-festődés mindig a gomba-struktúrák megjelenésével társult (4. ábra/C,D,E). Halvány GUS-festődés az álfertőzött leveleken is látszott, de ez tisztán elkülöníthető volt a fertőzés helyén látható intenzív *gusA* indukciótól (4. ábra/A,C,D). A riporter gén azokban a növényi szövetekben expresszált erősen, amelyek fizikailag is kapcsolatban álltak a gombával (4. ábra/C,D,E). A mikroszkópon nagyobb nagyítás kimutatta, hogy a *gusA* indukció főleg azokban a növényi sejtekben jelent meg, amelyekben a gomba hausztóriumot növesztett (4. ábra/D,E). Ez a lisztharmat-függő *gusA* indukció mindhárom típusú transzgénikus növényben (vad, *nim1-1*, *nahG*) azonosítható volt, ami további bizonyítéka annak, hogy a *NAC042\_5* szabályozásához nem szükséges a szalicilsav.



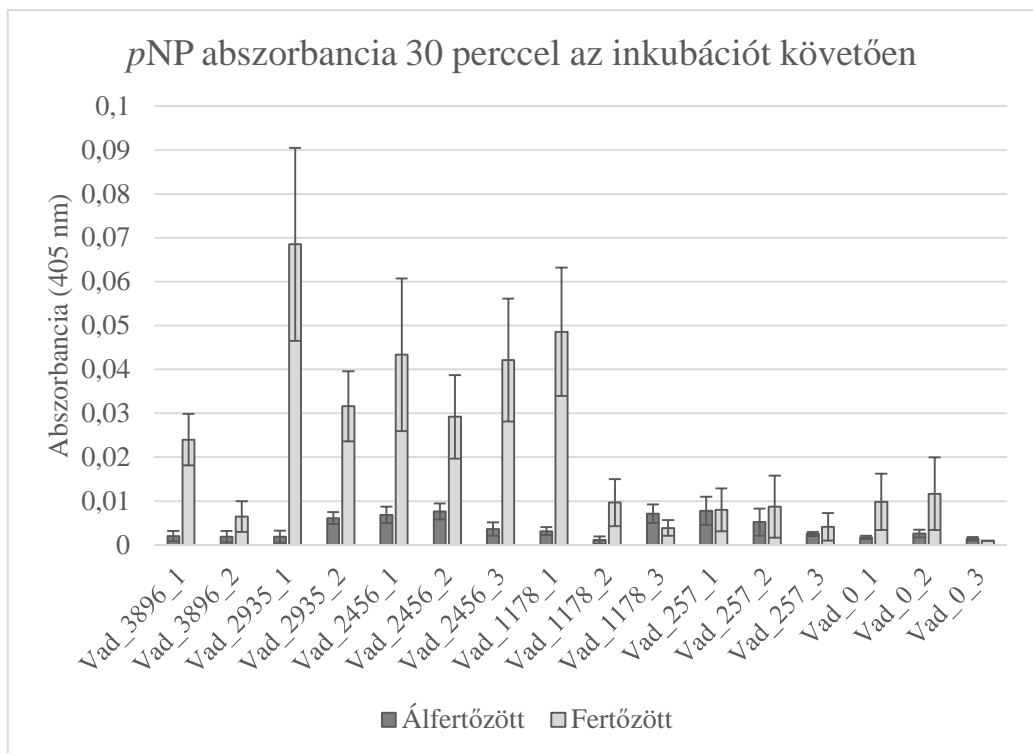
4. ábra A pNAC042\_5::gusA-transzgénikus növények hisztokémiai festése *O. neolycopersici* fertőzést követően. (A) Az álfertőzött és *O. neolycopersici*-fertőzött levelek (2. tölevélrózsa levél) GUS festése 11 nappal a fertőzést követően; (B) Mikroszkópos kép az álfertőzött levélről; (C, D és E) Mikroszkópos kép a gyapot kékkel festett gomba hifáról (sötét kék) a GUS-festett levélen fertőzést követően. Intenzív GUS-festődés látható (türkiz kék) a levélszőrben (B, C), és a gombafonal mentén (C, D és E). A beillesztés a D képen egy kinagyított epidermisz sejtet ábrázol a nyílhegyek pedig hausztórium nyakat mutatják. A lépték 50  $\mu\text{m}$ -t mutat.

Ha a *NAC042\_5* fehérje a *PLL* gének aktiválásában játszik szerepet, a *NAC042\_5* indukciója a fertőzés helyén valószínűleg a gomba fertőzését támogatja. *PMR6* gén egy pektát liáz-típusú fehérjét kódol, amely szintén a fertőzés helyén aktiválódott, a *pmr6* mutáció pedig a rezisztenciát növelte lisztharmat fertőzés ellen (Chandran *et al.*, 2009; 2010). Az *SND1* (egy *NAC* gén) túl-expresszáltatása indukálta egy pektát liáz gén működését, továbbá törpe növekedést okozott a

transzgenikus növényekben (Ko *et al.*, 2007; Hussey *et al.*, 2011), csakúgy, ahogy a *NAC042\_5*-t túl-expresszáló növények (még nem publikált adat).

#### A *NAC042\_5* promoter deléciók elemzése a transzgenikus növényekben

Hogy meghatározzuk a *NAC042\_5* transzkripció szabályozását, rövidebb és rövidebb szakaszokat szaporítottunk fel az eredeti promoterből és mindet a *gusA* riporter génhez kapcsoltuk. A *gusA* expressziója a már korábban tárgyalt GUS mintázathoz volt hasonló minden vonalban (2. ábra), kivéve a 257 bp és a null-promotert tartalmazó vonalakat. Fertőzést követően mértük a *gusA* indukcióját. Szignifikáns növekedést ( $p$ -érték  $< 0.05$ ) mutattak a 3896 bp, 2935 bp, 2456 bp, és 1178 bp hosszú promoter tartalmazó vonalak fertőzés hatására az álfertőzéshez képest, viszont a 257 bp és a null-promoterral ellátott növények nem indukálódtak (5. ábra).



5. ábra *NAC042\_5* deléciók promotereinek indukciója lisztharmat fertőzés hatására a transzgenikus *Arabidopsis*-ban. *GUS* mennyiségi meghatározása a p*NAC042\_5::gusA* aktivitása alapján a 14 napos lisztharmat kolóniákkal borított vad háttérű transzgenikus *Arabidopsis* vonalakban (az oszlopok független vonalakat ábrázolnak; mindegyik legalább három ismétlést tartalmaz; a hibásávok a standard hibát mutatják).

## A *NAC042\_5* szekvenciájának bioinformatikai elemzése

Az elemzés során abszcizinsav-érzékeny elemeket azonosítottunk a promoter szekvenciában (ABRE és G-box) a *cis*-elem adatbázisok alapján. Habár a *NAC042\_5* nem reagált szalicilsav kezelésre, néhány szalicilsav-függő elemet (ASF1-motívum) is detektáltunk. Az elemzés kimutatta, hogy a promoter etilén, jasmonsav-érzékeny boxokat (T/G-box, GCC-elem), és elicitorra reagáló helyeket is tartalmaz, amelyek mind felelősek lehetnek a *NAC042\_5* liztharmat általi szabályozásában. Növekedési hormon-indukálható motívumokat is azonosítottunk a szekvenciában, auxin- és gibberellin-érzékeny elemeket (auxin: ARF- és BBF1-kötő; gibberellin: GARE), amelyek a fejlődés során szabályozhatják a *NAC042\_5*-t.

## Az *ANAC042/JUB1* szabályozásának vizsgálata transzgenikus növényekben

A fertőzetlen transzgenikus növények hisztokémiai festése kimutatta, hogy mindhárom típusú *Arabidopsis* (vad, *nim1-1*, *nahG*) alapszinten expresszálta a *gusA*-t hasonló módon, ahogy a szőlő ortológgal transzformált növények. Specifikus expressziót mutattak a pálhalevélkezdemények és a bibecsatorna.  $\beta$ -glükuronidáz aktivitást azonosítottunk a gyökérsüvegben, a gyökér és szár találkozásánál, és a levelek szélén. A *NAC042\_5* gén működésével összehasonlítva az *Arabidopsis* ortológ nem expresszálta a levélszőrökben. A különbségeknek magyarázata lehet a CARE (gibberellin-érzékeny), CBF-kötő (hideg-érzékeny), CPB (citokinint fokozó protein-kötő), DPBF-kötő (abszcizinsav-érzékeny), TCA1 (szalicilsav-érzékeny) és CGCG-box (calmodulin-kötő) elemek hiánya a *NAC042\_5* promoterben. Az *O. neolycopersici*-vel fertőzött levelek hisztokémiai festése kimutatta, hogy jelentős *gusA* indukció figyelhető meg a fertőzött levelekben az álfertőzött növényekhez képest, különösen a fogékonyabb *nim1-1* és *nahG* növényekben. A fertőzött levelek mikroszkópos vizsgálata során láthatóvá vált, hogy az indukció főként ott történt, ahol a gomba közvetlen kapcsolatban volt a növénygel. A fertőzetlen növényi részek alap-expressziót mutattak, ami egyértelműen elkülöníthető volt az indukált expressziótól. Az alap és indukált *gusA* működést mindhárom típusú transzgenikus növényben azonosítottuk (*vad-pJUB1::gusA*, *nim1-1-pJUB1::gusA* and *nahG-pJUB1::gusA*), amely szerint feltételezhetően a szalicilsav nem szükséges sem a *JUB1* alap-szabályozásához, sem az *O. neolycopersici* által történő indukciójához. A *JUB1* promoter szekvenciájának elemzésekor további hormon- (ET/JA, SA, GA, ABA, auxin és citokinin), és elicitor-érzékeny elemeket, MYB és WRKY transzkripciós faktorok kötőhelyeit,



és egy kalmodulint kötő helyet azonosítottunk, melyek felelhetnek a *JUB1* patogén hatására bekövetkező szabályozásában.

## Új tudományos eredmények

Kutatómunkám során az alábbi új tudományos eredményeket értem el:

**T1:** A globális expressziós elemzés kimutatta, hogy 179 gén hasonlóképpen reagált mindkét kezelésre (lisztharmat, szalicilsav) a kontrollhoz képest. Azonosítottunk közöttük védekezésért felelős géneket, melyek a szalicilsavas szignál transzdukcióban funkcionálnak, köztük az *EDS1*, *WRKY*, *NIMIN1*, *GST*, *PR* géneket.

**T2:** Globálisan 373 gén változtatta expresszióját lisztharmat fertőzés hatására a kontrollhoz képest. Ezek között 185 kizárólag lisztharmatra reagált. Ez a csoport magába foglalt géneket, melyek sztilbén szintáz, dirigent-típusú és lipid transzfer fehérjéket kódolnak, valamint itt fotoszintézisben szerepet játszó, aquaporin *TIP1\_3* és NAC transzkripciós faktor (*NAC042\_5*) géneket is detektáltunk.

**T3:** A microarray elemzéssel mért NAC transzkripciós faktor 42 (*NAC042\_5*) expressziós változást a kvantitatív PCR módszer is igazolta.

**T4:** A *NAC042\_5* promoter által szabályozott riporter gén alap-expressziót detektáltunk az apikális merisztémában, fiatal fejlődő szervekben, a levélszőrökben, edénynyalábokban, sziklevelek csúcsában, pálhalevélkezdeményekben, edénynyaláb-végződéseken, oldalhajtás rügyben, portoktartóban, bibecsatornában, szeptum szállítónyalábjában, és a kocsánykoronában. Ez a mintázat hasonló volt mindegyik típusú transzgenikus vonalban a vad, és a szalicilsav-hiányos genotípusokban (*nim1-1*, *nahG*), ezért kijelenthetjük, hogy a *NAC042\_5* alap-működése független a szalicilsavtól.

**T5:** Bizonyítottuk, hogy a *NAC042\_5* lisztharmat hatására bekövetkező szabályozása is független a szalicilsavtól. A *gusA* indukció mindig a gombafonalak megjelenésével párosult és főként azokban a növényi sejtekben fordult elő, amelyekbe a gomba hausztóriumot fejlesztett.

**T6:** A promoter szekvenciájának elemzése kimutatta, hogy a 3896 bp hosszú fragmentum hormon- (ABA, auxin, gibberellin, jazmonát/etilén), és elicitor-érzékeny elemeket, WRKY- és MYB-kötő helyeket foglal magába. A deléciós elemzés szemléltette, hogy az 1178 bp-os fragmentumot tartalmazó növényekben még indukálódott a *gusA*, viszont a 257 bp-t tartalmazóakban már nem. A felelős *cis*-elemek ebben a

szakaszban helyezkedhetnek el, amelyben ASF1, ERELEE4, BIHD1-, MYB-kötő, SURE2 és W-box elemeket azonosítottunk.

**T7:** A *NAC042\_5* ortológjának, az *Arabidopsis JUB1*-nek az expressziós mintázata hasonló volt a *Vitis* promoter által szabályozott működéshez. Annyi különbséget észleltünk a kettő között, hogy a *JUB1* a gyökérsüvegben és a levélszáron indukálta a *gusA*-t, a levélszövetben viszont nem, ami azzal magyarázható, hogy a CARE, CPB, CBF-, DPBF-kötő, TCA1 és CGCG-box elemek nem találhatóak meg a *NAC042\_5* promoterben.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Korábbi kutatások kimutatták, hogy lisztharmat fertőzés hatására megnövekszik a szalicilsav szint a fogékony *V. vinifera* cv. ‘Cabernet sauvignon’ szőlő fajtában. Ezzel szemben a lisztharmat-ellenálló *V. aestivalis*-ban állandó magas szalicilsav szint volt tapasztalható fertőzéstől függetlenül, ami arra enged következtetni, hogy a szőlő növényben a rezisztenciáért a szalicilsav felel (Fung *et al.*, 2008). Kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk van-e különbség a transzkriptomban lisztharmat fertőzés hatására és szalicilsav-kezelés hatására a fogékony *V. vinifera* cv. ‘Cabernet sauvignon’ szőlő fajtában. Az expressziós változásokat microarray (Affymetrix Vitis GeneChip) módszerrel mértük, amely kimutatta, hogy a lisztharmat fertőzés számos gén expresszióját megváltoztatta, köztük olyanokét is, amelyek a szalicilsavas jelátvitelben is szerepet játszanak. Ebben a csoportban azonosítottunk olyan géneket, melyek tipikusan a védekezésben működnek, mint például a patogenezishez kötött fehérjék, *EDS1*, *NIMIN-1*, *WRKY* transzkripciós faktorok, ABC transzporterek és receptor-típusú protein kináz gének. A lisztharmatra reagáló gének között azonban voltak olyanok is, amelyek a szalicilsav-kezelésre nem reagáltak. Az eredmény alapján feltételezhető, hogy a növény lisztharmat ellen védekezésének a szalicilsavas jelátvitelen túlmutató elemei is vannak. Ebben a csoportban is találtunk géneket, melyek a védekezésért felelnek a növényben, de meghatároztunk olyanokat is, amelyeknek a funkciója nem feltétlenül a rezisztencia kialakítása. Köztük a PR-10-t, sztilbén szintázt, dirigent-típusú fehérjét, aquaporint, cikokróm P450-t és NAC transzkripciós faktort kódoló géneket azonosítottunk.

A globális génexpressziós vizsgálat eredményei az alapkutatásokban megszerzett tudáshoz járulnak hozzá. Gének szintjén ismerhettük meg a lisztharmat fertőzésre adott válaszreakciót, amely rávilágíthat e gének jelentőségére a védekezésben. Ezt bizonyítja a vizsgált NAC transzkripciós faktor is, mely specifikusan reagál a fertőzés helyén a fogékony növényben, és valószínűleg a gomba irányítja működését. A három *A. thaliana* genotípusban (vad, *nim1-1*-és *nahG*) alkalmazott transzgénikus rendszer kimutatta, hogy a *NAC042\_5* lisztharmat általi szabályozása valóban független a szalicilsavas jelátviteltől és valószínűleg más szignál befolyásolja működését. A lisztharmat kiváltotta indukció kizárólag a gomba struktúrák megjelenésével párosult. A *NAC042\_5* promoter „lisztharmat-függősége” lehetőséget ad arra, hogy a promotert olyan alkalmazott kutatásokban használják fel, amelyekben bizonyos géneket (például *R* vagy patogenezishez-kötött gént) specifikusan csak a fertőzés helyén expresszáltassanak. Így a növény többi része kisebb mennyiségben tartalmazza majd a transzgén transzkriptumát, anélkül, hogy a védekezés elleni hatékonyságából veszítene.

Ha a *NAC042\_5* génről bebizonyosodik, hogy auxin jelátvitelben van szerepe és a lizstharman-függő szabályozása az endoreduplikáció kialakulását segíti, akkor a NAC transzkripciós faktor a gomba szaporodását támogatja. Ezért elképzelhető, hogy a *NAC042\_5* gén elcsendesítésével lizstharman elleni rezisztenciát növelhetünk a növényben, ahogy a pektát-liáz kódoló *PMR6* gén esetében is már bizonyították. Ennek a kivitelezésére azonban nemcsak a transzgenézis az egyetlen mód; elérhetjük ugyanezt a TALEN vagy a CRISPR/cas9-es technikákkal is, amelyek már nem teljesen ugyanaz az eljárás alapján valósulnak meg, mint a GMO növények előállítása. A fogékony fajták ellenállóságának növelésével pedig kevesebb lenne a vegyszerfelhasználás a termesztés során.

## 6. IRODALOMJEGYZÉK

- Aich, S., Delbaere, L. T. and Chen, R. (2001) Continuous spectrophotometric assay for beta-glucuronidase. *Biotechniques*, **30**(4): 846-850.
- Chandran, D. *et al.* (2009) Temporal global expression data reveal known and novel salicylate-impacted processes and regulators mediating powdery mildew growth and reproduction on *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **149**(3): 1435-1451.
- Chandran, D., Inada, N., Hather, G., Kleindt, C. K. and Wildermuth, M. C. (2010) Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(1): 460-465.
- Chow, C. N. *et al.* (2016) PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucleic Acids Res*, **44**(D1): D1154-1160.
- Fung, R. W. *et al.* (2008) Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiol*, **146**(1): 236-249.
- Gilmartin, P. M. and Bowler, C. (2002) *Molecular Plant Biology. A Practical Approach, 2.* Oxford University Press, Oxford, OX2 6DP, 368 pp.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. and Korenaga, T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*, **27**(1): 297-300.
- Hussey, S. G. *et al.* (2011) *SND2*, a *NAC* transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in *Arabidopsis* fibres and increases fibre cell area in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biol*, **11**: 173.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987) *GUS* fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J*, **6**(13): 3901-3907.
- Ko, J. H., Yang, S. H., Park, A. H., Lerouxel, O. and Han, K. H. (2007) *ANAC012*, a member of the plant-specific *NAC* transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **50**(6): 1035-1048.
- Nakamura, S. *et al.* (2010) Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, *bar*, as a selection marker for plant transformation. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**(6): 1315-1319.
- Sun, L. és van Nocker, S. (2010) Analysis of promoter activity of members of the *PECTATE LYASE-LIKE (PLL)* gene family in cell separation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, **10**: 152.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J. (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, **9**(11): 1963-1971.

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN ÍRT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

### Angol nyelvű cikkek

**Tóth Zs., Kiss E.** (2015) Plant genes as sources to improve pathogen resistance of cultivated plants. *Columella: Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 2:(1) 37-56.

**Tóth Zs., Kiss E.** (2015) Regulation of JUB1 transcription factor in *Arabidopsis* by the fungus, *Oidium neolycopersici*. *Columella: Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 2:(2) 39-48.

**Tóth Zs., Winterhagen P., Kalapos B., Su Y., Kovacs L., Kiss E.** (2016) Expression of a grapevine NAC transcription factor gene is induced in response to powdery mildew colonization in a salicylic acid-independent manner. *Scientific Reports* 6:30825 Impact factor: 5.228

### Egyéb értékelhető angol nyelvű cikk

**Tóth Zs., Kiss E., Kovács L.** (2014) The ANAC042 transcription factor gene is responsive to powdery mildew infection in *Arabidopsis thaliana*. *Hungarian Agricultural Research* 2: 22-26.

### Angol nyelvű proceedings

**Tóth Zs., Kiss E., Kovács L.** (2015) NAC transcription factors as key regulators in stress responses. *Shao-Hua Li, Archbold D., Londo J. (szerk.) Acta Horticulturae: Proceedings of the eleventh international conference on grapevine breeding and genetics (1082. kötet)* 402 p. Beijing, Kína, 2014. július 29.-augusztus 2. pp. 293-298.

### Angol nyelvű absztraktok

Winterhagen P., **Tóth Zs.**, Higgins A., Szabó Z., Kiss E., Li N., Howard S., Su Y., Qiu W., Kovács L. (2008) Powdery mildew- and salicylic acid-induced gene regulation in a susceptible grapevine. *Hayes P. F. (szerk.) Special Issue: Selected Papers and Abstracts from the 8th International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology* 151, A77 p. Adelaide, Ausztrália, 2008. november 23-28. pp. A65.

**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. *Bedő Z., Láng L. (szerk.) Plant Breeding for Future Generations: Proceedings of the 19th EUCARPIA General Congress.* 448 p. Budapest, Magyarország, 2012. május 21-24. pp. 411.

**Tóth Zs., Kiss E., Kovács L.** (2014) Powdery mildew induced gene expression in a susceptible grapevine. *11th International Conference on Grapevine*

*Breeding and Genetics. Program & Abstracts Book.* 314 p. Beijing, Kína, 2014. július 29.-augusztus 2. pp. 92.

**Makovecz-Tóth Zs.,** Winterhagen P., Kalapos B., Su Y., Kovacs L., Kiss E. (2016) Expression of a grapevine *NAC* transcription factor gene is induced in response to powdery mildew colonization in a salicylic acid-independent manner. *X. International symposium on grapevine physiology and biotechnology. Book of Abstracts.* 262 p. Verona, Olaszország, 2014. június 13-18. pp 218.

**Tóth Zs.,** Kovács L., Kiss E. (2016) Promoter analysis of a grapevine *NAC* transcription factor gene in response to powdery mildew. *X. International symposium on grapevine physiology and biotechnology. Book of Abstracts.* Verona, Olaszország, 2014. június 13-18. pp 223.

#### Magyar nyelvű cikk

**Tóth Zs.,** Kiss E. (2015) Növényi transzkripciós faktor gének szerepe az abiotikus és biotikus stressz-tűrésben. *Kertgazdaság* 47:(4) pp 57-64.

#### Magyar nyelvű proceedings

**Tóth Zs.,** Kiss E. (2013) A lisztharmat és a fogékony szőlő közötti molekuláris kapcsolat. *Ferencz A. (szerk.) "Környezettudatos gazdálkodás és menedzsment": Gazdálkodás és Menedzsment Tudományos Konferencia (1. kötet),* 550 p. Kecskemét, Magyarország, 2013. szeptember 5. pp. 183-187.

**Tóth Zs.,** Kovács L., Kiss E. (2014) A *NAC* transzkripciós faktor szerepe a lisztharmat elleni védekezésben. *Veisz O. (szerk.) Növénynevelés a megújuló mezőgazdaságban (A XX. Növénynevelési Tudományos Nap proceedings kötete),* 522 p. Budapest, Magyarország, 2014. március 18. pp. 478-482.

#### Magyar nyelvű absztraktok

**Tóth Zs.,** Winterhagen P., Szőke A., Kiss E., Kovacs L. (2012) Lisztharmat indukálta génexpresszió szőlőben. *Veisz O. (szerk.) XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok: Összefoglalók.* 133 p. Budapest, Magyarország, 2012. március 6. pp. 129.

**Tóth Zs.,** Kovacs L., Szőke A., Kiss E. (2013) A *NAC* transzkripciós faktor szövetspecifikus expressziója. *Hoffmann B., Kollaricsné Horváth M. (szerk.) XIX. Növénynevelési Tudományos Nap: Összefoglalók.* 151 p. Keszthely, Magyarország, 2013. március 7. pp. 146.

**Tóth Zs.,** Kiss E. (2015) Az *ANAC042* patogén-függő gén antagonist interakciót vált ki a növény biotróf és nekrotrof gombákkal szembeni védekezésben. *Veisz O. (szerk.) XXI. Növénynevelési Tudományos Napok:*



*Összefoglalók.* 155 p. Martonvásár, Magyarország, 2015. március 11-12. pp. 129.

Tudományos Konferenciák, Előadások

- Tóth Zs.,** Kiss E., Kovács L. (2015) Lisztharmat (*Erysiphe necator*) indukálta génexpresszió fogékony szőlőben. "GENETIKAI MŰHELYEK MAGYARORSZÁGON" XII. Minikonferencia, Szeged, Magyarország, 2015. szeptember 4.
- Tóth Zs.,** Kiss E., Kovács L. (2016) Lisztharmat indukálta génexpresszió fogékony szőlő fajtában. *Fiatal Biotechnológusok II. Országos Konferenciája*, Gödöllő, Magyarország 2016. március 21-22.