

A NÖVÉNYEK ÁLTALÁNOS VÉDEKEZÉSI RENDSZERÉNEK BIOKÉMIAI ÉS GENETIKAI VIZSGÁLATA

Doktori értekezés

Szarka Eszter

Témavezető

Dr. Sárdi Éva

Külső konzulens

Dr. Szarka János



Genetika és Növénynevelés Tanszék

Budapest

2008

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Biológiai tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna
tanszékvezető egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Sárdi Éva
tudományos főmunkatárs, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Genetika és Növénynevelés Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Dr. Tóth Magdolna
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Sárdi Éva
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács, 2008. június 10-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Palkovics László, DSc

Tagjai

Barna Balázs, DSc

Németh Zsolt, PhD

Gémesné Juhász Anikó, PhD

Papp István, PhD

Opponensek

Kiss Erzsébet, CSc

Bisztray György Dénes, PhD

Titkár

Papp István, PhD

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	6
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. <i>R génekhez kötött rezisztencia</i>	9
2.1.1. Hiperszenzitív reakció	10
2.1.2. Reakcióképes oxigénformák	12
2.1.3. A sejtfal megerősítése	13
2.1.4. Benzoésav és szalicilsav	14
2.1.5. PR fehérjék és más, védekezéshez kötődő fehérjék	15
2.1.6. Lipoxigenázok	16
2.1.7. Fitoalexinek	17
2.2. <i>Nem-gazda rezisztencia</i>	17
2.2.1. A nem-gazda rezisztencia alkotóelemei	18
2.2.1.1. Passzív védekezési formák	18
2.2.1.2. Aktív, indukálható növényi válaszok	20
2.2.1.3. A növényi védekezés jelzővegyületei	25
2.2.1.4. Széles spektrumú rezisztenciát biztosító gének	25
2.2.2. A nem-gazda rezisztencia típusai	27
2.2.3. A „növényi immunitás” - avagy a növényi betegségellenállóság különböző felosztásai	29
2.2.4. A „gene for gene” és a nem-gazda rezisztencia összevetése	32
2.3. <i>Indukált rezisztenciaformák és biokémiai alapjaik</i>	33
2.3.1. A szalicilsav és a szisztemikus szerzett rezisztencia	33
2.3.1.1. A szisztemikus szerzett rezisztencia jelensége	33
2.3.1.2. A szisztemikus szerzett rezisztencia molekuláris markerei	34
2.3.1.3. A szisztemikus szerzett rezisztencia és a szalicilsav összefüggése	35
2.3.1.4. A szisztemikus szerzett rezisztenciához szükséges áthelyeződő jel	38
2.3.1.5. A szalicilsav bioszintézise	39
2.3.1.6. A szalicilsav hatásának módja	40
2.3.1.7. Kémiailag aktivált szisztemikus szerzett rezisztencia	42
2.3.1.8. A növényvédelem és az indukált rezisztenciaformák	44
2.3.2. A jázmonsav és etilén által közvetített szisztemikus válaszok	45
2.3.2.1. Az indukált szisztemikus rezisztencia	45
2.3.2.2. Jázmonsav és etilén a sebzés- és kártevők indukálta válaszokban	47
2.3.2.3. Jázmonsav és etilén a kórokozók fertőzésére adott válaszokban	48
2.3.2.4. Jázmonsav és etilén által szabályozott válaszok molekuláris markerei	49
2.3.2.5. A szalicilsav, jázmonsav és etilén által szabályozott jelz utak közti szinergista illetve antagonistista viszony	49
2.3.3. Az etilén alternatív szerepe a betegség kifejlődésében	51
2.3.3.1. Az etilén és a kórtünetek kapcsolata	51
2.3.3.2. Az etilén és a szalicilsav kölcsönhatása a kórtünetek kifejlődésében	52
2.3.3.3. Szalicilsav- és jázmonsav-független anyagcsereutak	53
2.4. <i>A transzmetilezés és a formaldehid szerepe az élővilágban</i>	55
2.4.1. Metilcsoport és metilezés	55
2.4.2. Aminosavak metilezése	56
2.4.2.1. Az arginin és metilezett származékai	56
2.4.2.2. A lizin és metilezett származékai	57
2.4.3. A fehérjék metilezésének biológiai jelentősége	57
2.4.4. A formaldehid és a metilezés kapcsolata	58
2.4.5. Formaldehid a biológiai rendszerekben	59
2.4.6. Transzmetilezés a biológiai rendszerekben	60
2.4.7. A transzmetilezés szerepe a növényi stressz reakciókban	60
2.5. <i>A növények általános védekezési rendszere</i>	64
2.5.1. Az általános védekezési rendszer jellemzése	64
2.5.1.1. Tünettan	64

2.5.1.2. Az általános védekezési reakció jelentősége és hatástartománya a növény-mikroba kapcsolatokban.....	66
2.5.2. Az általános és a specifikus védekezési reakció viszonya.....	67
2.5.2.1. Az általános és a specifikus védekezési reakció sebessége.....	69
2.5.2.2. Az általános és a specifikus védekezési reakció ingerküszöbe.....	70
2.5.2.3. A <i>gds</i> és a <i>Bs-2</i> gén kölcsönhatása.....	72
2.5.3. Az általános védekezési rendszerre alapuló rezisztencianemesítés evolúciós alapjai.....	73
2.5.3.1. Az általános védekezési rendszer restaurálására irányuló nemesítési stratégia.....	74
2.5.3.2. Az általános védekezési rendszer jelentősége az alap kutatásban.....	75
2.5.4. Az általános védekezési rendszer elméleti és gyakorlati vonatkozásai.....	75
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	77
3.1. A felhasznált növényanyag.....	77
3.2. Az inokuláláshoz alkalmazott baktériumok.....	77
3.3. Az inokuláció eszköze és az inokulálás módszere.....	78
3.4. A genetikai vizsgálatok során alkalmazott körtünetrendszer.....	80
3.5. A mintavétel.....	81
3.6. A biokémiai és élettani vizsgálatok módszerei.....	81
3.6.1. A szénhidrát vegyületek kromatográfiás meghatározása.....	81
3.6.2. A hidrogén-peroxid koncentráció spektrofotometriás meghatározása.....	82
3.6.3. A szalicilsav HPLC-s meghatározása.....	82
3.6.4. A peroxidáz enzimaktivitás spektrofotometriás meghatározása.....	84
3.6.5. A formaldehid és metilezett vegyületek kromatográfiás meghatározása.....	85
3.7. A kísérletek statisztikai elemzése.....	86
4. EREDMÉNYEK.....	87
4.1. Az általános védekezési rendszer működésének gazdaságossága.....	87
4.2. Az általános védekezési rendszer és a hidrogén-peroxid kapcsolata.....	91
4.3. A szalicilsav szerepe az általános védekezési rendszerben.....	93
4.4. Az általános védekezési rendszer jellemzése peroxidáz enzimaktivitás alapján.....	96
4.5. A stressz hatása a metilezett vegyületekre és a formaldehid képződésére az általános védekezési rendszerben.....	100
4.6. Az általános és specifikus növényi védekezési reakciók kölcsönhatásának genetikája.....	103
4.7. A <i>gds</i> és a <i>Bs-2</i> gén kódolta körtünetek biokémiai háttere.....	107
4.8. Új tudományos eredmények.....	114
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	116
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	126
7. SUMMARY.....	128
MELLÉKLETEK.....	130
M1 IRODALOMJEGYZÉK.....	130
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	146

Rövidítések jegyzéke

Arg	arginin
<i>avr</i> gén	avirulencia gén
<i>Bs-2</i> gén	a paprika <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> baktérium elleni specifikus rezisztenciáját biztosító gén
BA	benzoic acid = benzoesav
BA2H	benzoesav-2-hidroxiláz
BTH	benzotiadiazol-karbotionsav metilésztere
DH	dihaploid
GDR	general defense reaction = általános védekezési reakció
<i>gds</i> gén	general defense system = általános védekezési rendszer
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HR	hypersensitive reaction = hiperszenzitív reakció
INA	2,6-diklór-izonikotinsav
ISR	induced systemic resistance = indukált szisztémikus rezisztencia
JA	jasmonic acid = jázmonsav
LAR	localized acquired resistance = helyi szerzett rezisztencia
Lys	lizin
PAL	phenylalanine-ammonia-lyase = fenilalanin-ammónia-liáz
PAMP	pathogen-associated molecular pattern = a patogénekre jellemző molekuláris mintázat
POD	peroxidáz enzim
PR	pathogenesis-related = kórfolyamathoz kapcsolódó
R gén	monogénes, domináns rezisztenciagén
ROS	reactive oxygen species = reakcióképes oxigénformák
SA	salicylic acid = szalicilsav
SAG	szalicilsav-glikozid
SAR	systemic acquired resistance = szisztémikus szerzett rezisztencia
TML	N ^ε -trimetil-L-lizin

1. BEVEZETÉS

A genetika és növénykórtan szakterületét magában foglaló rezisztencia nemesítés egy-egy növényfaj főbb kórokozói, kártevői ellen specifikus rezisztencia gének beépítésével kívánja többek között a friss fogyasztásra szánt zöldségfélék növényvédőszer mentes termesztését lehetővé tenni. A paprika rezisztencia nemesítésén három évtizede dolgozó munkacsoport is, mint a rezisztencia nemesítés története során mindenki, a gyors szövetpusztulás, az úgy nevezett hiperszenzitív reakció alapján végezte a szelekciót. A közel két évtized alatt összegyűjtött tapasztalat, stratégiaváltásra készítette a kutatócsoportot. A változtatás egyik lépése a hiperszenzitív reakciónak, mint úgy nevezett rezisztencia válasznak felülbírálnak. Ezzel párhuzamosan egy másik, általuk felismert növényi tulajdonság, az *általános védekezési rendszer* felhasználásával új alapokra helyezték a rezisztencia nemesítést.

A paprika általános védekezési rendszerének genetikai elemzése és kórtani jellemzése egy alapvetően új betegség ellenállósági rendszer létezését bizonyította, mely eddig ismeretlen stratégia alapján, a megtámadott sejtek, szövetek megtartásával, megerősítésével zárja ki a kórokozókat. Az általános védekezési rendszer aspecifikus reakcióval védi meg az egészséges sejteket, mely sejtnagyobbodáson, sejtosztódáson alapuló szövettömörödésben megnyilvánul meg.

Ebben a munkacsoportban feladatul kaptam a paprika általános védekezési rendszerét kódoló *gds* (*general defense system*) gén által szabályozott folyamatok biokémiai hátterének feltárását. Munkám során kontrollként a paprikát megbetegítő *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal szemben védettséget adó *Bs-2* specifikus rezisztencia gént használtam.

- A paprikával kompatibilis és inkompatibilis kapcsolatban lévő kórokozókkal szemben egyaránt védelmet biztosító *gds* gén jellemzéséhez elengedhetetlennek tartottam a gazda rezisztencia és nem-gazda rezisztencia témakörben ismert szerteágazó irodalom áttekintését és rendszerezését abból a célból, hogy genetikai, tüneti és biokémiai alapon egyértelműen elhelyezhessük a meglévő rendszerezésben és kijelenthessük, hogy egy olyan védekezési formával állunk szemben, mely az eddig ismert jelenségekkel nem azonosítható.

- A *gds* génre és a *Bs-2* génre jellemző szöveti reakciók energetikai hátterét a glükóz mennyiségi változásain keresztül kíséreltem meg felmérni.

- A specifikus rezisztencia gének gyors szövetpusztulásban megnyilvánuló hiperszenzitív reakciójának egyik fő biokémiai jellemzője az oxidatív kitörés, melynek során nagy mennyiségben hidrogén-peroxid halmozódik fel. Célul tűztem ki a *gds* gént tartalmazó növények fertőzött szöveteiben képződő hidrogén-peroxid koncentráció alakulásának és szerepének vizsgálatát.

- Különböző gazda-patogén kapcsolatokban általánosan elterjedt jelzőmolekula a szalicilsav, mely nagyban hozzájárul a rezisztencia kialakításához. A léziószám és lézióméret csökkenésére ható szalicilsav magas koncentrációban tünetmentes rezisztenciához vezethet. E jelenség ismeretében szükségesnek tartottam a szövetpusztulás nélküli reakcióval jellemezhető, *gds* gént tartalmazó növények fertőzött szöveteiben lévő szalicilsav mennyiségének meghatározását.

- Fontos kérdésként merült föl, hogy az oxidatív kitöréssel jellemezhető, szövetpusztulással járó rezisztens reakciókkal ellentétes hatású, szövetmegtartást eredményező általános védekezési reakcióban milyen szerepe van a káros gyökök semlegesítését végző peroxidáz enzimnek.

- Vizsgálat tárgyát képezte, hogy a stresszhatások kivédésében szerepet játszó transzmetilezés, vagyis a metil-csoportok leválásán illetve beépülésén alapuló szabályozás folyamata, hogyan megy végbe illetve a transzmetilezés folyamán keletkező formaldehidnek van-e szerepe a *gds* gén által irányított általános illetve a *Bs-2* gén által irányított specifikus védekezési reakció során.

- A *gds* és *Bs-2* gén közti kölcsönhatás genetikai alapjainak tisztázásával illetve kórtünetekben megnyilvánuló egymásra hatásuk biokémiai folyamatok alapján történő mélyreható vizsgálatával kívántam tisztázni a két reakciótypus növényi betegség ellenállóságban betöltött szerepét. A *gds* és *Bs-2* gén által szabályozott két reakciótypus, fertőzés kivédésében evolúciósan meghatározott egymás utániségének kórélettani alapjait vizsgáltam a rezisztencia nemesítési munkában való helyes alkalmazhatóság érdekében.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. *R* génekhez kötött rezisztencia

A növények, életük folyamán számtalan mikroba fajjal kerülnek érintkezésbe. A kontaktusok többsége közömbös, kisebb részben lehetnek előnyösek és elenyésző esetben a növény számára hátrányosak, vagyis a növény megbetegedését eredményezik. Ez utóbbi esetben a növény-mikroba kapcsolat gazda-patogén kapcsolattá válik.

A gazda-patogén kapcsolat kialakulásának feltétele, hogy a potenciális kórokozó a növény fizikai és kémiai védekezési rendszere ellenére képes legyen a behatolásra, a növény számára észrevétlen maradjon, a növényben megfelelő életfeltételeket találjon, vagy a növény által megindított általános védekezési folyamatok ellenére szaporodni tudjon.

A növények a kórokozóikkal szembeni védekezéshez különböző, kórokozó-felismerő rendszereket és specifikus reakciókat alakítottak ki. A specifikus felismerés valószínűleg a növény domináns vagy szemidomináns rezisztencia (*R*) gén termékének és a kórokozó részéről a megfelelő, domináns avirulencia (*Avr*) gén termékének közvetlen vagy közvetett kölcsönhatásának eredménye (Keen, 1990; Martin, 2003). Az ezt követő jelátviteli események különböző védekezési válaszok aktiválását irányítják, melyekhez tipikusan hozzá tartozik a hiperszenzitív reakció (HR), vagyis a gyors, lokális, azaz a fertőzés helyét érintő sejthalál. Ezt nevezik „gene for gene” típusú rezisztenciának (Flor, 1955; 1971).

E folyamattal kapcsolatban még számos kérdés megválaszolatlan.

Az *R* gének valószínűleg kulcselemei a felismerésnek, de vajon a különböző csoportba tartozó *R* gének különböző válaszokat aktiválnak? A kórokozóspezifikus ingerekre adott, *R* gének szabályozta növényi válaszoknak, sajátosságaik mellett, vannak-e közös, általános jellemzőik?

A „gene for gene” alapú és a nem-gazda rezisztencia válaszok között vannak-e közös elemek? Melyek az elsődleges illetve a másodlagos válaszok? Melyek irányulnak a kórokozó szaporodásának visszafogására vagy megállítására és hogyan? A transzkripció szintű szabályozás, a már meglévő enzimek aktiválása, az ionáramlás megváltozása kizárólag az elsődleges válasz részei-e? Milyen összefüggés van az elsődleges válasz sebessége és a rezisztencia hatékonysága között? Milyen a rezisztencia és a hiperszenzitív reakció viszonya?

2.1.1. Hiperszenzitív reakció

Az inkompatibilis válaszok általában nekrozissal járnak, melynek mértéke az egy sejtre lokalizált HR-től a folyamatosan terjedő szövetpusztulásig változhat (Holub és mtsai 1994).

A növényi sejtek gyors nekrozisát, a kórokozóra és a növényi sejtre egyaránt káros szabadgyökök okozzák, melyek a hiperszenzitív válasz esetén beinduló anyagcsere folyamatok során nagy mennyiségben termelődnek (Dangl és mtsai 1996). A sejtek pusztulásával kiszabaduló antimikrobiális enzimek és metabolitok révén kémiai, a jól körülhatárolt léziókban pedig fizikailag is izolált kórokozók nem jutnak további tápanyaghoz, így szaporodásuk megáll (Clough és mtsai 2000). A sejthalál során keletkező helyi illetve szisztémikus jelek fölszabadulásával egyúttal a nem fertőzött, szomszédos sejtekben és a távoli szövetekben is védekezés aktiválódik. Ezt nevezik lokális illetve szisztémikus szerzett rezisztenciának.

Ross (1961) *N* gént tartalmazó dohányt TMV-vel inokulálva megfigyelte, hogy a hiperszenzitív lézió körüli 1-2 mm-es zónában magas szintű rezisztencia alakult ki. A jelenséget helyi szerzett rezisztenciának (localized acquired resistance= LAR) nevezte el.

Dorey és mtsai (1997) dohányon gomba elicitorral való kezeléssel váltottak ki HR-t és LAR-t. Az infiltrált, HR-t mutató levélterületet 1-es zónaként, a körülötte lévő, 5 mm széles szövetet 2-es, vagy LAR-zónaként különítették el. A sejtszintű analízis során látható volt, hogy élesen elhatárolódik az elhalt és az élő sejteket tartalmazó zóna. Az egyes zónára jellemző volt az erős oxidatív kitörés, a szalicilsav (SA) felhalmozódás és olyan, a másodlagos anyagcserében részt vevő gének gyors stimulációja, melyek fenilpropanoidok és szeszkviterpenoidok termeléséért felelősek. A kettes zónában, ahol a HR és az oxidatív kitörés elmaradt, a fent említett gének mellett PR (Pathogenesis Related) fehérjék indukcióját és SA termelődését mutatták ki. Bizonyították, hogy a LAR indukcióját nem az elicitor, hanem a HR-t adó szövetből kijutó növényi jel, jelek okozzák.

Ugyanez a kutatócsoport (Costet és mtsai 1999) állapította meg azt is, hogy a kettes zónában elmarad a LAR, amennyiben nem indukálódik HR a fertőzött illetve elicitorral kezelt szövetekben. SA felhalmozására képtelen dohány típus (*NahG*) segítségével bemutatták, hogy nem a SA az, ami jelként a HR zónából a LAR zónába diffundál.

Klement és mtsai (2003) a helyi indukált rezisztenciának (localized induced resistance= LIR) egy korai és egy késői szakaszát különböztetik meg. A korai indukált rezisztencia (early induced resistance= EIR) a fertőzést követő harmadik és 24. óra között működik, míg a késői indukált rezisztencia kifejlődéséhez 24 óra kell és hosszabb ideig hatékony. Az EIR-t nem-

specifikus helyi reakcióként írják le, mely párhuzamosan fejlődik ki a HR-rel, és amennyiben indukciós ideje rövidebb, mint a HR-é, megelőzi annak kialakulását.

A fentiek alapján úgy tűnik, hogy a kórokozó szaporodásának gátlása a hiperszenzitív szövetpusztulás miatt alakul ki.

Egy másik elgondolás szerint a HR csak egy mellékhatás, mely a védekezés rendkívül erős megnyilvánulásának következménye, mint például az „oxidatív kitörés” (oxidative burst) vagy a sejten belül képződött, toxikus hatású antimikrobiális vegyületek nagy mennyisége (Király és mtsai 1972; Goulden és Baulcombe, 1993; Bendahmane és mtsai 1999).

Ezt támasztja alá az a tény is, hogy az oxidatív kitörés, vagyis a hirtelen, nagy mennyiségben termelődő reakcióképes oxigénformák (Reactive Oxygen Species=ROS), illetve a kórfolyamat során megjelenő PR fehérjéket kódoló gének aktiválódása és a megemelkedett szalicilsav szint olyan változások, melyek a fertőzés okozta sejthalált megelőzően jelentkeznek. Később a sejthalál maga is kivált ilyen válaszokat, de ezeknek ebben az esetben már csak kiegészítő, védekezést erősítő szerepe van (Yu és mtsai 1998).

Az *R* gén - *Avr* gén kölcsönhatástól eltérő rezisztenciaformák esetében a növényi válaszok alacsonyabb szinten aktiválódnak, és jellemzően nem is járnak sejthalállal (Mysore és Ryu, 2004).

A „gene for gene” rezisztencián belül is előfordul, hogy egy rezisztencia gén HR megjelenése nélkül biztosít rezisztenciát, bizonyítván, hogy a sejthalál önmagában nem lényegi jelentőségű a kórokozó megállításában. Burgonyában az *Rx* gén a burgonya X vírussal (PVX) szemben ad tünetmentes, úgynevezett extrém rezisztenciát (Köhm és mtsai 1993). A *dnd1* (*dnd*= defense no death = sejthalál nélküli védekezés) mutáns allélt hordozó *Arabidopsis* növények HR nélküli „gene for gene” alapú rezisztenciával bírnak az avirulens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* baktériummal szemben és fokozott rezisztenciát mutatnak számos vírus, baktérium és gomba kórokozó ellen is (Yu és mtsai 1998). Az árpanak az árpalisztharmat (*Erysiphe graminis* f. *sp hordei*) összes rasszával szemben védettséget biztosító *mlo* gén hatása sem a HR kiváltásán alapul (Büschges és mtsai 1997).

A paprika *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal szembeni specifikus rezisztenciáját biztosító *Bs-2* gén a genetikai háttértől függően hiperszenzitív reakcióval vagy anélkül akadályozza meg a kórokozó növényben történő elszaporodását (Szarka és mtsai 2002).

A HR jelenléte vagy hiánya nem feltétlenül utal eltérő rezisztencia mechanizmusra (Hammond-Kosack és Jones, 1996). Lehetséges, hogy minden *R* gén olyan választ indukál,

mely HR-rel végződik, de egyes esetekben a válasz olyan hatékonyan előzi meg a betegség kialakulását, hogy a sejthalál nem következik be.

Érdekes a sejthalál szerepének megítélése külön az ellenállóság illetve a fogékonyság szempontjából (Abramovitch és Martin, 2004). Több tanulmány is rámutatott arra, hogy egyes biotróf gombák megbetegítő képessége abban rejlik, hogy olyan molekulákat és enzimeket termelnek, melyekkel elnyomják a gazda sejthalállal járó válaszát. Ezzel ellentétben, számos nekrotróf gomba gazdaszelektív toxinokat használ arra, hogy egy specifikus növény fajtát parazitáljon és patogenezise részeként elősegíti a gazdában a sejthalált. A patogének a növényi sejthalál elnyomásához vagy elősegítéséhez általános sejthalál anyagcsereutakat is megváltoztathatnak. Így a növényeknek, a különböző életformájú kórokozók támadásai esetén, felváltva kell használniuk az egyes rezisztenciaformákat, mert a biotróf patogének számára előnyös, ha a sejthalál túl könnyen elnyomható, ellenben egy könnyen aktiválható sejthalál rendszer, mely védelmet nyújthat a biotróf patogének ellen, kiaknázható a nekrotrófok által.

A védekezési stratégia változtatásának szükségessége jól illusztrálható az árpa és a mutáns *mlo* gén példáján keresztül, mely elősegíti a sejthalált és rezisztenciát nyújt a biotróf árpalisztharmat ellen, ugyanakkor a vad *MLO* genotípushoz képest fogékonyabbá válik a heminekrotróf *Magnaporthe grisea* kórokozóval szemben (Jarosch és mtsai 1999).

2.1.2. Reakcióképes oxigénformák

Az inkompatibilis kapcsolatokban kialakuló hiperszenzitív reakció beindításában elsődleges szerepet tulajdonítanak a reakcióképes oxigénformáknak. Doke és mtsai (1983, 1988) megfigyelései szerint a legkorábban megjelenő reaktív oxigénforma a szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$). A savas PH-jú növényi sejtfalban a szuperoxid felezési ideje egy másodpercnél kevesebb (Sutherland, 1991). A szuperoxidot az extracelluláris szuperoxid-dizmutáz (SOD) gyorsan hidrogén-peroxiddá (H_2O_2) alakítja, melynek következtében a H_2O_2 mennyisége jelentősen megemelkedik. Ezt nevezik oxidatív kitörésnek (oxidative burst). Míg a H_2O_2 könnyen átjut a membránokon, a szuperoxid erre csak nagyon lassan képes. A szuperoxid és a H_2O_2 csak mérsékelten reakcióképes, ugyanakkor reaktívabb formába, hidroperoxil (HO_2^{\bullet}) illetve hidroxil (OH^{\bullet}) gyökké való átalakulásuk révén sejtkárosító hatásúak. Ha a H_2O_2 a citoplazmában megfelelő koncentrációt ér el és eljut a növény vagy a kórokozó sejtmagjáig, a vas ionokkal reagálva hidroxilgyökké alakul, mely a DNS roncsolására képes (Halliwell and Gutteridge, 1990).

Virulens és avirulens baktérium hatására igen gyorsan, 5 percen belül H_2O_2 -termelődés következik be. Ezt az extra- és intracelluláris tér közötti ionáramlás megváltozása előzi meg, melyhez a sejten kívüli tér Ca^{2+} -koncentrációjának megemelkedése és az anion csatornák aktivációja szükséges (Nürnberg és mtsai 1994). Avirulens baktérium esetén 2-4 órával a fertőzés után egy második, erőteljesebb oxidatív kitörés is megfigyelhető. Valószínűleg ennyi idő alatt váltja ki az avirulencia fehérje a növény H_2O_2 -termelésben megnyilvánuló védekezését (Levine és mtsai 1994; Baker and Orlandi, 1995).

A növények és emlősök esetében azonos ROS-termelődésen kívül a növényekben, két további módon képződhet H_2O_2 . Oxálsavból az oxalát-oxidázon keresztül, illetve a sejt falban lokalizált peroxidázok (POD) által (Bolwell és mtsai 1995). Ezek alapján a növényekben legalább három mechanizmus létezik a reakcióképes oxigénformák termelésére. Különböző növényfajokban eltérő lehet a ROS-termelés módja, illetve az, hogy ezek közül melyik folyamat dominál az oxidatív kitörés során.

A ROS a növényi védekezésben többféle szerepet tölthet be. A növény képes olyan koncentrációban előállítani H_2O_2 -t, melynek közvetlen toxikus hatása van a mikrobákra. A H_2O_2 a sejt falszerkezet megerősítésében is részt vesz a sejt falat alkotó egyik polimer, a lignin előanyagainak előállításán keresztül, valamint a sejt falfehérjék közti oxidatív keresztkötések kialakításának katalizálásával. A H_2O_2 jelzőmolekulaként fokozza a szalicilsav szintéziséhez szükséges benzoésav-2-hidroxiláz (BA2H) enzim aktivitását. A H_2O_2 az antimikrobiális hatású fitoalexinek termelését is indukálja, de valószínűleg nem a fenilpropanoid illetve flavonoid anyagcsereúton, nem a fenilalanin-ammónia liáz (PAL) enzim aktiválásán keresztül.

A védekezés során termelődő ROS miatt megváltozik a sejt redox egyensúlya. Mivel számos transzkripciós faktor szabályozása a redoxállapoton keresztül történik (Schreck és mtsai 1991; Meyer és mtsai 1993), a szuperoxid és a H_2O_2 is szolgálhat jelként a növény védekezési gégeinek indukálásához. A redoxállapot változására indukálódhatnak olyan enzimek is, melyek a szabadgyökök semlegesítéséért felelősek, védő vagy javító aktivitásúak (Mehdy, 1994). Ezekre a folyamatokra a különböző reaktív oxigénformák más-más módon hatnak.

2.1.3. A sejt fal megerősítése

A mikrobák bejuthatnak a növénybe természetes nyílásokon vagy sérüléseken keresztül is, de legtöbbször át kell hatolniuk a kutikulán és a sejt falon. Ehhez a sejt fal különböző polimerjeit bontó enzimeket használnak, de maga a mechanikai nyomás is segít a mikroba bejutásában. A sejt fal megerősítése különböző módon járulhat hozzá a rezisztenciához. A sejt falban zajló

polimerizációs reakciók során keletkező fenolos lignin prekursorok és szabadgyökök hatással lehetnek a kórokozók membránjának plaszticitására, inaktíválhatják enzimeiket, toxinjaikat, elicitoraikat. A sejtfalszintézis természetes folyamata alkalmas arra is, hogy a gazdanövény a magas szinten specializálódott gomba kórokozó hifáit is lignifikálja (Mauch-Mani and Slusarenko, 1996).

A mikrobák enzimikus tevékenysége során keletkező sejtfal fragmentumok maguk is védekezési folyamatokat indíthatnak el, vagy erősíthetnek meg (De Lorenzo és mtsai 1994).

A sejtfal fragmentumok közül a galakturonsav oligomerjei a poligalakturonáz enzimet gátló fehérjék (PGIPs) megjelenését vonja maga után. Bell és mtsai (1986), valamint Nuss és mtsai (1996) kísérletei alapján a PGIPs indukálódásának folyamata a PR fehérjékkel megegyező volt. Érdekes, hogy a PGIP fehérjékben is van egy leucinből álló ismétlődésekben gazdag motívum, mely egyes *R* gének fehérjetermékében szintén megtalálható (Bent és mtsai 1994).

A gomba kórokozókra adott gyors sejtfalválasz a papillaképződés, mely fizikailag akadályozza a gomba behatolását (Heath, 1980; Bayles és mtsai 1990). A papillák egyik fő összetevője a kallóz, melyet a sejthártyában lokalizált kallóz-szintáz enzim termel.

A bázikus hidroxiprolinban gazdag glikoproteinek (HRGPs) az elsődleges sejtfalszerkezet fő alkotói és a lignin polimerizáció kiindulási pontjai lehetnek (Showalter, 1993; Bolwell és mtsai 1995). Az oxidatív kitöréskor a HRGP fehérjék közt kialakuló keresztkötések a leggyorsabb válaszok közé tartoznak, melyek a sejtfal megerősítésére szolgálnak (Bradley és mtsai 1992).

A sejtfal és a mikroba kölcsönhatásánál a lignin tartalom helyi megemelkedése szintén a sejtfal áthatolhatatlanná tételére irányul, de ez a keresztkötések kialakulásához képest lassabb reakció (Whetten and Sederoff, 1995).

2.1.4. Benzoésav és szalicilsav

Inkompatibilis kapcsolatokban gyakori jelenség a benzoésav (BA), szalicilsav (SA) és konjugátumaiknak fölhalmozódása, mely sok esetben HR-rel jár (Raskin, 1992). A SA a fenilpropanoid anyagcsere során képződik BA-ból a BA2H enzim segítségével. A SA-szintézis szabályozása az egyes fajokban eltérő lehet. Egyik esetben a konjugált formából felszabaduló szabad BA indukálja a benzoésav-hidroxilázt (Léon és mtsai 1995), míg olyan fajok esetében, amelyek nem raktároznak BA-konjugátumokat, a PAL enzim megnövekedett aktivitása indítja el a SA-szintézishez vezető folyamatot (Mauch-Mani and Slusarenko, 1996). A BA és a SA védekezés során közvetlen antimikrobiális hatást fejthetnek ki (Raskin, 1992; Klessig és Malamy, 1994).

A magas SA-szint egyfelől a mikrobiális kórokozók elleni válaszokat aktiválja, ugyanakkor a jázmonsav (JA) bioszintézis gátlásán keresztül biztosítja, hogy a rovarok és nematódák ellen hatásos, sebzés-indukálta gének ne indukálódjanak szükségtelenül.

A SA feltétlen szerepét különböző, vírusok, baktériumok és gombák elleni *R* géneken alapuló rezisztencia esetében is bizonyították a bakteriális eredetű *NahG* génnel transzformált növények segítségével. Az állandóan kifejeződő *NahG* gén által kódolt szalicilát-hidroxiláz a SA-at lebontja, így ezekben a növény típusokban határozottan kevesebb a SA mennyisége (Gaffney és mtsai 1993; Delaney és mtsai 1994). A SA-felhalmozódás elmaradása miatt a transzgénikus növények helyi, *R* gének által biztosított rezisztencia válaszai gyengébbek voltak, nagyobb léziót adtak (Ryals és mtsai 1996). Ez alól kivétel a *Cf* gént tartalmazó, *Cladosporium fulvum* kórokozóval szemben rezisztens paradicsom, ahol a *NahG* gén jelenléte nem rontotta a rezisztencia szintjét.

A rizsre jellemző állandóan magas SA-szint összefügg az általános betegségellenállósággal, ugyanakkor fertőzés hatására nem nő a mennyisége.

Ezek alapján a SA szerepe mindenképpen összetett, és valószínűleg fajok szerint is változó lehet.

2.1.5. PR fehérjék és más, védekezéshez kötődő fehérjék

Bowles (1990) definíciója alapján PR fehérjének számít minden olyan extra- és intracelluláris fehérje, mely érintetlen növényben vagy sejt kultúrában kórokozóval való fertőzést illetve elicitor-kezelést követően halmozódik fel.

A PR fehérjék esetében is kérdés, hogy milyen módon járulnak hozzá a rezisztenciához. Számos PR fehérjéről derült ki, hogy kitináz vagy glukanáz aktivitású (Collinge és mtsai 1993; Melchers és mtsai 1994). A kitinázok egy változatos enzimescsoport, melyeknek a gomba kórokozók elleni védelemben lehet szerepük, mivel a gombák sejt falában található kitint bontják. Vírus- vagy baktérium ellenes hatású PR-fehérjéről máig nem számoltak be (Heil és Bostock, 2002).

Bizonyíték a PR fehérjék rezisztenciában betöltött szerepére, hogy az olyan transzgénikus növények, melyekben az ismert, vagy akár ismeretlen funkciójú PR fehérjék kifejeződése állandó, egyes gombakórokozókkal szemben rezisztensebbek (Broglie és mtsai 1991; Lui és mtsai 1994). Az ilyen kísérletekből további következtetések születtek. A vakuólumban lévő bázikus PR fehérjék gombaellenes hatása sokkal erősebbnek bizonyult, mint savas megfelelőiké, melyeket a sejt fal választ ki (Sela-Buurlage és mtsai 1993). Amikor egyszerre két vagy több PR fehérje fejeződött ki folyamatosan, szinergista hatást fejtettek ki a

betegségellenállóság növelésére (Zhu és mtsai 1994). Ez arra enged következtetni, hogy a rezisztenciához a PR gének összehangolt működése szükséges.

A PR fehérjék valószínűleg nem a „frontvonalon zajló védekezés” részei, leginkább a biotróf kórokozókkal szemben lehet szerepük, a növényi sejtek jelentős roncsolódását követően. Bár, egyes citoplazmában lokalizált PR fehérjék génjei nagy sebességgel aktiválódnak elicitorkezelést követően, így lehetséges, hogy ezek az elődleges válaszhoz kellenek (Somssich és mtsai 1989; Hahlbrock és mtsai 1995).

A védekezéshez kapcsolódó gének másik csoportját a bázikus, ciszteinben gazdag tioninok alkotják, melyek főleg gabonafélékben találhatóak és szintén antimikrobiális hatásúak (Bohlmann, 1994). A PR fehérjékhez hasonlóan ezek is különböző módon halmozódnak fel az egyes inkompatibilis kapcsolatokban. Epple és mtsai (1995) bemutatták, hogy míg a PR gének aktivációjához vezető folyamatot a SA közvetíti, a tionin gén kifejeződését *Arabidopsis* esetében, a JA-közvetítette jelátviteli út szabályozza.

Zeller sejt kultúrával és *Phytophthora sojae* kórokozóból származó elicitorral modellezett nemgazda kapcsolatban Somssich és mtsai (1989) megfigyelték, hogy legalább 19féle, elicitorral aktiválható gén indukálódott. Egy másik tanulmány (Kawalleck és mtsai 1992) arról számol be, hogy az elicitorral indukálható gének között a tipikus, PR fehérjék és fitoalexinek termeléséért felelős géneken kívül olyanok is vannak, melyek géntermékei az aktivált metilcsoport ciklusban szerepelnek, mely viszont az elsődleges anyagcsere része.

Ezek alapján a tanulmányok alapján kiderül, hogy a védekezés alatt a sejt különböző részeiben rendkívül változatos növényi fehérjék szintetizálódnak összehangoltan, mely az elsődleges és másodlagos anyagcserét is érinti.

2.1.6. Lipoxigenázok

A lipoxigenáz (LOX) enzim aktivitásában bekövetkező hirtelen növekedés gyakran specifikusan összefügg az *R* gének és *Avr* gének által meghatározott rezisztenciával. Ez a rezisztenciáért több módon lehet felelős. A LOX szignálmolekulákat generálhat, úgy mint SA, metil-jázmonát (MeJA), lipid-peroxidok, melyek együttesen specifikus válaszokat erősítenek fel. A LOX enzim működése irreverzibilis membránkárosodást okozhat, majd a sejttartalom kiömlése által sejthalálhoz vezet (Kepler and Novacky, 1986). Egy másik lehetőség, hogy a LOX által katalizált reakciók során toxikus illékony és nem illó, zsírsav eredetű szekunder metabolitok termelődnek, melyek közvetlenül hatnak a kórokozóra (Croft és mtsai 1993).

2.1.7. Fitoalexinek

A fitoalexinek kis molekulású, lipofil, antimikrobiális vegyületek, melyek inkompatibilis kórokozók fertőzése körül illetve számos biotikus és abiotikus elicitor hatására termelődnek. A fitoalexinek jellemzően azon a ponton képződnek, ahol az elsődleges anyagcsereutak folyamán megtermelődött prekursorok a másodlagos anyagcsereútba belépnek. A prekursoroknak ez az átalakulása olyan enzimek *de novo* indukálódására következik be, mint például a PAL, mely a bioszintézis utak kulcsfontosságú pontjait szabályozza (Dixon and Paiva, 1995). Ugyanakkor, mivel a legtöbb fitoalexin szintéziséhez számos enzim kell, az ilyen jellegű védekezés sikeréhez magas szinten koordinált jelzőeseményekre van szükség.

A fitoalexinek *in vitro* antimikrobiális hatása tagadhatatlan, de hogy az *R* gén függő válaszokban milyen mértékű a szerepe, az még nem ismert. Ezt a kérdést mutánsok segítségével közelítették meg (Glazebrook and Ausubel, 1994). A *pad1*, *pad2*, *pad3* fitoalexin hiányos *Arabidopsis* mutánsok *P. syringae* (*avrRpt2*) elleni *R* gén (*RPS2*) függő rezisztenciája nem sérült a fitoalexin hiány miatt. Egy másik tanulmány szerint az olyan transzgenikus dohányoknak, melybe a resveratrol nevű fitoalexint állandóan termelő gént építettek be, a *Botrytis cinerea* ellen magasabb rezisztenciája volt (Hain és mtsai 1993).

Több növény-kórokozó kapcsolatban fölmerülhet a kérdés, hogy a fokozott fitoalexin termelés célja a másodlagos fertőzés súlyosságának vagy a virulens kórokozó általános elterjedésének mérséklése.

Az elemi ként is az erős gombaellenes hatással bíró fitoalexinek közé sorolják (Cooper és mtsai 1996). Kakaó esetében kizárólag a *Verticillium dahliae* kórokozóval szemben rezisztens genotípusban mutatták ki a ként a szállítószövet fa részében fölhalmozódva. A kén bioszintetikus eredete ismeretlen a növényekben.

2.2. Nem-gazda rezisztencia

Egy fogékony gazdanövény fajon belül fajtákra, genotípusokra jellemző a *gazda rezisztencia*, mely specifikus kórokozó-genotípusok ellen alakult ki. A rezisztencia egy másik formája egy növényfaj egésze számára, általánosan biztosít védelmet. Ez a *nem-gazda (non-host) rezisztencia*. A növények a legtöbb mikroorganizmus ellen a nem-gazda rezisztenciával védekeznek, melyet a növényi betegségellenállóság leggyakoribb formájának tartanak.

A gazda rezisztencia általában monogénes, melyet az *R* gének irányítanak. E gének termékei, az *R* fehérjék közvetlenül vagy közvetve kölcsönhatásba lépnek a kórokozó avirulencia (*avr*)

génjei által termelt elicitorokkal (Flor, 1971). A „gene for gene” rezisztenciának a megértése viszonylag előrehaladott, bár még olyan alapvető kérdések mindig megválaszolatlanok, mint hogy egy patogén miért teljesen virulens az egyik növényfajon míg egy másikon nem.

A nem-gazda illetve a „gene for gene” rezisztencia között vannak határozott hasonlóságok, de kérdés, hogy a rezisztencia válaszok ugyan azon mechanizmuson keresztül valósulnak-e meg. Mára a nem gazda rezisztencia számos elemét azonosították, de a mechanizmusáról még keveset tudunk. Ma még kevés esetben tudják megnevezni, hogy melyek azok a tulajdonságok, amelyek egy növényben közvetlenül állítják meg azon kórokozók szaporodását, melyeknek az adott növény nem gazdanövénye. Gomba kórokozókat illetően az ismert adatok alátámasztják azt a lehetőséget, hogy a sejtfalon belüli erősen lokalizált válaszok és a korai jelzőfolyamatok elsődleges szerepet játszanak a nem-gazda rezisztenciában (Heath, 2000).

2.2.1. A nem-gazda rezisztencia alkotóelemei

A nem-gazda rezisztenciához szükségesek az eleve meglévő, passzív illetve az indukálható védekezési mechanizmusok, a jelzőrendszer elemei és a széles spektrumú rezisztenciát biztosító gének.

2.2.1.1. Passzív védekezési formák

A kórokozó a passzív védekezési formákkal találja szemben magát először. Ilyen a fizikai akadályt jelentő sejtfal, a citoszkeleton, valamint az antimikrobiális hatású szekunder metabolitok.

A sejtfal elsődleges alkotói a nagy molekulatömegű poliszaharidok, melyek hálózatot képezve fizikai akadályként szolgálnak a mechanikai erőt kifejtő, illetve a sejtfalbontó enzimeket kibocsátó kórokozók ellen. A sejtfal összetételének szerepe lehet a betegségellenállóságban és az enzimeknek ellenálló poliszaharidok felhalmozódása hatékony védelmet jelenthet (Vorwerk és mtsai, 2004).

A sejtfal hidratált és gélszerű, főként cellulózt, hemicellulózt és egy, a pektint is magában foglaló, galakturonsavban gazdag frakciót tartalmaz. A sejtfal összetétele jelentősen eltérő és egyben jellemző is az egyes fajok esetében. Így például, míg a kétszikűek sejtfala 35% pektint, 30% cellulózt, 30% hemicellulózt és 1-5% szerkezeti fehérjét tartalmaz, a fűfélék esetében 55% hemicellulózt, 25% cellulózt, 10% pektint alkotja a sejtfalat. A finomszerkezet

szintjén valószínűleg még magasabb szintű a variabilitás, azonban eddig a legtöbb sejtfalpoliszaharid finomszerkezeről csak átlagos képet szerezhettünk, mert a nagy molekulású poliszaharidok tisztítása és jellemzése nem olyan fejlett, mint a fehérjéké.

A sejtfal összetételének fazon belüli, genetikai alapú különbségeiről keveset tudunk, de felmerül, hogy ennek alapján eltérő lehet a gazda-patógén kapcsolatok kimenetele és hogy a nem-gazda rezisztencia oka lehet a nem-gazdanövény és gazdanövény sejtfalösszetétele közti különbség (Vorwerk és mtsai, 2004).

A sejtfalban található antimikrobiális anyagok és a kórokozó szaporodását gátló szekunder metabolitok további tényezők a védekezés során (Darvill és Albersheim, 1984; De Lorenzo és Ferrari, 2002). A kórokozók sejtfalbontó tevékenysége következtében, a poliszaharidokból felszabaduló oligoszaharidok szignálmolekulaként védekezési válaszokat indítanak el a növényben.

El-Benoby és Rudolph (1979), Trigalet és Démary (1986), valamint Gross és Rudolph (1987) egy kórokozó-centrikusabb megközelítéssel vizsgálták a szénhidrátok és a betegségellenállóság közti kapcsolatot. Ennek alapja, hogy a levélfoltosodást okozó baktériumok a növénybe jutva extracelluláris poliszaharid (EPS) burkot képeznek maguk körül, ami jó vízmegkötő képességű, így megfelelő környezetet biztosít a baktérium szaporodásához és ez felelős a zsírfolt kialakulásáért is. A növény emiatt a burok miatt nem érzékeli a baktériumot, mert a burok eltakarja azokat a speciális kötőhelyeket, amelyek a növénysejt receptorai számára felismerhetőek lennének. A felismerés elmaradásával a növény védekezése sem indukálódik.

E szerint az elmélet szerint azok a növénytípusok fogékonyabbak a kórokozóval szemben, amelyek eleve több glükózt tartalmaznak. Abban az esetben, ha a növény más szénhidrátokat, elsősorban szaharózt tartalmaz nagyobb koncentrációban, a baktériumnak először le kell azt bontania, és csak ezután tudja a glükóz felhasználásával az EPS burkot felépíteni. Ez alatt a kórokozó felismerése megtörténhet, a növény beindíthatja védekező reakcióit a baktérium szaporodása, illetve az általa okozott stressz ellen (Stefani és Rudolph, 1989; Osman és mtsai, 1986; Gross és Rudolph, 1987).

Sárdi és mtsai (1996, 1999) bab növények különböző korú leveleiben vizsgálták egyes szénhidrát frakciók mennyiségét, valamint azok arányát. Ezzel párhuzamosan mesterséges fertőzésekkel ellenőrizték a zsírfoltosodás mértékét a különböző fenofázisban lévő levélszinteken. Az eredmények azt mutatták, hogy a levelek korával arányosan a glükóz koncentrációja erőteljesen lecsökken és ezzel párhuzamosan az egyébként fogékony növény fokozatosan toleranciára illetve rezisztenciára utaló kórtünetekkel reagál.

Neugabauer és mtsai (1989) a baktériumok EPS-termelő tulajdonságát mutáns törzsek segítségével vizsgálták. Kutatásaik eredményei alapján a levanból és az alginátból, mint két fő komponensből álló EPS-t a baktérium szintetizálja. Kísérleteikből kiderült, hogy az alginát-produkció a *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* fertőzés egyik fontos virulenciafaktora. A növényben jelenlévő alginát, befolyásolja tünetokozó képességét a babon. A szaharóz enzimesen monomerjeire bomlik és ezekből épül fel a glükóz egységeket tartalmazó levan, ami szubsztrátként működik a baktérium számára. Ha a kórokozó erre nézve mutáns, vagyis lev-, akkor szaharózos közegben jól fejlődik, de glükózos, glükonátos vagy glicerolos táptalajon nem.

A baktériumok EPS burkának szerepét a reaktív oxigénformákkal szembeni védelemmel kapcsolatosan is vizsgálta Király és mtsai (1997).

Az antimikrobiális hatású szekunder metabolitok közé tartoznak a szaponinok, melyek széles körben elterjedtek a növényvilágban (Osborn, 1996a). Ugyanakkor, azt nem tudni, hogy a nem- gazda rezisztenciában mennyire általános a szerepük.

A növényi sejt szerkezetét adó citoskeleton, vagyis mikroszálak és mikrotubulusok hálózata, átrendeződés révén, számos nem-gazda gomba behatolását képes megakadályozni. Kobayashi és mtsai (1997a) árpa, búza, uborka és dohány sejtjeiben gátolták a mikroszálakat felépítő aktin polimerizációját, aminek következtében elvesztették nem- gazda rezisztenciájukat számos gomba kórokozóval szemben.

Az árpa és *Erysiphe pisi* nem-gazda kapcsolat vizsgálatához a sejt hosszirányában elhelyezkedő mikroszálakat felépítő aktin, illetve a sejtben keresztirányban található mikrotubulusokat felépítő tubulin polimerizációját gátló vegyülettel kezelték az árpa hajtáscsúcsát (Kobayashi és mtsai 1997b). A mikroszálak és mikrotubulusok lebomlása esetén határozatlanná vált a citoplazma aggregációja és az árpát egyébként megbetegíteni nem tudó *E. pisi* micéliuma képes volt hatolni a sejtekbe.

Yun és mtsai (2003) *Arabidopsis* és búza lisztharmat (*Blumeriella graminis* f.sp. *tricoli*) kapcsolatában bizonyították, hogy mivel a sejtíváz szerkezetének bontását okozó kezelés segítette a gomba szaporodását, a citoskeletonnak meghatározó szerepe van a nem-gazda rezisztenciában.

2.2.1.2. Aktív, indukálható növényi válaszok

A második akadályt az aktív, indukálható növényi védekezési válaszok jelentik, melyek akkor lépnek működésbe, mikor a növény nem specifikus módon felismeri a patogének általános

elicitorait. Az elicitorok olyan, mikrobák által termelt, vagy a mikrobák felszínéről származó molekulák, melyek a növényben válaszreakció kiváltására képesek. A mikrobákra jellemző termékek közé tartozhatnak fehérjék, peptidek, szénhidrátok, lipidek. Gombák esetében nem specifikus elicitorok lehetnek gomba anyagcseretermékek, valamint olyan növényi anyagcseretermékek, melyek a kórokozó által végzett sejtfal-bontás alatt szabadulnak el. Az elsőként azonosított általános bakteriális elicitor a flagellumot alkotó flagellin, illetve annak egy konzervált része (Felix és mtsai 1999; Gómez- Gómez és mtsai 1999).

Az indukált rezisztencia egyik formája az EIR, melyet kiválthatnak hővel előlt baktériumok, nem-kórokozó baktériumok, illetve patogenitásukban hibás mutáns törzsek (Klement és mtsai, 2003). Az EIR megállítja ezen baktériumok szaporodását és helyi rezisztencia alakul ki. Ez azt jelenti, hogy inkompatibilis kórokozóval való felülfertőzéskor elmarad a HR, kompatibilis kórokozóval való felülfertőzés esetén pedig megáll a baktériumszaporodás.

Klement és mtsai (1999) fogékony Samsun dohányfajta és *P. s. pv. phaseolicola* nem-gazda kapcsolatban vizsgálták az indukált rezisztencia korai szakasza (EIR) és a HR viszonyát. Véleményük szerint egyszeri fertőzés után is gátolható a baktérium HR nélkül, mert az inokulálás hatására két párhuzamos válasz indul el, a HR és az EIR. Ezek kölcsönhatása határozza meg a tünettípust. A HR gyors kifejlődése általában elfedi az EIR-t, ezért az csak indirekt módon, a hiperszenzitív nekrosis elmaradásával mutatható ki. Tanulmányukban azt vizsgálták, hogy milyen körülmények közt előzi meg az EIR a HR kialakulását. Az EIR-re nézve megállapították, hogy gyors kifejlődése nagyban függ a hőmérséklettől és a növény élettani állapotától.

Szatmári és mtsai (2005) a nevezéktan egységesítése után a korábban EIR-nek, jelenleg EBR-nek nevezett jelenség, vagyis az általános rezisztencia (basal resistance=BR) korai eseményeinek jellemzéséről számolnak be az általuk izolált molekuláris genetikai markerek segítségével. Tanulmányukban HR-negatív *P. s. pv. syringae* baktériummal indukálják az EBR-t dohánynövényeken, majd ezek génkifejeződési profilját kezeletlen kontroll növényekhez hasonlítják.

A növényi betegségellenállósági válasz és az emlősök veleszületett immunitása esetében lejátszódó molekuláris mechanizmusok közt számos hasonlóság található (Cohn és mtsai 2001). Az emlősök immunrendszeréről szerzett ismeretek és az ott használt elnevezések segítségével közelítenek a növényi folyamatok megértéséhez.

Az állatok veleszületett immunválaszát indukálják a patogén felületi molekulái (PAMPs = pathogen-associated molecular patterns = a patogénekre jellemző molekuláris mintázatok). Ezek felismerő receptorokhoz kötődnek, és az immunválasz gének kifejeződését, valamint

antimikrobiális anyagok termelődését indítják el. A PAMP-ok jellemzői, hogy erősen konzervált a szerkezetük, funkcióbeli jelentőségük van, számos mikroorganizmusban jelen vannak, de hiányoznak a lehetséges gazdaszervezetekből.

Kérdés, hogy a növényi általános elicitorok is mutatnak-e ilyen tulajdonságokat? Úgy tűnik, a veleszületett immunitás molekuláris alapjai az élővilág birodalmi között evolúciós konzerváltságot mutatnak. Az állatokban ismert, veleszületett immunválaszt aktiváló PAMP-okhoz hasonló növényekben is elindítanak úgynevezett alapvédekezéseket (a veleszületett immunitást), ill. a védekezési gének kifejeződését (immunválasz génjei) (Nürnberger és Brunner, 2002). Ennél fogva használatosak a növényeknél is a „PAMPs”, az „immunválasz” és az „immunválasz génjei” kifejezések.

További közös vonás, hogy a veleszületett immunválaszok mitogén-aktiválta fehérje kinázon (MAPK) keresztül aktiválódnak. Asai és mtsai (2002) *Arabidopsis* esetében bizonyították, hogy a flagellin, egy általános elicitor fehérje a baktérium flagellumából, a MAP kináz kaszkádon keresztül aktivál védekezési válaszokat.

Az indukálható védekezés valószínűleg komplex és kölcsönösen összefüggő stressz válaszok sorából áll, melyeket sokféle inger válthat ki, köztük a mikroba támadás is (Heath 2000). Az általános elicitorok és a PAMP-ok által kiváltott növényi válasz a sejtfalvastagodás, a sejtfal lignifikációja, fenolok és flavonoidok fölhalmozódása, szaponin-és fitoalexintermelés, papillaformálás, valamint PR gének indukciója, mely a szisztemikus szerzett rezisztencia (SAR) egyik eleme.

Ma már közismert, hogy a **sejtfal** nem csupán egy passzív, szerkezeti akadály. A gombák esetében a sejtfal a nem-gazda rezisztencia kifejeződésének elsődleges helye. A fertőzés kimenetele a gomba sejtfalon belüli növekedése alatt dől el. Ha a nem-gazda rezisztencia azt megelőzően fejeződik ki, hogy a gomba bejut a sejtekbe, vagyis a sejtközötti járatokban vagy a sejtfalon belüli növekedés során megtörténik a gátlása, akkor nem jár sejthalállal.

Nem specifikus sejtfalhoz kapcsolódó válaszok gazda és nem-gazda növényekben egyaránt elindulnak. Gombák fertőzése során tipikusan ilyen növényi válasz a sejtfalvastagodás, mely **szilika** és **kallóz** lerakódása során alakul ki. A kallóz nevű polimer, mely egy (1-3)- β -D-glükán, a mikrobák támadásakor nagy sebességgel szintetizálódik és rakódik le a sejtfal és a sejthártya közti térben. Ezzel a kórokozó bejutási kísérletének helyén segíti a növényben az antimikrobiális vegyületek (a kórokozó sejtfalát bontó enzimek, fitoalexinek, reaktív oxigénformák) koncentrációját és fizikai akadályként is hat. A sejtfalvastagodásokat, vagy papillákat jellemzően különböző **fenolok** és **reaktív oxigénformák** együttes fölhalmozódása kíséri.

Brown és mtsai (1995) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal szemben *Bs-3* rezisztenciagént tartalmazó paprikanövényen (ECW-30R) vizsgálták a patogenitásért és HR-okozó képességért felelős *hrp* génekben mutáns kórokozó törzsek segítségével a *hpr* gének szerepét a papillaképzés elnyomásában.

A vad típusú, *hrp* gént tartalmazó kórokozó az ECW-30R paprika fajtán 5 nappal a fertőzést követően vizenyős foltokat váltott ki és az érintett sejtek csak gyenge papillaképzéssel reagáltak, mert a *Bs-3* gén ebben a gazda-patogén kapcsolatban nem biztosít HR-t. A különböző *hrp* génekben mutáns baktérium törzsekkel végzett fertőzés nem okozott látható elváltozásokat, mert a növény különböző erősségű papillaképzéssel képes volt ellenállni. A papillaképzés erőssége megegyezett a *hrp* gént nem tartalmazó szaprofita baktériumok által kiváltott válaszok erősségével. Az *avrBs-3* gént tartalmazó baktérium törzs HR-t okozott, míg az avirulencia gén mellett mutáns *hrp* gént tartalmazó baktérium törzs nem okozott makroszkopikus tüneteket. A szerzők ezek alapján bizonyítottak látták a *hrp* gének papillaképzésre gyakorolt gátló hatását.

Vita tárgya, hogy a sejtfalvastagodásnak a betegség ellenállóságban van szerepe, vagy pedig ez a gyűrűszerű szerkezet a gomba kórokozó számára teszi könnyebbé a sejtbe való bejutást. Molekuláris genetikai adatok vannak arra nézve, hogy a sejtfalvastagodások valóban Janus-arcúak, mert funkciójuk van a gomba patogenezisében és a rezisztencia válaszban is. A kórokozót oly módon segítheti a termelő kálló, hogy a gomba elicitorait elszigetelvé megakadályozza a növényt annak érzékelésében, vagy megvédi a gombát a növény által termelt antimikrobiális anyagoktól (Schulze-Lefert, 2004).

Gombák behatolásának helyénél megfigyelhető a citoskeleton szerkezet gyors fölbomlása majd újrászerveződése, mely a kórokozó okozta polarizáció jele. A polarizálódott sejtben lehetővé válik egy ősi, a vezikulumokon alapuló rezisztencia válasz, melynek során a szabályozáshoz szükséges anyagok illetve toxinok kiválasztása és szállítása irányzottan történik. Hückelhoven és mtsai (1999) a sejtfalvastagodásoknál, papilláknál koncentráló vezikulumokban H_2O_2 fölhalmozódását figyelték meg, melyeknek előfordulása összefüggött az árpa lisztharmat elleni „penetration” rezisztenciájával. Ezzel szemben a fogékony kontrollként használt árpavonalon a sikertelen papillaképzési kísérletnél H_2O_2 alig volt kimutatható és ezen sejtekbe a gomba bejutott.

Árpában az *Mlo* gén mutagenézisével előállított recesszív *mlo* allél is úgynevezett „penetration” rezisztenciát biztosít. A rezisztencia abban nyilvánul meg, hogy a kórokozó a behatolási kísérlet helyén a sejtfal átszerveződése és keresztkötések által történő megerősítése miatt nem képes bejutni az epidermisz sejtbe (Thordal-Christensen és mtsai 1997).

Az *mlo* genotípusú árpa növény széles spektrumú rezisztenciával bír az árpa- és búzalisztharmattal szemben. Az *mlo* gén pleiotróp hatása, hogy bár egy epidermisz sejt olyan hatékonyan zárja ki a kórokozót, hogy a sejt nem pusztul el, az érintett epidermisz sejt alatt elhelyezkedő mezofill sejtekben nagy mennyiségű H_2O_2 képződik és ezek HR-t mutató elhálnak. Az *mlo* gént tartalmazó növényben az epidermisz sejtek rezisztens reakciója és az alattuk lévő mezofil sejtrétegek hiperszenzitív pusztulása mind térben, mint időben elkülönül egymástól, de a két folyamat elválaszthatatlan (Peterhansel és mtsai 1997). A pleiotróp hatás következtében ezek a növények kórokozómentes környezetben spontán léziókat mutatnak, ami felgyorsult öregedési folyamatokra utal. Ez a magyarázata, hogy a kiemelkedő lisztharmat rezisztencia mellett a hemibiotróf és nekrotróf hatásokkal szemben érzékenyebbek.

Piffanelli és mtsai (2002) a lisztharmattal szemben fogékony árpában található vad típusú *Mlo* gén szerepére indirekt módon, az *mlo*-szabályozta folyamatokból következtettek. Az *Mlo*, hatása alapján, az *mlo* allél esetében látott védekezési válaszok negatív regulátora, vagyis elnyomja úgy a papillaképzést, mint az *mlo* által biztosított rezisztenciához káros mellékhatásként társuló szövetpusztulást. Ezzel egyben a levél öregedése ellen is hat.

McLusky és mtsai (1999) megfigyelték, hogy a vöröshagyma azon epidermisz sejtjeiben, melyek ellenállnak a *Botrytis allii* fertőzésnek, a fertőzés helyén megnő a fenolos vegyületek mennyisége és a peroxidáz aktivitás, összefüggésben az aktin citoskeleton polarizálódásával. Ezek az elváltozások rámutatnak a fenolvegyületek szerepére a gomba kórokozók okozta sejtfalbontás megakadályozásában, azaz a fenilpropanoid anyagcsereút során szintetizálódó másodlagos anyagcseretermékek védekezésben való fontosságára, valamint a citoskeleton sejtfalhoz kapcsolódó védekezési válaszokban való általános szerepére.

A sejtfal alapú válaszok közül a legtöbb gomba kórokozó kiváltja a kallóz lerakódását és a ROS extracelluláris termelődését. Ezek a nem-specifikus reakciók a gombák behatolási kísérletének folyamán ébredő mechanikai hatásokra és az enzimikus tevékenységre indulnak be. A lisztharmat gombák ezeket az alapvető válaszokat a nem gazda növényeken, illetve fogékony és rezisztens gazdanövényeiken is előidézik. A rozsdagombák viszont legtöbbször nem okoznak kémiai kimutatható válaszokat vagy sejtszintű elváltozásokat sem a fogékony, sem a rezisztens genotípusú gazdanövényeiken. A rozsdagombák azon képessége, hogy hatástalanítják a növény védekezését, úgy tűnik gazda-specifikus, mert nem saját gazdanövényeikkel való kapcsolatban számos védekezési választ indítanak be. Rozsdagomba és gazdanövénye kapcsolatában Mellersch és Heath (2001) számolt be először sejtszintű elváltozásról. Bemutatták, hogy a tehénborsó rozsdagomba (*Uromyces vignae*) megbetegítési stratégiájának alapja, hogy a tehénborsóban a behatolás helyén a sejtfal és sejthártya tapadását

lokálisan megszünteti. Fogékony gazdanövényében tehát úgy képes szaporodni, hogy a nem specifikus, sejtfalon alapuló védekezést gátolja. Rezisztens tehénborsóban az inváziós hausztóriummal érintkező sejtfal lignines megvastagodását vagy az egész sejt HR-rel történő elhalását figyelték meg. Mellersch és Heath tanulmányukban egyben azt is bizonyították, hogy a sejtfal alapú válaszok feltétele a sejtfal és a citoplazma közti összeköttetés, mely a sejthártyán keresztül valósul meg.

A fertőzés hatására történő **de novo fitoalexin termelődés** is egy indukálható védekezési mechanizmus. A jelenség általános volta ellenére az antimikrobiális tulajdonságú fitoalexinek nem-gazda rezisztenciában betöltött szerepéről keveset tudunk. *Arabidopsis* növények között több olyan fitoalexin hiányos (*pad*= *phytoalexin-deficient*) mutánst azonosítottak, melyek a *P. syringae* pv. *maculicola* virulens törzsével való fertőzést követően nem képesek a kamalexin nevű fitoalexin fölhalmozására. A *pad3* esetében sérül az *Alternaria brassicicola* elleni nem-gazda rezisztencia (Thomma és mtsai 1998). A *pad4* mutánst megemelkedett fogékonyság jellemzi a *P. s.* pv. *maculicola* virulens törzsével és a *Peronospora parasitica* kórokozóval szemben (Glazebrook és Ausubel, 1994).

2.2.1.3. A növényi védekezés jelzővegyületei

Nem gazda kapcsolatok esetén a védekezés indukciójában számos, a gazda rezisztencia során megismert jelzővegyület is részt vesz. A SA-ról, jázmonsavról és etilénről számos növény és kórokozó kapcsolatában bizonyították, hogy hiányukban adott növény fogékonnyá válik több olyan kórokozó fajjal szemben is, melyeknek eredetileg nem gazdanövénye. E jelzővegyületeket a 2.3. fejezet tárgyalja részletesen.

2.2.1.4. Széles spektrumú rezisztenciát biztosító gének

Főként az *Arabidopsis thaliana* fajból izoláltak nem-gazda rezisztenciáért felelős géneket. Ezeket más szóval széles spektrumú rezisztenciagéneknek hívják, mivel több olyan kórokozó ellen nyújtanak védelmet, melynek az adott növény nem gazdanövénye.

Ilyen az *NHO1* gén (*non-host resistance 1*) (Lu és mtsai 2001), mely a *Botrytis cinerea* és a *P. syringae* elleni rezisztenciához szükséges, ugyanakkor az *nho1* mutáció nem befolyásolja az *Arabidopsis* rezisztenciáját számos más nem saját patogénnel (*Alternaria brassicicola*, *Peronospora trifoliorum*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) szemben. Tehát az *NHO1* gén kifejeződése az általános védekezés, azaz a nem-gazda rezisztencia része, de nem az összes,

csak bizonyos nem saját patogének ellen nyújt rezisztenciát. Az *Arabidopsis thaliana* fajjal nem-gazda kapcsolatban lévő baktériumok, ill. az inkompatibilis, avirulens *P. syringae* pv. *syringae* aktiválják az *NHO1* gén kifejeződését, míg a virulens típus nem. Ez azt valószínűsíti, hogy itt is érvényes lehet a „gene for gene” modell, de ebben az esetben „gene for gene immunity”- nek nevezik (Kang és mtsai 2003).

Az *EDS1* (*enhanced disease susceptibility 1*) gén önmagában csak részleges nem-gazda rezisztenciát biztosít az *Arabidopsis* számára a *Peronospora parasitica* és az *Albugo candida* ellen (Parker és mtsai 1996).

A *PEN1* és *PEN2* géneknek tulajdonítható, hogy az árpalisztharmat nem hatol be az *Arabidopsis* sejtjeibe (Thordal-Christensen 2003). Úgy tűnik, mindkét génnek a sejtfa szerkezet fenntartásában van szerepe.

Cao és mtsai (1998) elsőként számolnak be arról, hogy egyetlen génre irányuló génszabályozási beavatkozással, nem specifikus rezisztenciát lehet kialakítani. A SAR egyik kulcsgénje, az *NPR1* (*nonexpresser of PR genes*) gén túltermelésével széles spektrumú rezisztenciát alakítottak ki, mely hatékonyan gátolta a *P. syringae* pv. *maculicola* baktériumot és a *Peronospora parasitica* szaporodását *Arabidopsis* növényekben. A rezisztencia határfoka az *NPR1* gén által termelt fehérje mennyiségétől függ. Az *NPR1* gén indukció nélkül nem aktív, viszont felülfertőzés követően, vagy SA-val történő provokáció hatására háromszorosára nő a PR-1, PR-2 és a PR-5 fehérjék mennyisége. A gén ezen tulajdonsága igen előnyös a növény számára, mert nem jár hátrányos következménnyel a növekedésre, fertilitásra, valamint nem gyakorol szelekciós nyomást a növényt támadó kórokozókra, szemben a PR-géneket állandóan kifejező mutáns típusokkal.

2.2.2. A nem-gazda rezisztencia típusai

A nem-gazda rezisztenciának fenotípus alapján két megjelenési formája van (Mysore és Ryu, 2004). A nem gazda rezisztencia I-es típusa nem jár látható tünetekkel, míg a II-es típus mindig gyors, lokális nekrozissal, azaz hiperszenzitív válasszal végződik.

Az **I-es típusú nem-gazda rezisztencia** esetében a növény képes megállítani a kórokozót az előre meglévő illetve általános elicitorok által indukálható védekezési válaszokkal, így az nem képes bejutni és szaporodni a növényben. Bár ez látható tünettől nem jár, valószínűleg számos molekuláris változás történik (pl. tünetmentesség mellett PR gének aktiválódása).

Ezek alapján látható, hogy a betegségellenállóság számos formájához nem szükséges a sejthalál. Még a „gene for gene” típusú rezisztencián belül is találunk olyan példákat, melyek azt erősítik, hogy a sejthalál önmagában nem lényegi jelentőségű a kórokozó megállításában.

Ilyen a burgonyában talált *Rx* gén, mely a burgonya X vírussal (PVX) szemben tünetmentes, széles spektrumú rezisztenciát ad a kórokozó összes izolátumával szemben. Az *Rx* gén egy receptort kódol, mely közvetlenül érzékeli a vírus köpenyfehérjéjét, mint elicítort (Bendahmane és mtsai 1995). A gyors gazda reakciónak köszönhetően a vírus tünetmentesen, HR nélkül lokalizálható az elsődlegesen fertőzött sejtben. Ezt nevezik extrém rezisztenciának (ER). Az *Rx* gén tanulmányozása alapján Goulden és Baulcombe (1993), valamint Bendahmane és mtsai (1999) szerint a sejthalál és a kórokozó lokalizálása, külön betegség ellenállósági válaszok a növényekben.

Az *Arabidopsis* növényben a *dnd1* (*dnd1* = *defense, no death 1* = elhalás nélküli védekezés) allél avirulens baktériumok ellen ad HR nélküli „gene for gene” alapú rezisztenciát. A *dnd1* mutáns az alapján különítették el (Yu és mtsai 1998), hogy avirulens *P. syringae* kórokozókkal való fertőzést követően nem mutatott HR-t, a kórokozók szaporodását mégis jelentősen korlátozni tudta. Érdekes módon a mutáció folyamatosan megnyilvánuló szisztémikus rezisztenciát okozott bizonyos gomba, baktérium és vírus kórokozók ellen. Miután megállapították az avirulens *P. syringae* elleni rezisztenciát, hasonlóképpen virulens típusal is tesztelték a kórokozó levélben való szaporodását. Ebben az esetben gyengébb rezisztenciát tapasztaltak, olyan szintűt, mely a rezisztencia gén (*RPS2*) nélkül ellenálló, szisztémikus szerzett, vagy indukált szisztémikus rezisztenciát mutató növényekre jellemző. *P. syringae* pv. *maculicola* baktériummal végzett provokálás hatására is hasonló eredményt kaptak. A rezisztencia szint fölmérését a Dohány gyűrűsfoltosság vírus, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. c.* pv. *raphani* és a *Peronospora parasitica* kórokozó fajok virulens típusaival is elvégezték. Minden kórokozó esetében azt tapasztalták, hogy az gyengébben szaporodik a *dnd1* mutánsban, mint a vad típusú *Arabidopsis thaliana* fajban. A

mutánsra jellemző még a megemelkedett SA-szint és a törpe termet. A törpeség és a széles spektrumú rezisztencia valószínűleg az állandóan magas SA-szintnek köszönhető. Hasonló jelenséget megfigyeltek más, magas SA-szintet mutató *Arabidopsis* mutánsok között is, de a HR elmaradását a *dnd1* mutáns esetében figyelték meg először.

Clough és mtsai (2000) később izolálták a *DND1* gént, mely egy a Ca^{2+} és a K^+ vándorlását lehetővé tevő ioncsatornát kódol. A növény védekezése során a legkorábbi válaszok között említhető, jelzésre szolgáló esemény a sejthártya áteresztőképességének megváltozása, a membránon keresztüli ionáramlás (Ca^{2+} és H^+ beáramlása ill. K^+ és Cl^- kiáramlása), valamint a ROS termelődése. A Ca^{2+} beáramlása és a Ca^{2+} szint megemelkedése a citoszolban szükségesnek és elégségesnek bizonyult az oxidatív kitörés indukálásához. Számos tanulmány jelent már meg arról, hogy az ionáramlás a védekezés jelzőrendszerének része, de ez az első példa arra, hogy mindennek a genetikai alapját is megtalálták. Clough és mtsai azt is tisztázták, hogy a SA kell a *dnd1* mutáció okozta emelkedett szintű rezisztenciához, de a HR elmaradásáért nem az felelős.

A nem gazda rezisztencián belül a **II-es típus**, vagyis a nem-gazda HR a leggyakrabban vizsgált jelenség. Ez fenotípusosan nagyon hasonló az inkompatibilis „gene for gene” kölcsönhatáshoz, és sokkal kifinomultabb mechanizmust feltételez, mint az I-es típusú nem gazda rezisztencia.

Egyes patogének képesek legyőzni az I-es típusú nem-gazda rezisztenciát oly módon, hogy detoxifikáló enzimeket termelnek a növényben eleve meglévő antimikrobiális szekunder metabolitok ellen (Osbourn 1996b), vagy általános elicitoraik észrevétlenek maradnak a növény számára. Ezt követően a növényi sejt fölött örökődő védekező mechanizmussal találják szemben magukat, mely a sejthártya felületén vagy a citoplazmában felismeri a specifikus patogén elicitorokat, és elindítja azt a védekezést, mely a HR-hez vezet. Ez előzi meg a patogén további terjedését. A PR gének és a SAR kifejeződése a II-es típus alatt is megfigyelhető.

A nem- gazda rezisztencia I-es és II-es típusába tartozó védekezési formák együtt egy alap védekezést (basal defense) képviselnek (Abramovitch és Martin 2004).

2.2.3. A „növényi immunitás” - avagy a növényi betegségellenállóság különböző felosztásai

A növényeknél az „immunitás” szót azokban az esetekben kezdték el használni, mikor a növényi rezisztenciában részt vevő receptorok, jelátviteli komponensek vagy mechanizmusok hasonlóságot mutattak az emlősök veleszületett immunitásában szereplő elemekkel. Később a szigorú meghatározás kiszélesedett és szinte a növényi betegségellenállóság szinonimájaként fordul elő. Ezek alapján immunitásnak számít a HR is és olyan megfogalmazásokkal is találkozunk mint a „gene for gene immunitás” (Kang és mtsai 2003; Abramovitch és Martin 2004) vagy a „növények kórokozó támadásra adott immunválasza” (Cohn és mtsai 2001).

Abramovitch és Martin (2004) a növényi immunitás részeit a következőképpen foglalja össze.

1. A „gene for gene immunitás” a hagyományos felfogása szerint, abban az esetben alakul ki, ha a növény R fehérjéje specifikusan felismeri a kórokozó avirulencia (Avr) fehérjéjét. A patogén felismerése gyakran eredményez HR-alapú sejthalált, melynek során elpusztul mind a patogén, mind a gazda fertőzött sejtje.

2. A sejtfal alapú védekezés során sejtfallvastagodás és papillák figyelhetők meg, melyek olyan sejtfaelváltozások, ahol kallóz, fenolok és hidroxiprolinban gazdag glikoproteinek halmozódtak fel a sejtfal megerősítése végett.

3. A védekezés jelzőrendszerét a SA-, JA- és etilén-függő jelzőutak alkotják, melyek a patogéntámadásra adott növényi védekezési válaszokat koordinálják.

A SA-függő jelzés többek között antimikrobiális savas PR fehérjék expresszióját váltja ki, mely számos mikrobiális patogén ellen biztosít rezisztenciát. A JA és etilén jelzőutak a rovarok által okozott sebzések és a nekrotróf kórokozók (*Alternaria brassicicola* és *Botrytis cinerea*) elleni védelem esetén működnek. A JA és az etilén olyan antimikrobiális peptidek termelődését indukálja, melyeket a SA nem. Érdekes módon a JA és az etilén antagonistaként viselkedik a SA-val szemben, ami arra enged következtetni, hogy az általános betegségellenállóság fönntartásához összetett anyagcsereút szükséges (Dong, 1998; Cohn és mtsai 2001).

4. A SA- és JA- függő jelzőutak aktiválják a savas és bázikus PR fehérkéket kódoló géneket, melyek antimikrobiális anyagokat termelnek.

Cohn és mtsai (2001) a növényi immunválaszok közé sorolják az oxidatív kitörést és a szisztémikus szerzett rezisztenciát is.

A növényi anyagcsere folyamatoknak állandó melléktermékei a különböző reakcióképes oxigénformák, melyeket a növény azonnal semlegesít, így sejtkárosító hatásukat minimalizálja. Ugyanakkor a növény stressz válaszok aktiválása a környezeti hatások, anyagcserezavarok következtében megváltozó ROS koncentráció érzékelésén keresztül történnek. A ROS, és különösen a H_2O_2 a már említett kórokozók és kártevők elleni védekezés mellett olyan folyamatok szabályzásában is szerepel, mint a sztómazárás, a sejt megnyúlása és a növény fejlődése. A ROS által történő jelzés igen összetett, mivel biológiai aktivitását megszabja, hogy melyik reakcióképes oxigénformáról van szó, illetve hogy a sejtnél melyik részén termelődik. A ROS, mint biológiai jel koncentrációjának emelkedése számtalan gén kifejeződését is befolyásolja (Laloi és mtsai 2004).

Az emlősök esetében az **oxidatív kitörés**ként leírt jelenség és a növények kórokozó támadásra adott egyik legkorábbi válasza, a ROS termelődése között közös vonásokat találtak, amelyet ennél fogva a növényeknél szintén „oxidative burst”-nek neveztek el.

A növények az elicitorokra, vagy mikrobiális kórokozókra gyakran, de nem mindig, oxidatív kitöréssel reagálnak (Heath, 2000). A védekezés alatt a sejtthártyában található NADPH-oxidázok, a sejt falban lokalizált peroxidázok és az apoplazmikus térben lévő amin-oxidázok megnövekedett enzimaktivitásának következménye a ROS-termelődés (Laloi és mtsai 2004). Ez alapvető része a védekezésnek, hiszen a rezisztens növények a kórokozók fertőzését követően megemelkedett ROS-szintet tartanak fent (León és mtsai 1995; Durner és mtsai 1997). Megfigyelték, hogy az oxidatív kitörést megelőzi és stimulálja a kalcium ionok sejtbe történő beáramlása (Scheel, 1998). Az extracelluláris térben a különböző reaktív oxigénformák közül jellemzően a szuperoxid, hidrogén-peroxid és hidroxil-gyök jelenik meg. A többnyire sejten kívül termelődő reakcióképes oxigénformák közvetlenül károsíthatják úgy a kórokozót, mint a gazda sejtjeit. Utóbbi esetben az oxigén-gyökök direkt hatására következik be a HR. Mára mindinkább kérdésessé válik az az általános feltételezés, hogy a ROS univerzálisan hiperszenzitív sejthalált közvetít (Heath, 2000).

A ROS szerepet játszik a fizikai akadályok azonnali megerősítésében is. Az oxidatív kitöréskor sejt felszínre jutó H_2O_2 indukálja a sejt fal fehérjéi közti keresztkötéseket. Brisson és mtsai (1994) szója sejt kultúra elicitorral való kezelése után megfigyelték, hogy a sejt fal ellenállóbbá vált a lebontó enzimekkel szemben. Két ismert, gyakori előfordulású szerkezeti fehérjét tanulmányozva bizonyították, hogy a fehérjék közti „oxidatív keresztkötések”

kialakulásával a fehérjék oldhatatlanná váltak. A sejtfal ilyen módon való megerősítésének köszönhető a kórokozók sejtfalbontó tevékenysége elleni rezisztencia.

A növényi védekezés során a sejtfal fehérjék oldhatatlanná válását megfigyelték babon a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* fertőzésre adott nem-gazda HR alatt, illetve a szója és *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* inkompatibilis kölcsönhatás alatt, míg kompatibilis kapcsolatban ez elmaradt.

Ez a mechanizmus egy igen gyors válasz, mely megelőzi a védekezésben szereplő gének transzkripcióját és translációját. Templeton és Lamb (1988) sejtuszpenzió gomba elicitorral való kezelése után már 10 perccel észlelték a kitináz és a fitoalexintermelésben szereplő enzimek transzkriptumát. Bár a védekezés génjeinek transzkriptuma a kórokozó érzékelése után igen rövid időn belül megjelenik, órák kellenek a transzkriptum megfelelő mennyiségben való felhalmozódásához, vagyis e védekezési válasz hatékonyságához. Ezzel szemben a fehérjék oldhatatlanná válása 2-5 percen belül megindul és 20-30 percen belül végbemegy.

A sejtfal megerősítését szolgálja a fenolos vegyületek közti kötések megerősítése vagy „peroxidatív összekapcsolódása” is, amely folyamatot a ROS termelődése táplál.

A peroxidáz enzimek csoportja igen változatos. A növényekben különböző peroxidáz-izoenzimek találhatók, melyeknek kémiai tulajdonságaik, sejten belüli lokalizációjuk és szubsztrát-specifitásuk eltérő. Alapvetően a szabadgyök reakciók szabályozásában vesznek részt, úgy oxidálják szubsztrátjaikat, hogy közben a H_2O_2 -ot használják H-akceptorként (Haraszy, 1978). A H_2O_2 segíti a peroxidáz-katalizálta lignin-szintézist is, mely a sejtfal erősítés további formája. Azért beszélünk „ H_2O_2 -függő” keresztköteésekről, illetve „ H_2O_2 -függő” lignin szintézisről, mert a reakciókhoz szükség van a H_2O_2 -ra.

A gazda és nem-gazda rezisztencia esetén is előforduló papillák képződéséhez illetve a sejtfal megvastagodásához nélkülözhetetlen a H_2O_2 .

Bestwick és mtsai (1998) saláta és vad típusú illetve nem patogén *P. syringae* pv. *phaseolicola* törzsek kapcsolatában kimutatták, hogy a H_2O_2 -akkumuláció fő helye a növényi sejtfal baktériummal érintkező felülete és a papillák. A H_2O_2 -felhalmozódással szoros összefüggésben lokális növekedést mutatott a peroxidáz enzimaktivitás is. A nem patogén baktérium sejtek okozta stressz hatására a H_2O_2 -képződés és a POD aktivitás lényegesen alacsonyabb szintű volt, mint a vad típus esetében.

Az inkompatibilis kapcsolatokban megfigyelt szuperoxid-, H_2O_2 - és fenolvegyület képződés, valamint fehérje keresztköteések kialakítása közül a különböző kórokozók nem mindegyik választ aktiválják. Mellersch és mtsai (2002) három inkompatibilis növény-gomba kapcsolatban vizsgálták a H_2O_2 védekezésben betöltött hatásmechanizmusát. Kiindulásul,

hemicelluláz kezeléssel modellezték a gomba kórokozók növényi sejtfalra gyakorolt általános, enzimikus hatását. Ennek hatására nőtt a sejtek H₂O₂- és fenoltermelése, valamint fehérje keresztkötések jöttek létre. Tehénborsó rozsdagomba és borsó nem-gazda kapcsolatában az enzimikus kezeléskor leírt változások mindegyikét észlelték. A platánlisztharmat és tehénborsó nem-gazda kapcsolat specifikumát a sejtfal és a sejthártya közt termelődő szuperoxid jelentette, melyet H₂O₂ és fenoltermelődés követett. A sejtfalban fehérje keresztkötések kialakulása nem volt megfigyelhető. A kolletotrichummal szemben rezisztens paradicsom sejtfala papilla képzéssel reagált és az appresszóriumokkal történő érintkezés helyén a sejtfalban fehérje keresztkötések alakultak ki.

A különböző reakcióképes oxigénformák jelzővegyületként olyan későbbi reakciókért felelősek, mint a fitoalexin termelődés, a védekezés génjeinek aktivációja, a sejthalál és az egészséges szövetek ROS-sal szembeni védekezési reakciói (Scheel, 1998).

A **szisztemikus szerzett rezisztencia** az immunitás azon formája, mikor egy elsődleges fertőzést (immunizációt) követően egy második fertőzéskor a növény szisztemikusan egy magasabb szintű rezisztenciát mutat a kórokozók egy szélesebb körével szemben (Cohn és mtsai 2001). A SAR PR-fehérjék indukálódásán és szalicilsav (SA) termelődésén keresztül jellemezhető. A SA-függő rezisztenciát gyakran „basal defense”-nek nevezik (Schulze-Lefert, 2004). A szisztemikus szerzett rezisztencia a 2.3.1. fejezetben szerepel részletesen.

2.2.4. A „gene for gene” és a nem-gazda rezisztencia összevetése

A nem-gazda és a „gene for gene” rezisztencia között vannak határozott hasonlóságok (Mysore és Ryu, 2004). Ezek között említhető, hogy mindkettőhöz kapcsolódhat a HR, illetve a reakcióképes oxigénformák termelődése. Gombákat illetően mindkét esetben lignifikáció gátolja a gomba behatolását a sejtbe. Ennek ellenére kérdéses, hogy ezeket a rezisztencia válaszokat ugyan azok a mechanizmusok alakítják-e ki, ugyan az a szignál transzdukciós út játszódik-e le?

Valószínű, hogy a gazda és a nem-gazda rezisztencia jelátviteli útja közti átfedésről lehet szó. Az *nhol* és az *eds1 Arabidopsis* mutánsokban ugyanis nem csak egyes nem-gazda kórokozókkal szembeni, hanem az *R* gének által biztosított rezisztencia is sérült (Lu és mtsai 2001, Parker és mtsai 1996). Szintén erre utal, hogy *Arabidopsis* esetében a nem-gazda rezisztencia, vagyis a *P. syringae* pv. *phaseolicola* baktériummal való kapcsolat, valamint a *P. syringae* pv. *syringae* baktériummal szembeni „gene for gene” (*RPS2* ill. *avrRpt2*) típusú

rezisztencia esetén a génkifejeződési profil hasonlóságokat és különbségeket is mutatott (Tao és mtsai 2003).

Mi lehet a kapcsolat a növényfajok rezisztenciája, és a fajta-specifikus rezisztencia között? A nem-specifikus, széles spektrumú védelem valószínűleg egy együttes szelekciós nyomás eredményeképpen jött létre, amit számos parazita, növényevőállat és abiotikus stresszek gyakoroltak a növényekre (Heath 2000). A feltételezések szerint (Nürnbergger és Brunner, 2002) az evolúció alatt a növényfajok széles spektrumú rezisztenciáját a kórokozók virulencia faktorai segítségével győzték le. Ezek tették képessé őket a növény védekező mechanizmusának magtámadására vagy elnyomására és ezek az újonnan kifejlődött, kórokozórassz-specifikus virulencia faktorok vezették a növényi rezisztencia gének koevolúcióját. Ezek alapján feltételezhető, hogy a kórokozórassz- ill. növényfajta-specifikus betegségellenállóság törzsfejlődésileg sokkal fiatalabb.

Eddig több mint 40 *R* gént izoláltak (Martin és mtsai 2003). Ezek a monogénes domináns gének közeli rokon fajokból átvihetők a gazdaságilag hasznos növényekbe. Az *R* gének specifikusak egy bizonyos patogén rászra, tehát egy adott avirulencia génre expresszálódnak. A patogén *avr* génjei könnyen mutálódnak, így az *R* gének által nyújtott védelem nem időtálló.

A nem-gazda rezisztencia azért stabilabb, mert valószínűleg a mikrobák általános és összetett jeleinek felismerése sokrétű rezisztencia választ vált ki. Így ha a felismerés során egy-egy mozzanatban hiba következik be, az alapvetően nem változtatja meg a nem gazdanövény és a mikroba kölcsönhatását. Mivel a nem-gazda rezisztencia időtálló, a nemesítők számára jól kihasználható lenne a gazdasági növények betegségellenállóságának javítására. Különösen igaz ez az I-es típusra, mely nem jár HR-rel.

2.3. Indukált rezisztenciaformák és biokémiai alapjaik

2.3.1. A szalicilsav és a szisztémikus szerzett rezisztencia

2.3.1.1. A szisztémikus szerzett rezisztencia jelensége

Szisztémikus szerzett rezisztenciának (SAR) nevezik azt a jelenséget, mikor egy nekrotizáló kórokozóval való elsődleges fertőzést követően egy második fertőzőskor a növény magasabb szintű rezisztenciát mutat, ami kórokozók egy szélesebb körével szemben érvényesül (Ryals és mtsai 1996). A SAR-t úgy is emlegetik, mint „élettani immunitást” (Chester, 1933). Fontos

kitétel, hogy a SAR anyagcsereút nekrotikus lézió képződése után aktiválódik, legyen a nekrozis akár a HR, akár a betegség tünetének velejárója.

A SAR megkülönböztethető más betegséggellenállósághoz kapcsolódó válaszoktól a *kórokozók* elleni védelem *spektruma* és a hozzá kapcsolódó, megváltozott génkifejeződés alapján. Dohányban a SAR aktiválódásával jelentősen visszaszorulnak a *Phytophthora parasitica*, *Cercospora nicotianae*, *Peronospora tabacina*, a TMV, TNV (dohánynekrozis vírus), a *Pseudomonas tabaci*, és az *Erwinia carotova* dohány kórokozók által okozott betegségektől (Vernooij és mtsai 1995; Delaney és mtsai 1994). *Arabidopsis* esetében a SAR a *Peronospora parasitica*, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 és a tarlórépa göndörödés vírus (*Turnip crinkle virus*) ellen hatásos (Uknes és mtsai 1992). Vagyis, a SAR jellemezhető az által, hogy adott növény kórokozói közül melyekkel szemben nyújt fokozott válaszadó képességet. Ez egyben azt is jelenti, hogy a védelem nem hatékony minden kórokozó ellen.

2.3.1.2. A szisztémikus szerzett rezisztencia molekuláris markerei

A SAR-t már csaknem 100 éve felfedezték. Kezdetben csak a jelenséget leíró közlemények jelentek meg, majd biokémiai SAR-markerek azonosítását követően mennyiségileg is analizálhatóvá váltak ezek a válaszok.

A SAR-hoz illetve a rezisztencia állapotához bizonyos **markergének** igen erős kifejeződése is társul, amiket „SAR géneknek” neveznek (Dong, 2001). A SAR gének fertőzetlen szövetekben bekövetkező indukciója szorosan összefügg a SAR működésbe lépésével. Nem az összes „védekezéshez kapcsolódó gén” fejeződik ki a SAR alatt, így a génkifejeződés sajátos spektruma is megkülönbözteti a SAR választ más védekezési válaszoktól (Ryals és mtsai 1996).

A SAR gének kódolják a **SAR marker fehérjéket**, melyeknek kitétele, hogy jelenlétük vagy aktivitásuk együtt kell hogy járjon a rezisztencia állapottal. Közülük sok a **PR-fehérjék** közé tartozik. Ilyeneket eredetileg dohány és TMV kapcsolatában írtak le. Megfigyelték, hogy a *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc fajtában, melyben a monogénes domináns *N* gén szabályozza a HR-t a TMV ellen, a fertőzést követően számos olyan fehérje halmozódott fel nagy mennyiségben, melyek az egészséges szövetből hiányoztak (van Loon és van Kammen, 1970). Ezeket nevezték el kórfolyamathoz kapcsolódó (= Pathogenesis Related, PR) fehérjéknek. Mennyiségük nagyban függ a fertőzés erősségétől. Két csoportjuk van: a savas PR fehérjék, melyek főleg a sejtközötti járatban találhatók és a bázikusak, melyek funkcionálisan hasonlóak és a vakuólumban lokalizáltak.

Két ok miatt feltételezik, hogy ezek szerepet játszanak a rezisztenciában: fogékony fajtában nem termelődnek, valamint röviddel a fertőzés helyén való megjelenésük után, a nem fertőzött levelekben is megkezdődik felhalmozódásuk. Ezen szisztémikus megjelenésük pedig összefügg a szerzett rezisztencia szisztémikus természetével.

A szisztémikus szerzett rezisztencia legjobban jellemzett modelljében, a dohányban a SAR markereknek 9 csoportja ismert, köztük a PR-1, a PR-1 fehérje savas formája, a glükánáz aktivitású PR-2, a kitináz aktivitású PR-3, a PR-4 és PR-5. Ezek közül a PR-1, PR-2 és PR-5 *Arabidopsis* esetében is ismert. Hogy a SAR alatt az egyes növényfajokban mely markergének és milyen intenzitással fejeződnek ki, változó. Egy növényfajon belül a PR gének indukciójának kinetikája, azaz az időbeniség és az intenzitás, a különböző kórokozókra adott válasz során szintén más és más (Ryals és mtsai 1996). Ezek a fajspecifikus különbségek tükrözhetik azt, hogy az evolúció vagy a nemesítés nyomása során melyik – a leghatékonyabb – SAR válasz szelektálódott ki a kórokozók adott szortimentje ellen (Kessmann és mtsai 1994).

Mivel a PR-fehérjék termelődése a HR-rel ill. a SAR-ral előforduló egyik legkézzelfoghatóbb változás, számos PR-fehérjét jellemeztek már szekvenciájuk alapján, de a legtöbbjüknek ismeretlen a funkciója. Ennek ellenére a PR-gének kifejeződési szintjének követése kényelmes SAR-marker, mert a feltételezések szerint (Cao és mtsai 1998) a SAR a PR-gének összehangolt működésének eredménye. Ebből egyben az is következik, hogy önmagában egy-egy PR-gén túltermeltetése csak korlátozott védelmet nyújthat a növénynek. A komplex SAR válasz genetikai manipulációjához a SAR jelátviteli út génjeinek azonosítására van szükség.

2.3.1.3. A szisztémikus szerzett rezisztencia és a szalicilsav összefüggése

Tudománytörténetileg a PR-fehérjéket korábban figyelték meg, majd azt vizsgálták, mi indukálja ezeket. Ekkor jött a felfedezés, hogy a PR-gének indukciójával párhuzamosan a TMV-vel fertőzött levelekben 20-szorosára, a nem fertőzött levelekben pedig 5-szörösére emelkedett a SA szint a rezisztens dohány típusban, míg a fogékonyban nem (Malamy és mtsai 1990). Mivel már köztudott volt, hogy a külső SA-kezelés rezisztenciát (White, 1979) illetve PR génkifejeződést indukál, a kezdeti feltételezés az volt, hogy ezekhez a SA szolgál természetes jelátvivőként.

Ezzel egyidőben Métraux és mtsai (1990) uborka növényeket dohány nekrozis vírussal illetve *Colletotrichum lagenarium* gombával fertőzve a SAR szisztémikus kifejeződéséért felelős anyagot keresték. Egy a fertőzés után és a SAR kialakulása előtt magas koncentrációban

előforduló metabolitot mutattak ki a háncsnedvből, amit SA-ként azonosítottak. Ebből arra következtettek, hogy a SA lehet a SAR-hoz szükséges endogén jel.

Tetemes irodalom támasztja alá a SA-koncentráció és a fokozott betegségellenállóság közti összefüggést, azt hogy a SA központi szerepet játszik a SAR jelzésében, illetve hogy a betegségellenállóságot befolyásolja a növény azon képessége, hogy képes-e nagy sebességgel SA-at termelni.

Közkedveltek az olyan, transzgenikus növényekkel végzett kísérletek, melyek a bakteriális eredetű *NahG* gént tartalmazzák (Gaffney és mtsai 1993). Ez a gén a szalicilát-hidroxiláz nevű enzimet kódolja, mely a SA-at biológiailag inaktív katechollá bontja. Az ilyen növénytípusok képtelenek SA-at fölhalmozni, ami nemcsak a SAR válasz elmaradásához vezet, de súlyosabb fogékonyasághoz is, vagyis nagyobb léziók figyelhetők meg rajtuk, mint a vad típusú kontrollon.

Yalpani és mtsai (1993) az *N* gént tartalmazó *N. tabacum* cv. Xanthi-nc és a *N. glutinosa* x *N. debneii* hibrid TMV-vel fertőzött levelének SA-szintjét vizsgálták. Annak ellenére, hogy mindkét dohányvonal tartalmazta a specifikus rezisztencigént, a *N. tabacum* cv. Xanthi-nc levelein 1,8 mm, míg a hibriden 0,2 mm átmérőjű léziók alakultak ki. Megállapították, hogy a hibrid fertőzés nélkül harmincszor annyi SA-at tartalmaz, mint a Xanthi-nc. A fertőzés hatására a Xanthi-nc dohányban 3 nap múlva ugrásszerűen, 70-szeresére nőtt a SA mennyisége, míg a hibridben alig volt növekedés.

Dempsey és mtsaitól (1993) származik az első olyan közlés, hogy az *Arabidopsis* vírusfertőzésre HR-rel reagál. Az általuk szelektált Di-17 vonal a tarlórépa göndörödés vírus (TCV) fertőzésére jól körülhatárolt léziókat mutat. Ez a gazda-patogén kapcsolat kiválóan alkalmasnak mutatkozott a HR és a SAR összefüggésének tanulmányozására. A TCV-vel szemben fogékony és rezisztens *Arabidopsis* vonalakban a PR-fehérjék kifejeződését vizsgálták. A fogékony vonal fertőzött leveleiben a PR-1, PR-2, PR-5 és a PR-3 fehérje savas formája későn és gyengén, ezzel szemben a rezisztens vonalban gyorsabban és intenzíven indukálódott.

Rasmussen és mtsai (1991) uborkában, patogén és nem patogén *P. syringae* pv. *syringae* baktériummal való fertőzés hatására, a szisztémikusan indukálódó SA-felhalmozódást vizsgálták. Patogén baktérium esetén az előfertőzött levélben 8 óra, a fertőzött feletti levélben 12 óra múlva kezdett felhalmozódni a SA. A nem patogén baktériummal végzett fertőzés nem indukált, sem szisztémikus SA-termelődést, sem szisztémikus rezisztenciát.

Mauch-Mani és Slusarenko (1994) egy a *Fusarium oxysporum* fertőzésre korlátozott nekrozissal reagáló *Arabidopsis* vonal levelein végeztek előfertőzést a patogénnel, majd az így indukált rezisztenciát *Peronospora parasitica* kórokozóval végzett felülfertőzés alapján

vizsgálták a rozetta fentebbi levelein. A különböző időpontokban végzett felülfertőzések alapján megállapították, hogy a hatékony SAR kialakulásához 7 nap kellett.

Izgalmas kérdést vet fel a SAR szempontjából az a tény, hogy egyes növényfajok, úgy mint a rizs és a burgonya, alapvetően magas SA-szintet tartanak fent. Vajon ez esetben is a SA a SAR kialakulásához szükséges jelzőmolekula?

Yu és mtsai (1997) az állandóan magas SA-tartalmú burgonyában vizsgálták a SAR kialakulását, *NahG* gént tartalmazó kontrollt használva. Mivel a burgonya a fajra jellemző, állandóan magas SA koncentráció ellenére nem bír állandóan kifejeződő rezisztenciával és külső SA-kezelés ellenére sem mutatott magasabb szintű rezisztenciát a SA-hiányos típushoz képest, ezért azt feltételezték, hogy gyenge a SA-érzékelő képessége és/vagy a SA-jelátvivő mechanizmusa. A vad típusú burgonyában a *Phytophthora infestans* elicitorával, az arachidonsavval való kezelés után annak ellenére alakult ki a SAR, hogy a felső, kezeletlen levelekben nem nőtt a SA szintje. Ezzel szemben a *NahG* típusú, SA-hiányos burgonyában nem alakult ki a SAR. Ezek alapján a burgonyában is esszenciális a SA, de a dohánytól, az *Arabidopsis*tól és az uborkától eltérően, a SAR kialakulásáért nem a megnövekedő SA-szint a felelős, hanem a SA-érzékelő képesség fokozódása, amit a kórokozók támadása idéz elő.

Érdekes Delaney és mtsai (1994) azon kísérlete, melyben SA hiányában a SAR és „gene for gene” rezisztencia is összeomlott, jelezvén, hogy a SA jelzőmolekulaként funkcionál az *R* gén közvetítette rezisztencia válaszban is. Az *Rpt2* domináns *R* gént tartalmazó *Arabidopsis* növény *AvrRpt2* gént tartalmazó *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 törzssel szemben HR- rel járó „gene for gene” rezisztenciával bír. Ehhez képest, az *Rpt2* gént és a *NahG* gént egyaránt tartalmazó típusban a kórokozó olyan mértékben szaporodott, mint egy fogékony típusban és súlyos betegségi tüneteket mutatott. Tehát egy gazda-patogén kapcsolatban SA hiányában olyan növény is fogékonyabbá válik, melynek genetikailag meghatározott rezisztenciája van. Delaney és mtsai bizonyították, hogy a *NahG* gént tartalmazó növényekben a jelátviteli mechanizmus nem sérül. A *NahG* genotípusú növények megnövekedett fogékonyságának okát abban találták meg, hogy SA hiányában a SAR-gének kifejeződéséhez vezető jelátviteli út megszakad.

Cameron és mtsai (1994) egy genetikailag jól meghatározott modellen tanulmányozták azt a mechanizmust, hogy a HR hogyan indukál SAR-t. Az *RPS2* rezisztencia gént tartalmazó *Arabidopsis* növényen a *P. syringae* pv. *tomato* virulens törzse nagy kiterjedésű klorózist és nektrózist okoz, ezzel szemben az avirulens (*AvrRpt2*) baktérium törzs hiperszenzitív reakciót, jól körülhatárolt léziót indukál. A vizsgálat során az avirulens törzssel végzett előkezeléssel

HR-t váltottak ki. Ennek hatására az előkezelt fölötti levél a virulens törzssel való felülfertőzésre rezisztens reakciót adott, mert az előkezeléssel biológiai úton SAR-t indukáltak.

2.3.1.4. A szisztemikus szerzett rezisztenciához szükséges áthelyeződő jel

A SAR-hoz szükséges, szisztemikus mozgásra képes jelzőmolekula azonosítása nagyban hozzájárulna a SAR működésének megismeréséhez. A jelenlegi álláspont szerint a SA szükséges a SAR kialakulásához, de nem az az áthelyeződő jel (Vernooij és mtsai 1994). A SA az ismeretlen, hosszú hatástartamú jel *után* van a mechanizmusban. Ettől függetlenül az igaz, hogy a SAR válasz kialakulásakor a nem fertőzött szövetekben fölhalmozódó SA-nak akár 50-70%-a is származhat áthelyeződésből.

Shulaev és mtsai (1995) *N* gént tartalmazó dohány TMV-vel fertőzött leveleiben 36-48 óra múlva mutatták ki a SA-szintézis megindulását. A felső levelekben a SAR hatásának kialakulásához 60 óra volt szükséges, melyért döntően a fertőzött levélből áthelyeződésből származó SA volt felelős. Szoros összefüggést találtak a SA koncentráció és a SAR hatékonysága között, mely fenotípusosan a lézióátmérő csökkenésében ill. a PR-1 gén fokozott kifejeződésében nyilvánult meg.

Szintén a SA szisztemizálódását vizsgálták Mölders és mtsai (1996) oly módon, hogy fogékony uborkafajta szikleveleit dohány nekrotízis vírussal (TNV) inokulálták, majd ezeket és a kontrollként használt szikleveleket a SA prekursorának számító, izotóppal jelölt benzooesavval (BA) injektálták. Az első lomblevélen *Colletotrichum lagenarium* kórokozóval felülfertőzést végeztek, hogy a nekrotikus foltok alapján ellenőrizzék a SAR hatását az érintetlen sziklevelű kontroll növényekhez képest. A SAR-t indukáló szabad SA mennyisége mind a sziklevelekben, mind az első lomblevelekben nőtt és a 4. napon érte el a maximumot. A *C. lagenarium* kórokozóval fertőzött, SAR-t mutató lomblevelekben mért SA döntő része jelzett volt, bizonyítván, hogy az transzport útján jutott oda. Ez a mennyiség a vírussal való előfertőzés esetén 160-szoros volt az előkezelés nélküli kontrollhoz képest!

Durner és Klessig (1999) szerint lehetséges, hogy a nitrit-oxid (NO) a szignál molekula. A NO emlősökben egy jól ismert másodlagos jelzőmolekula, mely úgy tűnik, a növényekben is hasonló szerepet tölt be, mivel PR fehérjék kifejeződését indítja el és a ROS-függő sejthalál indukálásához is szükséges.

Fölmerült, hogy a ROS az áthelyeződő jel. Alvarez és mtsai (1998) ezt arra alapozzák, hogy mikor *Arabidopsis* növényeket fertőztek *P. syringae* kórokozóval, a fertőzés helyén észlelt elsődleges oxidatív kitörés mellett a távoli, nem fertőzött levelekben is hirtelen bekövetkező,

másodlagos oxidatív kitörést tapasztaltak („mikroburst”). Ez szisztémikus mikro HR-ek kifejlődéséhez vezetett.

2.3.1.5. A szalicilsav bioszintézise

Mivel adott a SA jelentősége a betegségellenállóságban (a SAR kialakulásában és az R gének közvetítette rezisztenciában), a SA bioszintézis fontos tényező lehet a növényi válaszok szabályozásában. Azonban képződéséről és lebomlásáról keveset tudunk. A SA bioszintézisútja a fenilpropanoid anyagcsereútból a fenilalaninnál ágazik el, melyet a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) enzim transzfahéjsavvá alakít. Az ezt követő lépések során oldallánc rövidüléssel benzoésav termelődik, amiből egy hidroxil csoport hozzáadásával képződik a SA (Ryals és mtsai 1996). A SA, a kórokozók elleni védekezésen kívül, növényi hormonnaként olyan élettani folyamatokban is szerepel, mint a sztómazárás, virágképzés indukálása és a hőtermelés szabályozása (Verberne és mtsai 2000).

A PAL egy védekezési gén, mely számos inkompatibilis gazda-patogén kölcsönhatásban aktiválódik. A PAL enzim, aktivitása során, előanyagot szolgáltat a lignin szintézishez és más fenolvegyületekhez, így a SA-hoz is, melyek jellemzően fertőzés hatására halmozódnak fel.

Mauch-Mani és Slusarenko (1996) a PAL szerepét vizsgálták az *Arabidopsis* és a *Peronospora parasitica* kompatibilis és inkompatibilis kölcsönhatásában. A fertőzött szövetben a *Peronospora* micéliumát festéssel jelölték, míg a PAL enzim aktivitását riporter génnel mutatták ki. Mivel a PAL enzim részt vesz a ligninszintézisben, a szállítónyalábok közelében állandó aktivitást mutatott. Kompatibilis kölcsönhatásban ezen kívül a PAL aktivitás nem volt kimutatható a fertőzött szövetben. Inkompatibilis kölcsönhatásban, vagyis rezisztencia esetén a sejtek a *Peronospora* behatolási kísérletének helyén mutattak PAL aktivitást, mely a kórokozó gátlásához szükséges sejtfalerosító lignifikációra utal. A sejtbe történő behatolás esetén, a HR során elpusztult sejt környezetében a PAL aktivitást még fokozottabban lehetett észlelni.

Amennyiben inkompatibilis kapcsolatban az inokuláció előtt gátolták a PAL enzim működését, úgy a gomba oly mértékben volt képes szaporodni, mint a kompatibilis kapcsolatban, vagyis a lignifikáció elmaradásával a növény fogékonnyá vált. PAL enzim gátlása mellett, külső SA-kezelés hatására kimutatható volt a lignifikáció és kialakult a rezisztens kapcsolat.

Mindezek alapján bizonyították, hogy a lignifikáció és a SA-akkumuláció is PAL-függő, vagyis, hogy a PAL enzim szerepe a betegségellenállóságban az, hogy prekuzort szolgáltat a SA termeléshez.

A növényekben a szabad fenolsavak – így a SA – előfordulása, toxicitásuk miatt ritka. A szabad SA 0,1 mM fölötti koncentrációban fitotoxikus (Verberne és mtsai 2000), így nem csoda, hogy a növényben felhalmozódó SA gyorsan konjugátumot képez. A SA kötött formájának döntő hányada SA-glikozid (=SAG) formájában van jelen. Kezeletlen növényben a SA konjugált formában is nagyon kis mennyiségben van jelen (0,02-0,05 µg/g friss szövet). Malamy és mtsai (1992) kísérletei alapján *N. tabacum* cv. Xanthi-nc-ben TMV-fertőzés után 48 órával ez a mennyiség drámaian, 15-20-szorosra nőtt. A kötött forma ekkor kétszerese volt a szabad SA-nak, amely szintén megemelkedett. A SA konjugált formában való megjelenése arra utal, hogy a dohány a TMV- fertőzéskor keletkező nagy mennyiségű SA-at átalakítja, feltehetően a fent említett okból, toxicitásuk miatt. TMV-fertőzéskor az összes SA-tartalomnak mégis 20-40%-a van szabad formában, így lehet hogy ekkor egy specifikus mechanizmus akadályozza meg a konjugációt, hiszen a SAG nem aktív a betegségellenállóságban. Az, hogy a szabad SA mellett SA-glükozidok is indukálódnak a TMV-fertőzésre, arra enged következtetni, hogy a SA-jelzésen keresztül megvalósuló szabályzás komplexebb, mint korábban gondolták. Amennyiben csak a szabad SA az, amely biológiailag aktív, akkor a SA formáin belül ennek aránya jelentősen befolyásolja a jelzés vagy a védekezés folyamatát (Malamy és mtsai 1992).

2.3.1.6. A szalicilsav hatásának módja

A SA hatásának módjára több elképzelés is született, de még ma sem egyértelmű, hogy hogyan indukálja a SA a SAR-t.

Minden szervezet jelzőrendszereket használ az oxidatív stressz továbbítására, amire a válasz a szervezet antioxidáns rendszerének megerősítése. Lehetséges, hogy a SA-szint változása nyomán a sejt redoxállapotában bekövetkező változásnak van jelzésértéke.

Emlősöknél a fenol alapú gyulladásgátló gyógyszerek (SA és aszpirin) antioxidáns tulajdonságuknál fogva hatásosak. Lehetséges hogy ennél a kapacitásánál fogva a növényekben is hasonlóképpen működik a SA, vagyis a hiperszenzitív válasz alatt a lézióképződéssel ill. a lézió terjedésével járó oxidatív károsodást mérsékli. Azonban az élő növényi szervezet esetében a SA antioxidáns szerepét még nem bizonyították (Durner és mtsai 1997).

Egy korábbi elmélet szerint (Chen és mtsai 1993) a jelzőút során a H₂O₂ lehet a SA-at követő hírvivő molekula. Találtak egy kataláz aktivitású fehérjét, mely képes a SA megkötésére. A kataláz az egyik fő H₂O₂-hasító enzim, de a SA-hoz kötődve aktivitását veszti. Így következne be a sejten belüli H₂O₂-szint növekedése. De mivel a kezeletlen levelekben, ahová a

szisztemikus hatás végett el kéne jutnia a jelzőmolekulának, nem emelkedik a H₂O₂-szint a SAR alatt, ezt az összefüggést elvetették.

Neuenschwander és mtsai (1995) Xanthi-nc dohányon és ennek SA-hiányos, *NahG* gént tartalmazó változatán vizsgálták a H₂O₂-ot és a SA-at, mint a SAR kialakításáért felelős jelzőmolekulákat TMV-vel végzett fertőzés hatására. Az *N* gént tartalmazó Xanthi-nc fertőzött levele feletti levelében kimutatták a SAR kifejlődésére utaló PR-1 gén aktivitását. Ugyanakkor a fertőzést követő 9 nap alatt nem nőtt a H₂O₂ mennyisége a vírusfertőzött levélben. Ez alapján bebizonyították, hogy a H₂O₂ nem szolgálhat szisztemikus jelként a SAR kialakításában.

A vizes kontrollhoz képest, az 5 mM koncentrációjú H₂O₂ oldattal történő előzetes infiltrálás sem a Xanthi-nc, sem a *NahG* gént tartalmazó dohány levelén nem okozott lézióméret csökkenést TMV fertőzés esetén. A 3 mM-os SA-oldattal történő infiltrálás hatására azonban, a Xanthi-nc fajtán a lézióméret felére csökkent a vizes kontroll 2,5 mm-es léziójához képest. A *NahG* gént tartalmazó típus levelén a kezelés nem okozott lézióméret csökkenést a vizes kontrollhoz képest, mivel a bevitt SA azonnal elbomlott.

Mivel a H₂O₂ kezelés SA jelenlétében és hiányában sem gátolta a lézióméret kialakulását, tehát hatása nem volt SA-függő, így nem bizonyítható hogy a SA-at követő másodlagos hírvivő lenne a SAR kialakulása során.

A H₂O₂-nak azonban szerepe van a helyi válaszokban, a lézió kialakulásában, ugyanis a lézió közelében a SA koncentráció olyan magas, hogy lehetővé válik a katalázhoz való kötődése és ezáltal a H₂O₂ mennyiségének növekedése. A távoli, nem fertőzött levélben ehhez képest 10-100-szor kevesebb SA található (Enyedi és mtsai 1992). A fertőzés közelében a magas SA koncentráció a kataláz és más oxidoreduktázok gátlásán keresztül a H₂O₂ felezési idejét is hosszabbítja, ami által az oxidatív kitörés erősebb és ez sok helyi választ indíthat el.

Kauss és Jeblick (1995) megfigyelték, hogy SA-előkezelés után a szövetek alkalmasabbak lesznek az oxidatív kitörés gyors kiváltására. A SA-val való „kondicionálással” olyan hatás érhető el, mint amilyen a SAR megszerzése után alakul ki, vagyis az így kiváltott biokémiai változások egy következő fertőzéssel szemben gyorsabb választ tesznek lehetővé, növelik a növény rezisztenciáját.

León és mtsai (1995) a H₂O₂ helyi reakciókban betöltött szerepét, a H₂O₂ által stimulált SA-szintézist *N. tabacum* cv. Xanthi-nc dohányon vizsgálták. A kísérlet során 0,3–300 mM koncentrációjú H₂O₂ oldatot injektáltak a levélbe, majd az infiltrált és a tőle 3 cm-re levő szövetből vettek mintát. A SA-szintézis utolsó lépéséért felelős benzoészav-2 hidroxiláz (BA2H) enzim aktivitását 1 óráig, míg a SA-felhalmozódást 6 óráig időtartam alatt mérték. Az

infiltrált szövetben már 5 perc múlva jelentős BA2H aktivitás növekedés volt, a SA mennyisége pedig 1 óra múlva kezdett emelkedni. Az infiltrált szövetrésztől 3 cm-re vett mintában már 30 perc múlva megnőtt az enzimaktivitás, de a SA mennyisége még 6 óra múlva sem emelkedett. Megállapították, hogy az infiltrált szövetrészben a H₂O₂ két módon aktiválja a SA-szintézist. Elektron donor jelenlétében közvetlenül, gyorsan hat a BA2H enzim aktivitás növekedésére, elektron donor hiányában pedig a benzooesav felhalmozáson keresztül stimulálja a SA-termelődést, mely egy lassabb reakció.

A ROS, és ezen belül a H₂O₂, a sejt redoxállapotán keresztül védekezési gének kifejeződését indukálja és ennél fogva másodlagos hírvivőnek minősül (Durner és mtsai 1997). Például a ROS koncentrációjának emelkedése peroxidázokat, katalázokat és más, ROS-t hasító enzimeket stimulál. Növények esetében még nem ismert a redox jelzés folyamata, ami ezeknek a géneknek az aktiválódásához vezet (Brisson és mtsai 1994). Elképzelhető, hogy hasonlít ahhoz az állatokra jellemző mechanizmushoz, ahogyan az oxidatív stressz indukálja az immunválaszban és a gyulladásra adott válaszban részt vevő géneket.

2.3.1.7. Kémiaailag aktivált szisztémikus szerzett rezisztencia

Felvetődött, hogy a SAR kémiai aktivátorainak szerepe lehet a mezőgazdaságban, a növényvédelemben. A kórokozók okozta fertőzés mellett, egyes kis molekulatömegű molekulák is indukálhatnak SAR- t, így a növények védekezése aktiválható lenne a velük való kezeléssel. A SAR-aktivátorokkal szembeni kitételek, hogy ne legyen direkt antimikrobiális hatásuk, ugyan azon kórokozók ellen indukáljanak rezisztenciát mint a biológiailag aktivált SAR és indukálják azokat a SAR markergéneket, melyeket adott esetben egy kórokozó.

Friedrich és mtsai (1996) *N. tabacum* cv. Xanthi-nc dohányban benzotiadiazollal (BTH) indukáltak szisztémikus szerzett rezisztenciát. Az *N* gént tartalmazó *N. tabacum* cv. Xanthi-nc a TMV fertőzésre 2 mm-es léziókkal reagált. A TMV-vel való előfertőzés hatására a felső leveleken a TMV-vel végzett felülfertőzésre csak 1 mm-es léziók alakultak ki. BTH-val végzett előfertőzés esetén a felső levelek csak 0,2-0,3 mm-es léziókat mutattak a felülfertőzéskor. A BTH előkezelés által indukált SAR megfelelt annak a kritériumnak, hogy ugyan azon kórokozók ellen biztosítson védelmet, mint a TMV által biológiailag indukált SAR. Érdekes, hogy szemben a biológiailag indukált SAR-ral, melynek kiváltásához nekrozis és SA felhalmozódása szükséges, a BTH úgy váltott ki szisztémikus szerzett rezisztenciát, hogy az előkezelt levélen nem fejlődtek ki hiperszenzitív léziók és nem volt változás a SA

mennyiségében a SAR alatt. Mindezek ellenére, a SAR markergének kifejeződése igazolta, hogy a BTH a SAR anyagcsereúton keresztül indukálta a rezisztenciát. A BTH által aktivált SAR olyan erősnek bizonyult, hogy fogékony dohányban is megakadályozta a TMV szisztemizálódását. Specifikus rezisztenciagén nélkül, a TMV mellett kielégítő védekezést biztosított a *Peronospora tabacina*, *Cercospora nicotianae*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* és a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* kórokozók ellen, ezzel bizonyítva hogy a SAR anyagcsereút fontos szerepet tölt be a kórokozók széles spektruma elleni védekezésben.

Lawton és mtsai (1996) *Arabidopsis* növényeket kezeltek elő BTH-val, mely széles spektrumú rezisztenciát alakított ki a *P. syringae* pv. *tomato*, a tarlórépa göndörödés vírus (TCV) és a *Peronospora parasitica* kórokozókkal szemben. Azt, hogy a BTH valóban a SAR aktiválásán keresztül okoz rezisztenciát, a PR-1, PR-2 és PR-5 fehérjék indukálódásával igazolták.

Görlach és mtsai (1996) a BTH, mint kémiai SAR-aktivátor hatását, fogékony búzán vizsgálták. A BTH által aktivált SAR a tenyészidőszak végéig hatékonyan bizonyult az *Erysiphe graminis*, *Puccinia recondita* és *Septoria sp.* fertőzésével szemben.

Ezek alapján elmondható, hogy a BTH-val történő kezelés a növényfajok és az őket támadó kórokozók tekintetében is széles spektrumú rezisztenciát alakít ki. Fontos különbség a biológiailag aktivált SAR-hoz képest, hogy a BTH nem csak a rezisztens típusok ellenállóságát fokozza, hanem fogékony növényekben is képes megfelelő szintű rezisztenciát kialakítani egyes kórokozóikkal szemben.

Egy másik kémiai aktivátor, a 2,6-diklór-izonikotinsav (INA) által indukált rezisztenciát Vernooij és mtsai (1996) vizsgálták a TMV-vel szembeni ellenállóságért felelős *N* gént tartalmazó *N. tabacum* cv. Xanthi-nc fajtán és ennek *NahG* gént tartalmazó, SA-hiányos változatán. Előkezelés nélkül a TMV fertőzés a SA-hiányos típuson kétszer akkora léziókat váltott ki, mint a Xanthi-nc dohányon. Ez egyértelmű bizonyíték arra, hogy a SA a specifikus rezisztencia gén által irányított folyamatban fontos szerepet tölt be, ami fenotípusosan is megnyilvánul. Az INA-val való előkezelés mindkét dohány típus esetében megnövekedett rezisztenciát eredményezett. Az INA által kiváltott SAR kifejlődése alatt a PR-1 SAR markergén aktiválódott, de SA nem termelődött, ami arra enged következtetni, hogy az INA a SA-hoz képest a SAR- hoz vezető jelátviteli út későbbi pontján hat.

Ryals és mtsai (1996) szerint azonban a BTH és az INA kivételével sem a mesterséges, vagyis nem növényi eredetű SAR-aktivátorokat, sem a külső SA kezelést nem tolerálják a növények, így nem garantálható ezek gyakorlati haszna.

2.3.1.8. A növényvédelem és az indukált rezisztenciaformák

A növényvédelemmel való összefüggésben egyre nagyobb figyelmet kapnak az indukált rezisztencia formák, mert a legtöbb rezisztencia bélyeg mesterségesen kémiai vagy biológiai elicitorokkal is indukálható, valamint génszűrésrel elérhető, hogy ezek a bélyegek folyamatosan megnyilvánuljanak (Heil, 2002).

A feltételezések szerint az indukált rezisztencia (IR) formák azért alakultak ki, mert kevesebb ráfordítással járnak a növény részéről, mint az állandó rezisztencia. Olyan körülmények közt, mikor nincs szükség a rezisztenciára, egy rezisztens növény reprodukciója gyengébb a fogékonyénál, mert a rezisztencia bélyegek hátrányos hatással vannak a növény kondíciójára, amennyiben kórokozó mentes környezetben is kifejeződnek. Viszont az állandó rezisztenciával szemben az IR hátránya, hogy a rezisztencia megszerzése időben eltolódhat és a növények védtelenek, míg a rezisztenciát ki nem alakítja az első, kiváltó kórokozó támadás.

A fentiekből következik, hogy az indukálható rezisztencia folyamatos kifejeződése ugyanúgy lényeges költségekkel járhat. Az olyan transzgenikus növénytípusok, melyekben a rezisztenciát okozó gének folyamatosan nyilvánulnak meg, a rezisztencia folyamatos kifejeződésével járó nagy ráfordítás terhét viselik. Szintén ez magyarázhatja azt a megfigyelést, hogy sok transzgenikus *Arabidopsis* növény, mely a rezisztenciát túlexpresszálja, növekedési zavarral terhelt, törpe, vagy kevésbé fertilis fenotípus jellemzi (Heil és Baldwin, 2002).

Jelenleg sok tanulmány irányul arra, hogy a rezisztencia kémiai kiváltását követően, felmérje a növény rezisztencia okozta „költségeit” („costs of resistance”), vagyis azokat a negatív hatásokat, melyeket egy adott rezisztencia bélyeg termesztési körülmények közt okoz. A kutatások alapján azt találták, hogy az indukált rezisztencia okozhat késői virágzást, gyümölcsötést ill. érést, vagy a virág morfológiájában és a kinyíló virágok számában való elváltozásokat, amelynek hatása van a beporzó viselkedésére is. Általános megfigyelés, hogy a verseny hátrányosan befolyásolja a növényeket az IR kifejezésében, illetve fordítva, a rezisztencia kiváltása visszavetheti a növény kompetitív képességét. Például természetes körülmények között, mikor gyakori a nitrogénhiány, a PR-fehérjék előállítására, melyek a tapasztalatok szerint a fertőzött levélben az összes oldható fehérje tartalomnak 10%-át adják, egy lényeges ráfordítási költség.

A rezisztencia költségeit fölmérő kutatások még gyerekcipőben járnak és számos metodikai problémával kell számolni, amiknél fogva nehéz eldönteni, hogy az előálló költséget valóban a rezisztencia maga, vagy a rezisztencia kísérletes kiváltásának velejárói okozzák. A természetes környezetben végzett tanulmányok száma korlátozott, szorgalmazzák a szabadföldi megfigyelések és a laboratóriumi kísérletek integrálását.

Elképzelhető, hogy a betegségellenállóságért felelős jelátviteli utak megismerésének előrehaladtával jönne el a transzgenikus növények következő generációja. A kulcsfontosságú jelzővegyületek génszabályozásával, a védekezési válaszok sokasága lehetne aktiválható és így olyan növényeket állítanának elő, melyek a kórokozók széles spektruma ellen ellenállóak. A másik mód lehet a rezisztencia fokozására, génszabályozással olyan vegyületeket termeltetni a növényben, melyek SAR-t indukálnak (Ryals és mtsai 1996).

2.3.2. A jázmonsav és etilén által közvetített szisztémikus válaszok

A hormonok, mint kémiai hírvivők, a szervek és szövetek aktivitásait koordinálják. Olyan vegyületek, melyeket egy adott szerv megtermel, majd egy másikhoz szállítódva, annak funkcióját kémiai aktivitásánál fogva stimulálja. A SA-hoz hasonlóan, a jázmonsav (JA) is azért alkalmas szisztémikus válaszok közvetítésére, mert stressz esetén mennyisége nem csak helyileg nő meg, hanem mint növényi hormon, transzport útján képes a növény bármely részén koncentrálni és hatását kifejteni.

2.3.2.1. Az indukált szisztémikus rezisztencia

A növény komplex védekezését a hormonok együttesen szabályozzák, így nehéz megnevezni önmagában egy hormon szerepét. Az indukálható válaszok esetében kérdés, hogy mely anyagok játszanak szerepet hírvivőként azon jelzőutak során, melyek a kórokozó érzékelésétől a rezisztencia indukálásáig vezetnek. Az előzőekben a SAR-ról volt szó, melynek az indukálásához a SA-ra van szükség.

Emellett létezik egy másik indukált rezisztenciaválasz, mely szintén széles hatásspektrumú és szisztémikus, de függetlenül működik a SA-tól és a PR-génkifejeződéstől. Ez az indukált szisztémikus rezisztenciának (Induced Systemic Resistance= ISR) nevezett válasz, amit

gyökéren élő rizobaktériumok váltanak ki és amelyet a JA és az etilén szabályoz (Pieterse és mtsai 1996).

Egyes növényi növekedést segítő rizobaktériumokról, főleg fluoreszkáló *Pseudomonas* fajokról kimutatták, hogy felhasználhatók a növényvédelemben azon oknál fogva, hogy a jelenlévő kórokozókkal és káros mikroorganizmusokkal folytatott verseny során elnyomják azokat. A mechanizmus tanulmányozása során megfigyelték, hogy egyes baktérium törzsek azáltal védik a növényt, hogy szisztémikus rezisztenciát indukálnak anélkül, hogy ők maguk tünetet váltanának ki. A *P. fluorescens* által kiváltott ISR-ről számos növény-kórokozó rendszerben számoltak be, úgy mint babban *P. syringae* pv. *phaseolicola* ellen, szegfűben a fuzáriumos hervadás ellen, és uborkában a *Colletotrichum orbiculare* ellen.

Pieterse és mtsai (1996) a védekezési mechanizmus tanulmányozására olyan modellt állítottak fel, melyben az *Arabidopsis* a gazdanövény, míg az indukáló ágens egy nem kórokozó, a gyökérszónában élő baktérium, a *P. fluorescens* egy bizonyos, a biológiai védekezésben használatos, szelektált törzse (WCS417r). Arról a baktérium törzsről már ismert volt, hogy az ISR-t erősen indukálja szegfűben és retekben a *Fusarium oxysporum* ellen. A kísérlet során a *P. fluorescens* baktérium szuszpenziójával előkezelték a gyökérszóna alsó zónáját, majd a gyökérszóna felső zónájában a *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* kórokozóval történt a felülfertőzés. A föld feletti részek rezisztenciáját virulens *P. syringae* pv. *tomato* baktériummal való fertőzéssel ellenőrizték. Az így kiváltott ISR hatékonynak bizonyult a gyökérben a *Fusarium* és a föld feletti részekben a *Pseudomonas* ellen, de nem járt SA-termelődéssel és SAR-markerfehérjék megjelenésével, vagyis az indukált rezisztencia ezen formája nem a SAR-anyagsereúton keresztül valósul meg. Kísérletekkel igazolták, hogy az indukált rezisztencia nem a mikroorganizmusok közti antagonista hatásnak volt köszönhető, hanem a növényben a baktérium törzssel való kezelés hatására beinduló folyamatoknak. van Wees és mtsai (1997) szerint ebben a modellben az ISR függhet az *Arabidopsis* ökotípusától és az indukáló baktériumtörzstől, illetve ezek specifikitást adnak a reakciónak.

Pieterse és mtsai (1998) azt is megfigyelték, hogy a JA és etilén érzékelésére nem képes mutánsokban a gyökérszónában élő baktériumok által kiváltott ISR gyengül.

2.3.2.2. Jázmonsav és etilén a sebzés- és kártevők indukálta válaszokban

A JA és az etilén betegségellenállóságban való szerepe nem olyan rég óta kutatott terület.

A JA, csak úgy mint a SA, endogén hormon. A jázmonsav félék az oktadekanoid anyagcsereút folyamán termelődnek, mely részt vesz a növekedés, bizonyos fejlődési folyamatok (gyümölcsérés, gumófejlődés, öregedés, pollenképződés) és a védekezés szabályozásában (Ellis és Turner, 2001).

A JA-ról és az etilénről, a növények sebzésre és rovartámadásra adott válasza terén szerencsére bőséges ismeretanyag áll rendelkezésre, ami kiindulásul szolgálhat. A sebzés-indukálta oktadekanoid anyagcsereút a JA, mint szignálmolekula termelésével és proteináz inhibitor gének aktivációjával végződik (Dong, 1998). A sebzési válaszokhoz az etilén szükséges, de a JA nélkül önmagában nem elegendő. Az etilén termelés gátlása negatívan érinti a JA anyagcsereút indukálódását.

A kártevők táplálkozása helyi és szisztémikus válaszokat vált ki, melyek fizikai vagy kémiai alapon közvetlenül a kártevő tevékenységére irányulnak, vagy a növényt károsító rovar ellenségét vonzzák oda. Ez a kártevők elleni indukált rezisztencia (induced resistance against herbivores= IRH), melynek központi jelzőmolekulája a JA (Creelman és Mullet, 1997). Sérüléskor, vagy a kártevők táplálkozása során a membránlipidekből linolénsav szabadul fel, ami enzimatikusan JA-vá alakul. A JA képes a hánicsba szállítódni, így alkalmas a szisztémikus jel szerepének betöltésére. A JA olyan géneket aktivál, melyek proteináz gátlókat, valamint illékony vegyületeket és szekunder metabolitokat termelő enzimeket kódolnak (pl. nikotin, fenolok).

Az általános sebzési válaszok kiváltói lehetnek sérült sejtfalakkból felszabaduló oligoszacharidok is (Heil és Bostock, 2002).

Paradicsom esetében egy specifikus polipeptid elicitorról is beszámoltak, a sziszteminről, mely sérülés esetén szabadul fel prekursorából (Pearce és mtsai 1991). Ez váltja ki a linolénsav termelődését, ami aktiválja az oktadekanoid jelzőkaskádot. A szisztemint még csak paradicsomban találták meg. A JA és a szisztemin is képes a hánicsba szállítódni, így mindkettő lehet szisztémikus jel.

2.3.2.3. Jázmonsav és etilén a kórokozók fertőzésére adott válaszokban

A rovarok táplálkozása során megsérült sejtekből felszabaduló szisztemin, vagy a kórokozók fertőzésekor a növény vagy a gomba sejtfalából származó oligoszacharidok egyaránt aktiválják a proteináz inhibitor géneket.

Doares és mtsai (1995a) kísérletükben paradicsom levelét sziszteminnel és oligoszacharidokkal, mint elicitorokkal kezelték, aminek hatására megemelkedett a JA- szint. Ebből arra következtettek, hogy sérüléskor, vagy fertőzéskor a provokáció helyén felszabaduló elicitorok (oligoszacharid és polipeptid jelek) az oktadekanoid anyagcsereút aktiválásán keresztül indukálják a védekezés génjeinek kifejeződését, ahol a jelátviteli útnak fontos eleme a JA.

Blechert és mtsai (1995) szerint az, hogy rovarkártételre vagy mikrobiális kórokozókra JA termelődik, erősen specifikus válasz, mely nem jellemző olyan környezeti hatásokra adott stressz válaszok során, mint a fény, nehézfém, hideg vagy hősokk. Feltételezéseik szerint az érzékeléstől a génaktiváción át a másodlagos anyagcseretermékek szintéziséig vezető jelek pentaciklusos oxylipid származékok lehetnek, melyekből egy oxylipid kaszkád áll össze. A JA maga, egy oxylipid típusú hormon, mely oxigenált linolénsavból származik. Az oktadekanoid sav származékok nélkülözhetetlenek az antibiotikum hatású vegyületek szintézisének módosításához, így szerves részei a növényi védekezésnek.

Thomma és mtsai (1998) *Arabidopsis* növényeken szemléltették, hogy a különböző kórokozók ellen, különböző jelzúton keresztül aktiválódik a védekezés. Vad típusú, SA-felhalmozásra nem képes (*NahG*), SA érzékelésre nem képes (*npr1-1*) és JA-at érzékelni nem képes (*coil*) *Arabidopsis* vonalakat *Alternaria brassicicola* és *Botrytis cinerea* kórokozókkal, valamint a *Peronospora parasitica* inkompatibilis törzsével inokuláltak. A vad típust egyik kórokozó faj sem tudta megbetegíteni. A *NahG* és *npr1-1* típusban a *Peronospora parasitica* képes volt szaporodni, tehát az ellene való védekezésben szerepe van a SA-nak, míg az alternária és botritisz ellen SA jelenléte nélkül is védett volt a növény. A *coil* mutánst, a JA érzékelésének hiányában, az alternária és a botritisz jelentős mértékben károsította, bizonyítván, hogy az alternária és a botritisz elleni védekezésben a JA szerepel jelzővegyületként. A *P. parasitica* nem okozott rajta szövetpusztulást.

2.3.2.4. Jázmonsav és etilén által szabályozott válaszok molekuláris markerei

Penninckx és mtsai (1996) arról számoltak be, hogy *Arabidopsis* növényekben az *Alternaria brassicicola* kórokozóval való felülfertőzés hatására a JA mennyisége erősen emelkedett a fertőzött és a nem fertőzött levelekben egyaránt. A fertőzés, vagy a metil-jázmonáttal (MeJA) való külső kezelés a *PDF1.2* gén helyi és szisztemikus indukcióját okozta, mely egy a defenzinek közé tartozó gombaellenes hatású peptidet kódol.

Ellis és Turner (2001) az *Arabidopsis thaliana* fajban a JA jelzőút során szereplő gének azonosítására olyan mutánst (*cevl*) találtak, melyben állandóan aktív a JA- és etilén-anyagcsereút. Emiatt a mutáns a vad típushoz képest folyamatosan magas JA- és etilén szintet mutatott, amely egyes védekezési gének, köztük a *Thi2.1* és a *PDF1.2*. állandó kifejeződését okozta és törpe növekedést eredményezett. A JA- és az etilén- jelzőutat egyaránt érintő *cevl* mutáció, a JA- és etilén- indukálta gének stimulációján keresztül széles spektrumú rezisztenciát alakított ki három olyan lisztharmat faj ellen (*Erysiphe cichoracearum*, *Erysiphe orontii*, *Oidium lycopersici*), melyekkel szemben a vad típusú *Arabidopsis* fogékony.

A JA és az etilén jelzőmolekulák által közvetített rezisztencia választ specifikusan kísérő fehérjék közül eddig a tionin ill. defenzin fehérjecsaldhoz tartozó antimikrobiális peptideket írták le az *Arabidopsis thaliana* fajban, ami kézzel foghatóbbá teszi a szisztemikus rezisztencia és a JA, etilén közti kapcsolatot. Ezek más jelátviteli úton keresztül indukálhatók mint a PR fehérjék, melyek a SAR válasz tipikus velejárói. A tionint kódoló gén (*Thi2.1*) kifejeződését a JA és a *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiolae* fertőzés indukálja (Epple és mtsai 1995). *Arabidopsis* növényekben a *Thi2.1* gén túltermeltetésével Epple és mtsai (1997) fokozott rezisztenciát értek el a *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiolae* ellen. A *PDF1.2* nevű defenzin gént a JA és az etilén együtt szabályozza és az *Alternaria brassicicola* is indukálja (Penninckx és mtsai 1996). Érdekes módon az ISR alatt a *Thi2.1* és a *PDF1.2* gének nem indukálódnak.

2.3.2.5. A szalicilsav, jázmonsav és etilén által szabályozott jelzőutak közti szinergista illetve antagonistista viszony

A főnti kísérletek és az, hogy a JA által szabályozott, sebzés- és rovarkártétel indukálta anyagcsereút egy kórokozó támadása során termelt lítikus enzim működésekor felszabaduló oligoszacharid fragmentekre is indukálódik, régóta megalapozta a JA és a kórokozók elleni rezisztencia összefüggését. Azonban a JA és az etilén szerepe bizonytalan a

betegségellenállóságban. Ellentmondások származhatnak abból, ha az etilén/JA anyagcserében történő változásokat önmagukban vizsgálják, és nem a SA által szabályozott válaszokkal közösen kialakított hatást (Dong, 1998).

A JA és a SA közti antagonista viszonyt a növényi sebzési válaszokról szóló tanulmányokban jól dokumentálták. Ismert, hogy a SA a sérüléskor indukálódó proteináz inhibitorok termelődését gátolja. Doares és mtsai (1995b) azt is bemutatták, hogy a SA a jelátvitelt a JA szintézis után, de az inhibitor gének transzkripcióját megelőzően gátolja.

A különböző jelz utak lehetnek szinergista vagy antagonista viszonyban egymással. A kórokozókkal szemben működő, SA-szabályozta szisztemikus rezisztencia és a kártevők elleni indukált rezisztencia kapcsolatára vonatkozóan, ahol a JA a központi jelzőmolekula, már vannak eredmények (Heil és Bostock, 2002). Kölcsönhatásukat illetően kereszt rezisztenciára és a kettő közti optimalizációra is van példa. Ezek a kutatások segítséget jelentenek a SA- illetve a JA- szabályozta válaszok betegségellenállóságban való kölcsönhatásának vizsgálatához.

A SA jelzés JA általi gátlása nem olyan gyakori. Viszont a SA gátolja az oktadekanoid anyagcsereút különböző lépéseit, így a JA szintézisét, jelátviteli szerepét, ezen keresztül a JA-szabályozta gének kifejeződését, vagyis a sebzés- és JA-indukálta válaszokat. Ezért van az, hogy a kórokozók támadása főleg az SAR komponenseit indukálja, mert a nagy koncentrációban termelődő SA blokkolja az oktadekanoid jelzést. Kivételt képez a *P. syringae* pv. *tomato*, mely a paradicsom levelében a proteináz inhibitorokat indukálja, mely inkább a sebzési válasz és az indukált kártevő rezisztencia jellemzője, mint az SAR-é.

Niki és mtsai (1998) a SA és a JA antagonista hatását sértett dohány levélben a PR fehérjék szintjén vizsgálva azt találták, hogy a SA által indukálható bázikus típusú PR-1 fehérje termelődésének megfelelő körülmények között a JA- indukálta savas kémhatású PR fehérjék kifejeződése háttérbe szorult, és fordítva.

A JA és etilén anyagcsere utat a paradicsom sebzési válaszában keresztül tanulmányozva (O'Donnell és mtsai 1996) kiderült, hogy a JA és az etilén indukálják egymás termelődését, hatásukat szinergista módon fejtik ki. Mindkettő szükséges a sebzési válaszhoz, antimikrobiális peptidek szisztemikus termelődéséhez (defenzin és tionin), az *Arabidopsis Peronospora parasitica* elleni rezisztenciájához és az ISR-hez.

Az eddigi eredmények a nem specifikus, széles spektrumú ellenállóság kialakulásához vezető anyagcsereutak összetett hálózatát sejtetik, melyek külön-külön és együtt is működnek. A hálózat közepén a SA, JA és az etilén található (Dong, 1998).

2.3.3. Az etilén alternatív szerepe a betegség kifejlődésében

Számos környezeti hatás ill. fejlődési folyamat során képződik etilén, ami a növényi szövetek nekrozisához vezet. A különböző stresszeket gyakran kíséri az etilén megjelenése, mely ideális jelzőmolekula, mivel gyorsan szintetizálódik, könnyen diffundál és sok stresszválaszhoz kötődő gént indukál.

Ismert a növényi betegségek és az etilén fölszabadulás közti kapcsolat. Több növényfaj esetén összefüggést találtak a kórokozó fertőzésre bekövetkező etiléntermelés és a klorotikus, hervadásos tünetek kifejlődése között. Dohány és TMV kapcsolatában de Laat és Van Loon (1983), dohány és *Phytophthora infestans* esetében Spanu és Boller (1989) figyelte meg, hogy az etilént termelő enzimek aktivitása közvetlenül az elsődleges léziót körülvevő klorotikus szövetre koncentrált.

A fogékony válasz első szakasza alatt a növény aktiválja védekezési mechanizmusait – úgy mint sejtfal megerősítés, PR-fehérjék termelése, fenol akkumuláció – majd akkor, illetve azért kezdődik el a második szakasz, mikor a kórokozó megállítására irányuló védekezés nem megfelelő. Ennek során indul el az elsődleges lézióból a kiterjedt nekrozis. Az azonban még nyitott kérdés, hogy a fertőzés alatti magas etilén szint okozati tényező, vagyis jel a nekrozis fokozására, vagy egyszerűen csak velejárója a terjedő betegségi tünetnek, a sejtek sérülésével járó következmény aminek nincs jelentősége a folyamatban.

2.3.3.1. Az etilén és a kórtünetek kapcsolata

A betegség kifejlődésének és az etilén, illetve etilén érzékelés kapcsolatának genetikai megközelítéséről először Lund és mtsai (1998) jelentettek meg közleményt. Fogékony paradicsom fajta virulens *X. c. pv. vesicatoria* és *P. s. pv. tomato* fertőzésére adott válaszát hasonlították össze az *Nr* (*Never ripe*= soha meg nem érő) mutáns típusával, melynek nincs receptora az etilénre, így nem képes annak érzékelésére. Megállapították, hogy az etilén érzékelésének hiányában a betegség súlyossága csökkent, tehát az etilénnek fontos szerepe

van a betegség kifejlődésében. Ugyanakkor, a kevésbé súlyos tüneteket mutató *Nr* paradicsom szövetében nem szaporodott csökkent ütemben a kórokozó! Mivel az *Nr* mutánsokban csak az érzékelés hibás és nem az etiléntermelő képesség, ezért kizárható, hogy a jelenség a csökkent etilén szintézisnek köszönhető. Úgy ítélik meg, hogy az *Nr* mutánsokra jellemző mérsékeltbb betegségi tünetet az etilén érzéketlenség egy specifikus hatása.

Lund és mtsai magyarázatot adtak arra is, hogy fogékony válasz esetén mi indítja el a sejthalál terjedését. Az etilén hatása alapján a fogékony válasznak két szakaszát határozták meg. Mivel az etilén érzékelés hiánya nem befolyásolta az első szakaszra jellemző védekezési kísérletet és az elsődleges léziófejlődést, így ebben az etilénnek nincs szerepe. A második szakasz viszont etilénfüggő, mert a léziómegnagyobbodás és a betegség során kialakuló kiterjedt szövetpusztulás, a fogékony fajtában egybeesett a fokozott etilén termeléssel. Ezzel szemben az etilén érzékelésében hibás mutáns leveleiben ugyan az etiléntartalom megnőtt, de a levelek nem pusztultak, ami az etilén, mint jel érzékelésének és továbbításának jelentőségére utal.

Gyakorlati szempontból fölvetődik, hogy ha génebeszettel előállíthatók lennének etilénérzéketlen növények, időtálló toleranciával bírnának számos kórokozó ellen és a betegségek által okozott kár mérsékelhető lenne.

2.3.3.2. Az etilén és a szalicilsav kölcsönhatása a kórtünetek kifejlődésében

O'Donnell és mtsai (2001) fogékony paradicsom *X. c. pv. vesicatoria* baktériumra adott válasza során vizsgálták az etilénfüggő szövetpusztulás folyamatát illetve hogy eközben az etilén befolyásol-e más jelzőutakat.

Fogékony fajtát, etilént nem érzékelő *Nr* mutánst és SA-hiányos (*NahG*) típust összehasonlítva azt találták, hogy az elsődleges léziók mérete, száma és a baktériumszaporodás mértéke ugyanúgy független a SA-tól, mint az etiléntől. Ez ellentétes az *Arabidopsis* és dohány esetében tett megfigyelésekkel, ahol a *NahG* típusú növényekben a kórokozó könnyebben szaporodott és súlyosabb tünetek fejlődtek ki (Delaney és mtsai 1994). A második fázis SA-függő, mert SA- felhalmozódás gátlásával megelőzhető volt a tünet teljes kifejlődése. Ezek alapján a fogékony paradicsom és virulens *Xcv* kapcsolatában a SA hatása megegyező az etilénével, vagyis a SA is szükséges a tünet kifejlődéséhez.

A fogékony kontrollban a 4-6. nap közti etilén felhalmozódást a 10-12. napon SA felhalmozódás követte, melynek mértéke összefüggött a szövetpusztulás súlyosságával. Az

etilénre nem reagáló fertőzött szövetekben (*Nr*) elmarad a SA-felhalmozódás és a szövetpusztulás. Ebből arra következtettek, hogy az etilénszintézis és –érzékelés előfeltétele a SA akkumulációnak és akár az etilén, akár a SA felhalmozódása gátolt, az a tünet súlyosságát mérsékli. Ugyanakkor, egyiknek sem a kórokozó gátlására irányul a hatása.

O'Donnell és mtsai (2001) arra figyelmeztetnek, hogy a különböző gazda-patogén kapcsolatok vizsgálata függvényében ellentétes megfigyelések születhetnek: az etilénérzékelő képesség hiányát összefüggésbe hozták úgy a megnövekedett fogékonysággal, mint a betegség súlyosságának csökkenésével, de arra is vannak példák, hogy az etilénnek nincs hatása a tünetfejlődésre.

A SA-szintézis időzítése alapján úgy tűnik, hogy a SA is más-más módon vesz részt a különböző növényfajok fogékony válaszában, mert míg saját kísérleteikben a paradicsom csak napok múlva mutatott SA-felhalmozódást, az *Arabidopsis* egy kompatibilis kórokozó hatására már órákon belül szintetizál SA-at (Zhou és mtsai 1998).

Így nehéz általánosítani a hormonok védekezésben betöltött szerepét. Továbbá felhívják a figyelmet arra, hogy a látható tünetek alapján a gazda-patogén kapcsolat jellegének megítélése téves lehet, mert esetükben a mérsékelt szövetkárosodás nem jelentette a baktériumszaporodás korlátozását.

2.3.3.3. Szalicilsav- és jázmonsav-független anyagcsereutak

A kompatibilis kapcsolatban mért jelentős SA-felhalmozódáshoz képest, rezisztens paradicsom fajta és avirulens *X. c. pv. vesicatoria* inkompatibilis kapcsolatában lényegesen kisebb SA-szint emelkedést figyeltek meg, amiből arra következtettek, hogy ebben az inkompatibilis kapcsolatban a SA-nak minimális szerepe van. Ezt megerősítette az is, hogy a rezisztens fajtának és SA-hiányos változatának (*NahG*) válasza közt nem volt különbség.

Paradicsom esetében nem példa nélküli, hogy az avirulens kórokozóra adott válaszban nincs központi szerepe a SA-nak. A *Cladosporium fulvum* ellen rezisztenciát biztosító *Cf-2* illetve *Cf-9* géneken alapuló válasz is SA-független, mivel a *Cf-2* illetve *Cf-9* gén általi rezisztenciát nem befolyásolja a *NahG* genotípus (Hammond-Kosack és Jones, 1996).

Venkatappa és mtsai (1999) etilén-, SA- és JA-hiányos paradicsom mutánsokon végzett kísérletek alapján megállapították, hogy a *Pto* gén transzkripció faktorainak, a *Pti4*-nek és

Pti5-nek a kórokozó általi indukálódása SA-, etilén- és JA-független anyagcsereúton keresztül történik.

Az *RPP7 Arabidopsis* génen alapuló *Peronospora parasitica* elleni rezisztenciához szintén nincs szükség a SA-ra, ugyanakkor az ellenállóság az etilén/JA jelzótól is független (McDowell és mtsai 2000).

Ezek alapján valószínű, hogy a SA-, etilén- és JA jelzótól kívül a védekezés új anyagcsereútjai várnak felfedezésre (Dong, 2001).

2.4. A transzmetilezés és a formaldehid szerepe az élővilágban

Az élőlényeket ért biotikus és abiotikus hatások által kiváltott stressz jól nyomonkövethető a különböző metilezett vegyületek, mint a formaldehid (HCHO) előanyagai és a formaldehid változása alapján. A metilcsoport, illetve a HCHO és a metilezés élővilágban való előfordulása, szerepe úgy humán, mint állati és növényi vonatkozásban az eddigi kutatások alapján feltételezhetően általános érvényű.

2.4.1. Metilcsoport és metilezés

A metil gyök egy atomcsoport, mely szabad gyökként is előfordul ($\cdot \text{CH}_3$). A $\cdot \text{CH}_3$ csoport bevitele szerves vegyületekbe, más-más módon történik a C-, O-, N- és S atomok metilezése esetén. Az élő szervezetekben történő „biológiai metilezés” metil-transzferázok hatására megy végbe pl. tetrahidrofolsav, metionin, szarkozin, kolin részvételével. Attól függően, hogy milyen atomon található, megkülönböztetünk C-, O-, N- és S- metilcsoportot. A bázikus aminosavak, mint a lizin (Lys), arginin (Agr), hisztidin (His) esetében a N-atomok metilezésével egy nagyon stabil N-metil származék képződik (Tyihák és mtsai, 1977).

A fehérjék molekula szerkezetét elsősorban aminosav összetevőinek sorrendje határozza meg, de az oldalláncok specifikus enzimatis módosításával tovább változtatható. Ilyen módosítás a metilezés is. Fehérjék esetében ismert, hogy leginkább a Lys és az Arg azok a pontok ahol a metilezés megtörténhet (Bannister 2002). A metil csoport a lizin esetében az ϵ -amino csoporthoz, az argininén pedig a guanidin csoporthoz kötődik. E két aminosav azért is érdemel kiemelt említést, mert egyrészt a Lys és az Arg elengedhetetlenek a mikrobák, növények és állatok normális fejlődéséhez, másrészt, mert eddig a következő metilezett aminosav származékokat találták meg fehérjékben *in vivo*: ϵ -N-monometil-L-lizin (MML), ϵ -N-dimetil-L-lizin (DML), ϵ -N-trimetil-L-lizin (TML), N^G -monometil-L-Arg (MMA), N^G -dimetil-L-Arg (DMA) (Tyihák és mtsai, 1977). Ezek az aminosav származékok szabad formában is előfordulnak, valószínűleg a metilezett fehérjék *in vivo* enzimatis hidrolízisekor keletkeznek.

2.4.2. Aminosavak metilezése

2.4.2.1. Az arginin és metilezett származékai

Az Arg szabad aminosavként és fehérjealkotóként is igen reakcióképes. Guanidin (G) csoportja formaldehid akceptor, mert képes gyorsan reagálni a formaldehiddel, melynek során NG-hidroximetil származékok keletkeznek. Az Arg guanidin csoportja egy, kettő vagy három HCHO molekulát tud megkötni hidroximetil csoport formájában, így mono-, di-, és trihidroximetilezett Arg keletkezik (Szende és mtsai, 2001).

A hidroximetilezett Arg (HMA) dózisfüggő módon befolyásolja a sejtosztódást. Trézl és mtsai (2003) kísérleteiben kis dózisban (1 µg/ml) segítette a sejtosztódást, míg nagy dózisban (10 és 100 µg/ml) jelentős sejtosztódás gátlást okozott. A 100 µg/ml-es dózis nagymértékű sejtpusztulást okozott.

Mivel a hidroximetil csoport kis kötéseerősségű, könnyen leszakítható formában van kötve, így az Arg molekulák képesek azt szállítani és továbbítani, vagyis a hidroximetilezett Arg formaldehid-generátor, közvetlen formaldehid termelő aktivitása van. Valójában a különböző biológiai aktivitások a formaldehiden keresztül nyilvánulnak meg (Szende és mtsai, 1998, 2001; Tyihák és mtsai, 1998).

A HMA képes kontrollálni az endogén szabad formaldehid szintet. A sejtfehérjék Arg-oldalláncaikhoz hidroximetil csoport formájában kötött formaldehid lassan szabadul fel. Így egy kiegyensúlyozott formaldehid szint tartható fent, mely nem toxikus. Ha nagy dózisban van jelen a formaldehid, a formaldehid-akceptoroknak kimerül a kapacitása, így a maradék szabad formaldehid mérgező hatásúvá válik (Trézl és mtsai, 2003).

A különböző Arg-formák hatását vizsgálva a sejthalálra és sejtosztódásra, Tyihák és mtsai (1977) kimutatták, hogy a mono- és dimetil Arg gátolja a dohány sejt kultúrát. Singh és mtsai (2000) bizonyították, hogy amennyiben a HMA a kötött formaldehidet tumorsejtekhez szállítja, ezen keresztül jelentős sejtosztódás gátlást és apoptózist okoz. Ennél fogva a humán terápiás lehetőségként vetették fel az Arg metil- és hidroximetil származékainak bevitelét a tumorsejtek elhalása vagy a tumorsejtek osztódásának megelőzése érdekében (Szende és mtsai, 2001).

2.4.2.2. A lizin és metilezett származékai

Az élő szervezetekben az arginin (Arg) és a lizin (Lys) közötti antagonistika viszony régóta ismert.

Míg az Arg hidroximetileződni tud, a Lys-nek az aminocsoportjai metileződnek. A Lys formaldehid általi spontán metilezéséből keletkező N-metilezett lizinek szintén hatással vannak a sejtosztódásra. Például növénykultúrák TML-nel történő kezelése növelte a sejtosztódást (Trézl és mtsai, 2003). A DML-ről kimutatták, hogy jelentősen stimulálja a dohány szövetkultúra növekedését.

A metilezett vegyületek farmakológiai hatásáról tett megfigyelések is érdekes adalékkul szolgálhatnak e vegyületek általános érvényű hatásainak megismeréséhez.

Szende és mtsai (1970) egerekkel végzett vizsgálatai alapján a mono-, di- és trimetil-lizin tumornövekedést segítőnek bizonyultak, melyek közül a TML feltehetően három metilcsoportja miatt volt a leghatékonyabb. Egészséges egerekben a TML kezelés a sejtosztódást fokozta.

A TML sejtosztódást okoz a nyugalmi állapotban levő, emberi limfocitákban, illetve lerövidíti a sejtciklust a lassan növekedő tumorsejt populációban. Nagyon valószínű, hogy a TML lebomlásával szabad metilcsoportok képződnek, és így nukleinsavak és fehérjék *in vivo* metileződhetnek a TML által.

Összességében elmondható, hogy a pihenő sejtek populációi, legyenek akár tumor vagy nem tumor sejtek, a DNS szintézis és sejtosztódás fázisának irányába stimulálhatóak ϵ -N-metilezett lizinek jelenlétében.

2.4.3. A fehérjék metilezésének biológiai jelentősége

Azonban a fősorolt megfigyelések ellenére, összességében az aminosavak, és rajtuk keresztül a fehérjék metilezésének biológiai funkciójáról mind máig keveset tudunk.

A közvetlen kémiai reakcióknál messzebbre mutató következtetések szerint a sejtciklus G2 fázisában, a sejtosztódásra való felkészüléskor, a metilezési aktivitás megkettőződik, így a hisztonok specifikus metilezése lehet az egyik olyan tényező, mely a mitózist megelőzően a DNS represszióját okozza.

A TML sejtosztódásra gyakorolt stimuláló hatásának tisztázására a TML DNS-hez, hisztonfehérjékhez és nem-hisztonokhoz való kötődését vizsgálta tumorsejtekben Jeney és mtsai (1980). A tanulmány célja az volt, hogy a TML hatásának, illetve működésének

lehetséges helyét kromatinszinten megmutassa, és hogy a kromatinkomponenseket érő módosulások és a sejtosztódás stimulálása közti összefüggést kutassa. Valószínűnek tűnik, hogy a kromatinfehérjék kémiai módosításának van köze a sejtosztódás stimulálásához.

A metilezés biokémiailag stabil változás. A fehérjék metilezésének gyors visszafordíthatóságát még nem dokumentálták, vagyis, meglepő módon, a demetilezés folyamatáról keveset tudunk, a beépült metilcsoportok visszaalakulásának kérdése még nem tisztázott. A metilezés visszaalakulására a legegyszerűsebb út egy demetiláz enzim működése lenne. Egy ilyen enzim keresése 35 éve folyik, ez ideig sikertelenül (Kim és mtsai 1964, Paik és Kim 1974, Wagner és Jorns 2000, Khanna és Jorns 2001). Bannister és mtsai 2002-ben megjelent összefoglaló munkájában is az áll, hogy a jelenlegi dogma szerint a fehérjék metilezése irreverzibilis. Emellett fennáll az a lehetőség is, hogy metil csoportok aktív forgalma létezik ugyan alacsony, de kimutatható szinten.

Az eddig vizsgált, feltételezett demetiláz enzimek működésének azonban közös vonása, hogy formaldehid termelődésével végződött, így ezek a demetilezési folyamatok valószínűleg oxidatív mechanizmuson keresztül jelennek meg.

Tyihák és mtsai (1998) egy zárt reakciólánc lehetőségét vetik fel. E szerint a demetilezéskor keletkező formaldehid azonnal reagál valamilyen aminnal *in vivo*, így metildonora lehet a hidroximetil-transzferázoknak, vagyis a metilcsoportok egy körforgásban maradnak.

2.4.4. A formaldehid és a metilezés kapcsolata

A metilezés, illetve a metilcsoportok keletkezése több szerző szerint is formaldehiden keresztül történik. Már régóta ismert, hogy a hisztamin-N-metiltranszferáz, másnéven S-adenozil-L-metionin (SAM), mind amellet, hogy különböző központi fontosságú vegyület, a TML, karnitin, kolin bioszintézisében fontos szereppel bír, számos metilezési reakcióban metildonorként is résztvesz. Mikor Huszti és Tyihák (1986) a SAM metil csoportját radioaktív jelölés segítségével követték, bizonyítást nyert, hogy a hisztamin N-metil-hisztaminná való enzimátikus átalakulása során a SAM metilcsoportjából formaldehid képződik, vagyis mielőtt a metilcsoport eljut az adott akceptormolekulához, formaldehid formájában található meg. A szerzők e munkájukban elsőként mondják ki, hogy a formaldehid képződése nem mellékreakció, hanem az enzimátikus transzmetilezés komplex folyamatában foglalt jelenség.

2.4.5. Formaldehid a biológiai rendszerekben

A formaldehid egy nagyon reakcióképes alifás aldehid, endogén vegyület, mely minden biológiai rendszerben jelen van. Főleg a sejten belül fordul elő, labilis hidroximetil csoportok formájában (Tyihák és mtsai, 1998). Endogén formaldehidet kimutattak emberi, állati szervekben és különböző növényekben is.

A kérdés, hogyan keletkezik az endogén formaldehid, és mi a szerepe a biológiai rendszerekben?

Egyik lehetőség, hogy folyamatosan szabadul fel különböző prekursorok, például N-, O- és S-metil vegyületek metilcsoportjaiból oxidatív demetilizációs reakciókban, illetve metil-transzferáz enzimek működése során. Ez esetben specifikus biokémiai útvonalon képződik a formaldehid, bonyolult enzimrendszer mellett, mely azt helyben, biztonságosan kezeli. Például metilcsoportokat léptet be a szén körforgásba formaldehiden keresztül.

Ezzel ellentétben, az exogén prekurból felszabaduló formaldehid szubsztrátspecifikus enzimek nélkül, képes egyszerű anyagcsereutakba belépni és így a sejtkomponensekkel *in situ*, véletlenszerű reakciókba lépni. Ha nincs elég akceptor molekula, mint a cisztein, a glutation vagy aszkorbinsav, ezek a reakciók veszélyesek, sőt karcinogének lehetnek (Trézl és mtsai, 2003). A formaldehid ellenőrizetlen termelődése különböző betegségek esetében a patogenezis rizikófaktorát jelentheti (Tyihák és mtsai, 2001).

Köztudott, hogy a formaldehid vizes oldata koncentrációtól függően sejtosztódás gátló, azaz általános antibakteriális és antimikrobiális hatású, valamint karcinogén. Szerepe lehet a betegségellenállóságban is, abból adódóan, hogy megöli a kórokozókat ill. tumorsejteket, bár ugyanakkor különböző rendellenességek rizikófaktorai is lehet (Tyihák és mtsai, 1994). Szende és mtsai (1998) apoptotikus folyamatokban való lehetséges szerepéről jelentettek meg közleményt. Mivel ezek alapján úgy tűnik, hogy a formaldehidnek alapvetően szerepe lehet a sejtosztódásban, Tyihák és mtsai (2001) egészséges és rákos emberi sejtvonalakon vizsgálták a formaldehid különböző koncentrációinak hatását. Megfigyelték, hogy a formaldehid alacsony dózisban (0,1 mM) serkentette a sejtosztódás aktivitást és gátolta az apoptotikus hatást, míg nagy dózisban (1 mM) fordítva. 10 mM-os koncentrációban erősen toxikus volt a formaldehid.

2.4.6. Transzmetilezés a biológiai rendszerekben

A formaldehid, mint a legreaktívabb molekulák egyike, igen sokféle reakcióban résztvehet (addíciós, kondenzációs, redoxi- és polimerizációs reakciók) és a legkülönbözőbb endogén kis- és makromolekulákkal reagálhat.

A kísérleti eredmények azt bizonyították, hogy a metilezési és demetilezési reakciók alkotta körfolyamat, a transzmetilezés is a formaldehid molekulán keresztül megy végbe (Huszi és Tyihák, 1986; Tyihák és mtsai, 1998). A körfolyamathoz, a formaldehid-ciklushoz egyfelől metilcsoport leadására képes vegyületek, azaz metildonorok kapcsolódnak, melyekből a demetilezési folyamatokban speciális peroxidázok (Sárdi és Stefanovits-Bányai, 2006), demetilázok és más oxidázok által, demetilezett vegyületek és HCHO keletkezik (Gullner és Tyihák, 1987; Kalász és mtsai., 1998). A biológiai világban a legkülönbözőbb metilezett vegyületek lehetnek potenciális HCHO előanyagok. A különböző anyagcsere-folyamatokban résztvevő endogén N-, S- és O- metilezett vegyületek közül, kiemelt szerepük van az N-metilezett vegyületeknek, köztük a sejtosztódást fokozó metil-lizineknak és a sejtosztódást gátló hidroximetil-arginineknak. Másfelől, a transzmetilezési folyamatokban formaldehid-akceptor molekulák vesznek részt, melyek lehetnek nukleinsavak, fehérjék, peptidek, aminosavak, biogén aminok, nor-alkaloidok (Tyihák, 1985).

A transzmetilezés, vagyis metilcsoportok eltávolítása és beépítése is az ismert biokémiai szubsztitúciók közé tartozik. Bár sok esetben a pontos biológiai hatása még nem ismert, a transzmetilezés általános érvényű előfordulása arra enged következtetni, hogy fontos szerepet tölt be a fehérjék közötti, illetve a sejten belüli kölcsönhatásokban. A térszerkezetet módosító szubsztitúciós reakciók az enzimek aktivitásának gyors és megfordítható szabályozására teremtenek lehetőséget. Közös jellemzőjük a térszerkezet néhány funkcionális csoporton keresztüli változtatása, amely sokkal kisebb energiaigény mellett valósul meg mint az időigényes fehérjebioszintézisek (Paik és Kim, 1980).

2.4.7. A transzmetilezés szerepe a növényi stressz reakciókban

Az előrehaladott humán és állati vonatkozású kutatások mellett növényekkel kapcsolatban kevesebb publikáció áll rendelkezésünkre.

Tyihák és mtsai (1978) egészséges és TMV-fertőzött dohány leveléből mutatták ki a formaldehidet. Vékonyréteg kromatográfiás méréseik alapján az egészséges dohánylevél szabad formaldehid tartalma 15-20 ng/g szövet volt. A dohánymozaik vírussal fertőzött, hiperszenzitíven reagáló *N. tabacum* cv. Xanthi-nc dohány kivonatában ehhez képest

megemelkedett a szabad formaldehid mennyisége. Ezzel szemben, a TMV-vel szemben fogékony *N. tabacum* cv. Samsun fajta szisztemikus fertőződése esetén, a fertőzött és az egészséges, kontrol dohány leveléből kimutatható szabad formaldehid szint között nem volt különbség.

Szarvas és mtsai 1982-ben megjelent munkája során nem pusztán a kimutatás volt a cél, hanem hogy közelebb jussanak a formaldehid szerepének megismeréséhez. Hasonlóképpen beállított kísérleteik segítségével, részletesebb eredményeket közölnek. Egészséges és TMV-fertőzött *N. tabacum* cv. Xanthi-nc levelében a formaldehid-tartalmat vizsgálták a fertőzéstől a látható nekrozis kifejlődéséig. A fertőzött és egészséges szövetek közt egy nappal a fertőzés után volt a legnagyobb a különbség - mintegy nyolcszoros formaldehid termelést mértek a fertőzés hatására- ami folyamatosan esett vissza a kontroll szintre a lokálléziók kifejlődése, vagyis a szövetnekrozis alatt. Ezek alapján a fokozott formaldehidtermelés, mint a tünetfejlődés előtt illetve alatt bekövetkező esemény, figyelemre méltó esemény lehet a növény gyors válaszreakciója során, mely a sikeres védekezés feltétele.

Tyihák és mtsai (1989) babnövényen tanulmányozták a formaldehid metabolizmust egy más típusú, ezúttal abiotikus stressz, a hőshock hatására. A formaldehid mennyisége és a különböző hőmérséklettel (20-40°C) való kezelések között egyenes arányosságot találtak, és hőshock (40°C) után mérték a legmagasabb formaldehidtartalmat. Fölvetődik, hogy a megnövekedett formaldehid mennyiségnek szerepe lehet a hőstressz alatt fölerősödő metilezési, demetilezési folyamatokban, közelebbről a hőshock fehérjék metilezésében. A hőshock fehérjék a hőshock válasz alatt szintetizálódó erősen konzervált szerkezetű polipeptidok, melyeknek a hőtoleranciában való funkciója azonban még nem tisztázott.

A növények hőmérsékletfüggő formaldehid metabolizmusának vizsgálata során egyben bizonyítható volt az is, hogy formaldehid nem csak a hisztamin-N-metiltranszferázból (SAM) képződhet, hanem különböző metilezett vegyületekből is. A metilezett vegyületek mennyiségének csökkenésén keresztül metilcsoportjaik leválására és demetilezett vegyületekké való átalakulásukra következtetünk. Mikor a metilezett vegyületek közül mért trigonellin, kolin és TML mennyisége a hőmérséklet emelkedésével párhuzamosan csökkent, a formaldehid mennyisége nőtt, tehát a leszakadó metilcsoportok valószínűleg formaldehiddé alakultak.

Sárdi (1994) kísérletei elsősorban annak a kérdésnek a megválaszolására irányultak, hogy a formaldehid, valamint a formaldehid fontosabb generátorainak tekinthető bizonyos teljes N-metilezett vegyületek mennyiségi és minőségi viszonyai alkalmasak-e különböző betegséggellenálló és fogékony görögdinnye fajták jellemzésére, illetve összehasonlítására. A

nagyobb betegség ellenállósággal összefüggésben a teljes N-metilezett vegyületek nagyobb mennyiségben való előfordulását tapasztalta, amivel igazolta, hogy a formaldehid, illetve a metilezett vegyületek mennyisége és az adott növény rezisztenciája között összefüggés van, továbbá, hogy a formaldehid és előanyagai meghatározó szerepet játszhatnak a stresszreakciókban és feltételezhetően a betegségellenállóságban is (Sárdi és Tyihák, 1995).

Később babnövények vizsgálatával is igazolta, hogy a formaldehid-ciklusban résztvevő vegyületek mennyiségi és minőségi viszonyai nemcsak fajokra, hanem fajtákra is jellemző, gyakorlatban hasznosítható mutatók lehetnek (Sárdi és Velich, 1995a).

Az egyedfejlődés folyamatát követve, Sárdi (1994) összefüggést talált a vizsgált növényi rész kora és a formaldehid és egyes metilezett vegyületek mennyiségi és minőségi viszonyai között.

Ugyanezeket az eredményeket támasztotta alá babnövények fejlődését követve, a különböző levélemeletek tanulmányozásával Velich és Sárdi (1997).

Trézl és mtsai (2003) karalábéban nagy mennyiségben azonosítottak hidroximetil-arginint és trimetil-lizint, melyek kötött formában formaldehidet tartalmaznak, így ezek is HCHO-generátorok. Formaldehidet legnagyobb mennyiségben az érett karalábé gumóban találtak, míg a fiatalban ehhez képest sokkal kevesebb volt. Ebből arra következtettek, hogy a formaldehid valószínűleg a gumó érése során halmozódik föl.

Sárdi (1994) a Selye-féle stressz-szindróma alapfázisainak tanulmányozása céljából két, egymástól jelentősen eltérő rezisztencia-potenciállal rendelkező görögdinnyefajtán vizsgálta a *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* gombafertőzés hatását. Fertőzés hatására a stressz-szindróma feltételezett alapfázisait jól követő, különböző intenzitású, de azonos tendenciát mutató változásokat talált. Az alarm fázisban a teljes N-metilezett vegyületek mennyiségének csökkenését és ezzel párhuzamosan a formaldehidszint emelkedését tapasztalta, melynek feltételezett oka, hogy a demetilezési folyamatok során leszakadó metil-csoportokból formaldehid molekulák keletkeznek, melyek részt vehetnek a célzott, a biológiai rendszer stresszérzékeny pontjait (pl. enzim fehérjék, nukleinsavak) metilezéssel levédő reakciókban. A normalizálódási fázisban, a belső egyensúly helyreállítására való törekvés során, a formaldehid mennyisége csökkent, a metilezett vegyületek mennyisége pedig tovább emelkedett. A normalizálódási fázis után, a rezisztencia-potenciál jellemzőinek tekinthető vegyületek mennyisége alapján a fuzárium toleráns fajta betegségellenállóságának növekedése, míg a fogékony fajtánál a rezisztencia-potenciál csökkenése volt megfigyelhető (Sárdi és Tyihák, 1998).

A görögdinnye és fuzárium gazda-patogén kapcsolatban tapasztalt összefüggések a bab-*Pseudomonas* kapcsolatban is igazolhatóak voltak (Sárdi és Velich, 1995b; 1996).

A transzmetilezés és a növényeket ért abiotikus és biotikus stresszek közti kölcsönhatást görögdinnyén és paprikán Szarka és mtsai (2007) vizsgálták. Fuzáriummal szemben fogékony és ellenálló fajták gyökerének mechanikai sértése, általános érvényűen, fajtától függetlenül, a TML és a kolin mennyiségének azonnali, gyors csökkenését okozta, míg ezzel egyidőben a formaldehid mennyiségének erős növekedése volt tapasztalható. A mechanikai sérülés és fuzárium fertőzés okozta kombinált stresszhatásra a fogékony fajtán a fertőzés következtében a TML és a kolin mennyisége tovább csökkent a formaldehid koncentráció fokozott növekedése mellett. A fuzárium-rezisztens görögdinnye fajta csak a TML kismértékű csökkenésével és a formaldehid ennek megfelelő változással reagált a fuzárium okozta stresszre.

A *gds* gént tartalmazó paprikavonalban, a magas szintű általános védekezési rendszer élettani funkciójából következően, a fertőzés okozta stresszre rendkívül nagy reakciósebességgel indult meg a kolin demetileződése és ezzel párhuzamosan a formaldehid szint emelkedése. A formaldehid mennyisége a fertőzést követő első óra végén érte el a maximum értéket, majd hirtelen csökkenni kezdett. Ezzel a védekezési reakció lezajlott, a formaldehid mennyisége visszaállt a kiindulási szintre és ezzel egyidőben megkezdődött a kolin koncentrációjának lassú növekedése.

2.5. A növények általános védekezési rendszere

2.5.1. Az általános védekezési rendszer jellemzése

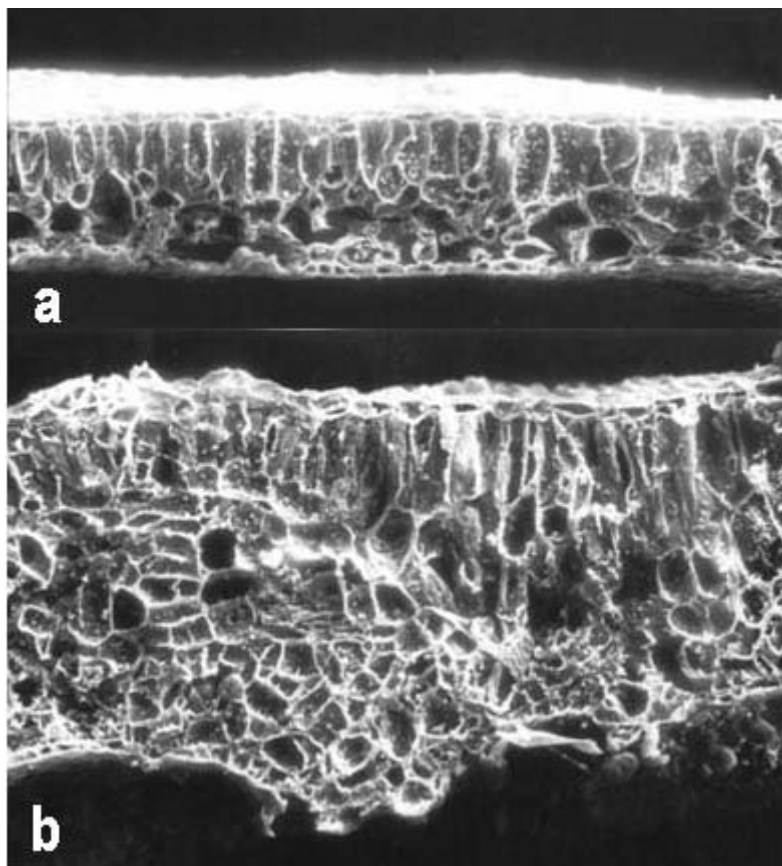
2.5.1.1. Tünettan

Szarka és Csilléry (1995), a paprika (*Capsicum annuum* L.) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktérium elleni rezisztencianemesítői munkája során, olyan növényi reakciót figyelt meg, mely a specifikus rezisztenciagénekre jellemző gyors sejt- és szövetpusztulással ellentétes módon, a fertőzött szövetek megtartása mellett, hatékonyan akadályozza meg a kórokozó terjedését. Az általuk leírt tünettípus esetében a fertőzött szövetrészt csak enyhén klorotizálódik, alapvetően zöld marad és nem szárad ki, hanem sejtnagyobbodás és sejtsztoódás következtében megvastagodik (1. ábra).



1. ábra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal végzett inokulálás hatására bekövetkezett szövetvastagodás paprika levélen

A scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok során láthatóvá vált, hogy a sejtnagyobbodás és sejtosztódás következtében a sejtközötti járatok megszűnnek és a kórokozóval érintkező szövetrész két- háromszorosára vastagodik (Csilléry és mtsai 2004) (2. ábra).

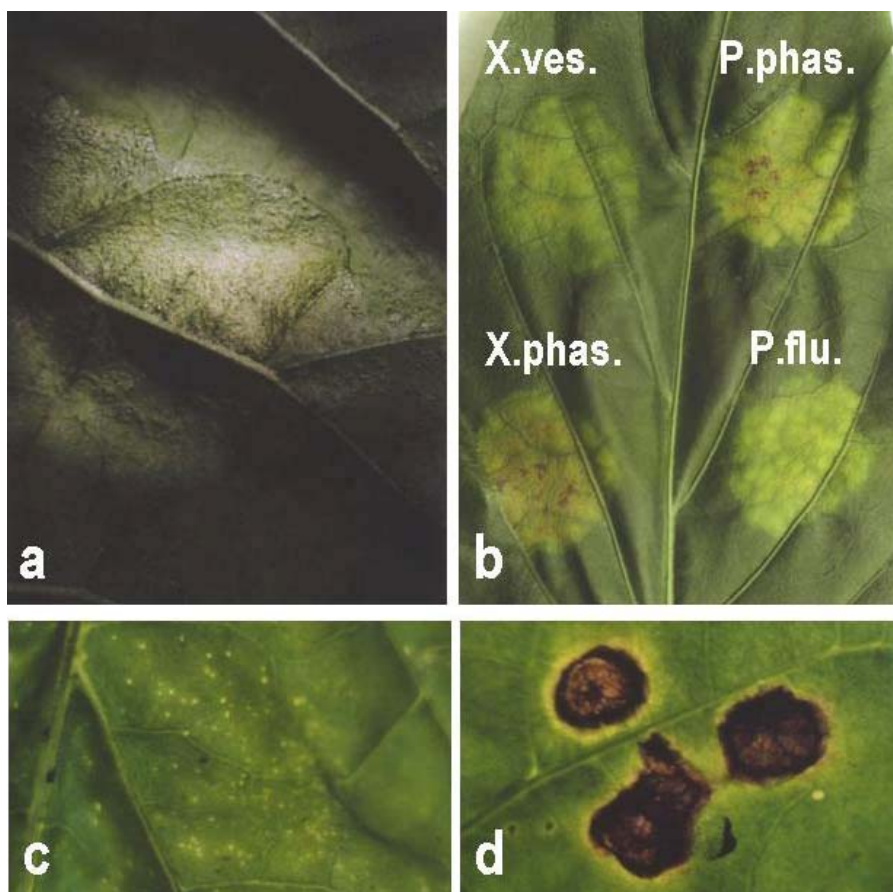


2. ábra A *gds* gént tartalmazó paprikavonal kontrollként szolgáló, nem fertőzött (a) és *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal fertőzött, sejtnagyobbodást, sejtosztódást mutató (b) levelének keresztmetszeti képe
(Fotó: Nagy Barbara)

Ez a növényi védekezési forma a genetikai vizsgálatok alapján monogénes, recesszív tulajdonságnak bizonyult (Szarka és Csilléry, 1995). A gént *gds*-nek nevezték el a *general defense system*, azaz *általános védekezési rendszer* kifejezés rövidítéseként.

2.5.1.2. Az általános védekezési reakció jelentősége és hatástartománya a növény-mikroba kapcsolatokban

Az elnevezés azért indokolt, mert a *gds* gén nem kórokozóspezifikus. A *gds* gént tartalmazó növényekben a sejtnagyobbodással, sejtszétválással járó védekezési reakció a paprika több kórokozójával szemben is ugyanazon fenotípusos elváltozásokat mutatva nyilvánult meg (3. ábra).



3. ábra Magas szintű általános védekező képességet biztosító *gds* gént tartalmazó paprika vonalak reakciói *Leveillula taurica* (a), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* és *Pseudomonas syringae* pv. *fluorescens* (b) baktériumokkal szemben, valamint a *gds* gén mellett dohány mozaik vírussal (TMV) szembeni rezisztenciát biztosító *L3* gént (c) is tartalmazó, illetve csak *L3* gént (d) tartalmazó paprika vonalak reakciói a TMV Ob törzsével végzett carborundumos fertőzés hatására (Szarka és mtsai, 2006)

A paprikával kompatibilis kapcsolatban levő *Leveillula taurica* és *X. c. pv. vesicatoria*, valamint az inkompatibilis kapcsolatban levő *X. c. pv. phaseoli*, *P. s. pv. phaseolicola* és *P. s. pv. fluorescens* is a *gds* génre jellemző szöveti elváltozásokat, azaz szövettömörödést váltottak ki.

A dohány mozaik vírussal szembeni ellenállóságot biztosító *L3* rezisztenciagén jellemző kórtünetei sem tudtak kifejlődni a *gds* gén jelenléte mellett, a lombleveleken végzett inokulálást követően. A specifikus rezisztenciagénre jellemző, 3-4 mm átmérőjű, barnásvörös léziók helyett csak az inokulációhoz használt karborundum szemcsék okozta, túszerű, beszáradt pontok mutatják a *gds* génnek tulajdonítható hatékony védekezés jeleit. Elektronmikroszkópos vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a karborundum szemcsék okozta sérülések körül a sejtek megnagyobbodtak, osztódásnak indultak. Feltételezhető, hogy a mechanikai sérülésre adott reakció mellékhatásaként lokalizálódott a vírus. Így a mechanikai sérülésekre adott reakció az abiotikus stresszek területére is kiterjeszti a *gds* gén hatástartományát (Szarka és mtsai 2006).

Az eddig felsoroltak alapján látható, hogy a paprika esetében a *gds* gén által biztosított, szövetmegtartáson alapuló ellenállóság gomba, baktérium és vírus eredetű kórokozók ellen, tehát kórokozófajok széles spektruma ellen hatásos.

2.5.2. Az általános és a specifikus védekezési reakció viszonya

A paprika *X. c. pv. vesicatoria* elleni rezisztencia nemesítésnek ma világszerte a *Bs-2* specifikus rezisztencia gén az alapja. A *Bs-2* gén által kialakított tünet esetén a fertőzött szövetrész hiperszenzitív pusztulás következtében gyorsan kiszárad, amit jellegzetes lilás elszíneződés kísér. A rezisztencianemesítés eddigi gyakorlata során, a provokatív fertőzést követő szelekció a gyors szövetpusztulás alapján történik.

Szarka és Csilléry (2001b) megfigyelték, hogy különböző genetikai háttérben más-más a *Bs-2* gén fenotípusos megnyilvánulása (4. ábra). *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal való injektálást követően, a különböző paprikavonalak tünettípusai esetében a fertőzött szövetek lilás elszíneződése egyöntetűen megjelenik, mivel a lilás elszíneződésben megnyilvánuló biokémiai reakció a *Bs-2* gén sajátja. Ugyanakkor, egy másik tulajdonság, a szövetmegtartó képesség tekintetében az egyes növényvonalak nagy változatosságot mutattak, a hirtelen történő szövetkiszáradástól a szövetek erőteljes megvastagodásáig. E két tulajdonság, a *Bs-2* génre jellemző lilás szín erőssége és a szövetpusztulásban avagy szövetvastagodásban megnyilvánuló növényi tulajdonság szoros összefüggést, fordított arányosságot mutatott.

Minél erőteljesebb volt a bordó elszíneződés, annál nagyobb mértékű volt a szövetnekrózis, illetve a lilás szín halványulásával arányban egyre intenzívebben jelentkezett a levélszövet vastagodása. A *Bs-2* génre jellemző fenotípus megnyilvánulásának mértékét tehát az adott paprikavonal szövetmegtartó képessége, azaz általános védekezőképességének szintje határozta meg.



4. ábra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal szembeni ellenállóságot biztosító *Bs-2* gén kórtünetei eltérő genetikai háttérrel rendelkező paprika vonalakban

A levélszövet megvastagodása, mint eddig ismeretlen tulajdonság és a *Bs-2* gén közti viszonyt Szarka és Csilléry (2001a) tovább tanulmányozták. Kísérletük során két olyan, *Bs-2* gént tartalmazó paprikavonalat alkalmaztak, melyek közül az egyik a lila elszíneződés mellett szövetpusztulással, a másik szövetvastagodással reagált a *X. c.* pv. *vesicatoria* baktériummal végzett inokulálásra. A *X. c.* pv. *vesicatoria* baktériumon kívül más baktériumfajokkal is inokulálták a növényeket. Ezek közt volt két bab kórokozó, a *P. s.* pv. *phaseolicola* és a *X. c.* pv. *phaseoli*, és egy szaprofita baktérium, a *P. s.* pv. *fluorescens*. A *X. c.* pv. *vesicatoria* baktériummal végzett inokulálás az ismert elváltozásokat, vagyis erős bordó színeződést és szövetpusztulást illetve enyhe elszíneződés mellett szövetvastagodást eredményezett. A *P. s.* pv. *phaseolicola* baktérium az egyik paprikavonalon gyors szövetelhalást idézett elő. Míg a másikon nem gyors szövetpusztulás, hanem szövetvastagodás volt tapasztalható. A *X. c.* pv. *phaseoli* illetve *P. s.* pv. *fluorescens* baktérium, mindkét vonalon elszíneződés nélküli szövetvastagodást váltott ki.

A kísérletek alapján a szerzők a következő megállapításokat tették.

- 1.) Lilás elszíneződés csak a *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal végzett inokulálás hatására jelenik meg, ami jelzi, hogy a *Bs-2* specifikus rezisztenciagén csak ezzel a kórokozó fajjal szemben ad választ. A bordó színt szövetpusztulás ill. szövetvastagodás kísérte.
- 2.) Az exotoxint termelő *P. s. pv. phaseolicola* baktériummal való fertőzéskor elszíneződést nem tapasztaltak, de a szövetpusztulás illetve szövetvastagodás ezzel a baktériummal szemben is megnyilvánult.
- 3.) Az exotoxint nem termelő *X. c. pv. phaseoli* illetve a szaprofita *P. s. pv. fluorescens* baktériumot mindkét növény vonal elszíneződés nélküli szövetvastagodással lokalizálta.

Ezek alapján azt bizonyították, hogy az inokulálás hatására bekövetkező szövetpusztulás illetve szövetvastagodás, a specifikus rezisztenciagén működésétől függetlenül is megjelenő tulajdonságnak két szélsőséges formája. Ezt a növényi tulajdonságot nevezték el általános védekezési reakciónak (General Defense Reaction, GDR) (Szarka és Csilléry, 1995).

Paprika esetében a recesszív *gds* gén a GDR-nek nevezett tulajdonságrendszer meghatározó eleme.

A szövetmegtartást, szövettömörödést eredményező növényi életfolyamat azonban feltehetően minden növényfaj alapvető jellemzője. Több növényfajban is megtalálták azt a sejt- és szövetmegtartással járó reakciót, amely az adott növényfaj számára specifikus rezisztenciagének nélkül is védelmet nyújt az egyes kórokozókkal szemben, szövetpusztulás nélkül. A bab *P. s. pv. phaseolicola* és *X. c. pv. phaseoli* (Szarka és Csilléry, 2001b), az uborka *Pseudoperonospora cubensis* (Szarka és Csilléry, 2001a) és a paprika TMV illetve *X. c. pv. vesicatoria* (Szarka és mtsai, 2007) kórokozókkal szembeni sejtpusztulás nélküli ellenállóságát állapították meg ez ideig.

Tehát az általános védekezési reakció elnevezés egyrészt azért érvényes, mert egy növényfajnak általános védelmet nyújt több kompatibilis és inkompatibilis kórokozóval szemben, másrészt mert a növényvilágban valószínűleg általánosan elterjedt tulajdonság.

2.5.2.1. Az általános és a specifikus védekezési reakció sebessége

Szarka és Csilléry (2001a) a *Bs-2* és a *gds* gén által kódolt specifikus illetve általános védekezési reakció működésének összehasonlítása céljából *X. c. pv. vesicatoria* 10^8 baktériumsejt/ml koncentrációjú szuszpenziójával fertőztek két közel izogén paprika vonalat, melyek közül az egyik a *Bs-2* gént, másik a *gds* gént tartalmazta homozigóta állapotban.

A *Bs-2* rezisztencia gént tartalmazó vonal injektált szövetrészen 48 órán belül megjelent a gén működésére utaló jellegzetes lilás elszíneződés.

A *gds* gén által kódolt rezisztencia válasza utaló tünet, a világoszöld elszíneződést okozó enyhe klorózis és a szövettömörödés, 8-10 nap múlva jelent meg, és a fertőzött szövet hónapok múltán sem száradt ki. Az a tény, hogy a tünet csak 8-10 nap múlva vált láthatóvá, nem azt jelenti, hogy a védekezési reakció lassú. Épp ellenkezőleg, arra enged következtetni, hogy a *gds* gén által szabályozott folyamat nagyon gyors. Olyan gyorsan és hatékonyan tudta megakadályozni a kórokozó szaporodását, hogy a reakció csak kismértékű szöveti elváltozásokat okozott, melyek a levéllemez növekedésével váltak láthatóvá.

Ezek alapján kimondható, hogy a *gds* gén által irányított védekezési folyamat reakciósebessége sokkal nagyobb, mint a *Bs-2* gén által kódolt specifikus védekezési reakcióé.

2.5.2.2. Az általános és a specifikus védekezési reakció ingerküszöbe

Az általános és a specifikus védekezés eltérő reakciósebességének ismeretében Szarka és mtsai (2006) a két reakció beindulásához szükséges ingerküszöb megállapítására *X. c. pv. vesicatoria* különböző hígítású, 10^1 - 10^8 baktériumsejt/ml koncentrációjú inokulumával végeztek teszteléseket. A hígítási sorral fogékony, *Bs-2*, valamint *gds* gént tartalmazó, közel izogén paprika vonalakat teszteltek (5. ábra).

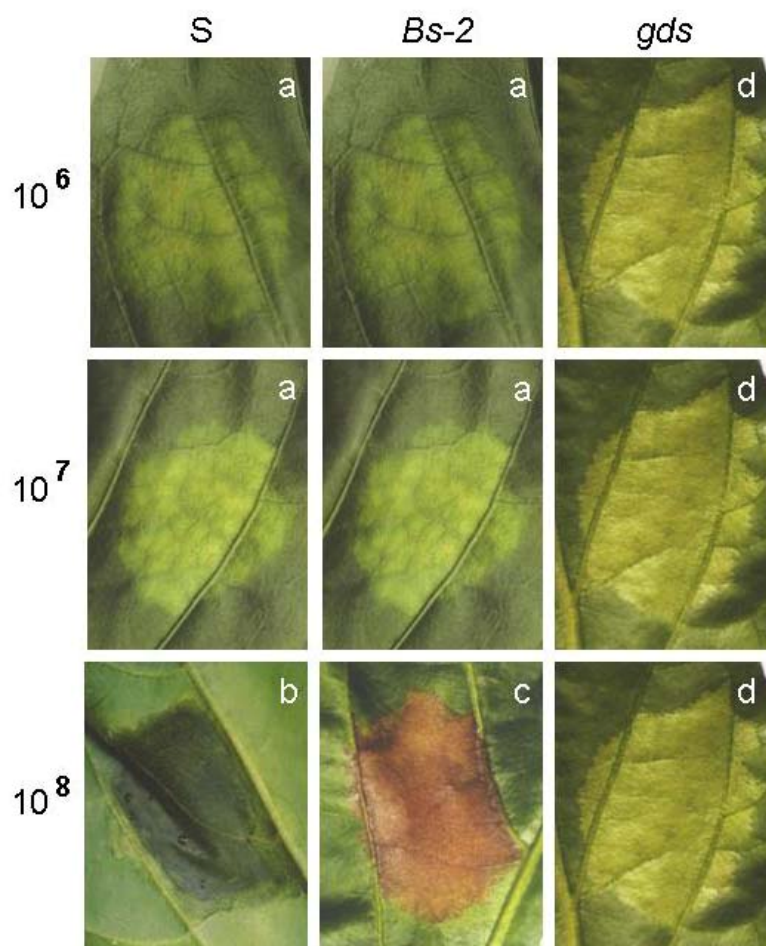
A fogékony növényben 10^1 - 10^7 sejt/ml koncentrációjú szuszpenzió hatására, vagy szemmel nem látható reakció zajlott le, vagy az injektált levélfoltok (a) enyhén klorotizálódtak, esetenként kidomborodtak. Ez azt bizonyítja, hogy egy fogékony növénynek is van bizonyos szintű általános védekező képessége. Jelen kísérletben használt növény esetében az általános védekezőképesség 10^7 sejt/ml koncentrációjú baktérium kivédéséhez volt elég. A 10^8 baktériumsejt/ml koncentrációjú szuszpenzió kialakította a *X. c. pv. vesicatoria* által okozott betegségre jellemző zsírfoltokat (b).

A 10^1 - 10^7 sejt/ml koncentrációjú szuszpenzió hatására a specifikus rezisztenciagént tartalmazó paprikanövény is az általános védekezési reakcióra jellemző elváltozásokat mutatta sejt- illetve szövetszinten (a). A 10^8 baktériumsejt/ml koncentrációjú szuszpenzió a *Bs-2* rezisztenciagént tartalmazó növények levelén a specifikus rezisztencia tüneteket, bordós- lilás elszíneződésű foltokat (c) idézett elő.

A vizsgálatokban közel izogén paprika vonalak szerepeltek, ezért levonható az a következtetés, hogy a specifikus rezisztenciagén ugyanabban a stressz tartományban (10^8 baktériumsejt/ml koncentrációnál) kezdi meg működését, amelyikben az adott növény általános védekezési rendszere már hatástalan a kórokozó adott koncentrációjú

szuszpenziójával szemben. Vagyis a specifikus védekezési reakció ugyanabban a stressz sávban működik, amelyikben a fogékonyság állapota kialakul.

Az általános védekezési reakció komplett működését biztosító *gds* gént tartalmazó paprika vonal, pusztulás helyett sejtnagyobbodáson illetve sejtosztódáson alapuló szövettömörődéssel (d) reagált a 10^1 – 10^8 sejt/ml koncentrációjú baktérium szuszpenzió által okozott stresszre.



5. ábra Paprika levelében a fogékonyság (*S*) állapotának, a specifikus rezisztenciagén (*Bs-2*) és az általános védekezési reakció (*gds*) működési tartományának meghatározása *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktérium 10^6 , 10^7 és 10^8 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziójával előidézett stressz szintek alapján.

a – inkomplett általános védekezési reakció, b – fogékony kórtünet, c – specifikus védekezési reakció, d – általános védekezési reakció

(Szarka és mtsai, 2006)

Az ingerküszöbre vonatkozóan megállapítható, hogy az általános védekezési reakció a legkisebb mértékű biotikus stresszre is beindul, akár egy mikroba sejtre is érzékenyen reagál. Hatástalansága esetén bekövetkezik a növény megbetegedése. A betegséget, vagyis a kórokozó okozta speciális stresszt, csak egy speciális védekezési reakcióval képes kivédeni a növény, amelyhez egy specifikus rezisztenciagénre van szüksége. A rezisztenciagén által meghatározott védekezési folyamat csak a kórokozó elszaporodását követően, a megbetegedés okozta stressz-szinten lép működésbe. Az általános védekezési reakcióra jellemző alacsony és a specifikus védekezési reakcióra jellemző magas ingerküszöb egyértelműen bizonyítja, hogy a két reakció más hatástartományban nyújt védelmet, ezért nem egymással párhuzamosan, hanem sokkal gazdaságosabban, egymásra épülve alkotja a növények betegségellenállóságának egységes egészét.

2.5.2.3. A *gds* és a *Bs-2* gén kölcsönhatása

A *gds* és a *Bs-2* gén kölcsönhatásának vizsgálata egy *gds* gént, és egy *Bs-2* gént homozigóta állapotban tartalmazó paprikavonal keresztezésével előállított F1 nemzedék egyedein történt (Csilléry és mtsai 2004; 2007). A magas szintű általános védekezési reakciót kódoló *gds* gén és a specifikus védekezési reakciót kódoló *Bs-2* gén egy növénybe történő beépítésével, a kórokozót eltérő stratégia alapján gátló gének kölcsönhatásának vizsgálatára nyílt lehetőség.

A domináns *Bs-2* gént és a recesszív *gds* gént heterozigóta állapotban tartalmazó F1 hibridek 10^8 sejt/ml koncentrációjú *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal való fertőzés után nem azt a tünettypust mutatták ami a *Bs-2* gén dominanciájának megfelelően várható volt. A *Bs-2* génre jellemző sötétlilán elszíneződő szövetkiszáradás helyett az inokulált szövetek megvastagodtak, zöldek maradtak és csak enyhe lilás, főleg érmenti elszíneződést mutattak. Ez azt jelenti, hogy a recesszív *gds* gén ugyan heterozigóta állapotban van jelen, mégis megjelenik az általa kódolt szövetvastagodás, sőt elnyomja a domináns *Bs-2* génre jellemző fenotípust. Ez a növénynevelésben igen szokatlan megfigyelés, hogy egy domináns, specifikus rezisztenciagénnel szemben, a recesszív *gds* gén hatása ilyen módon érvényre jut, az általános védekezési rendszer alapvető szerepét bizonyítja.

Tünettani és kórélettani ismereteink alapján ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a *gds* gén által kódolt reakció ingerküszöbe sokkal alacsonyabb, mint a specifikus védekezési reakcióé. A két gén együttes jelenléte esetén, a *Bs-2* génre jellemző klasszikus tünettypustól eltérő, csupán halvány lila elszíneződés feltételezhetően arra utal, hogy a *Bs-2* gén szerepe visszaszorul a kórokozó lokalizálásában, hiszen a fertőzésre hamarabb működésbe lépő, valamint gyorsabb folyamatokat szabályzó *gds* gén (recesszív állapota ellenére) is hozzájárul

a védekezéshez, illetve részben szükségtelessé teszi a *Bs-2* génhez köthető biokémiai folyamatok teljes kifejlődését.

2.5.3. Az általános védekezési rendszerre alapuló rezisztencianemesítés evolúciós alapjai

Az általános védekezési rendszer, a növényeknek a környezetükben élő mikrobák kivédésére kialakult olyan összetett, ősi rendszere, mely alapszintű reakciót tesz lehetővé a nem specifikus és specifikus ingerekkel, valamint biotikus és abiotikus hatásokkal szemben is (Szarka és mtsai, 2006).

Ez az általános védekezési reakció nem kórokozóspezifikus, alacsony ingerküszöbénél és nagy reakciósebességénél fogva minden, a növényt ért támadásra azonnal reagál, amely lehetővé teszi a megtámadott sejtek, szövetek életben tartását. A reakció során sejtnagyobbodás és sejtosztódás következtében kialakuló szövettömörödés következik be. Ezeknél a tulajdonságoknál fogva, az általános védekezési rendszer a növényi immunrendszer szerepét tölti be (Csilléry és mtsai 2004).

Egy specifikus rezisztenciagén által irányított védekezési reakció csak gazda-patógén kapcsolatokban nyújt védelmet, tehát az adott gazdanövényre specializálódott mikroba, vagyis a kórokozó gátlására irányul. Azon a ponton lép működésbe, amikor a kórokozó által okozott stressz az általános védekezési rendszer hatástartományát meghaladja. A specifikus rezisztenciagének által szabályozott folyamat során jellemzően szövetpusztulás, vagyis hiperszenzitív nekrosis fejlődik ki.

A természetben az általános védekezési rendszer által szabályozott sejttömörödéses, sejtmegtartást eredményező növényi reakciók igen gyakoriak, míg a sejtpusztulásos reakciók ritkán fordulnak elő (Szarka és mtsai 2002).

Ha az általános védekezési reakció, mint elsődleges védekezési front, a növényvel kontaktusba kerülő számtalan mikroba faj valamelyikével szemben hatástalan, az ellenállás nélkül szaporodván, képes lesz megbetegíteni a növényt, vagyis kórokozóvá válik. Így alakul ki a fogékony állapot, mint evolúciós állomás.

Az evolúció során a megbetegített, fogékony gazdanövényben a kórokozó okozta specifikus stresszel szemben egy specifikus védekezési reakció fejlődött ki. Ezt a reakciót specifikus rezisztenciagén, vagy gének kódolják. Az evolúciósan fiatalabb specifikus védekezési reakció sejtpusztulást eredményez, melyet a növény a legvégső esetben, csak a kórokozóvá specializálódott mikrobákkal szemben alkalmaz.

A két védekezési forma közül, az általános védekezési reakció evolúciós ősiségét bizonyítja az is, hogy a paprikában azonosított, általános védekezési reakciót szabályozó *gds* gén recesszív tulajdonság. Ezzel szemben, a specifikus rezisztenciagének domináns öröklődésűek.

A gazda-patogén kapcsolat evolúciós fejlődésének folyamata napjainkban is lejátszódik, minden megbetegítés során (Szarka és mtsai 2002). A növényben bármilyen biotikus hatásra, köztük a saját kórokozóval való kontaktus okozta stresszre is, működésbe lép az általános védekezési reakció. Amennyiben a saját kórokozóval szemben az általános védekezési reakció szintje nem hatásos, a kórokozó szaporodásnak indul a szövetekben. Ha a növény specifikus rezisztencia gént tartalmaz, a fogékonyság mint élettani állapot, vagyis a kórokozó megfelelő mértékű szaporodása, akkor is nélkülözhetetlen feltétele a specifikus védekezési reakció beindulásának, hiszen ehhez a kórokozó koncentrációjának el kell érnie az evolúciósan őrzött, magas ingerküszöböt.

2.5.3.1. Az általános védekezési rendszer restaurálására irányuló nemesítési stratégia

Szarka és Csilléry, a szövetmegtartással járó általános növényi reakció rezisztencianemesítésben való használhatóságát és fontosságát fölismerve, munkájuk során tudatosan szelektáltak erre a tulajdonságra. Ez az új szemléletű megközelítés azt eredményezte, hogy a nemesítési vonalak szövetmegtartó képessége, azaz általános védekezőképessége javult. Ezzel a nemesítési stratégiával sikerült a növényvonalak általános védekezőképességének visszaállítása.

Ugyanis, a specifikus rezisztencia gének felhasználásával folyó nemesítés korábbi gyakorlata során, a gyors szövetelhalást mutató tünetek alapján végzett korai szelekció, az általános védekezési rendszer gyengítését, lerombolását idézte elő (Szarka és Csilléry, 2001a és 2001b). Véleményük szerint, ezért a nemesítés során elengedhetetlen a növények általános védekezési rendszerének restaurálása és csak ezt követően építhetők be a specifikus rezisztenciagének. Az egyes specifikus kórokozókkal szemben ellenállóságot biztosító rezisztenciagének, mint a növények védekezési rendszerének hibajavító egységei, csak a magas szintű általános védekezési rendszer biztosította háttérben működnek kielégítően. Így biztosítanak jó hatásfokú és időtálló védelmet a kórokozókkal szemben úgy, hogy mindemellett a növényfajta megőrzi előnyös kultúrtulajdonságait is.

2.5.3.2. Az általános védekezési rendszer jelentősége az alap kutatásban

Az általános védekezési rendszer felismerése, amellett hogy a rezisztencia nemesítésben alapvető szemléletváltás szükségességére hívta fel a figyelmet, nagyban hozzájárult a növényeknek a mikrobákkal, illetve kórokozóikkal kialakított kapcsolatainak összetettebb megismeréséhez (Szarka és mtsai 2006). A növényi védekezés sejtnagyobbodással, sejtosztódással kísért és szövettömörödést, sejtmegtartást eredményező formája eddig ismeretlen volt, mely most új perspektívát nyit a kutatásban.

A *gds* gént tartalmazó, illetve a magas szinten restaurált általános védekezési rendszerrel bíró növények kitűnő objektumként szolgálnak a növényi védekezés új nézőpontból történő vizsgálatához. A hiperszenzitív szövetpusztuláson alapuló védekezésről rendelkezésre álló ismeretanyag mellett, a *gds* gén által kódolt reakció kórélettani, biokémiai tanulmányozása során alapvetően új ismeretekhez juthatunk.

2.5.4. Az általános védekezési rendszer elméleti és gyakorlati vonatkozásai

1) A paprikában felismert *gds* gén által kódolt általános védekezési reakciót kísérő morfológiai elváltozások, **a sejtnagyobbodáson, sejtosztódáson alapuló szövettömörödés, eddig ismeretlen megnyilvánulási formái a növényi védekezésnek.**

2) Az egyedülálló tüneti megnyilvánulás mellett a *gds* gén azért is példa nélküli, mert az általa biztosított védelem nemcsak hogy nem rassz-specifikus, de nem is kórokozóspezifikus. Hatásos a paprikával kompatibilis és inkompatibilis kórokozókkal szemben is, tehát a gazda rezisztencia és a nem-gazda rezisztencia kialakításában egyaránt részt vesz.

A magas szintű általános védekezési reakcióval rendelkező növények az abiotikus stresszeket is jobban tűrik.

Ezek alapján, a *gds* gén nyújtotta védelem **kiemelkedően széles spektrumú.**

E tulajdonságrendszer jelentőségét fokozza, hogy valószínűleg minden növényfaj sajátja, így az erre való szelekcióval kiemelhetők olyan típusok, egyedek, melyek a rezisztencia nemesítés alapját képezhetik.

3) Az általános védekezési rendszer nyújtotta rezisztencia nem tartozik az indukált rezisztenciaformák közé. Csak annyiban érdemes összehasonlítani, hogy többnyire az indukált rezisztenciák jellemzője a széles spektrumú védelem. Viszont hátrányuk, hogy

kifejlődésükhöz idő kell, és hatásuk is csak egy adott időtartamra korlátozódik. Mivel a szövetmegtartásban megnyilvánuló általános védekezőképesség genetikailag meghatározott tulajdonság, a szelekcióval megfelelően magas szintre emelt általános védekezési reakció a fertőzéskor **gyorsan kifejlődik, azonnal és véglegesen hat** – előzetes stimuláció nélkül.

4) Mivel az általános védekezési rendszer egy növényi életjelenség, működését a környezet csak annyira befolyásolja, amennyire a növény más alapvető életjelenségeit is, szemben a specifikus rezisztenciagének hőmérsékletfüggésével.

5) Ma már több, klasszikus nemesítéssel előállított rezisztens paprika fajtajelölt van, melyeknek *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal szembeni ellenállóságát a *gds* gént biztosítja. A termesztési tapasztalatok azt mutatják, hogy az általános védekezési rendszernek köszönhető rezisztenciához gazdaságilag hátrányos tulajdonságok szorosan nem kapcsolódnak.

A fűszer és étkezési paprika nemesítésben elért eredmények azt mutatják, hogy **az általános védekezési rendszerre való szelekcióval hatékony, széles spektrumú rezisztencia állítható elő bonyolult és költséges biotechnológiai eljárások nélkül.**

Azok a próbálkozások, melyek a modern technológia, a génebézészet eszközeivel a széles spektrumú rezisztencia összetett rendszerét alkotó egyes gének átvitelét célozták vad fajtából, vagy egy gazdasági növényből a másikba, eddig változó sikerrel végződtek (Heath, 2000).

6) Tudomásunk szerint csak az *Rx* és a *dnd1* gének azok, melyek szövetpusztulás nélküli rezisztenciát okoznak.

- Burgonyában az *Rx* gén a PVX vírus bármely izolátuma ellen extrém rezisztenciát biztosít, mely olyan gyors és hatékony, hogy a pusztulás minimális: csak az az elsődlegesen fertőzött növényi sejt hal el, melybe a vírusrészecske bejutott.

A rezisztencia széles spektruma a PVX vírus rasszaira terjed ki.

-A kémiai mutagenézissel előállított *dnd1 Arabidopsis* mutáns avirulens *Pseudomonas syringae* kórokozókkal szemben bír HR nélküli rezisztenciával. A mutáció okozta folyamatosan megnyilvánuló szisztémikus rezisztencia miatt bizonyos vírus, gomba és baktérium eredetű kórokozók gyengébben szaporodnak benne, mint a vad típusú *Arabidopsis* növényekben.

A *dnd1* mutációval azonban hátrányos tulajdonságok is párosulnak, úgy mint a törpenövekedés és spontán léziók megjelenése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A felhasznált növényanyag

A munkacsoport több mint tíz éve kezdett rezisztencia nemesítői munkája során alapanyagként a *C. annuum* PI 163192 vonalat, amely a *gds* gén forrása, illetve a *Bs-2* gént tartalmazó ECW-20 vonalat használta fel. A két vonalból többszörös visszakeresztezéssel, elsősorban a magyar szabadföldi termesztési igényeknek megfelelő fenotípusú rezisztens vonalakat állítottak elő. Az utolsó visszakeresztezéseket követően, a megfelelő fenotípusú vonalokból a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Központban Mitykó Judit (Mitykó és mtsai 1995) közel izogén rezisztens és fogékony dihaploid (DH) vonalakat állított elő. A rezisztencia nemesítői munka során genetikai és kórtani szempontból is szükségessé vált, hogy dihaploid módszerrel előállított vonalakkal folyjon a munka. A *gds* gén által kódolt jelenség pontos megismerése, jellemzése érdekében és a genetikai analízisek során is csak dihaploid vonalak felhasználásával lehet biztosítani ezeknek a vizsgálatoknak a megbízhatóságát és reprodukálhatóságát.

A részletes genetikai és élettani vizsgálatokhoz a *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal szemben fogékony (DH-99-71), *gds* gént tartalmazó (DH-99-269), valamint *Bs-2* rezisztencia gént tartalmazó (DH-99-487), genetikailag teljesen kiegyenlített DH vonalakat használtuk. A specifikus rezisztencia gének eltérő genetikai háttér okozta különböző kórtüneteinek bemutatásához kísérletünkben alkalmaztuk még a DH-99-501-es, *Bs-2* gént tartalmazó DH paprikavonalat is.

A vizsgálati célra nevelt növényeket 8 literes konténerekben, klimatizált üvegházban neveltük. Az üvegház éjjeli hőmérséklete 22–24 °C, nappali hőmérséklete 28-30 °C volt.

A fertőzés során a páratartalomra különösebben nem kellett figyelniük, mert az inokulumot injekciós fecskendővel juttattuk a sejtközötti járatokba. A fertőzést követően az alacsonyabb, 70-75%-os páratartalom volt a kívánatos annak érdekében, hogy a sejtközötti járatokba fecskendezett folyadék minnél hamarabb felszívódjon.

3.2. Az inokuláláshoz alkalmazott baktériumok

Az inokuláláshoz a *X. c. pv. vesicatoria*, *X. c. pv. phaseoli* és *P. s. pv. phaseolicola* baktériumfajok magyarországi gyűjtésből származó, közepes agresszivitású izolátumait használtuk.

Az alkalmazott, 7-es pH-jú táptalaj összetétele :

10 g	élesztőkivonat
20 g	glükóz
20 g	kalcium-karbonát
2 g	kálium-dihidrogén-foszfát
2 g	dikálium-hidrogén-foszfát
20 g	agar-agar
1000 ml	desztillált víz

A baktérium 48 órás tenyészetéből készítettük a 10^8 sejt/ml koncentrációjú inokulumot.

3.3. Az inokuláció eszköze és az inokulálás módszere

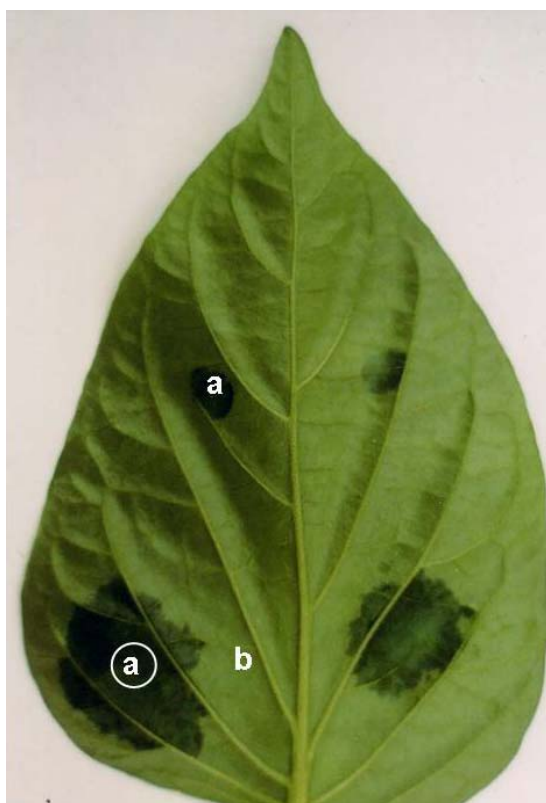
Az erős vegetatív növekedési szakaszban lévő növények nyolcadik-kilencedik, 80%-os fejlettségű, de még növekedésben lévő levelét inokuláltuk. A vizsgálatok céljának megfelelően két fertőzési módszert használtunk. Az első esetben a főértől jobbra és balra, egy-egy 1,5-2 cm átmérőjű infiltrált folt kialakításához szükséges mennyiséget injektáltunk a baktériumszuszpenzióból a levelek sejtközötti járataiba. Ezt követően, a mintavételi időpontokban dugófúróval oly módon vágunk ki a levélkorongokat, hogy csak az infiltrált foltból származzanak a minták. Ezzel párhuzamosan minden időpontban, ugyan azon levélből, a fertőzött folt mellől is vágunk ki levélkorongokat. Ezzel a levélen belüli anyagáramlás volt tanulmányozható, vagyis hogy milyen átcsoportosulások mutathatók ki a fertőzött folt irányába a szomszédos, baktériummal nem érintkező szövetrészekből. A másik esetben a teljes levéllemezre infiltráltuk baktérium szuszpenzióval és a teljes levél homogenizátumából készítettük a mintát. Így a levélen belüli transzport kizárásával, tisztán a fertőzött levél helyi választ tudtuk vizsgálni.

Az inokulálási mód okozta abiotikus stresszek kivédése végett, a baktérium szuszpenziót a fonák felől, a sztómákon keresztül préseltük a sejtközötti járatokba olyan injekciós fecskendővel, melynek végére tű helyett átfűrt radírgumit erősítettünk a megfelelő tömítés érdekében és a levél sértésének elkerülése végett (6. ábra). Az inokulálást és a mintavételt aktív asszimilációs folyamat mellett végeztük.



6. ábra Paprikalevél baktérium szuszpenzióval való sérülésmentes fertőzése

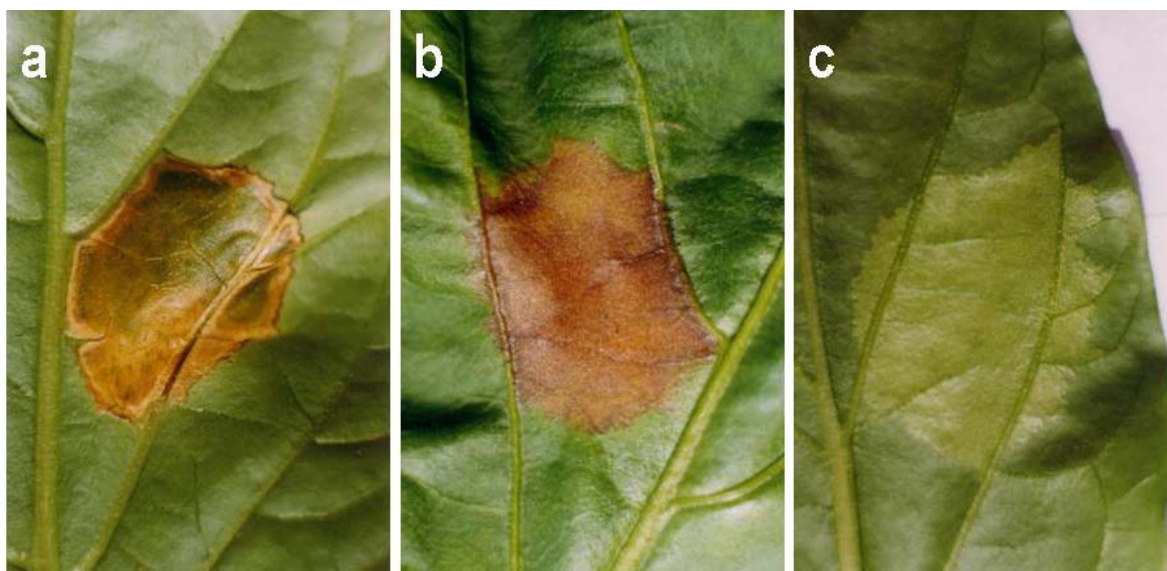
Az általános illetve specifikus védekezési reakciót irányító *gds* valamint *Bs-2* gén ép, illetve sérült növényi sejtekben való működésének összehasonlítása érdekében egy kis pontban olyan mechanikai nyomást gyakoroltunk a szövetekre, mely infiltrálódást eredményezett (7. ábra). Ezt követően oly módon végeztük az inokulálást, hogy a mechanikailag sértett szövetrészt a mintegy 2 cm átmérőjű inokulált szövetfolt közepén helyezkedjen el.



7. ábra Mechanikai hatásra (a) illetve az azt követő inokulálás következtében kialakult infiltrált szövetfolt (b), melynek közepén helyezkedik el a mechanikailag sértett szövetrészt

3.4. A genetikai vizsgálatok során alkalmazott kórtünetrendszer

Az inokulációt követő 7-8. napon a fogékony növények leveleinek *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal infiltrált szövetrészei vizenyössé váltak (8/a ábra). A domináns *Bs-2* specifikus rezisztencia gén kódolta növényi válasz enyhe lilulásban, esetleg szövetelhalásban nyilvánult meg, a fertőzést követő 3-4. napon (8/b ábra). A nagy reakciósebességű, általános védekezési reakciót szabályzó recesszív *gds* génre utaló fenotípus csak a 8-10. napon alakult ki. Ez a látszólagos ellentmondás azzal magyarázható, hogy az alacsony ingerküszöb miatt az általános védekezési reakció olyan gyorsan akadályozta meg a baktérium pusztítását, hogy az csak a levelek több napos növekedése után vált láthatóvá, enyhe klorózis és szövetvastagodás formájában (8/c ábra).



8. ábra. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktérium által kiváltott fogékony (a) kórtünet, *Bs-2* gén meghatározta specifikus védekezési reakció (b) és a *gds* gén által irányított általános védekezési reakcióra (c) utaló szövetváltozás paprikán

A növényeket, a baktériumszuszpenziót, az inokulálás eszközeit és módszerét, valamint a kórtünetek értékelési rendszerét Csilléry Gábor és Szarka János bocsátotta rendelkezésemre.

3.5. A mintavétel

A növényi védekezési reakciók feltételezett és kísérletekkel is igazolt (Sárdi és Tyihák, 1992; 1998) gyorsaságára való tekintettel a mintavételt közvetlenül a fertőzés után és azt követően 24 órán át végeztük.

A biokémiai vizsgálatokhoz szükséges mintákat a levéllemez infiltrált foltjaiból, valamint ezektől a levélváll felé eső, inokulum által nem érintett levélrészről 2 cm² területű korongok formájában dugófúróval vágtuk ki. Az infiltrált foltokat a fertőzéskor körberajzoltuk, hogy miután a szuszpenzió felszívódik a szövetben, akkor is pontosan kivágható legyen az injektált szövetrész.

A levélkorongokat, illetve a teljes levéllemez fertőzése esetén a leveleket, a mintavételt követően folyékony nitrogénben azonnal megfagyasztottuk.

3.6. A biokémiai és élettani vizsgálatok módszerei

3.6.1. A szénhidrát vegyületek kromatográfiás meghatározása

A fenti módon gyűjtött mintákat a feldolgozásig –80°C-on mélyhűtőben tároltuk. A feldolgozás során a levélkorongokat dörzsmozsárban, folyékony nitrogénnel homogenizáltuk. 0,3 g homogenizátumhoz 600 µl extraháló oldatot (metanol-desztillált víz, 80:20, v/v) adtunk, majd 20 perces ultrahangos rázatást követően a mintákat 10.000 g gyorsulással, 10 percig centrifugáltuk. Hamilton fecskendővel Kieselgel 60 F₂₅₄ vékonyréteg lapra vittük fel a mintákat és a minőségi és mennyiségi azonosításhoz szükséges standard vegyületeket (5 µl). A standard keverék 1 mg/ml koncentrációban xylózt, fruktózt, glükózt, galaktózt, szacharózt, maltózt és raffinózt tartalmazott.

A szénhidrát frakciók elválasztása túlnyomásos rétegekromatográfiás műszerrel (OPLC; OPLC-NIT Kft., Budapest) többszöri kifejlesztéses eljárással történt. Az eluens acetonitril-desztillált víz 85:15 v/v arányú elegye volt. A két egymást követő futtatás paraméterei a következők voltak: nyomás 50 bar, futtatás sebessége 350 µl/min, mobil fázis összes térfogata 6500 µl, mobil fázis térfogata a kezdeti, gyors fázis alatt 250 µl, kifejlesztés ideje 1121 sec.

A 200 ml acetont, 20 ml foszforsavat (86%-os), 4 ml anilint és 4 g difenil-amint tartalmazó reagenst porlasztva vittük fel a vékonyréteg lapra, majd szárítószekrényben 120°C-on 5 percig hevítettük, aminek hatására különböző színben megjelentek az elválasztott szénhidrát vegyületek. Az előhívás után a szénhidrát frakciók mennyiségét denzitométerrel (Shimadzu

Co., Kyoto, Japán) határoztuk meg ($\lambda = 540$ nm). A vizsgált minták denzitométer jelének a standardhoz való viszonyításával számítottuk ki a szénhidrátok koncentrációját (Sárdi és mtsai, 1996; Kátay és mtsai, 1998).

A módszer előnye az egyszerű mintaelőkészítés, az elválasztás kis eluens szükséglete, a nyomás alatt történő kifejllesztés révén a gyors és jó hatékonyságú elválaszthatóság, valamint a színreakciós előhíváson alapuló megbízható műszeres kiértékelés. Ez a módszer lehetőséget nyújt kis mennyiségű növényi minták vizsgálatára és a fenti módon készített extraktumból 1 μ l-es mennyiség is pontosan analizálható mennyiségileg. A kimutathatósági határ 1 μ g alatti. Egy vékonyréteg lapon akár 15-17 minta különböző szénhidrát frakcióinak egyidejű mérése, összehasonlítása lehetséges.

3.6.2. A hidrogén-peroxid koncentráció spektrofotometriás meghatározása

A hidrogén-peroxid (H_2O_2) spektrofotometriás meghatározását a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Központban, Dr. Toldi Ottóval való együttműködés keretében, Toldi és mtsai (2008) módszere alapján végeztük. 0,5 g levélmintát kvarchomokkal és folyékony nitrogénnel mozsárban eldörzsöltünk el, majd 2,5 ml 1,4 M perklórsavat adtunk hozzá. A homogenizátumot 13.000 g gyorsulással, 4°C-on 15 percig centrifugáltuk. Az így nyert felülúszó pH-ját 5 M-os kálium-karbonáttal 6-7 körüli értékre állítottuk be. A neutralizálás után újabb 15 perces centrifugálás következett 4°C-on, 13.000 g gyorsulással.

A felülúszóból 500 μ l mennyiséget Dowex 1x8/100-200 ioncserélő oszlopra pipettáztuk, melyet előzőleg deionizált vízzel aktiváltunk és 1 napig ülepítettünk. Az oszlopról 1 ml deionizált vízzel lemosott és ily módon megtisztított mintát spektrofotometriás méréshez használtuk fel (spektrofotométer: Jenway Genova).

A reakcióelegy a következőket tartalmazta: 1 ml minta, 400 μ l 12,5 mM DMAB (3-dimetilamino-benzoésav) 0,5 M kálium-foszfát pufferben oldva (pH=6,6) és 80 μ l 1,3 mM MBTH (3-metil-2-benzotiazolinon-hidrazon) deionizált vízben oldva. 3 μ l peroxidáz enzim (0,25 unit) hozzáadása után 590 nm-en mértük az abszorbancia változását.

A minták H_2O_2 tartalmát a H_2O_2 ismert koncentrációiból készített gradiens alapján számoltuk ki.

3.6.3. A szalicilsav HPLC-s meghatározása

A növényi minták szalicilsav tartalmának vizsgálata a Debreceni Egyetem Kertészettudományi és Növényi Biotechnológiai Tanszékén, Dr. Remenyik Judittal való

közös munka során történt. A mintaelőkészítés és a SA-meghatározás során Raskin és mtsai (1989) módszeréből indultunk ki. A mérések kivitelezésére HPLC-s technikát alkalmaztunk. A szalicilsav detektálására és mennyiségi meghatározására alkalmas kromatográfias eljárást Dr. Remenyik Judit (nem publikált eredmény) dolgozta ki.

A szövetmintából 1 grammot kvarchomokkal és 2,5 ml 90%-os metanollal eldörzsöltünk. A homogenizátum Greiner csőbe került, amit ultrahangos rázatás, majd 12.000 g gyorsulással 15 perc centrifugálás követett. A felülúszót pipettával átszívtuk egy új kémcsőbe, az üledékre 2,5 ml 100%-os metanolt mértünk és az előző műveletsort újra elvégeztük. Az így kapott felülúszót az előzővel összeöntöttük, majd vákumbepárlóval beszáritottuk. A beszáritott mintákat üveggyöngyös rázatással egyenként 2,5 ml triklórecetsavba oldottuk vissza. Ezután 12.000 g gyorsulással 10 perc centrifugálás, majd etil-acetát és ciklopentán 1:1 arányú elegyből 5 ml mennyiség hozzáadása következett. Ennek hatására elkülönült a szerves és a szervetlen fázis. A felső folyadékfázist, a szerves fázist pipettával újabb kémcsőbe szívtuk le, végül bepároltuk.

A kromatográfias vizsgálatok LaChrom rendszerű Hitachi HPLC-vel történtek, amely a következő részekből áll: L-7100 pumpa, L-7000 interface, 7250 autosampler, oldószerkeverő, 7455 DAD detektor.

Kromatográfias rendszer jellemzői:

Oszlop: Chromolith Performance RP-18e típusú kolonna

Mozgó fázis: MeCN:1% ecetsav, 2% EtOH = 15:85 izokratikus elúció

Áramlási sebesség: 1 ml/perc

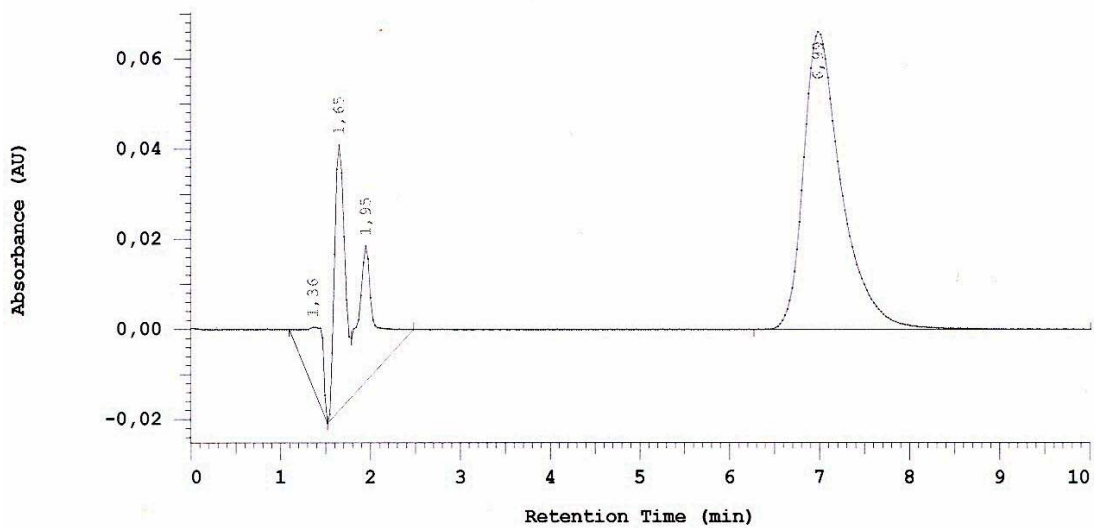
Kolonnatér hőmérséklete: 25°C

Mintatér hőmérséklete: 25°C

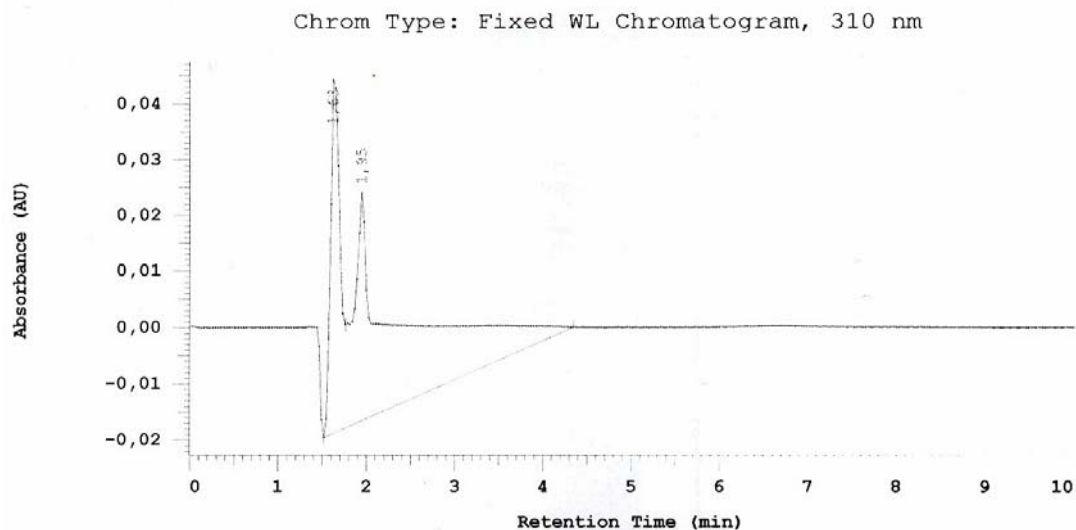
Érzékelő berendezés: UV detektor: 310 nm

Injektált mennyiség: 10 µl (a bepárolt mintákat 500 µl etanolba oldottuk vissza)

A 9. ábrán az egyik legtöbb szalicilsavat tartalmazó minta kromatogramja látható, míg a 10. ábra azokat az eseteket szemlélteti és bizonyítja, amikor a mintából nem volt kimutatható a szalicilsav.



9. ábra A vizsgált paprikalevelekben kimutatott szalicilsav mennyiségek felső tartományát képviselő egyik minta kromatogramja



10. ábra Szalicilsavat nem tartalmazó, paprikalevélből vett minta kromatogramja

3.6.4. A peroxidáz enzimaktivitás spektrofotometriás meghatározása

A peroxidáz (POD) enzimaktivitás meghatározását a Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Alkalmazott Kémia Tanszékén, Stefanovitsné Dr. Bányai Évával, együttműködésben végeztük.

0,3 g levélmintát kvarchomokkal és 900 µl 20 Mm Tris-HCl pufferrel (pH=7,8) homogenizáltunk. A mintákat 13.000 g gyorsulással, 4°C- on, 20 percig centrifugáltuk.

Az így nyert növényi kivonatból Shannon és mtsai (1966) spektrofotometriás módszere alapján mértük a POD aktivitást H₂O₂, mint szubsztrát és ortodianizidin, mint kromogén reagens ($\epsilon = 11,3$) jelenlétében. A reakcióelegy 10 µl mintát, 1700 µl 0,1 M Na-acetát puffert (pH=5), 20 µl 10 mg/ml koncentrációjú, metanolban oldott ortodianizidint és 30 µl 100x-os hígítású, desztillált vízben oldott hidrogén-peroxidot tartalmazott. Az abszorbancia növekedését 460 nm-en mértük (Varian DMS 100S UV-Visible Spectrophotometer), az enzimaktivitást u/ml- re vonatkoztattuk.

3.6.5. A formaldehid és metilezett vegyületek kromatográfiás meghatározása

A formaldehid és a metilezett vegyületek meghatározásakor 0,6 g homogenizált mintához 600 µl 0,05%-os dimedon oldatot adtunk. A dimedonnal a formaldehid megköthető és kötött formában mérhető. 20 perc ultrahangos rázatás után 10.000 g gyorsulással 15 percig centrifugáltuk.

A felülúszóból 25 µl-t vittünk fel a vékonyréteg lapra. A formaldehid esetében formaldimedont használtunk standardként, mert a formaldehidet dimedon addukt formájában határoztuk meg, míg a metilezett vegyületek közül N^e-trimetil-L-lizint, kolint, karnitint, trigonellint és betaint.

Gersbeck és mtsai (1989) módszere alapján a formaldehid kimutatását követően annak generátorai, a metilezett vegyületek is meghatározhatók ugyanabból a mintából, ugyanazon a vékonyréteg lapon, különböző eluens rendszerekkel végzett többszöri kifejlesztéssel.

A formaldehid meghatározásához a futtatást üvegcádban végeztük kloroform és diklórmetán 35:65 (v/v) arányú elegyével. Az elválasztás után a formaldimedon UV fény alatt látható, $\lambda = 270\text{nm}$ hullámhosszon detektálható. A denzitométeres kiértékelés után, szintén üvegcádban, acetonos futtatással tisztítjuk meg a lapot.

Ugyan ezen a vékonyréteg lapon n-propanol, metanol és 0,1 M Na- acetát elegyével (30:3:20, v/v) OPLC-s futtatással a metilezett vegyületek elválasztását végeztük el. A futtatás paraméterei: nyomás 50 bar, futtatás sebessége 200 µl/min, mobil fázis összes térfogata 9000 µl, mobil fázis térfogata a kezdeti, gyors fázis alatt 250 µl, kifejlesztés ideje 2712 sec. Az elválasztott metilezett vegyületeket Dragendorff reagenssel festettük meg, majd $\lambda = 525\text{ nm}$ hullámhosszon értékeltük.

3.7. A kísérletek statisztikai elemzése

A biokémiai illetve élettani kísérleteket három alkalommal, három függetlenül felnevelt növényanyagon végeztük el. Egy adott növényvonalon adott időpontban történő mintavételhez, három növény állt rendelkezésre. Így a levélkorongos mintavétel esetén egy minta hat korong homogenizálásával jött létre, míg a teljes levél infiltrálásakor három levél homogenizálása után készítettük az extraktumokat.

A statisztikai elemzésünk elsődleges célja a mérési eredmények megbízhatóságának vizsgálata valamint annak bizonyítása, hogy a mérési eredmények közti különbségek elsősorban a kezelések következményei.

Minden mérést háromszor ismételtünk meg. Statisztikai vizsgálati egységként kezeltük egy adott genotípus (fogékony, *Bs-2*, ill *gds*) levelében egy adott vegyület mennyiségének illetve a POD enzim aktivitásának időbeli változását a fertőzést követően. Minden ilyen mérésfolyamatot, vagyis a grafikonokon bemutatott görbéket illetve annak alapadatait önálló, egytényezős három ismétléses kísérletnek tekintettünk, ahol a fertőzésektől eltelt idő (óra) tölti be a kezelés szerepét.

A kiértékeléskor minden egyes mérésfolyamatra vonatkozóan külön-külön elvégeztük az egytényezős, három ismétléses kísérletekre vonatkozó számításokat (mérések szórása, variancia, hibavariancia, variációs koefficiens, F-próba).

Ezek alapján megállapítható volt, hogy az egyes mérésfolyamatok eredményei megbízhatóak, az ismétlések szórása a kívánatos szinten belül van, a hibavariancia alacsony, a variációs koefficiens (CV) értéke minden mérésfolyamat esetében 10 alatt volt. Az F-próba minden mérésfolyamtnál $P=5$ %-os tévedési valószínűségi szinten igazolta, hogy a kísérletek mérési eredményei közti különbségek elsősorban a kezelések (a fertőzéstől eltelt órák) következményei és nem a mérési hibákéi.

A dolgozatot jelentősen terhelte volna, ha az összes statisztikai analízist táblázatos formában szerepeltettük volna, ezért ettől eltekintettünk.

4. EREDMÉNYEK

Biokémiai vizsgálataink célja, hogy további bizonyítékokat nyújtsunk arra, hogy az *általános védekezési rendszer* elnevezés alatt általunk leírt növényi tulajdonság egy eddig ismeretlen védekezési folyamatot szabályoz.

4.1. Az általános védekezési rendszer működésének gazdaságossága

Paprikában az általános védekezési rendszert kódoló *gds* gén nem-gazda és gazda kapcsolatokat is magában foglalva, széles spektrumú ellenállóságot biztosítva, a növényi immunrendszer szerepét tölti be. Szerepükből következően a folyamatosan működő immunrendszer és a csak időszakosan ható specifikus betegségellenállóság energia igénye jelentősen eltér.

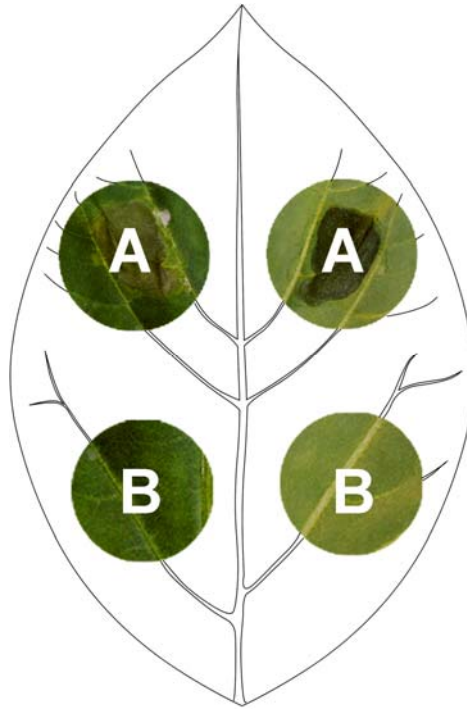
A *gds* gén által meghatározott általános védekezési rendszer szerepét, a kórtünetekben megnyilvánuló szövettani változások mellett, energetikai jellemzésével szerettük volna bizonyítani. A fogékony és betegségellenálló növényekben fertőzés hatására bekövetkező élettani változások kimutatására egyik legalkalmasabb vegyület a növény energetikai alapját képező glükóz, illetve annak mennyiségi változása.

Fogékony, specifikus védekezési reakciót kódoló *Bs-2* gént illetve az általános védekezési reakciót szabályzó *gds* gént tartalmazó paprika vonalak *X. c. pv. vesicatoria* baktérium szuszpenziójával inokulált, valamint baktérium mentes szöveiteiből vett levélkorong mintáinak glükóz tartalmát vizsgáltuk 24 órán át. A kontrollként szereplő, kezeletlen szövetet az infiltrált szövetfolt és a levélnyél közti levéllemezből vettük azzal a céllal, hogy a fertőzés okozta stressz által kiváltott esetleges szénhidrát áramlást is figyelemmel tudjuk kísérni (11. ábra).

A szénhidrát frakciók túlnyomósos rétegekromatográfiás műszerrel (OPLC) történő elválasztásával a paprikalevelekből vett mintákban glükóz, fruktóz és szacharóz volt kimutatható. A mintákban mért fruktóz és szacharóz tartalom alapján nem lehetett megbízható következtetéseket levonni, így csak a glükóz mennyiségi változásait elemeztük (12. ábra).

A kezeletlen kontrollok esetében a fogékony növények glükóztartalma volt a legmagasabb, amit az általános védekezési rendszerrel bíró illetve a specifikus védekezési reakcióval válaszoló növények követnek.

A fogékony, a specifikus és az általános védekezési reakciót adó növények fertőzött szöveiteiben bekövetkezett glükóztartalom változások mind időben, mind mennyiségben eltérőek voltak.

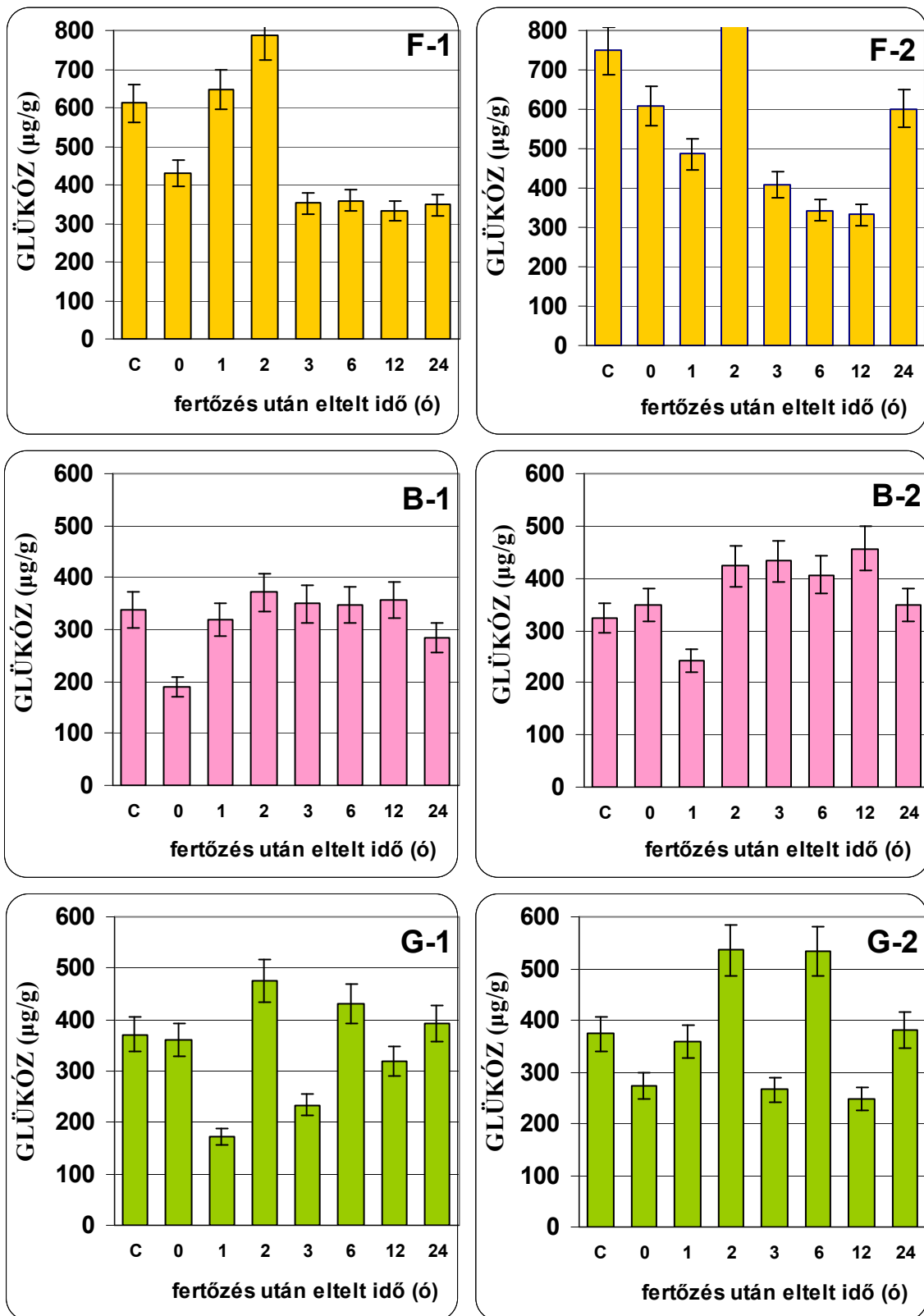


11. ábra Paprikalevél *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal inokulált (A), illetve kezeletlen (B) szöveteinek szénhidrát tartalom vizsgálatához alkalmazott mintavételi mód

(Sárdi és mtsai, 2006)

A **fogékony** növények fertőzött szöveteiben a glükóztartalom közvetlenül az inokulálás után lecsökkent, majd folyamatosan emelkedve mennyisége jóval meghaladta a kontrollét. A harmadik órában az inokulált szövetek glükóztartalma rohamosan lecsökkent és a vizsgálat végéig azonos szinten maradt. A glükóz mennyiségének gyors csökkenését és a készletek kimerülését a fertőzés következtében felgyorsult anyagcsere magyarázhatja. A kezeletlen levélrészről vett minták glükóz tartalmának változását a glükóz transzport következtében fáziskéséssel ugyan, de hasonló lefutású görbe jellemezte a különbséggel, hogy a 24. órában a cukortartalom magas értéket mutatott.

A **Bs-2** gént tartalmazó paprikavonal inokulált szöveteiben a glükóz mennyisége a fertőzés és az első mintavétel közt eltelt néhány percben jelentősen csökkent, míg a nem fertőzött szövetek glükózsintje nem változott. Egy óra elteltével a fertőzött szövetek glükóz koncentrációja visszaállt, a szomszédos levélrészeké viszont lecsökkent. Ez az összefüggés jól mutatja a levélen belüli glükóz átcsoportosulást a kezeletlen levélrészektől az inokulált terület irányába. Ezt követően a fertőzés hatása a vizsgálat 24 órája alatt nem érződött.



12. ábra Fogékony, specifikus *Bs-2* rezisztencia gént és az általános védekezési rendszert kódoló *gds* gént tartalmazó paprika vonalak glükóz koncentrációjának változása *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal végzett inokulálás hatására, a fertőzéstől eltelt idő függvényében, az inokulált és nem inokulált szövetekben
 C - nem inokulált növényekből származó kontroll, F - fogékony növény, B - specifikus védekezési reakciót adó növény, G - általános védekezési reakciót adó növény; 1 - inokulált szövet, 2 – nem inokulált szövet

A *gds* gén biztosította általános védekezési rendszerrel bíró növények inokulált szöveteinek glükóztartalma az első mintavétel alapján nem mutatott eltérést a kontrolltól. Egy óra múlva jelentős csökkenés következett be. Ez látszólag ellentmond azoknak a tünettanilag megfigyeléseknek, melyek szerint az általános védekezési reakció a specifikus védekezési reakciónál gyorsabb. A *Bs-2* gén által kódolt reakció gyors beindulására ugyanis már az első minta glükóztartalmának csökkenése egyértelmű bizonyítékot ad. A *gds* gén esetében a kezeletlen szövetekből vett első minta alacsony glükóz szintje viszont arra enged következtetni, hogy a fertőzött levélrész ekkor egy glükóz tartalmi minimumon már túl van, hisz csak ennek pótlására csökkenhetett le a szomszédos, nem inokulált levélszövetek cukortartalma. A fertőzött szövetekben a 3. és a 12. órában is alacsony glükóz koncentrációt mérünk. Figyelemre méltó, hogy a kórfolyamat második órájától az inokulált és nem inokulált szövetek glükóz tartalmának periodikusan váltakozó csökkenése és növekedése, szinkronban történik a vizsgálat végéig. Ez a periodicitás a folyamatos glükóz felhasználásra és utánpótlásra enged következtetni. Ezt a jelenséget feltehetően torzítja az a tény, hogy az inokulálás a természetes fertőződéshez képest nagy dózisban történt. A közel 2 cm²-es infiltrált levéllemez parenchima sejtjeinek nagyobbodása, osztódása, folyamatos és jelentős energia igényvel jár, ami nem feleltethető meg az általános védekezési reakció gyorsaságából következő, természetes fertőződés esetén pusztán néhány sejtre korlátozódó sejtnagyobbodásnak.

A három paprikavonal glükóztartalmának változása jól egyeztethető volt az adott gazdanövény kórtüneteit jellemző szövetelváltozásokkal.

A kórokozó főlényét jelző fogékony gazda-patogén kapcsolatban a lassan kifejlődő betegség fokozott energia felhasználással jár, melyet a növény az infekciós folt körüli közelebbi illetve távolabbi egészséges szövetekből fedez. A betegség következtében a fertőzött levelek fotoszintetizáló képessége egyre csökken, mely tartalékai kimerüléséhez és pusztuláshoz vezethet.

Funkciójának megfelelően, a hatékony helyi válaszokra képes specifikus védekezési reakció energiatakarékos, glükóz felhasználása egyszeri és gyors. Fenotípusos kifejlődése, az esetenként megjelenő hiperszenzitív szövetpusztulás, már nem energiaigényes folyamat.

Az általános védekezési reakció gyorsaságban megelőzi a specifikus reakciót és vele ellentétben folyamatosan működik, ezért glükóz felhasználása nagyobb és folyamatában is eltér attól. Ezt a nagyobb glükózfogyasztást viszont bőségesen ellentételezi az a tény, hogy a megtámadott szövetek nem pusztulnak el. A nagyobb mennyiségű glükóz a stressz-hatással járó általános reakciók mellett a sejtfalerősítés illetve sejtnagyobbodás folyamán használandó fel.

4.2. Az általános védekezési rendszer és a hidrogén-peroxid kapcsolata

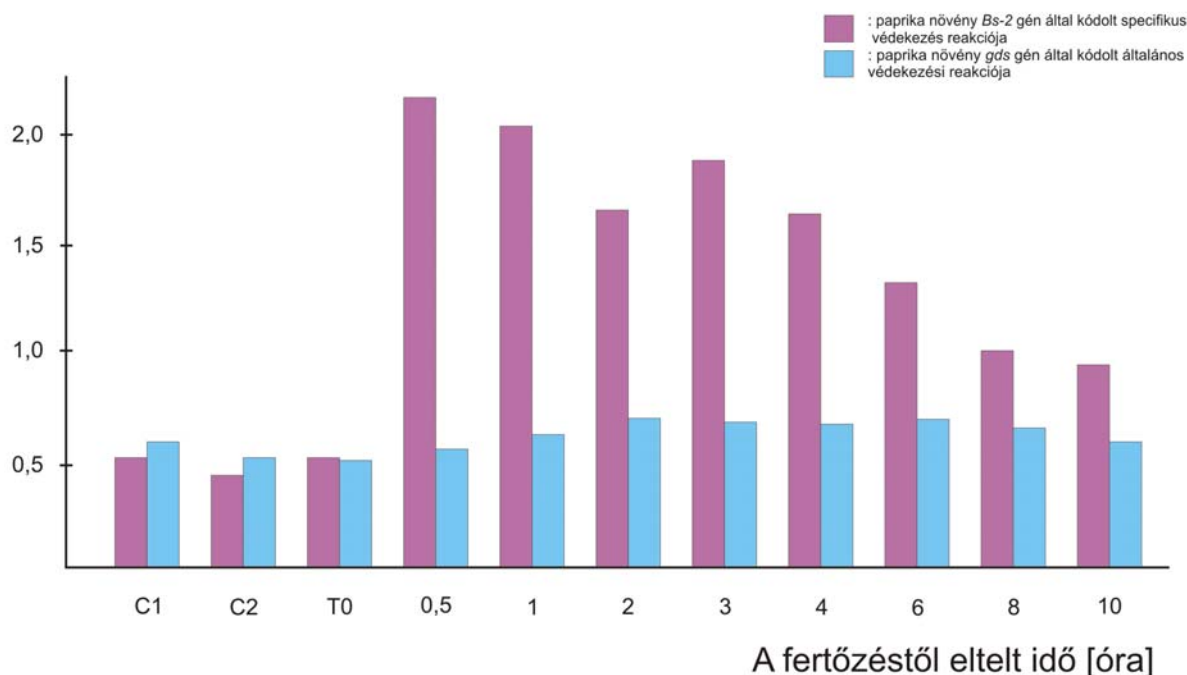
Az irodalomból ismert, szövetpusztulással járó hiperszenzitív kórtünetek a jól ismert hidrogén-peroxid „kitöréssel” jellemezhetők. Munkánk során gyors szövetpusztulással járó HR-t adó növényeken nem tudunk dolgozni, mert kísérleteinket nemesítési célokra szolgáló növényanyagon végeztük. Nemesítési programunk egyik vezérfonala a rezisztencianemesítésben alkalmazott hiperszenzitív szövetpusztulás alapján történő szelekció tagadása, hiszen kísérletesen igazolt, hogy a specifikus rezisztenciagének reakciói nem járnak feltétlenül szövetpusztulással. Pontosabban szólva, a specifikus rezisztenciagének erős általános védekezési reakciót biztosító rendszerben működnek a leghatékonyabban. Az általános védekezési reakció és a specifikus védekezési reakció kölcsönhatásának eredményeként a *Bs-2* gén hatékony védelmet nyújt jelentős mértékű szövetpusztulás nélkül is. Ebből következően a *Bs-2* specifikus rezisztenciagént a működéséhez legoptimálisabb környezetben, magas szintű általános védekezési reakciót biztosító genetikai háttérben vizsgáltuk.

Mivel a hidrogén-peroxid (H_2O_2) főként helyi reakciókban vesz részt, a fogékony kapcsolatban, valamint specifikus és általános védekezési reakcióban betöltött szerepét oly módon vizsgáltuk, hogy a teljes levéllemez felületét infiltráltuk. A *X. c. pv. vesicatoria* baktérium szuszpenziójával infiltrált levelek H_2O_2 -tartalmának változását, a fertőzést követő 10 órán át követtük. A kontrollként hagyott fertőzött leveleken kifejlődő kórtünetek, kiegészítő információkat adtak a három reakciótípushoz. A fertőzést követő 8. napon a fogékony növények levelei enyhe infiltrálódást és klorózist mutatva lehullottak. A *Bs-2* specifikus rezisztencia gén reakciója szövetpusztulás nélküli, enyhe lila elszíneződésben nyilvánult meg, majd a levelek enyhén klorotizálódva lehullottak. Az általános védekezési reakciót szabályozó *gds* gént tartalmazó növények fertőzött levelein színváltozás nem volt észlelhető, a levéllemez tovább növekedett és a különböző mértékben történő szövetvastagodás miatt a levél hullámossá, deformálttá vált, de egészséges maradt.

Fertőzés hatására a fogékony, *Bs-2* és *gds* gént tartalmazó gazdanövény H_2O_2 mennyiségében kifejezett válasza jól mutatja a különböző reakciók közti alapvető eltéréseket (13. ábra).

A **fogékony** növényekben a *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal végzett fertőzés következtében a vártak megfelelően, nem észleltünk jelentős változásokat a H_2O_2 mennyiségében. Ez a gazda-patogén kapcsolat jellegéből következik, hiszen a fogékony kapcsolat jellemzője, hogy a kórokozó stressz-hatás keltése nélkül jut be a növénybe és csak a felszaporodás során, a betegség kialakulásának kezdetén válik érzékelhetővé a növény számára. Vizsgálatunk 10

H₂O₂ koncentráció [$\mu\text{Mg}^{-1}\text{FW}$]



13. ábra *Bs-2* specifikus rezisztencia gént és általános védekezési rendszert kódoló *gds* gént tartalmazó paprikanövények H₂O₂ koncentrációban kifejezett reakciója a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* fertőzésre

C1= nem fertőzött kontroll, C2= vízzel infiltrált kontroll, T₀= közvetlenül a fertőzés után vett minta

(Szarka és mtsai, 2006 nyomán)

órás időtartama alatt ez az állapot nem következett be. A növény alapvető életfolyamatait, úgy mint a sejtfalképzéshez szükséges ligninszintézist és a lebontó folyamatokat is meghatározott mennyiségű H₂O₂ kíséri. Ehhez, a kontroll mintákban mért mennyiséghez képest, a fogékony növény fertőzött leveleiben mért H₂O₂ szint nem mutatott szignifikáns különbséget a kísérlet teljes időtartama alatt.

A ***Bs-2*** gént tartalmazó növényekben a fertőzés után közvetlenül leszedett mintához képest, 30 perccel az inokulálás után, négyszeres növekedést tapasztaltunk a H₂O₂ koncentrációban. Tehát a kórokozó fertőzését követően igen rövid időn belül nagy mennyiségű H₂O₂ előállítására volt képes a növény. A H₂O₂ felhalmozódása a fertőzést követő 30 perc alatt elérte a maximumot. A kezdeti növekedés után, a következő 8 óra alatt, a H₂O₂-szint

szignifikánsan magasabb maradt a *Bs-2* gént tartalmazó paprikavonalban a nem fertőzött mintákhoz viszonyítva, de aztán visszatért a kontroll minták szintjére.

A *gds* gént tartalmazó növényekben a H_2O_2 mennyisége állandó maradt, nem mutatott változást a nem fertőzött kontroll növényekhez képest a mérések adott időtartamán belül. Eredményeink alapján valószínű, hogy a *gds* gént tartalmazó növényeknek nincs szükségük a H_2O_2 -közvetítette oxidatív kitörésre a védekezéshez, szemben a specifikus rezisztencia géneket tartalmazó, gyors szövetpusztulást mutató növényekkel.

A *gds* gén esetében nincs szükség nagymennyiségű H_2O_2 -ra a hatékony védekezéshez. A növény általános védekezési reakcióját áttörő kórokozó pusztítása következtében, fogékony gazda-patogén kapcsolatban, H_2O_2 termelődik. A megbetegedést jelző H_2O_2 , mint jelzőmolekula szükséges a specifikus védekezési reakció beindulásához. Az általános védekezési rendszer hibajavító egysége, a specifikus védekezési reakció a pusztulásra utaló H_2O_2 jelenléte esetén lép működésbe.

4.3. A szalicilsav szerepe az általános védekezési rendszerben

A szalicilsav (SA) számtalan növény és kórokozó kapcsolatban általánosan előforduló jelzőmolekula, mely fertőzés hatására nagy mennyiségben halmozódik fel helyileg és a nem fertőzött levelekben is, ahol egyaránt védekezési válaszokat indukál. Ismert a növényekben előforduló SA-koncentráció és a betegségellenállóság mértéke közti összefüggés is, valamint az a tény, hogy külső SA kezeléssel fokozható a növények rezisztenciája, ami a nekrotikus léziók méretének csökkenésében nyilvánul meg. Ezek ismeretében a *gds* gén és a biológiailag aktív, szabad SA kapcsolatának vizsgálatát tűztük ki célul.

A *gds* gén mellett fogékony és *Bs-2* gént tartalmazó paprikavonalak szabad SA-tartalmának alakulását mértük gazda és nem-gazda kapcsolatban. A vizsgálat során fogékony, a *Bs-2* gént és a *gds* gént tartalmazó vonalak teljes levéllemezre kiterjedő infiltrálását végeztük el a *X. c. pv. vesicatoria* illetve *X. c. pv. phaseoli* baktérium szuszpenziójával. Azért döntöttünk a teljes levéllemez infiltrálása mellett, hogy csak tisztán az elsődleges helyi reakciókat vizsgálhassuk és az eredményt ne zavarja az egészséges levélrészekből érkező transzport.

A SA meghatározás eredményének és a fertőzés okozta szövetváltozások kapcsolatának vizsgálata érdekében a fertőzött kontroll növényeken kialakult kórtüneteket is megfigyeltük. A paprikával nem-gazda kapcsolatban lévő *X. c. pv. phaseoli* fertőzésének hatására a fogékony és a *Bs-2* specifikus rezisztencia gént tartalmazó paprikavonal infiltrált szövete is enyhe klorózissal reagált. Az enyhe klorózis a gazdanövény inkompatibilis kapcsolatban is

működő általános védekezési reakciójára utal. A *X. c. pv. phaseoli* provokációjának hatására, a szövetek lilás elszíneződésének elmaradása, a *Bs-2* gén *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal szembeni kizárólagos specifitását bizonyítja. A *gds* gént tartalmazó paprikavonal a *X. c. pv. phaseoli* baktériummal végzett fertőzésre ugyanolyan enyhe klorózissal és szövettömörődéssel válaszolt, mint a *X. c. pv. vesicatoria* baktérium fertőzésére.

A SA-tartalom alakulását a fertőzést követő első 12 órán át vizsgáltuk (14. ábra).

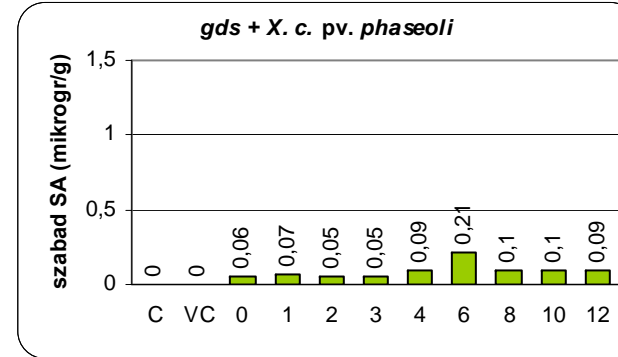
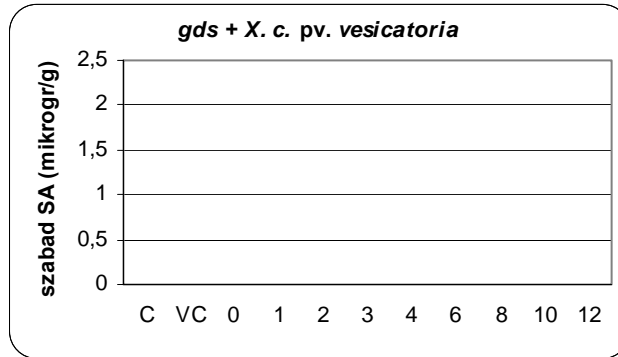
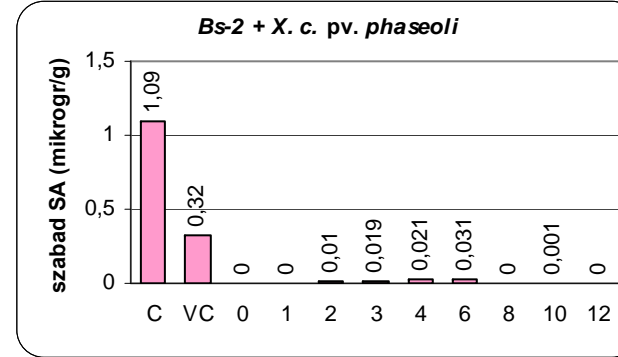
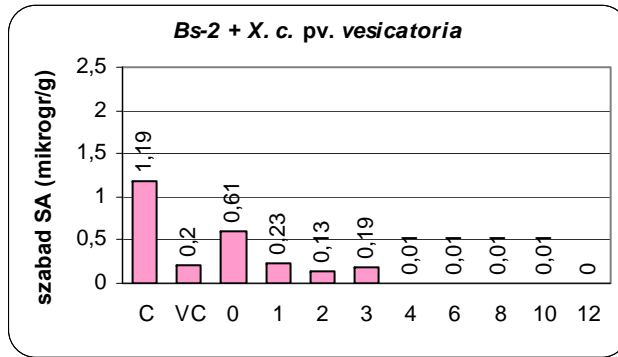
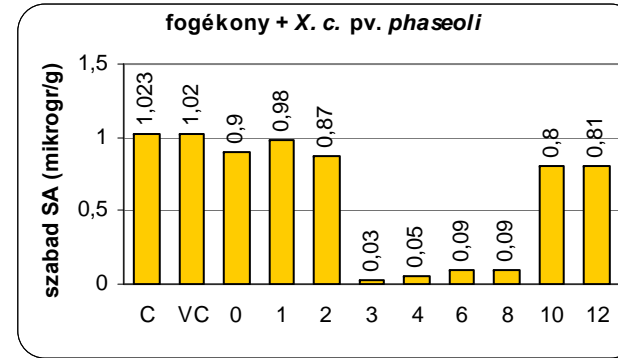
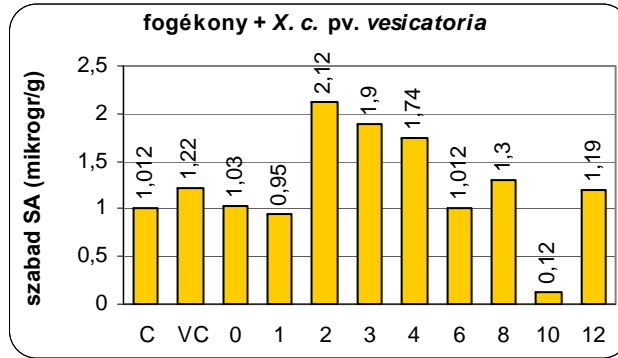
A paprikával kompatibilis kapcsolatban lévő *X. c. pv. vesicatoria* baktérium fertőzése hatására, a **fogékony** vonalban a SA mennyisége a fertőzést követő 2. órában a kontrollhoz képest hirtelen megduplázódott. Ez a csúcserték a 10. órában közel nullára csökkent, majd újra emelkedést mutatott. Lehetséges, hogy a 10. órában bekövetkezett szabad SA-minimumot követő növekedés a SA glükózzal képzett konjugátumából, a szalicilsav-glikozidokból való felszabadulásának köszönhető.

A *X. c. pv. phaseoli* baktériummal való fertőzés hatására, vagyis inkompatibilis kapcsolatban a SA tartalom a kontrollhoz képest nem emelkedett, viszont a fertőzést követő 3. órától a 8. óráig szinte nullára csökkent, és a 10. órában érte el újra a kontrollban mért mennyiséget.

A paprika számára a *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal szemben gazda rezisztenciát biztosító **Bs-2** gént tartalmazó növényekben már közvetlenül a fertőzést követően vett mintában felére, a 4. órában szedett mintában közel nullára csökkent a SA mennyisége. Ezen a rendkívül alacsony értéken stabilizálódott a 12. órával bezárólag.

A paprikával nem-gazda kapcsolatban lévő *X. c. pv. phaseoli* baktériummal végzett infiltráció hatására a SA-tartalom a fertőzés pillanatában nullára csökkent és a kísérlet végéig ezen az értéken maradt. Megjegyzendő, hogy a kezeletlen kontrollhoz képest a vizes kontroll SA-tartalma mindkét baktérium fajjal való kezelés hatására ötödére csökkent.

A paprika **gds** gén által kódolt általános védekezési rendszerében a SA szerepét vizsgálva sem a kezeletlen, sem a vizes kontrollban nem tudtunk szabad SA-at kimutatni. A fertőzés első 12 órájában, a *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal végzett inokulálást követően sem volt kimutatható mennyiségben a SA. A *X. c. pv. phaseoli* baktérium hatására 0,05 és 0,21 µg/g friss tömeg körüli értékeket mértünk, tehát igen kis mennyiségben találtunk szabad SA-at.



14. ábra Fogékony, *Bs-2* illetve *gds* gént tartalmazó paprikavonalak szabad SA-tartalmának alakulása *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* illetve a paprikával nem-gazda kapcsolatban lévő *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* baktériummal való infiltrálás hatására, a fertőzéstől eltelt idő függvényében
c – nem fertőzött kontroll, VC – vízzel infiltrált kontroll

4.4. Az általános védekezési rendszer jellemzése peroxidáz enzimaktivitás alapján

A rezisztencia nemesítés a kezdetektől fogva egy-egy kórokozó fajjal szemben kialakított, specifikus védekezési reakciókra alapult. A specifikus védekezési reakció fenotípusos megnyilvánulása a gyors sejt- és szövetpusztulás. Kedvezőtlen környezeti feltételek között, a gyors szövetpusztulás alapján szelektált specifikus rezisztenciagének nem biztosítanak kellő védelmet a kórokozókkal szemben. A nem megfelelő hatékonysággal működő specifikus rezisztenciagének mellett egy olyan növényi reakciót figyeltünk meg, mely a gyors szövetpusztulással ellentétes módon, a fertőzött szövetek megtartásával, hatékonyan akadályozza meg a kórokozó terjedését.

A gyors szövetpusztulással járó hiperszenzitív reakció folyamán a kórokozót és növényi sejtet egyaránt pusztító, nagymennyiségű H_2O_2 szabadul fel. A *gds* gén által kódolt sejt- és szövetmegtartással járó általános védekezési reakció során nem észleltünk változást a H_2O_2 -tartalomban. Kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy a sejt-megtartással járó reakcióban milyen szerepe lehet az antioxidáns hatású peroxidáz (POD) enzimnek.

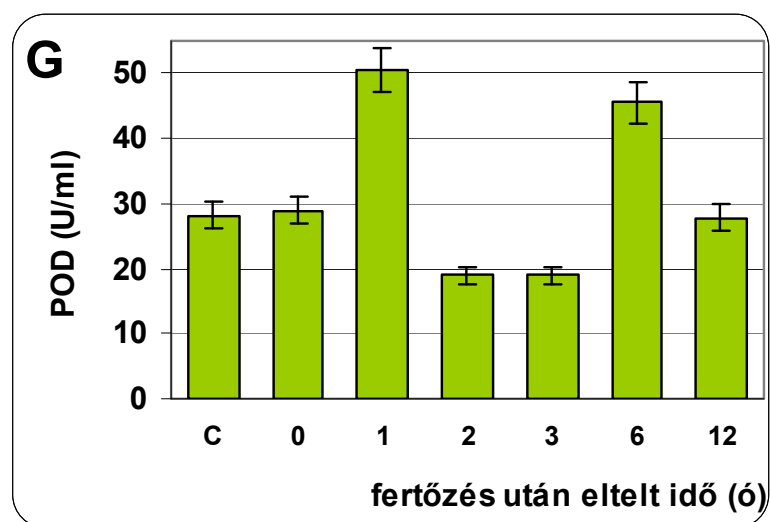
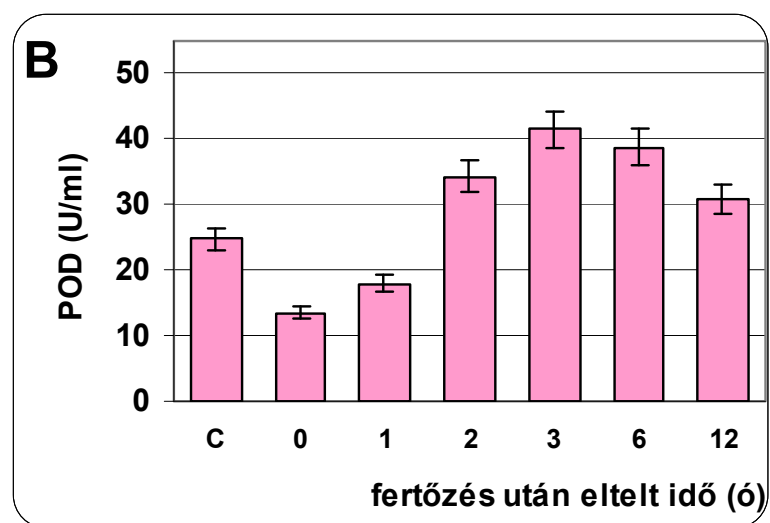
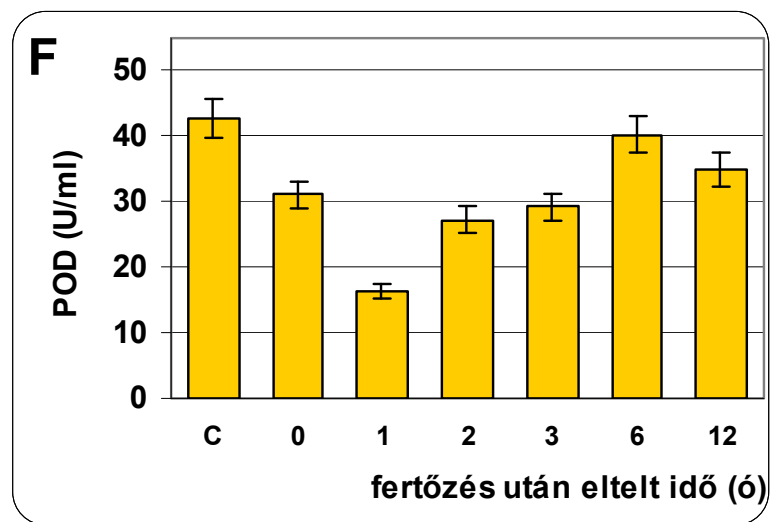
A *gds* gént tartalmazó paprikavonal POD aktivitás változását fogékony és *Bs-2* specifikus rezisztencia gént tartalmazó növényekével hasonlítottuk össze. A *X. c. pv. vesicatoria* 10^8 baktériumsejt/ml koncentrációjú szuszpenziójával foltban történő illetve teljes levéllemezre kiterjedő fertőzést végeztünk. A foltban történő infiltrálás hatására bekövetkező enzimaktivitás változást 12 órán át (15. ábra), míg a teljes levélre kiterjedő fertőzés hatását 24 órán át (16. ábra) vizsgáltuk.

A foltban történő infiltrálást követően, a *gds* gént tartalmazó paprikavonal leveléből vett első mintában, a POD aktivitás a kontrollhoz képest nem mutatott eltérést, de a fertőzést követő első órában ugrásszerűen emelkedett. A második és harmadik órában az enzim aktivitása erősen csökkent, majd a 6. órában ismételt aktivitás növekedést tapasztaltunk.

A *Bs-2* gén kódolta reakció esetében az első két mintában mért enzimaktivitás a kontrollhoz képest szignifikánsan kisebb volt. Ezt követően a POD aktivitás a második órában a kontrollt meghaladóan fokozódott és a 3. órában érte el a csúcst.

A **fogékony** paprikavonalban a fertőzést követően visszaeső enzimaktivitás csak nagyon lassan, a 6. órában érte el újra a kontrollban mért értéket. A fertőzést követő 12 óra hossza alatt az enzimaktivitás nem emelkedett a kezeletlen kontrollban mért érték fölé.

A három reakciótípus esetében a POD aktivitás különböző időpontokban érte el a csúcserőértéket. Ez a *gds* gént tartalmazó vonalban az 1. órában, a *Bs-2* gén esetében a 3., míg a



15. ábra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal foltban történő inokulálás által kiváltott peroxidáz enzimaktivitás változás fogékony (F), valamint *Bs-2* gént (B) illetve *gds* gént (G) tartalmazó paprikavonalban

fogékony növények esetében a 6. órában következett be. Az így kialakított sorrend megegyezik a kórtani vizsgálatok során tapasztalt reakciósebesség alapján felállított sorrenddel.

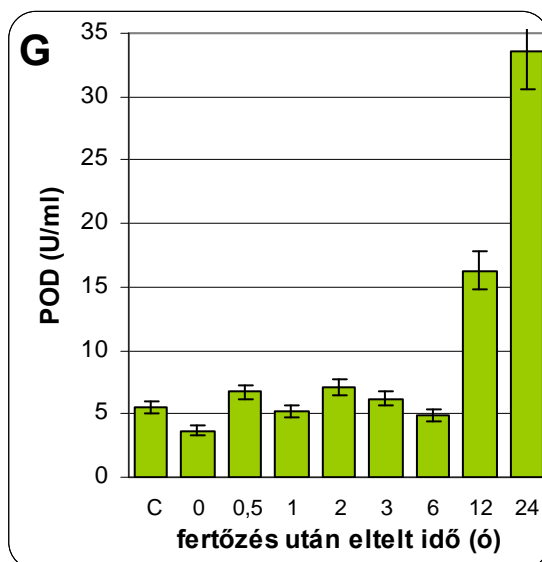
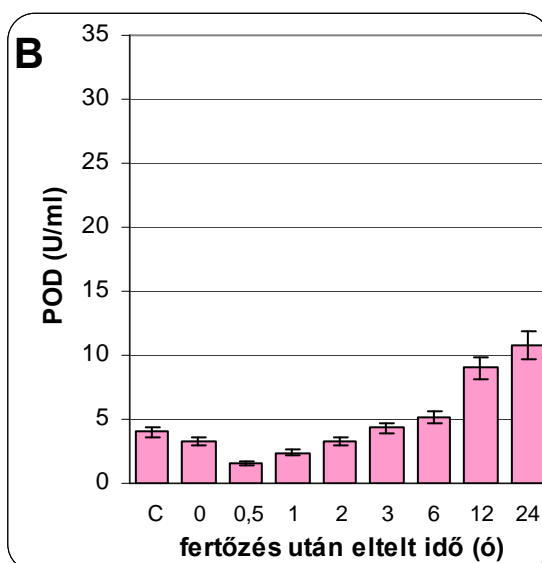
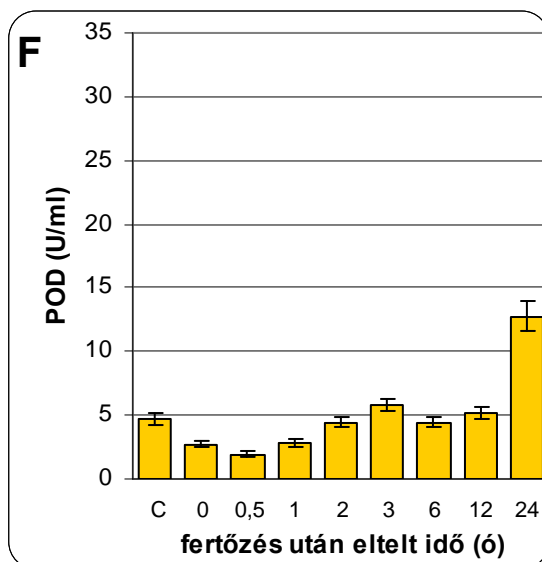
A fertőzés hatására bekövetkező enzimaktivitás időbeli lefutásának összehasonlítását követően a három különböző növénytypus antioxidáns kapacitását egy természetellenes dózisu fertőzéssel mértük fel (16. ábra).

A *gds* gént tartalmazó növény leveleiben a fertőzést követő 6. óráig nem észleltünk jelentős változást, de a 12. órára a POD aktivitás a 3-szorosára, a 24. órára pedig 6-szorosára emelkedett. A *Bs-2* gént tartalmazó növény levelében is a 12. órában kezdett nőni az enzimaktivitás, de a 24. órára csak közel kétszerese volt a kontrollban mért értéknek. Ezzel szemben a **fogékony** növényben a kontrollhoz képest még a 12. órában sem változott a POD aktivitás és a 24 órára csak 2,5-szeres emelkedést ért el.

Ezek alapján arra következtetünk, hogy a *gds* gént tartalmazó növények antioxidáns kapacitása sokkal nagyobb, mint a *Bs-2* gént tartalmazó valamint a fogékony növényeké.

A POD aktivitás beindulásának időpontjában, de főleg mértékében nagy különbség figyelhető meg, melyek összehatasának alapvető stratégiai jelentősége lehet a védekezésben, ez döntheti el a védekezés hatékonyságát.

Ezt megerősítették a kontrollnövényeken ellenőrzött kórtünetek is. A *gds* gént tartalmazó növényekben fertőzés hatására bekövetkezett POD aktivitás elegendő a szövetmegtartáson alapuló hatékony védelemhez, hiszen a növények fertőzött levelei a különböző mértékben történő szövetvastagodás miatt hullámossá, deformálttá váltak, de egészséges maradtak. A fertőzésre szövetpusztulással reagáló fogékony és *Bs-2* gént tartalmazó növényekben a POD aktivitás nem volt megfelelő és mindkét növénytypus fertőzött levelei lehullottak.



16. ábra Peroxidáz enzimaktivitás változás fogékony (F), valamint *Bs-2* gént (B) illetve *gds* gént (G) tartalmazó paprikavonalban *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal végzett, teljes levélre kiterjedő inokulálás hatására

4.5. A stressz hatása a metilezett vegyületekre és a formaldehid képződésére az általános védekezési rendszerben

A *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal szemben fogékony, a *Bs-2* specifikus rezisztencia gént illetve a magas szintű általános védekezési rendszert biztosító *gds* gént tartalmazó paprika vonalakban vizsgáltuk a fertőzés, mint stressz hatására történő demetileződés folyamatát, vagyis a metilezett vegyületek és a formaldehid mennyiségének egymással összefüggő változásait. A *X. c. pv. vesicatoria* 10^8 sejt/ml koncentrációjú szuszpenzióját a levél fonáka felől, sérülésmentesen préseltük a sejtközötti járatokba. Az infiltrált szövetekből 2 cm^2 területű darabot vágunk ki a vizsgálat céljára.

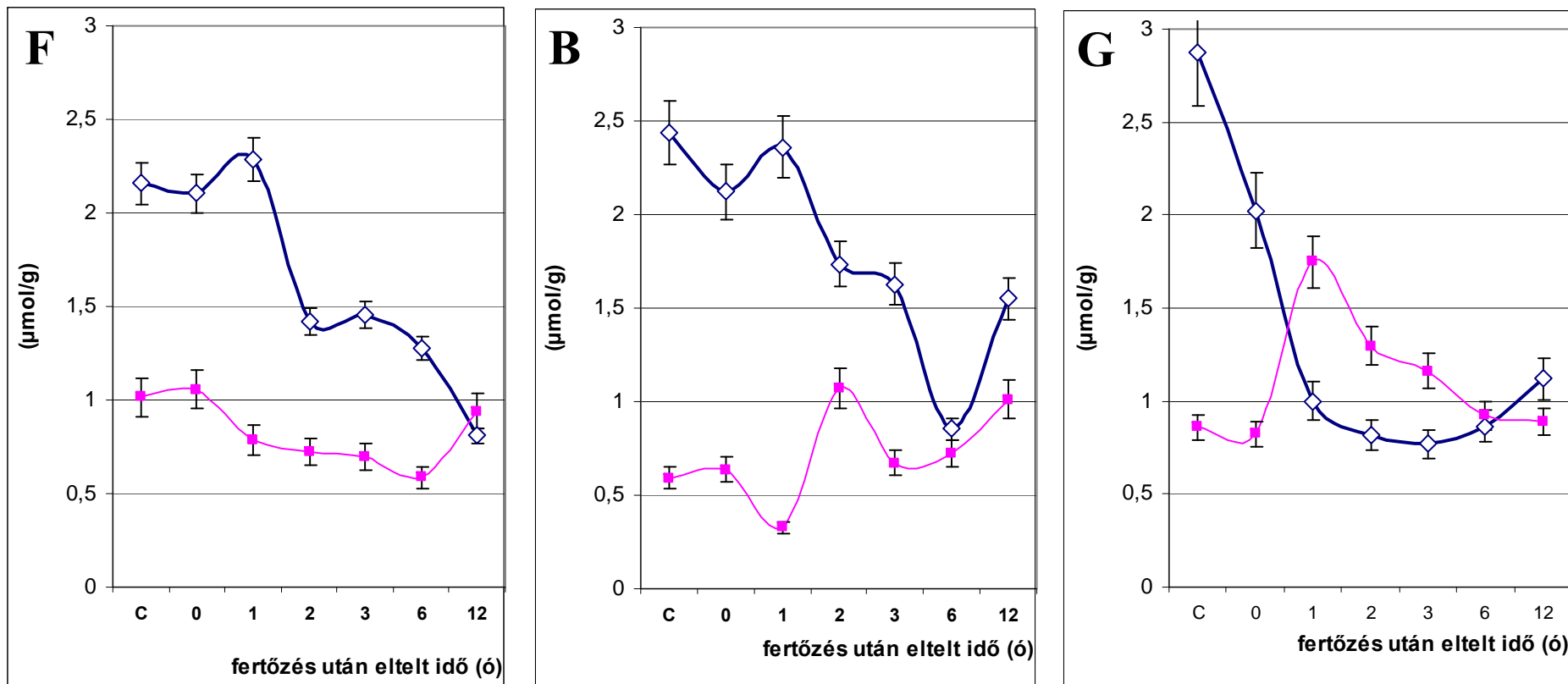
Kísérleteink során abból indultunk ki, hogy a különböző metilezett vegyületek stressz hatására történő demetileződése nyomán metilcsoportok szabadulnak fel, melyek egyből átalakulnak formaldehiddé. Ekkor a metilezett vegyületek mérhető mennyisége csökken, amellyel párhuzamosan nő a szabad formaldehid koncentrációja.

A paprikalevélben, a különböző metilezett vegyületek közül, az általunk alkalmazott OPLC-s rendszerrel a kolin, trigonellin és a trimetil-lizin (TML) volt azonosítható. Ezek közül csak a kolin tudtuk következetesen kimutatni és megbízhatóan értékelni (17. ábra).

A **fogékony** paprikavonal kontrollként használt, vízzel infiltrált szövege és közvetlenül a fertőzés után vett minta között nem volt lényeges eltérés sem a kolin, sem a formaldehid tartalom tekintetében. Az inokulálást követő egy óra elteltével, a kolin mennyisége a fertőzött szövetekben emelkedett, amely véleményünk szerint elsősorban a környező, nem infiltrált szövetekből való transzporttal magyarázható. Ezt követően a kolin a 12. óráig igen jelentős, folyamatos csökkenést mutatott anélkül, hogy a formaldehid mennyisége növekedett volna. A formaldehid az inokulálás pillanatától folyamatosan csökkent és csak 6 óra elteltével kezdett emelkedni, aminek következtében a két görbe a 12 óra eltelté előtt metszette egymást.

A **Bs-2** gént tartalmazó növény reakciójának kezdetén azonosságok fedezhetők fel a fogékony növényben történő változásokkal. A kolin mennyiségét mutató görbe a fogékony növényéhez hasonló tendenciájú csökkenést mutatott, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben nem a 12., hanem már a 6. órában csökkent mélypontra a kolin mennyisége, amit hirtelen növekedés követett. A formaldehid mennyisége a fertőzést követő első órában a fogékony növényhez hasonlóan lecsökkent, de a *Bs-2* gént tartalmazó növényben ezt a 2. órában erőteljes növekedés követte. Eddig az időpontig, a kolin és a formaldehid mennyisége, az elméletileg várt, fordított arányban változott.

A megnövekedett formaldehid szint egybeesik a *Bs-2* gén működésbe lépésének feltételezett időpontjával. Ez megerősíti azt a kórtani megfigyelést, miszerint a specifikus rezisztencia gén



17. ábra A kolin (kék vonal) és a formaldehid (rózsaszín vonal) mennyiségének változása fogékony (F), valamint *Bs-2* (B) illetve *gds* (G) gént tartalmazó paprikavonalak leveleiben *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal való fertőzés hatására (C – vízzel infiltrált kontroll)

reakciója, a védekezésben betöltött szerepének megfelelően, az általános védekezési reakcióhoz képest később lép működésbe.

A *gds* gént tartalmazó növények kolin tartalma volt a legmagasabb a vizsgált paprikavonalak közül. A kontrollként használt, vízzel infiltrált szövetekhez képest, a közvetlenül a baktérium szuszpenzióval való infiltrálás után vett szövetminták kolin tartalma jelentősen lecsökkent. A csökkenés mértéke az első óra végéig töretlenül folytatódott és ettől kezdve a kolin mennyisége a 6. óráig alacsony szinten maradt, majd emelkedni kezdett. A formaldehid mennyisége a vízzel infiltrált kontroll szövetekben, és a közvetlenül a fertőzés után vett szövetmintákban nem mutatott lényeges eltérést. Az infekciót követő egy órán belül viszont meredeken emelkedve hirtelen elérte a maximum értéket, miközben a két vegyület mennyiségét mutató görbék a 30. percben metszették egymást. Ezután a formaldehid mennyisége az első órától a 12. óráig folyamatos csökkenést mutatott úgy, hogy a 6. órában bekövetkezett a görbék második metszéspontja. A formaldehid mennyisége a 12 óra múlva visszaállt a kiinduláskor mért értékre.

A metilezett vegyületek vizsgálata során, a három különböző reakciótípusú paprikavonal kolin tartalmát illető változások dinamizmusában jelentős eltérést észleltünk.

A fogékony növények esetében a kolin mennyisége csak nagyon lassan csökken és ezzel egyidőben a formaldehid mennyiségében nem észlelhető a gyors reakcióra utaló változás.

A *Bs-2* specifikus rezisztencia gént tartalmazó paprikavonal kolin, valamint formaldehid tartalmának változása a kórokozó blokkolására nem elegendő, csak egy közepes hatékonysággal működő általános védekezési reakcióra enged következtetni, mely a szövetmegtartás mértéke alapján, fenotípusosan is igazolható volt. A *Bs-2* gén kódolta specifikus védekezési reakció esetén a kórokozó gátlása más biokémiai folyamat alapján történik.

A *gds* gén működésének eredményeként, az inokulálás pillanatában beinduló demetileződés következtében a kolin és a formaldehid mennyisége ellentétes irányú változást mutatott. A kolin gyors demetileződésének következtében a formaldehid mennyisége azonnal növekedésnek indult, és egy órán belül elérte a maximumot. Ezzel a védekezési reakció alaplépése lezajlott. A formaldehid mennyisége ezek után csökkenni kezdett és beindult a kolin mennyiségének lassú növekedése.

4.6. Az általános és specifikus növényi védekezési reakciók kölcsönhatásának genetikája

A paprika rezisztencia nemesítésben történő hasznosítása érdekében kezdtük el a *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal szembeni védekezésben alkalmazott, specifikus *Bs-2* gén és a *gds* gén külön-külön történő megismerését követően, a két gén kölcsönhatásának tanulmányozását (Csilléry és mtsai, 2007). A *Bs-2* és *gds* gének öröklődésmenetének pontos vizsgálhatósága miatt, valamint ezen gének által szabályozott kórélettani folyamatok fenotípusos megnyilvánulásának egzakttsága miatt, dihaploid (DH) vonalakkal dolgoztunk.






A domináns *Bs-2* gént ($Bs-2/Bs-2 \ gds^+/gds^+$) és a recesszív *gds* gént ($Bs-2^+/Bs-2^+ \ gds/gds$) homozigóta állapotban tartalmazó DH-99-487 illetve DH-99-269 vonal összekeresztezésével előállított F1 hibridek ($Bs-2/Bs-2^+ \ gds/gds^+$) meglepetésünkre nem azt a fenotípust mutatták amit *Bs-2* gén dominanciájának megfelelően vártunk. A *Bs-2* génre utaló sötétlila elszíneződés helyett az inokulált szövetek csak enyhén lilás elszíneződést mutattak. Ugyanakkor, a szövetek különböző mértékben zöldek maradtak, esetenként megvastagodtak (Szarka és mtsai, 2002), vagyis F1 nemzedékben a domináns génnel szemben a recesszív gén fenotípusa is megjelent, annak ellenére, hogy heterozigóta állapotban volt. A számunkra eddig ismeretlen fenotípusú kórtünet öröklődésére az F2 nemzedék elemzésétől vártunk magyarázatot (1. táblázat).

Klasszikus esetben, domináns és recesszív rezisztenciagént hordozó növények hibridjének F2 nemzedékében, a várható fenotípusos hasadási arány: domináns rezisztens 12/16 (75,0 %), fogékony 3/16 (18,75 %), recesszív rezisztens 1/16 (6,25 %).

A fogékony fenotípus közel a vártnak megfelelő arányban (19,0 %) jelent meg. Annak alapján, hogy a *Bs-2* gént és a *gds* gént tartalmazó vonalak keresztezésével előállított F2 nemzedékben fogékony egyedek is megjelentek, egyúttal bizonyítást nyert, hogy a *Bs-2* és a *gds* gén nem egy lókuszon helyezkednek el. A fogékony tünettípus mellett, a recesszív *gds* gén homozigóta állapotára utaló fenotípust is a várt 6,25 % hoz közeli arányban (7,5%) kaptuk meg.

Ugyanakkor, a domináns *Bs-2* gén klasszikus kórtüneteit a várt 75,0 % helyett csak 17,5 %-ban észleltük. Megtaláltuk viszont az F1-ben megismert, lilászöld fenotípust ($Bs-2^+/Bs-2 \ gds^+/gds$), vagyis a kettős heterozigótát. Az F1-re jellemző lilászöld kórtünet mellett egy újabb fenotípust észleltünk, amelyen a *Bs-2* gén jelenlétére utaló lilás elszíneződést a *gds* génre jellemző, világoszöld szövetvastagodás olyannyira elfedte, hogy lila elszíneződés csak az erek mentén alakult ki.

Az utóbbi két tünettípus számunkra különösen érdekes volt, ugyanis azt sugallta, hogy a két egymástól függetlenül öröklődő gén, egymással kölcsönhatásban egy bonyolult védekezési rendszert alakít ki.

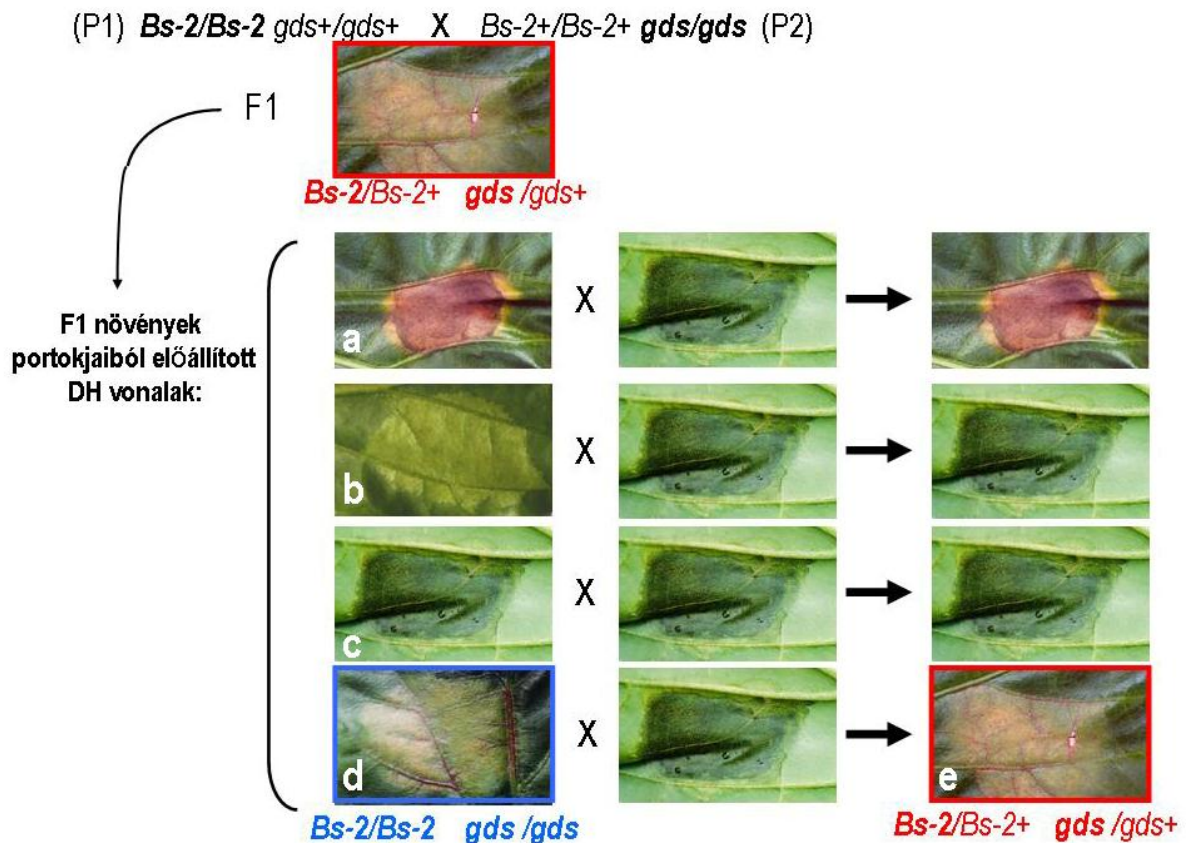
genotípusok	megfigyelt kórtünet fenotípusa		várt arány %	mért arány %
<i>Bs-2/Bs-2 gds⁺/gds⁺</i>	LILA		75.00	17.5
<i>Bs-2/Bs-2⁺ gds⁺/gds⁺</i>				
<i>Bs-2/Bs-2 gds/gds⁺</i>	LILÁS ZÖLD			41.5
<i>Bs-2/Bs-2⁺ gds/gds⁺</i>				
<i>Bs-2/Bs-2 gds/gds</i>	ZÖLD, ÉRMENTÉN LILA			14.5
<i>Bs-2/Bs-2⁺ gds/gds</i>				
<i>Bs-2⁺/Bs-2⁺ gds⁺/gds⁺</i>	INFILTRÁLT, PUSZTULT		18.75	19.0
<i>Bs-2⁺/Bs-2⁺ gds/gds⁺</i>				
<i>Bs-2⁺/Bs-2⁺ gds/gds</i>	ZÖLD, SZÖVETVASTAGODÁS		6.25	7.5
ÖSSZESEN			100.00	100.0

1. táblázat A *Bs-2* gént illetve a *gds* gént homozigóta állapotban tartalmazó DH szülővonalak keresztezésével előállított F2 nemzedékben várható 9 féle genotípus és az F2 populáció egyedeinek *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* fertőzéssel szembeni reakciója alapján meghatározott fenotípusai.

(Csilléry és mtsai, 2007)

E tünettípusokat mutató növények pontos genetikai elemzését a domináns *Bs-2* gént (*Bs-2/Bs-2 gds⁺/gds⁺*) és a recesszív *gds* gént (*Bs-2⁺/Bs-2⁺ gds/gds*) homozigóta állapotban tartalmazó vonalaink összekeresztezésével előállított F1 növények portokjaiból Mitykó Judit által előállított DH vonalakon végeztük (Mitykó és mtsai, 1995).

A DH egyedek inokulálása után négy féle fenotípus jelent meg (18. ábra), a *Bs-2* génre jellemző lila elszíneződés (a), a *gds* génre jellemző világoszöld színű szövetvastagodás (b), a fogékonyásra utaló szövetpusztulás (c) és az infiltrált szövetek megvastagodásával és érmenti lilulással járó (d) fenotípus. Egy fogékony DH vonallal tesztkeresztezéseket készítettünk mind a négy féle fenotípusra. Az a) b) és c) fenotípus esetében, a tesztkeresztezés és az utódokon végzett inokulálás, igazolta e három, jól ismert tünettípushoz (a, b, c) tartozó genotípust.



18. ábra A *Bs-2* gént és a *gds* gént heterozigóta állapotban tartalmazó F1 növényekből előállított DH növények genotípusának megállapítása *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal szemben fogékony paprikavonallal végzett teszt keresztezéssel, a kettős homozigóta genotípus kiválasztása és kórtünetének meghatározása érdekében (Csilléry és mtsai, 2007 nyomán)

A szövetvastagodással, érmelléki lilulással járó fenotípus (d) fogékony DH vonallal való visszakeresztezésével előállított utódok tünete (e) okozott számunkra meglepetést. Ez a tünet ugyanis azonos volt a *Bs-2/Bs-2 gds⁺/gds⁺* x *Bs-2⁺/Bs-2⁺ gds/gds* alapkeresztezéskor kapott F1 növények lilászöld tünetével, amelyhez tudjuk, hogy a kettős heterozigóta genotípus (*Bs-2/Bs-2⁺ gds/gds⁺*) tartozott. E szerint a tesztkeresztezéssel előállított lilászöld tünethez is a kettős heterozigóta genotípus kell hogy tartozzon. Ez csak úgy lehetséges, ha az ér menti lila elszíneződést mutató DH vonal kettős homozigóta volt, mivel a visszakeresztezéskor használt fogékony DH partner (*Bs-2⁺/Bs-2⁺ gds⁺/gds⁺*) sem a *Bs-2*, sem a *gds* gént nem tartalmazta.

Genetikai vizsgálataink alapján a két gén kölcsönhatásáról megállapítható, hogy akár homozigóta, akár heterozigóta állapotban van a domináns *Bs-2* gén, működésére csak

halványlila elszíneződés utal, ha a *gds* gén heterozigóta állapotban jelen van, mert szövetmegtartó képessége így is érvényesül.

A domináns *Bs-2* gén működését a homozigóta állapotban levő, recesszív *gds* gén szinte teljesen elnyomja. Ebben az esetben a *Bs-2* gén működésére csak az erek menti szövetek lilulása utal.

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a két gén egymástól függetlenül kombinálódik, nincs köztük genetikai kapcsoltság, csak funkcióbeli kapcsoltság. Ezzel magyarázható a dominanciaviszonyoktól eltérő fenotípusok, kórtünetek megjelenése. A *gds* gén és a *Bs-2* gén között ebben az esetben egy kórokozó okozta stressz teremt kapcsolatot. Természetes körülmények között, a stresszre az alacsony ingerküszöbvel rendelkező, nagy reakciósebességű és ezen okok miatt szövetmegtartásra képes általános védekezési reakció indul először és csak sikertelensége esetén lép működésbe a specifikus védekezési reakció. A két gén egyidejű működésének vizsgálatához olyan mesterségesen kialakított magas stressz szintre volt szükség, amely a természetben sosem fordulhat elő. A kísérletben használt, 10^8 baktériumsejt/ml koncentrációjú szuszpenzióval kiváltott stresszre, a *gds* gén mellett, már a magasabb ingerküszöbvel bíró *Bs-2* gén is működésbe lép és fenotípusosan is megjelenik. A mesterségesen kialakított provokatív környezetben kiválóan lehetett vizsgálni a két gén által irányított védekezési reakciók sebességét, sebességkülönbségét, melynek eredménye a leírt fenotípusokban nyilvánult meg.

Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a két gén működésbe lépésének ingerküszöb által meghatározott egymásutánisága miatt, a szövetvastagodással és enyhe lilás színnel járó, illetve a szövetvastagodás mellett csak az erek menti lilás elszíneződést mutató tünettípusok természetes fertőződés esetén nem jelenhetnek meg.

4.7. A *gds* és a *Bs-2* gén kódolta kórtünetek biokémiai háttere

A szövetelváltozásokban megnyilvánuló kórtünetek alapján történő génkövetés helyességét és a gének működése közti alapvető különbséget a biokémiai folyamatok megismerése tovább erősítette.

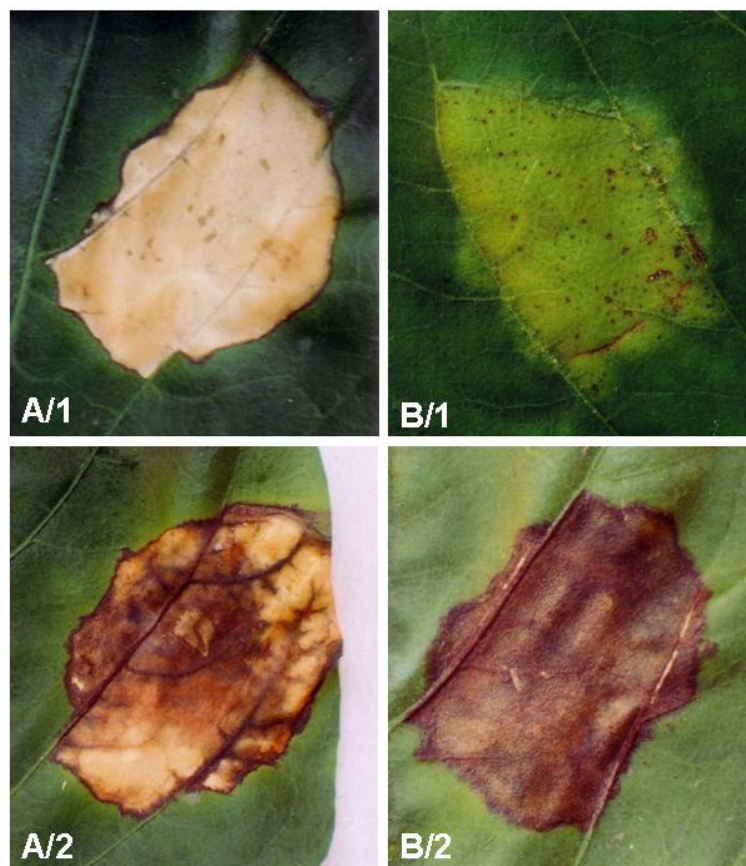
A növényi betegség ellenállóság megnyilvánulását kezdettől fogva a kórokozók által fertőzött szövetrészek gyors pusztulásában vélték felismerni (Ward, 1902; Holmes, 1929). A fertőzött szövetrészek gyors pusztulását, vagyis a hiperszenzitív reakciót (HR) nem-gazda kapcsolatokban is leírták (Klement és mtsai, 1964). A rezisztencia nemesítés kezdete óta, több mint hat évtizede, a szelekció a HR alapján történik, vagyis a pusztulást a rezisztencia elválaszthatatlan velejárójának tekintették.

Mind gazda rezisztencia, mind nem-gazda rezisztencia esetén a HR kialakulásához, mesterséges fertőzés esetén pontosan meghatározható stressz szintre van szükség. A növényeknek az a képessége, amellyel a HR küszöbértékét el nem érő, vagyis a természetes fertőződési folyamat során előforduló inokulum koncentráció okozta stresszeket szövetpusztulás nélkül védi ki, hosszú ideig elkerülte a kutatók figyelmét. A növényeknek ez a képessége meghatározó szerepet játszik a betegségellenállóság kialakításában (Szarka és Csilléry, 1995). Genetikai és kórtani vizsgálatok alapján a növényeknek ezt a tulajdonságrendszerét általános védekezési reakciónak (GDR) nevezték el. A GDR a megtámadott növényi sejtek folyamatos védelmét szolgáló aspecifikus, aktív reakció, míg ezzel szemben a HR a rezisztenciának nem oka, hanem következménye (Király, 1972).

Munkánk során a hiperszenzitív reakció, az általános védekezési reakció és a specifikus rezisztenciagénhez kötött védekezési reakció kórtüneteit vizsgáltuk (19. ábra).

Nem-gazda kapcsolatban, az alacsony GDR-rel bíró DH-99-501-es vonal *P. s. pv. phaseolicola* baktériummal infiltrált szövetei gyorsan kiszáradva, HR-t adtak (A/1), mely köztudottan magas hidrogén-peroxid (H_2O_2) koncentráció jelenlétében alakul ki. A magas szintű GDR-re képes DH-99-487-es vonal levelének infiltrált foltjai enyhén klorotizálódtak, elszíneződést nem mutattak (B/1). A H_2O_2 által kiváltott HR elmaradása feltételezhetően a magas szintű GDR-re jellemző erős antioxidáns hatásnak tulajdonítható.

Gazda rezisztencia esetén, a DH-99-501-es vonal *X. c. pv. vesicatoria* baktérium hatására kifejlődött kórtünete (A/2) két tulajdonság összhatásának eredője, melyben a szövetkiszáradás az alacsony szintű GDR, míg a lilás elszíneződés a *Bs-2* gén kódolta specifikus reakció megnyilvánulása. Az ilyen, gyors szövetpusztulással és jellemző szövetelszíneződéssel járó reakció alapján, véleményünk szerint helytelenül, történik a szelekció a rezisztencia nemesítés



19. ábra A *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal szemben *Bs-2* specifikus rezisztencia gént tartalmazó, alacsony (DH-99-501) (A) és magas szintű (DH-99-487) (B) általános védekezési reakcióval bíró paprikavonalak reakciói *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (1) és *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (2) baktérium 10^8 sejt/ml koncentrációjú szuszpenzióval végzett inokulálás hatására

során. A kórtünetre, fenotípusa alapján, a H_2O_2 -kitörésre utaló szövetpusztulás jellemző, amelyet az irodalomban tévesen, a specifikus *R* gének velejárójának tekintenek, holott ez egy másik tulajdonságtól, a GDR-től függ (Szarka és mtsai, 2006). Ezt bizonyítja a magas szintű GDR-rel bíró és *Bs-2* specifikus rezisztencia gént is tartalmazó DH-99-487-es vonal *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal szembeni reakciója (B/2). Ebben az esetben az inokulált szövetrész pusztulás nélkül, lilás elszíneződést mutatott. Vizsgálataink szerint az inokulálást követő 30. perctől a 6. óráig terjedő időszakban ugyan H_2O_2 termelődés figyelhető meg, de ebben az esetben a H_2O_2 csak a *Bs-2* gén működéséhez szükséges jelzőmolekulaként szerepel, szövetpusztulást nem okoz. A HR elmaradásáért, vagyis a reaktív oxigénformák okozta szövetpusztulás megakadályozásáért, ebben az esetben is feltehetően a nagy peroxidáz enzimaktivitással jellemezhető GDR felelős.

Az általános védekezési reakció minden növény alapvető tulajdonsága. Paprika esetében a GDR-nek nevezett tulajdonságrendszer genetikailag meghatározott, leghatékonyabb eleme a recesszív *gds* gén. A specifikus rezisztencia génekre jellemző, a kórokozót szövetpusztulás árán kizáró stratégia helyett, a *gds* gén a növényi szövetekre jellemző általános érvényű reakcióval képes megelőzni, megakadályozni a kórokozók pusztítását. Ez a rendkívül gyors reakció a növekedés természetes folyamatára épülő sejtnagyobbodásban, sejtosztódásban nyilvánul meg fenotípusosan (20. ábra).



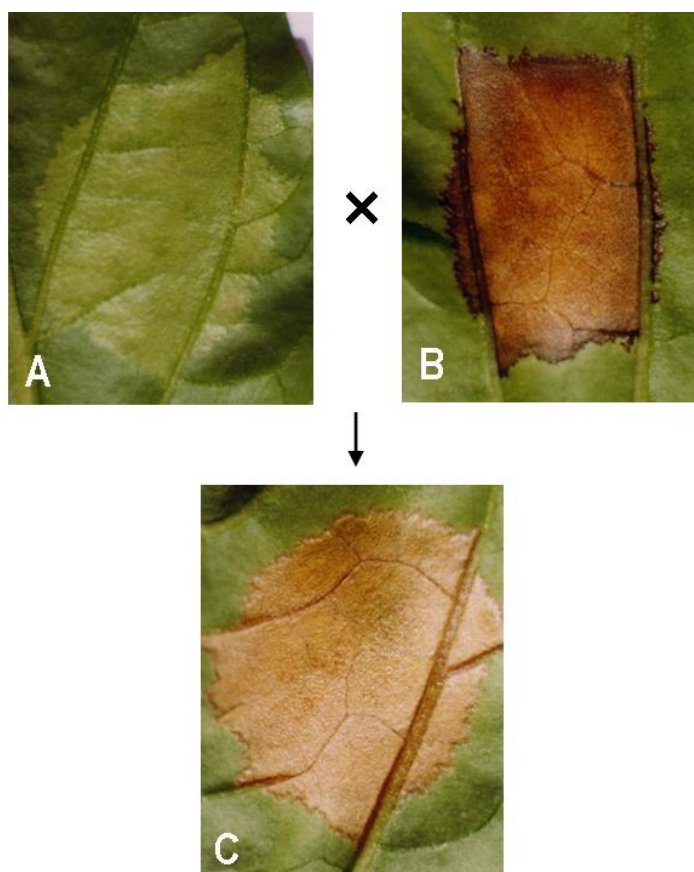
20. ábra A nem kórokozóspecifikus, általános védekezési rendszert szabályozó, *gds* gént tartalmazó DH-99-269- es paprikavonal reakciója *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (a) és *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (b) baktérium 10^8 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziójával végzett inokulálás hatására

A *gds* gén irányította, nem kórokozóspecifikus általános védekezési rendszerre jellemző, sejtnagyobbodással, sejtosztódással járó tünettípus kialakításában fontos szerepe lehet a demetileződés során keletkező formaldehidnek, mely kis mennyiségben sejtosztódást stimuláló hatású. A *gds* gén működése során stimulált sejtnagyobbodásos, sejtosztódásos reakció azért is figyelemre méltó, mivel a növények levelei nem sejtosztódásos, hanem sejtnagyobbodásos növekedéssel érik el kifejlett méretüket.

A *gds* gént tartalmazó növény fertőzött szöveteiben a H_2O_2 mennyisége nem változik sem természetes fertőződést, sem nagy stressz-hatást jelentő mesterséges fertőzést követően. A *gds* gén által szabályozott betegségellenállási reakcióban meghatározó szerepe van a peroxidáz enzimnek, mely már a fertőzés pillanatától a stressz erősségének megfelelően aktivizálódva, a szövetmegtartás irányába hat.

Az általános védekezési rendszert kódoló *gds* gén és a specifikus védekezési reakcióért felelős *Bs-2* gén növényi betegségellenállóságban betöltött eltérő szerepét, működésbe lépésük sorrendiségét, valamint kórtünetekben megnyilvánuló egymásra hatását igazoló biokémiai vizsgálatok megbízhatósága érdekében a két gént egy növénybe építettük be.

A recesszív *gds* (DH-99-269) és a domináns *Bs-2* gén (DH-99-487) F1 nemzedékben történő kölcsönhatásának vizsgálatához a *X. c. pv. vesicatoria* baktérium 10^8 sejt/ml koncentrációjú szuszpenzióját használtuk az inokuláláshoz (21. ábra). Ez a nagy koncentráció azért volt szükséges, hogy a magas ingerküszöbvel jellemezhető *Bs-2* gén a *gds* génnel egyszerre lépjen működésbe, mert csak így módon lehet összehasonlítani az általános és a specifikus reakció sebességét. Természetes fertőződés esetén ugyanis a gének funkciójából következően ez a versenyhelyzet sohasem alakulhat ki.



21. ábra A recesszív *gds* gént tartalmazó DH-99-269 (A) és a domináns *Bs-2* gént tartalmazó DH-99-487 (B) paprikavonal keresztezésével előállított F1 nemzedék (C), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktérium 10^8 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziójával kiváltott kórtünete a levél fonáka felől

Az F1 nemzedék egyedeiben a fertőzés hatására, a *Bs-2* gén dominanciája ellenére, nem képződött olyan mennyiségű H_2O_2 , mely szövetkiszáradást eredményezett volna. A fertőzött szövetfoltok megvastagodtak és homogén módon elszíneződtek a bordóslila szín egy világos árnyalatára. A sejtnagyobbodáson alapuló szövetvastagodás a heterozigóta állapotban levő, recesszív *gds* gén, a bordóslila elszíneződés a szintén heterozigóta állapotban levő, domináns *Bs-2* gén működésére utal. A fertőzött szövetek morfológiai változása erős antioxidáns hatásra enged következtetni, de a nagy dózisú fertőzés hatására mégis képződött olyan mennyiségű H_2O_2 , mely a *Bs-2* gén működésbe lépéséhez szükséges. A *Bs-2* gén kódolta specifikus reakció beindult ugyan, de a jellemző fenotípus nem alakult ki.

A két gén betegség kivédésében betöltött szerepének, kölcsönhatásának vizsgálatára a *gds* és *Bs-2* gént egyaránt homozigóta állapotban tartalmazó DH vonalak a legalkalmasabbak (22. ábra).



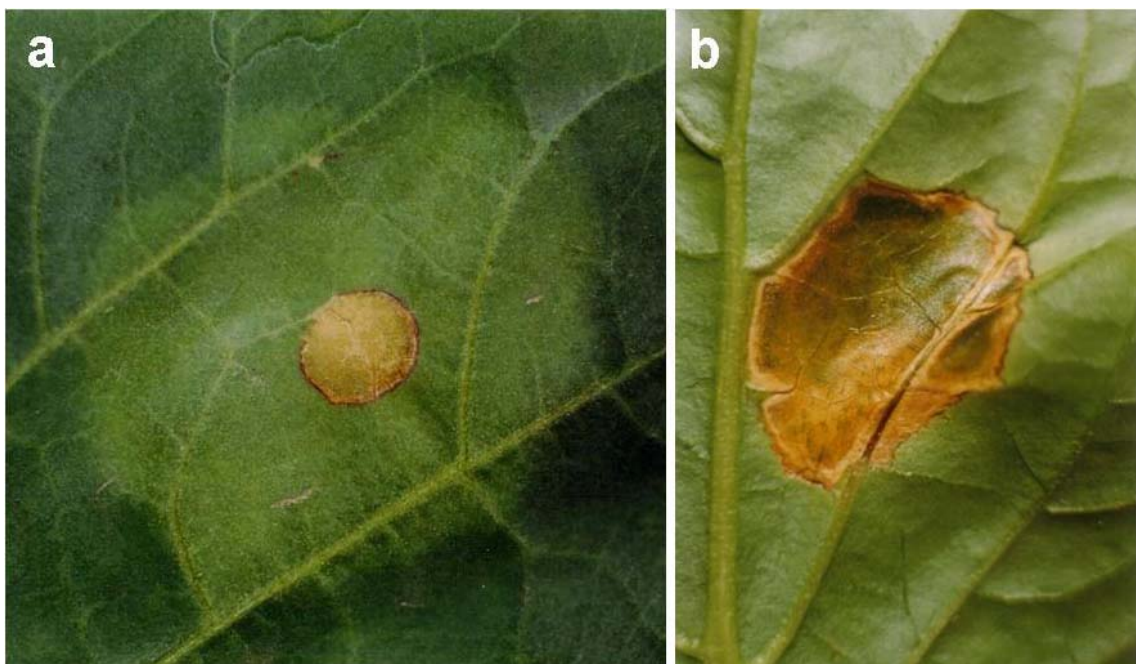
22. ábra A recesszív *gds* gént illetve a domináns *Bs-2* gént homozigóta állapotban tartalmazó paprikavonal szöveti elváltozása *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktérium 10^8 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziójával végzett inokulálás hatására

A *gds* és *Bs-2* gént egyaránt homozigóta állapotban tartalmazó növények sérülésmentesen infiltrált levéllemeze elszíneződés nélküli szövettömörődéssel reagált a *X. c.* pv. *vesicatoria* fertőzésre. A fenotípus alapján megállapítható, hogy az általános védekezési rendszer működését homozigóta állapotban tökéletesen biztosító *gds* gén szabályozta reakció olyan

gyors, hogy a fertőzés okozta erős stressz hatására sem képződött annyi H_2O_2 , amennyi a *Bs-2* gén működésbe lépéséhez szükséges (13. ábra). A *Bs-2* rezisztencia gén működésére utaló lilás elszíneződés csak az ereken illetve az erek mentén alakult ki. Ennek feltételezett oka, hogy a fonákon a levéllemez síkjából kiálló erek az inokulum sztómákon át történő beprézeléséhez szükséges nyomás következtében sérülnek, megroppannak (6. ábra).

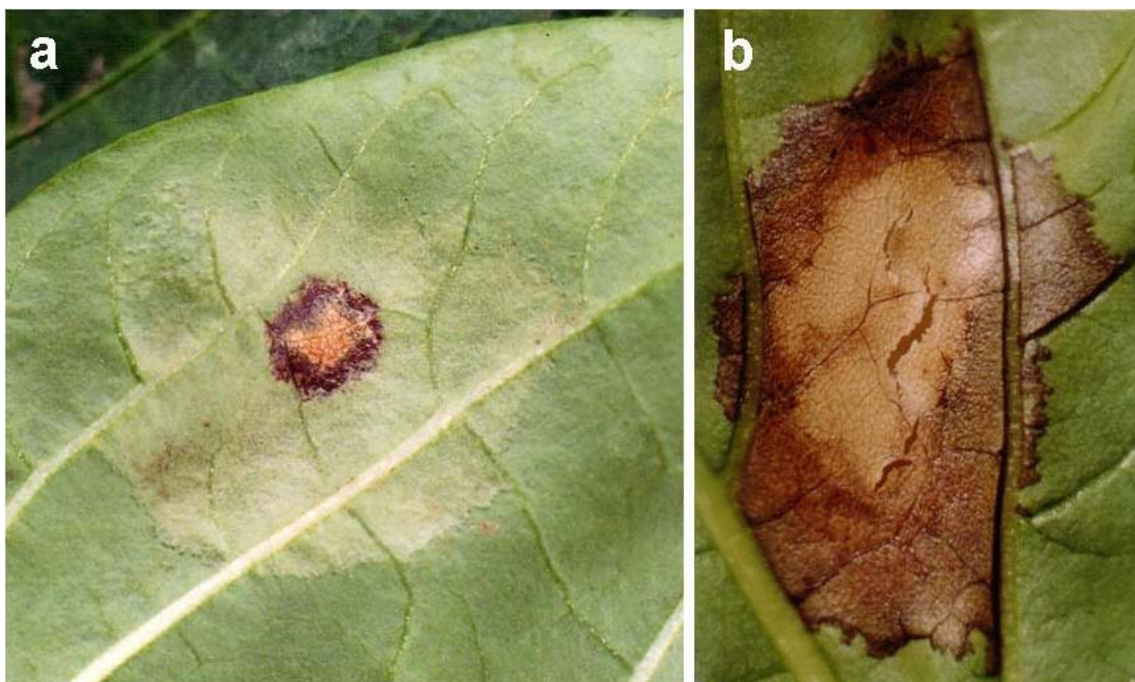
A növényi sejtek mechanikai sérülésének a *gds* és a *Bs-2* gén működésére gyakorolt hatását vizsgálva újabb összefüggéseket ismertünk meg a két gén betegségellenállóságban betöltött szerepét illetően. A kísérlet során az erek közti levéllemezre egy kis pontban, a szövet infiltrálódását eredményező nyomást gyakoroltunk, majd baktérium szuszpenziót préseltünk a sejtközötti járatokba olyan elhelyezésben, hogy a fertőzött szövetfolt közepére kerüljön a nyomástól sérült szövetpont (7. ábra).

A *gds* gént homozigóta állapotban tartalmazó növények fertőzött szövetei a *gds* génre jellemző reakciót adták, de a sértett szövetpontban fogékony gazda-patogén kapcsolatra utaló zsírfolt alakult ki (23. ábra). Ez alapján megállapítható, hogy csak az egészséges sejtek képesek általános védekezési reakcióra.



23. ábra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal inokulált, *gds* gént tartalmazó DH-99-269 paprikavonal szövetmegtartással reagáló egészséges és a nyomással sértett, zsírosodó, fogékonyagra utaló szövete (a), valamint a fogékony DH-99-71 paprikavonal fogékony kórtünete (b)

A *gds* és *Bs-2* gént homozigóta állapotban tartalmazó növények fertőzött szövetfoltja a vártnak megfelelően a *gds* génre jellemző, elszíneződés nélküli szövetvastagodással reagált, mely arra utal, hogy a nem sérült sejtekben az általános védekezési rendszer zavartalanul működik. A nyomással sértett szövetpontban a *Bs-2* gén működésére utaló lilás elszíneződés alakult ki, amely a specifikus rezisztencia génre jellemző hatékonysággal blokkolta a kórokozót (24. ábra).



24. ábra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal inokulált, a *gds* és *Bs-2* gént homozigóta állapotban tartalmazó paprikavonal egészséges szövetének általános védekezési reakciója (*gds* gén) és nyomással sértett szövetének specifikus védekezési reakcióra (*Bs-2* gén) utaló lila elszíneződése (a), valamint egy *Bs-2* gént tartalmazó vonal specifikus reakciója (b)

A *gds* és *Bs-2* gént homozigóta állapotban tartalmazó paprikanövények és a *X. c.* pv. *vesicatoria* baktérium kölcsönhatásának megismeréséhez további adalékot szolgáltatott az a kísérlet, melynek során a *gds* génre jellemző, már kifejlődött, elszíneződés nélküli szövetvastagodással reagáló szövetfoltra gyakoroltunk infiltrálódást eredményező nyomást. A sérült sejtek elszíneződés nélkül kiszáradtak. A *Bs-2* gén működésére utaló lilás elszíneződés elmaradása egyértelműen jelzi, hogy az általános védekezési reakcióra jellemző tünet kialakulását követően a baktérium már nem aktív.

4.8. Új tudományos eredmények

A paprikában leírt, új tudományos felismerésnek számító, általános védekezési rendszert kódoló *gds* gén örökléstani és kóréletti sajátosságainak biokémiai folyamatok alapján történő jellemzését az alábbiakban foglalom össze. A növények, így a paprika általános védekezési rendszeréről még keveset tudunk, ezért a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktériummal szembeni specifikus rezisztenciáért felelős *Bs-2* génhez viszonyítva végeztem a *gds* gén által biztosított, eddig ismeretlen védekezési forma bemutatását.

1.

A fertőzés hatására bekövetkező glükóztartalom változások a *gds* gént illetve a *Bs-2* gént tartalmazó növényekben mind időben, mind mennyiségben eltérőek és jól egyeztethetőek voltak az adott gazdanövény kórtüneteit jellemző szövetváltozásokkal.

A *gds* gén biztosította általános védekezési reakció egységnyi mesterségesen fertőzött levélfelületre eső szénhidrát felhasználása nagyobb, mint a specifikus reakcióé. Természetes fertőződés esetén viszont a néhány óra alatt lezajló, 10-15 sejtre korlátozódó általános védekezési reakció sokkal gazdaságosabb, mint az 5-6 nap alatt kifejlődő, 4-5 mm-es átmérőjű léziót eredményező specifikus reakció.

2.

Vizsgálataim alapján megállapítható, hogy a *gds* gént tartalmazó növényeknek nincs szükségük a hidrogén-peroxid által közvetített oxidatív kitörésre a védekezéshez, szemben a specifikus rezisztenciagéneket tartalmazó, gyors szövetpusztulással reagáló növényekkel.

3.

A *gds* gén kódolta általános védekezési rendszer esetében a szalicilsav, mint jelzőmolekula, nem vesz részt a védekezés szabályozásában. A *gds* gén igen alacsony szabad szalicilsav szint mellett, vagy annak teljes hiányában biztosít sejtpusztulás nélküli, széles spektrumú rezisztenciát.

4.

A *gds* gént tartalmazó növények kiemelkedő antioxidáns kapacitása alapvető stratégiai jelentőségű a szövetmegtartást célzó általános védekezési reakció során.

5.

A *gds* gén irányította általános védekezési reakció esetében a formaldehid előanyagának tekinthető kolin és a formaldehid mennyiségének egymással szorosan összefüggő, ellentétes irányú gyors változása megy végbe.

A fertőzést követő *gyors* demetileződés során keletkező, antimikrobiális hatású formaldehidnek jelentős hatás tulajdonítható a növényeket ért stressz kivédésében.

6.

Genetikai vizsgálatok alapján bebizonyosodott, hogy a *gds* gén és a *Bs-2* gén egymástól függetlenül öröklődik, de szoros funkcióbeli kapcsoltság van közöttük, melyet a kórokozó okozta stressz teremt meg. A stressz által kiváltott biokémiai folyamatok vizsgálatának eredményei megerősítették azt a kórtani megfigyelést, miszerint az alacsony ingerküszöbvel és nagy reakciósebességgel rendelkező általános védekezési reakció indul be először és csak sikertelensége esetén lép működésbe a specifikus védekezési reakció.

7.

A *Bs-2* gén dominanciája ellenére, a *Bs-2/Bs-2 gds⁺/gds⁺* x *Bs-2⁺/Bs-2⁺ gds/gds* kombináció F1 nemzedékének egyedeiben, a recesszív *gds* génre jellemző fenotípus megjelenése, a szövetmegtartás, antioxidáns hatás érvényesülésére utal, de a nagy dózisú fertőzés esetén mégis képződik olyan mennyiségű hidrogén-peroxid, mely a *Bs-2* gén működésbe lépéséhez elegendő.

Az F2 nemzedék kettős homozigóta (*Bs-2/Bs-2 gds/gds*) egyedeiben, az általános védekezési rendszer működését homozigóta állapotban tökéletesen biztosító *gds* gén szabályozta reakció során, olyan erős antioxidáns folyamatok indulnak be, melyek hatékonyan előzik meg a kórokozó okozta pusztítást. A *Bs-2* gén működésére utaló szöveti elváltozások csak a fertőzés okozta esetleges sérülések helyén figyelhetők meg, ahol az általános reakció működésének zavara miatt hidrogén-peroxid képződött. Itt a hidrogén-peroxid, mint jelzőmolekula váltja ki a *Bs-2* gén működésbe lépését.

A növényi sejtek sérülésének a *gds* és a *Bs-2* gén működésére gyakorolt hatását vizsgálva megállapítható, hogy a *gds* gén az egészséges sejteket védi a fertőzéssel szemben, tehát az általános védekezési reakció preventív. Egészséges sejtekben a *gds* gén mellett a *Bs-2* gén teljesen inaktív. A sérült sejtek nem képesek általános védekezési reakcióra. A *Bs-2* gén meghatározta specifikus védekezési reakció a kórokozó által megtámadott, megbetegített sejtek reakciója.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Paprikában az eddig ismeretlen védekezési folyamatot szabályzó, általános védekezési rendszert kódoló *gds* gén nem-gazda és gazda kapcsolatokat is magában foglalva, széles spektrumú ellenállóságot biztosítva, a növényi immunrendszer szerepét tölti be.

A *gds* gén által meghatározott általános védekezési rendszert, a kórtünetekben megnyilvánuló szövettani változások mellett, alapvető biokémiai folyamatok segítségével kíséreltük meg jellemezni és a betegség ellenállóságban betöltött szerepét a *Bs-2* specifikus rezisztenciagénnel való kölcsönhatásban feltárni.

A paprika fogékony és betegségellenálló DH vonalaiban *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal végzett fertőzés hatására bekövetkező élettani változások kimutatására egyik legalkalmasabb vegyület a növény energetikai alapját képező **glükóz**, illetve annak mennyiségi változása.

A fogékony, a specifikus és az általános védekezési reakciót adó növények fertőzött szöveteiben bekövetkezett glükóztartalom változások mind időben, mind mennyiségben eltérőek és jól egyeztethetőek voltak az adott gazdanövény kórtüneteit jellemző szövetelváltozásokkal.

A kórokozó fölényét jelző **fogékony** gazda-patogén kapcsolatban a lassan kifejlődő betegség fokozott energia felhasználással jár, mely a növény tartalékainak kimerüléséhez és pusztuláshoz vezethet.

A *Bs-2* gént tartalmazó paprikavonal inokulált szöveteiben a glükóz mennyisége a fertőzést követően rohamosan csökkent, de egy óra elteltével a fertőzött szövetek glükóz koncentrációja visszaállt. A hatékony helyi válaszokra képes specifikus védekezési reakció egyszeri és energiatakarékos.

A *gds* gén biztosította általános védekezési rendszerrel bíró növények inokulált szöveteiben a glükóztartalom gyors változására csak indirekt módon, a szomszédos, nem inokulált levélszövetek cukortartalom változása alapján lehetett következtetni. A növényi betegségellenállóságban betöltött szerepének megfelelően az általános védekezési reakció gyorsaságban megelőzi a specifikus reakciót és vele ellentétben folyamatosan működik, ezért glükóz felhasználása nagyobb. A sejtfalerősítés illetve sejtnagyobbodás folyamán felhasználódott nagyobb glükózfogyasztást viszont bőségesen ellentételezi az a tény, hogy a megtámadott szövetek nem pusztulnak el.

A három növényi reakció glükózfelhasználás alapján történő összehasonlítását torzítja a természetes fertőződéshez képest nagy dózisban történő mesterséges inokulálás. Az

infiltrációs fertőzési módszer alkalmazásával kizárólag a különböző reakciótípusok egymáshoz viszonyított, egységnyi fertőzött szövetrésze eső energia igényét lehet meghatározni, nem pedig a felhasznált glükóz abszolút mennyiségét. Fontos megjegyezni a mesterséges fertőzés és a természetes módon történő fertőződés közti lényeges különbséget, hiszen az utóbbi esetben a három különböző minőségű gazda-patógén kapcsolatra, méretben igen eltérő lézió jellemző.

Fogékony gazda-patógén kapcsolatban a legnagyobb (5-6 mm) a lézió mérete, azaz a szövetpusztulás mértéke. Ebből következően legnagyobb az energia veszteség is, amely a meglévő szénhidrát készletek felhasználásából, illetve a betegség előrehaladtával a fotoszintézis gátlásából tevődik össze.

Specifikus rezisztencia, a *Bs-2* gén által irányított reakció esetén, a fogékony kórtüneteknél kisebb átmérőjű (2 mm) nekrotikus léziók fejlődnek ki. A kórokozó kismértékű szövetpusztulással történő lokalizálása a gazdanövény számára előnyös. Ennek újabb bizonyítékát szolgáltatja az inokulált szövetekben mért kismértékű glükózfelhasználás. Viszont a léziók túlzott mérete és túlzott száma esetenként olyan jelentős szövetvesztést okozhat, mint amilyen a fogékony gazda-patógén kapcsolatban tapasztalható.

A *gds* gén biztosította általános védekezési reakció egységnyi fertőzött levélfelületre eső szénhidrát felhasználása nagyobb ugyan, mint a specifikus reakcióé, de természetes fertőződés esetén ez csak az infekciós pont körüli 10-15 sejtre korlátozódik. Ezt a rendkívüli gazdaságosságot tovább növeli, hogy az infekciós pontban nincs sejtelhalás. Az általános védekezési reakció a növekedés természetes folyamatára épülő rendkívüli gyorsasága következtében képes betölteni a növényi immunrendszer szerepét, mely a folyamatos, intenzív glükózfelhasználásban is megnyilvánul.

A **hidrogén-peroxid** a növény-mikroba illetve gazda-kórokozó kapcsolatokban, mennyiségétől függően hol a gazdanövény sejtjeinek erősítését végzi, hol pedig pusztulását jelzi, okozza. A H_2O_2 ezen szerepei jól nyomon követhetők a növényi betegségellenállóság evolúciós folyamatán. Az általános védekezési reakció, a fogékony állapot illetve a specifikus védekezési reakció evolúciós egymásutánisága a kórtani vizsgálatok során már beigazolódott (Szarka és mtsai, 2002).

A növényeket minden biotikus stresszel szemben elsődleges védekezési frontként az általános védekezési reakció védi a sejtfal megerősítésével. A mikrobák számára fizikai akadályt jelentő sejtfal azonnali megerősítésében fontos szerepet játszanak a reaktív oxigénformák (ROS). A H_2O_2 a ligninszintézist, a fenolos vegyületek közti és a sejtfalfehérjék közti

keresztkötéseket indukálja, melynek következtében a sejtfal ellenállóbbá válik a kórokozók sejtfalbontó enzimeivel szemben (Brisson és mtsai, 1994). A sejtfalfehérjék közti keresztkötések kialakulása igen gyors, inger hatására 2-5 percen belül megindul és 20-30 percen belül végbemegy (Templeton és Lamb, 1988).

A nem-gazda rezisztencia elsődlegesen a sejtfalhoz kötött általános válaszokon alapul, melyekkel a növény sikerrel akadályozza meg különböző kórokozófajok támadását. Ilyen válaszok a ROS extracelluláris termelődése, a sejtfalvastagodás, a sejtfal lignifikációja, fenolok és flavonoidok fölhalmozódása, papillaformálás, melyek a kórokozó behatolási kísérletének pontjánál kifejeződő, erősen lokalizált válaszok (Heath, 2000).

Paprikában, a magas szintű általános védekezési reakcióért felelős *gds* gén, olyan hatékony sejtfal alapú, sejtet védő válaszokat biztosít, melynek során nem képződik nagy mennyiségű H_2O_2 . A *gds* gén számos, a paprikával kompatibilis és inkompatibilis kórokozó fajjal szemben biztosítja a megtámadott sejtek védelmét.

Kompatibilis kapcsolatban a sejtfal alapú védekezés nem hatékony. Ebben az esetben a növény általános védekezési rendszerét kijátszó mikroba kórokozóként szaporodik el a növényben. A megbetegített **fogékony** növényekben a H_2O_2 a lassú szövetpusztulás során szabadul fel és a védekezésben nem vesz részt.

A kórokozó okozta specifikus stressz kivédésére, az evolúció során a gazdanövényben specifikus védekezési reakció alakult ki, melyet paprikában a *X. c. pv. vesicatoria* ellen a **Bs-2** specifikus rezisztencia gén kódol. Ez, az evolúciósan legfiatalabb reakció csak a fogékony fázisban bekövetkezett pusztulásra utaló H_2O_2 , mint jelzőmolekula hatására lép működésbe. Működését a genetikai háttértől, vagyis az általános védekezési reakció szintjétől függő, különböző mértékű szövetpusztulással járó H_2O_2 -kitörés jellemzi. A specifikus védekezési reakció így válik az általános védekezési rendszer hibajavító egységévé és a két reakció egymásra épülve így alkotja a betegségellenállóság egységes egészét.

A **szalicilsav** (SA) számtalan növény és kórokozó kapcsolatban általánosan előforduló jelzőmolekula. A gazda-patogén kapcsolatokban kifejtett általános jelző szerepe mellett, ismert a növényekben előforduló SA-koncentráció és a betegségellenállóság mértéke közti összefüggés is. A többi növényfajhoz képest kiemelkedően magas SA-szinttel bíró burgonyában találták meg az *Rx* gént, mely extrém rezisztenciát biztosít a PVX összes izolátuma ellen. Az extrém rezisztencia annak köszönhető, hogy az *Rx* gén közvetlenül a vírus köpenyfehérjéjét ismeri fel elicitorként és ennek következtében olyan hatékony választ indít

el, melynek során a vírus az elsődlegesen fertőződött sejtben lokalizálódik. A gyors válasznak köszönhetően, az extrém rezisztencia tünetmentes (Köhm és mtsai, 1993; Bendahmane és mtsai, 1995).

Arabidopsis esetében a *nd1* mutáció állandóan magas SA szintet és emellett széles spektrumú, HR nélküli rezisztenciát okozott. A *nd1* mutáns a vad típusú növényhez képest magasabb szintű rezisztenciával bír több kórokozófaj, így a Dohány gyűrűsfoltosság vírus, egyes *P. syringae* fajok, a *X. c. pv. campestris*, *X. c. pv. raphani* és a *Peronospora parasitica* kórokozó fajok ellen (Yu és mtsai, 1998).

A magas SA-tartalom mellett működő, tünetmentes rezisztenciát biztosító *Rx* és *nd1* génhez képest a *gds* gén és a SA kapcsolatát vizsgáltuk.

Fogékony vonal esetén a *X. c. pv. vesicatoria* baktérium hatására a SA-tartalomban a 10. órában bekövetkezett, és a *X. c. pv. phaseoli* inkompatibilis kapcsolatban a 3. és a 8. óra között mért minimum érték okára csak újabb kísérletek alapján adható válasz.

A **Bs-2** gént tartalmazó paprikavonalban gazda rezisztencia és nem-gazda rezisztencia esetén mért, a kontrollhoz viszonyított igen alacsony szintű SA tartalom a gazdanövényre jellemző magas szintű általános védekezési reakció hatásának tulajdonítható. Ennek a megállapításnak a valószínűségét tovább erősíti, hogy a paprika általános védekezési rendszeréért felelős *gds* gént tartalmazó növények esetén sem a kontroll, sem a fertőzött mintákban nem tudunk SA-t kimutatni. Megválaszolatlan kérdés, hogy az infiltrálást követően a SA mennyisége miért csökkent erőteljesen.

A kísérletek alapján megállapítható, hogy a *gds* gént tartalmazó növények teljes levéllemezre kiterjedő infiltrálása következtében, helyi SA-szintézis nem indul be. Ennek következtében a felső levelekbe sem szisztemizálódhat SA, így nem alakulhat ki a szisztemikus szerzett rezisztencia (SAR). Az általános védekezési rendszer esetében erre nincs is szükség, hiszen a SAR-nál lényegesen gyorsabb, határozottabb és szélesebb spektrumú védelmet biztosít, a növény bármely levelének provokálása esetén. A *gds* gén által biztosított általános védekezési reakció genetikailag kódolt tulajdonság, működéséhez előzetes indukcióra nincs szükség, azonnali és hatékony védelmet biztosít a vegetációs idő alatt a növény számára.

A SA vizsgálata alapján megállapíthatjuk, hogy a *gds* gén által irányított általános védekezési rendszer szabályozása valószínűleg SA-független anyagcsereutakon keresztül történik. Fölvetődik a kérdés, hogy vajon a jázmonsav és az etilén helyettesítői-e a SA-nak az általános védekezési rendszer szabályozásában?

Az irodalomból ismert, hogy az *Rx* gén és a *nd1* gén magas SA szint mellett biztosítanak tünetmentes, széles spektrumú rezisztenciát, valamint, hogy a SA-hiányos (*NahG* gén) növények kórokozókkal szemben fogékonyabbak. Ezek ismeretében egyedülálló, hogy a *gds*

gén igen alacsony szabad SA-szint mellett, vagy annak teljes hiányában biztosít széles spektrumú, szövetpusztulás nélküli rezisztenciát.

A *gds* gén által kódolt általános védekezési reakció során nem észleltünk változást a H₂O₂-tartalomban. Kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy a sejtmeztartással járó reakcióban milyen szerepe lehet az antioxidáns hatású **peroxidáz** (POD) enzimnek.

A vizsgált paprikavonalakra jellemző, fertőzés hatására bekövetkező enzimaktivitás változás időbeli lefutásának vizsgálatához csak egy foltban inokuláltuk a levéllemezt. A foltban történő inokulálást követően, reakciótípustól függően a POD aktivitás különböző időpontokban érte el a csúcértéket. Ez a *gds* gént tartalmazó vonalban az 1. órában, a **Bs-2** gén esetében a 3. órában következett be, míg a **fogékony** növényekben az inokulálást követően lecsökkenő enzimaktivitás csak a 6. órában érte el ismét a kontrollban mért értéket. Az így kialakított sorrend megegyezik a kórtünetek alapján meghatározható hatékonyság sorrendjével.

A három különböző növénytípus antioxidáns kapacitását természetellenes dózisú fertőzéssel mértük fel. A POD aktivitás beindulásának időpontjában, de főleg mértékében nagy különbség volt megfigyelhető, melyek összhatásának feltehetően alapvető stratégiai jelentősége van a hatékony védekezésben. A levéllemez teljes felületére kiterjedő infiltrálás hatására, a 24. órában a POD aktivitás a *gds* gént tartalmazó növény leveleiben 6-szorosára emelkedett, míg a **Bs-2** gént tartalmazó illetve **fogékony** növények levelében csak közel két-háromszorosára lett a kontrollban mért értéknek. Ezek alapján az általános védekezési rendszert kódoló *gds* gént tartalmazó növények antioxidáns kapacitása kiemelkedő.

Egyes szerzők szerint (Rasmussen és mtsai, 1991) a POD is a PR fehérjék közé sorolható, melyeknek jelenléte, felhalmozódása vagy aktivitása meghatározó a rezisztencia szempontjából (van Loon és van Kammen, 1970; Bowles és mtsai, 1990). Kísérleteinkben, mindkét fertőzési módszer esetén, a *gds* gént tartalmazó paprikavonalban mértük a legerősebb POD aktivitást. Vizsgálatunk során a POD a PR fehérjék azon tulajdonságának is megfelelt, hogy mennyiségük nagyban függ a fertőzés erősségétől, hiszen a kisebb stresszt jelentő, foltban történő injektáláskor, mindhárom paprikavonal esetében kisebb mértékű POD aktivitás növekedést mértünk, mint a durvább provokációnak számító teljes levéllemezre kiterjedő fertőzéskor.

A növények fertőzés okozta pusztulásának mértéke attól függ, hogy milyen egyensúly alakul ki a reaktív oxigénfajták képződése és az antioxidáns enzimek aktivitása közt (Fodor és mtsai, 1997). Kísérleteink alapján megállapítható hogy a *gds* védekezési reakciójában fontos

szerepet tölt be a POD. A káros gyökök semlegesítését végző POD jelentős mértékben járul hozzá a fertőzött szövetek pusztulással szembeni védelméhez a *gds* gént tartalmazó növényekben.

A **transzmetilezés**, vagyis metilcsoportok eltávolítása illetve beépítése, kis energiaigényű, gyors és megfordítható szabályozást tesz lehetővé. A három reakciótípust képviselő paprika vonalban vizsgáltuk a fertőzés okozta stressz hatására bekövetkező demetileződés folyamatát, vagyis a metilezett vegyületek és a formaldehid mennyiségének egymással összefüggő változásait. A kolin tartalom és vele összefüggésben a formaldehid változásának dinamizmusában észlelt eltérés alapján a három reakciótípus jól elkülöníthető volt.

A transzmetilezés folyamata alkalmasnak tűnik a növények alapvető, általános védekezési reakciójának, és a specifikus rezisztencia reakció funkcionális eltérésének bizonyítására. Továbbá, a *gds* gént tartalmazó növények megfelelő objektumok a transzmetilezési folyamatok kórélettani szerepének beható tanulmányozására.

Vizsgálataink alapján, a kolin mennyisége mindhárom növénytípusban erős csökkenést mutatott a fertőzést követő első 6 órában, de a **fogékony** és a **Bs-2** gént tartalmazó paprika vonalban a kolin és a formaldehid mennyiségének változása közt nem volt szoros összefüggés. A *gds* gén kódolta általános védekezési reakció esetében a kolin és a formaldehid mennyiségének egymással összefüggő, ellentétes irányú gyors változását figyeltük meg.

A transzmetilezési folyamatok összessége jól jellemezhető a formaldehid mennyiségi változásaival. A demetileződés során leváló metilcsoport, illetve a közbülső termékként megjelenő formaldehid, stressz-hatás kivédésében betöltött szerepe még nem tisztázott.

Az egyik elmélet szerint ez a folyamat a formaldehid formájában szállítódó metilcsoportok átcsoportosítását szolgálja, melynek során a metilcsoportok olyan vegyületekre, molekulákra kerülnek át, melyeknek reakcióképes oldalláncait, pontjait egy stressz hatás esetén lezárják. Például gének aktiválása illetve elnyomása is összefügg a DNS-t körülvevő hisztonfehérjék Lys-t vagy Arg-t tartalmazó pontjain megjelenő metilcsoportokkal. Bannister és mtsai (2002) szerint a metilezés a génszabályozás egy lassú formája.

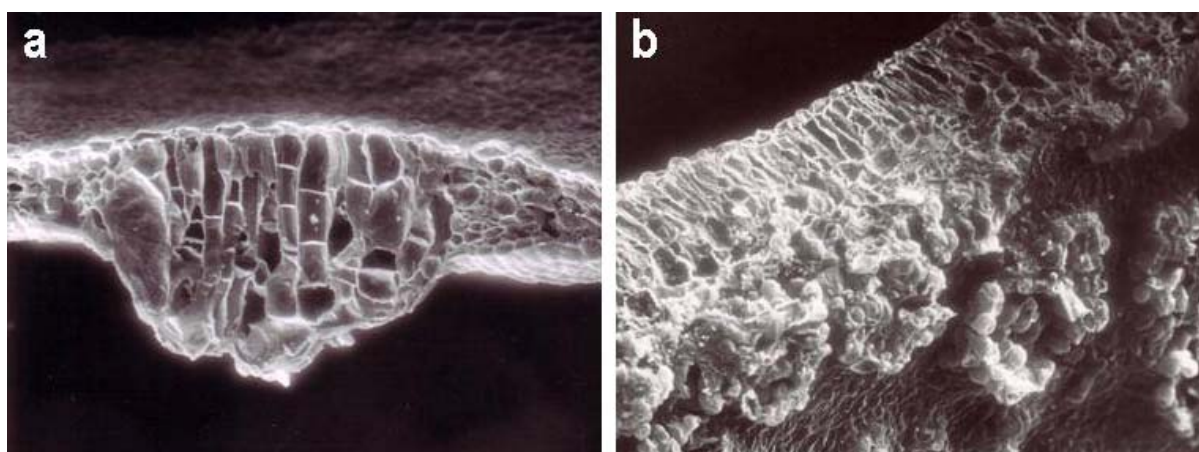
Egy másik vélemény szerint a fertőzés okozta stressz hatására demetileződéssel keletkező, nagy koncentrációban felszabaduló, antimikrobiális tulajdonságú formaldehidnek van szerepe a védekezésben (Tyihak és mtsai, 1994).

Az alacsony ingerküszöbvel és nagy reakciósebességgel bíró *gds* gént tartalmazó növényekben a fertőzést követő első órában, a kolin mennyiségének minimumra csökkenése és ennek következtében a formaldehid csúcserőve arra enged következtetni, hogy a metilezett vegyületek formaldehiddé való gyors átalakulásának van jelentős szerepe a növényeket ért stressz kivédésében.

A paprikalevélben általunk azonosított metilezett vegyületek, élettani hatásuk alapján, a növényi sejtek védelmét szolgálják.

A három metilcsoportot tartalmazó kolin, a membránlipidek egyik fő alkotójának, a foszfatidilkolinnak előanyagaként a sejtosztódáshoz szükséges (Yoshimoto és mtsai, 2004). Az egy metilgyököt hordozó trigonellin növényi hormonnak számít. Felelős azért, hogy a sejtek az osztódásra való felkészülés fázisába maradjanak (Evans és Tramontano, 1981). A három metilcsoportot tartalmazó trimetil-lizin sejtosztódást stimuláló hatásáról ismert (Szende és mtsai, 1970; Trézl és mtsai, 2003).

A kolin, a trigonellin és a trimetil-lizin a sejtosztódásra való felkészítést és a sejtosztódást, vagyis a folyamatos növekedésre alapuló életben maradáshoz készítik elő. Ezen metilezett vegyületek közös jellemzője, hogy demetileződésük során formaldehid képződik, melynek kis koncentrációban sejtosztódást serkentő hatása is van (Tyihák és mtsai, 2001). Lehetséges, hogy a formaldehid sejtosztódást serkentő hatása játszik közre a *gds* gén által kódolt, általános védekezési reakcióra jellemző, sejtnagyobbodásban, sejtosztódásban megnyilvánuló kórtünet (25/a ábra) kialakításában. Túlzott stressz, természetellenesen nagy dózisu fertőzés esetén, a



25. ábra Az általános védekezési rendszert kódoló *gds* gén természetes fertőződés (a) és mesterséges fertőzés (b) hatására kialakult reakciója paprikalevélen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktérium hatására

(Fotó: Nagy Barbara)

sejtmegtartást célzó reakció sejtburjánzásban nyilvánul meg (25/b ábra). Az általános védekezési reakció, a megtámadott növényi sejtek megerősítésével reagál a kórokozó támadására, míg a hiperszenzitív reakció a megtámadott növényi sejtek pusztulását eredményezi.

A biokémiai vizsálatokat az ismételhetségre és a megbízhatóságra való tekintettel dihaploid paprikavonalakon végeztük. A *gds* gén és *Bs-2* gén **öröklődés**menetének vizsgálata is ezeken a vonalakon történt.

A domináns *Bs-2* gént és a recesszív *gds* gént homozigóta állapotban tartalmazó DH vonalaink összekeverésével előállított F1 hibridek, melyek mindkét génre nézve heterozigóták, meglepetésünkre nem azt a fenotípust mutatták amit a *Bs-2* gén dominanciájának megfelelően vártunk. Az F1 nemzedékben a domináns génnel szemben a recesszív gén fenotípusa is megjelent, annak ellenére, hogy heterozigóta állapotban volt. Az F1 nemzedék kórtüneteire az F2 kettős homozigóta egyedeinek reakciója adta meg a választ.

Genetikai vizsgálataink alapján a két gén kölcsönhatásáról megállapítható, hogy akár homozigóta, akár heterozigóta állapotban van a domináns *Bs-2* gén, működésére csak halványlila elszíneződés utal, mert a *gds* gén szövetmegtartó képessége heterozigóta állapotban is érvényesül.

A domináns *Bs-2* gén működését a homozigóta állapotban levő, recesszív *gds* gén szinte teljesen elnyomja. Ebben az esetben a *Bs-2* gén működésére csak az erek menti szövetek lilás elszíneződése utal.

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a két gén egymástól függetlenül kombinálódik, nincs köztük genetikai kapcsoltság, csak funkcióbeli kapcsoltság. A *gds* gén és a *Bs-2* gén között ebben az esetben a kórokozó okozta stressz teremt kapcsolatot. A két gén működésbe lépéséhez szükséges ingerküszöb eltérő szintje miatt a két reakció természetes fertőződés esetén egyidőben, ugyan azon stresszre nem léphet működésbe. Természetes körülmények között, a stresszre az alacsony ingerküszöbvel rendelkező, nagy reakciósebességű és ezen okok miatt szövetmegtartásra képes általános védekezési reakció indul először és csak sikertelensége esetén lép működésbe a specifikus védekezési reakció.

Az általános védekezési rendszert kódoló *gds* gén és a specifikus védekezési reakcióért felelős *Bs-2* gén növényi betegség ellenállóságban betöltött eltérő szerepét, működésbe lépésük sorrendiségét, valamint kórtünetekben megnyilvánuló egymásra hatását igazoló biokémiai vizsgálatokhoz, kettős homozigóta növényeket használtunk. A kettős homozigóta növények előállításával célzatosan teremtettük meg a betegségellenállóság lehető legteljesebb egységes egészét. A szülővonalakra jellemző kórtünetek, illetve főbb biokémiai jellemzőik ismeretében következtettünk az F1 és F2 nemzedékben megfigyelt **kórtünetek biokémiai hátterére**.

Az F1 nemzedék egyedeiben a fertőzés hatására, a *Bs-2* gén dominanciája ellenére, nem képződött olyan mennyiségű H_2O_2 , mely szövetkiszáradást eredményezett volna. A sejtnagyobbodáson alapuló szövetvastagodás a heterozigóta állapotban levő, recesszív *gds* gén, a bordóslila elszíneződés a szintén heterozigóta állapotban levő, domináns *Bs-2* gén működésére utal. A fertőzött szövetek morfológiai változása erős antioxidáns hatásra enged következtetni, de a nagydózisú fertőzés hatására mégis képződött olyan mennyiségű H_2O_2 , mely a *Bs-2* gén működésbe lépéséhez elegendő.

A kettős homozigóta növényekben az általános védekezési rendszer működését homozigóta állapotban tökéletesen biztosító *gds* gén szabályozta reakció olyan gyors, hogy a fertőzés okozta erős stressz hatására sem képződött annyi H_2O_2 , amennyi a *Bs-2* gén működésbe lépéséhez szükséges. A *Bs-2* rezisztencia gén működésére utaló lilás elszíneződés csak az inokuláláskor sérült szövetrészekben alakult ki.

A *gds* és a *Bs-2* génre nézve homozigóta növényi sejtek sérülésének hatását vizsgálva újabb összefüggéseket ismertünk meg a két gén betegség ellenállóságban betöltött szerepét illetően. A *gds* gén kódolta általános védekezési rendszer csak az egészséges sejtekben működik, tehát az általános védekezési reakció preventív. A sérült sejtek nem képesek általános védekezési reakcióra. Egészséges sejtekben a *gds* gén mellett a *Bs-2* gén teljesen inaktív. A *Bs-2* gén meghatározta specifikus védekezési reakció a kórokozó által megtámadott, megbetegített sejtek reakciója.

Az általános és a specifikus védekezési reakció is a kórokozó által kiváltott oxidatív stressz kivédésére irányul. A minden növény-mikrba kontaktusra gyorsan reagáló, antioxidáns folyamatokra utaló erős peroxidáz enzimaktivitással jellemezhető, a sejtek megerősítését, megtartását célzó általános védekezési reakció, a növényi immunrendszer szerepét tölti be. A *gds* gén az egészséges sejtek védelmét biztosítja, olyan nagy hatékonysággal, hogy erős fertőzés hatására sem változik az egészséges szövetekre jellemző H_2O_2 koncentráció. Az általános reakció működésének zavara, hatástalansága esetén az oxidatív folyamatok kerülnek

túlsúlyba, többek között megnő a H₂O₂ koncentrációja. A biokémiai folyamatokat illetően, ez az állapot a fogékony gazda-patogén kapcsolatra jellemző. Az oxidatív stressz, vagyis a H₂O₂, mint aspecifikus jelzőmolekula és a kórokozó meghatározta specifikus inger együttes hatására lép működésbe a specifikus védekezési reakció, mely nem a gyors szövetpusztuláshoz vezető reaktív oxigénformák termelődésének fokozásával fejt ki kórokozót gátló hatását. A reakció során tapasztalható szövetpusztulás nem a specifikus védekezési reakció, hanem az alacsony szintű általános védekezési reakció következménye.

A paprika betegségellenállóságának egységes egészét alkotó általános védekezési reakcióért felelős *gds* gén és specifikus védekezési reakciót kódoló *Bs-2* gén genetikai, kórtani és biokémiai jellemzői alapján megállapítható, hogy a *gds* gén az egészséges sejtek védelmét biztosítja, míg a *Bs-2* egy specifikus rezisztenciagén, amely az elégséges általános védekező képességgel nem rendelkező, vagy ezen képességüket elvesztett sejteket védi a fertőzéssel szemben, de működéséhez a kórokozó által meghatározott specifikus stressz szükséges. A növények megbetegedésének folyamatában mind a mai napig nyomonkövethető az általános védekezési reakció, a fogékonyság és a specifikus védekezési reakció evolúciós sora. Az alacsony ingerküszöbvel bíró általános védekezési reakció sebessége lényegesen nagyobb, mint a magasabb ingerküszöbvel rendelkező specifikus védekezési reakcióé. Természetes körülmények között az eltérő ingerküszöb biztosítja a két védekezési folyamat egymásutánosságát. Az általános védekezési reakció hatástartományának végén lép működésbe a specifikus védekezési reakció. A két reakció hatásspektrumát a fogékonyság állapota, mint evolúciós emlék határolja el egymástól, mely egyértelműen jelöli ki a *gds* gén meghatározta tulajdonságrendszer növényi betegség ellenállóságban betöltött elsődleges szerepét.

Az általános védekezési reakció a fentiek alapján képes betölteni a növényi immunrendszer szerepét, amely mellett a specifikus rezisztencia reakciók csak hibajavító egységek a növények betegség ellenállóságának rendszerében. Az általános védekezési rendszer és a specifikus védekezés reakciók együttesen alkotják a növényi betegség ellenállóság egységes egészét. A magas szintű általános védekezési reakció restaurálásával olyan genetikai háttér alakítható ki, mely a legkisebb mértékű szövetpusztulással járó, vagy akár szövetpusztulás nélküli hatékony működést biztosít a specifikus rezisztencia gének számára. Ezen a felismerésen alapuló rezisztencianemesítési stratégiával hatékony és időtálló betegség ellenállósággal bíró fajták állíthatók elő.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A paprika több kórokozó fajjal szembeni rezisztencia nemesítését célzó munka igen gazdag, genetikailag és kórtanilag jól jellemzett növényanyagán végeztem a növényi betegségellenállóság egészét alkotó, általános és specifikus védekezési reakció biokémiai, kórélettani és genetikai vizsgálatát. Munkám során a paprika és a *X. c. pv. vesicatoria* baktérium gazda-patogén kapcsolatban vizsgáltam a *gds* gén által meghatározott általános védekezési reakció és a *Bs-2* által irányított specifikus védekezési reakció biokémiai sajátosságait és a fertőzés kivédésében betöltött összefüggő szerepüket.

A két gén kórtünetekben megnyilvánuló szöveti elváltozásai egyértelműen elkülöníthetők a gyors szövetpusztulással jellemezhető hiperszenzitív reakciótól. A nem kórokozó-specifikus általános védekezési reakció sejtnagyobbodáson, sejtszótódáson alapuló szövettömörödésben nyilvánul meg. A kórokozó-specifikus rezisztens reakcióra jellemző, elszíneződéssel illetve szövetpusztulással járó kórtünet, két különböző növényi tulajdonság eredője. A fertőzött szövetek elszíneződése a specifikus védekezési reakcióra utal, míg a hiperszenzitív szövetpusztulás egy másik tulajdonság, az általános védekezési reakció gyenge hatékonyságának következménye.

A *gds* gén által kódolt általános védekezési reakcióra természetes körülmények között csak az infekciós pont körüli néhány sejt megnagyobbodása jellemző, mely glükóz felhasználásban kifejezve igen energiatakarékos folyamat. A *gds* gént tartalmazó növényeknek nincs szükségük a hidrogén-peroxid által közvetített oxidatív kitörésre a védekezéshez. A *gds* gén igen alacsony szabad szalicilsav szint mellett, vagy annak teljes hiányában biztosít sejtpusztulás nélküli, széles spektrumú rezisztenciát. A *gds* gént tartalmazó növényeket kiemelkedő antioxidáns kapacitás jellemzi. Az általános védekezési reakció esetén a kolin, mint metilezett vegyület demetileződése során gyorsan és nagy mennyiségben szabadul fel formaldehid.

A recesszív *gds* és a domináns *Bs-2* gént tartalmazó növényvonalak keresztezésével kapott F1 nemzedékben nem a várt dominancia viszonyoknak megfelelő kórtünet jelent meg. A *Bs-2* gén működésére utaló szövetelszíneződés mellett a heterozigóta állapotban lévő *gds* génre utaló szövetvastagodás is megjelenik. A két gént homozigóta állapotban tartalmazó növényekben, az általános védekezési reakcióra jellemző nagy reakciósebesség következtében a *Bs-2* gén nem nyilvánul meg fenotipusosan. A *Bs-2* gén csak a sérült sejtekben lép működésbe, mivel a sérült sejtekben az általános védekezési reakció nem működik kielégítően. A *gds* gén az egészséges sejteket védi a fertőzéssel szemben, tehát az általános védekezési reakció preventív. A *Bs-2* gén meghatározta specifikus védekezési reakció a kórokozó által

megtámadott, sérült, megbetegített sejtek reakciója. Mindezek alapján töltheti be az általános védekezési reakció a növényi immunrendszer szerepét, melynek működési zavarait a specifikus védekezési reakciók, mint hibajavító folyamatok küszöbölik ki.

Az általános és a specifikus védekezési reakciók természetes egymásra épülését felhasználó rezisztencia nemesítési stratégia a lehető legalkalmasabb egy hatékony, széles spektrumú rezisztencia kialakítására.

7. SUMMARY

I studied the biochemical, pathophysiological and genetic background of the general and the specific defense reaction which constitute the unity of plant disease resistance. I had the opportunity to perform my examinations on an exceedingly diverse, genetically and pathologically well-characterized plant material, which is part of a pepper breeding work against several pathogen species. In the pepper and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* host-pathogen relation, I investigated characteristic biochemical features of the general defense reaction determined by the *gds* gene and that of the specific defense reaction regulated by the *Bs-2* gene as well as their closely related roles in protecting plants from infections.

Tissue alterations characteristic of the two genes can be unambiguously distinguished from the hypersensitive reaction accompanied by fast tissue destruction. The general defense reaction, which is not specific to pathogens, manifests itself in tissue compaction achieved cell enlargement and cell division. The symptom of the specific resistant reaction, accompanied by discolouration and destruction of tissues, is the result of two distinct plant features. Discolouration of the infected tissues refers to the specific defense reaction, while hypersensitive tissue necrosis is a consequence of weak efficiency of another feature, namely the general defense reaction.

Under natural circumstances the general defense reaction, encoded by the *gds* gene, is characterized by enlargement of only a few cells around the infection site, which is quite an energy-saving process if we consider glucose consumption. Plants containing the *gds* gene do not require an oxidative burst elicited by hydrogen peroxide to stimulate defense. The *gds* gene ensures broad-spectrum resistance without cell destruction for lack of free salicylic acid or in the presence of very low levels of salicylic acid. Plants that carry the *gds* gene are characterized by an outstanding antioxidant capacity. It was also found that during demethylation of choline, one of the formaldehyde generators, formaldehyde liberates fast and in great quantities.

Crossing pepper lines containing the recessive *gds* gene and the dominant *Bs-2* gene respectively, the F1 progeny did not show the symptom that we expected according to relations of dominance. Beside tissue discolouration referring to the operation of the *Bs-2* gene, tissue thickening appears as well which is typical of the *gds* gene - being in heterozygous constellation in this case. In such plants that carry both genes in homozygous constellation, the *Bs-2* gene does not manifest itself phenotypically as a consequence of the high reaction speed of the general defense reaction. The *Bs-2* gene is activated only in injured

cells, since since the general defense reaction does not operate satisfactorily in injured cells. The *gds* gene protects healthy cells against infections, thus the general defense reaction is preventive. The specific defense reaction, determined by the *Bs-2* gene, is the reaction of the cells that are attacked by pathogens, injured and diseased. On the basis of all these, is the general defense system able to fulfill the role of the plant immune system, while specific defense reactions serve for correcting deficiencies of the general defense system. A kind of resistance breeding strategy, which utilize that arising out of natural processes the general and the specific defense reactions are built on each other, is the most suitable for creating efficient resistance against a wide range of pathogens.

MELLÉKLETEK

M1 IRODALOMJEGYZÉK

Abramovitch, R. B. és Martin, G. B. (2004): Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7. 356- 364.

Alvarez, M. E., Pennel, R. I., Meijer, P- J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. és Lamb, C. (1998): Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell.* 92. 773- 784.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., William, M. R., Chiu, W-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M. és Sheen, J. (2002): MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415. 977- 983.

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

Bannister, A. J., Schneider, R. és Kouzarides, T. (2002): Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 109. 801-806.

Bayles, C.J., Ghemawat, M.S., and Aist, J.R. (1990): Inhibition by 2-deoxy-D-glucose of callose formation, papillae deposition, and resistance to powdery mildew in an *mlo* barley mutant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36. 63-72.

Bell, J.N., Ryder, T.B., Wingate, V.P.M., Bailey, J. A., and Lamb, C. J. (1986): Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a compatible and incompatible plant-pathogen interaction. *Mol. Cell. Biol.* 6. 1615-1623.

Bendahmane, A., Kanyuka, K. and Baulcombe, D.C. (1999): The *Rx* Gene from Potato Controls Separate Virus Resistance and Cell Death Responses. *Plant Cell* 11. 781–791.

Bendahmane, A., Köhm, B.A., Dedi, C., and Baulcombe, D.C. (1995): The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of *Rx1*-mediated virus resistance in potato. *Plant J.* 8. 933–941.

Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., and Staskawicz, B.J. (1994): *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265. 1856-1860.

Bestwick, C. S., Brown, I. R. és John W. Mansfield, J. W. (1998): Localized Changes in Peroxidase Activity Accompany Hydrogen Peroxide Generation during the Development of a Nonhost Hypersensitive Reaction in Lettuce. *Plant Physiol.* 118. 1067–1078.

Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T. M., Mueller, M. J., Xia, Z- Q. és Zenkt, M. H. (1995): The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *PNAS* 92. 4099- 4105.

Bohlmann, H. (1994): The role of thionins in plant protection. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13. 1-16.

- Bolwell, G.P., Butt, V.S., Davies, D.R., and Zimmerlin, A. (1995): The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad. Res. Comm.* 23. 517-532.
- Bowles, D.J. (1990): Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59. 873-907.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., and Lamb, C.J. (1992): Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell.* 70. 21-30.
- Brisson, L. F., Tenhaken, R. és Lamb, C. (1994): Function of oxidative cross- linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell.* 6. 1703-1712.
- Brogliè, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C.J., and Brogliè, R. (1991): Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science.* 254. 1194-1197.
- Brown, I., Mansfield, J. és Bonas, U. (1995): hrp Genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Determine Ability to Suppress Papilla Deposition in Pepper Mesophyll Cells. *MPMI.* 8. 825-836.
- Büsches, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F. és Schulze- Lefert, P. (1997): The Barley *Mlo* Gene: A Novel Control Element of Plant Pathogen Resistance. *Cell.* 88. 695- 705.
- Cameron, R. K., Dixon, R. és Lamb, C. (1994): Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 5. 715-725.
- Cao, H., Li, X. és Dong, X. (1998): Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *PNAS.* 95. 6531-6536.
- Chen, Z., Silva, H. és Klessig, D. F. (1993): Involvement of reactive oxygen species in the induction of systemic acquired resistance by salicylic acid in plants. *Science.* 242, 883- 886.
- Chester, K. S. (1933): The problem of acquired physiological immunity in plants. *Q. Rev. Biol.* 8. 275- 324.
- Clough, S. J., Fengler, K. A., Yu, I-ching, Lippok, B., Smith, R. K. és Bent, A F. (2000): The *Arabidopsis dnd1* „defense no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *PNAS.* 97. 9323-9328.
- Cohn, J., Sessa, G. és Martin, G. B. (2001): Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.* 13. 55- 62.
- Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., and Vad, K. (1993): Plant chitinases. *Plant J.* 3. 31-40.
- Cooper, R.M., Resende, M.L.V., Flood, J., Rowan, M.G., Beale, M.H., and Potter, U. (1996): Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. *Nature.* 379. 159-162.

- Costet, L., Cordelier, S., Dorey, S., Baillieux, F., Fritig, B. és Kauffmann, S. (1999): Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. *MPMI*. 12. 655- 662.
- Creelman, R. A. és Mullet, J. E. (1997): Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 48. 355- 381.
- Croft, K.P.C., Jüttner, F., and Slusarenko, A.J. (1993): Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Physiol.* 101. 13-24.
- Csillery, G., Mityko, J., Szarka, E. és Szarka, J. (2007): Genetics of interactions between general and specific plant defense reactions. XIIIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant. Warsaw, Poland. Proceedings 59-69.
- Csillery, G., Szarka, E., Sardi, E., Mityko, J., Kapitany, J., Nagy, B. és Szarka, J. (2004): The unity of plant defense. Genetics, breeding and physiology. XIIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant. Noordwijkerhout, The Netherlands. Proceedings 147-153.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., and Richberg, M.H. (1996): Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*. 8. 1793-1807.
- Darvill, A. és Albersheim, P. (1984): Phytoalexins and their elicitors- a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 35. 243-275.
- de Laat, C. M. M., és Van Loon, L. C. (1983): The relationship between stimulated ethylene production and symptom expression in virus-infected tobacco leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 22. 261–273.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, H. és Ryals, J. (1994): A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science*. 266. 1247-1250.
- De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D., Caprari, C., Clark, A.J., Desiderio, A., Devoto, A., Forrest, R., Leckie, F., Nuss, L., and Salvi, G. (1994): Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication. *Biochem. Soc. Trans.* 22. 394-397.
- De Lorenzo, G. és Ferrari, S. (2002): Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5. 295-299.
- Dempsey, D. M., Wobbe, K. K. és Klessig, D. F. (1993): Resistance and susceptible responses of *Arabidopsis thaliana* to turnip crinkle virus. *Phytopathol.* 83. 1021- 1029.
- Dixon, R.A., and Paiva, N.L. (1995): Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 7. 1085-1097.
- Doares, S. H., Narváez-Vásquez, J., Conconi, A. és Ryan, C. A. (1995b): Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiol.* 108. 1741-1746.

- Doares, S. H., Syrovets, T., Weiler, E. W. és Ryan, C. A. (1995a): Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *PNAS*. 92. 4095-4098.
- Doke, N. (1983): Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 23. 359-367.
- Doke, N., and Ohashi, Y. (1988): Involvement of an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32. 163-175.
- Dong, X. (1998): SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1. 316- 323.
- Dong, X. (2001): Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4. 309- 314.
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M.-A., Saindrenan, P., Fritig, B. és Kauffmann, S. (1997): Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *MPMI*. 10. 646-655.
- Durner, J. és Klessig, D. F. (1999): Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2. 369- 374.
- Durner, J., Shah, J. és Klessig, D. F. (1997): Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2. 266- 274.
- El-Banoby, F. és Rudolph, K. (1979): Induction of Water-soaking in Plant Leaves by Extracellular Polysaccharides from Phytopathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Physiol. Plant Pathol.* 15. 341-349.
- Ellis, C. és Turner, J., G. (2001): The *Arabidopsis* mutant *cevl* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell*. 13. 1025- 1033.
- Enyedi, A. J., Yalpani, N., Silverman, P. és Raskin, I. (1992): Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *PNAS*. 89. 2480- 2484.
- Epple, P., Apel, K. és Bohlman, H. (1995): An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis- related proteins.. *Plant Physiol.* 109. 813- 820.
- Epple, P., Apel, K. és Bohlman, H. (1997): Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*. 9. 509- 520.

Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H. (1995): An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 109. 813-820.

Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. és Boller, T. (1999): Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18. 265- 276.

Flor, H. H. (1955): Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathol.* 45. 680-685.

Flor, H. H. (1971): Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. of Phytopathol.* 9. 275-296.

Fodor J., Gullner G., Ádám A. L., Barna B., Kőmíves T. és Király Z. (1997): Local and Systemic Responses of Antioxidants to Tobacco Mosaic Virus Infection and to Salicylic Acid in Tobacco. *Plant Physiol.* 114. 1143-1451.

Freialdenhoven, A., Peterhansel, C., Kurth, J., Kreuiler, F., and Schulze-Lefert, P. (1996): Identification of genes required for the function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell.* 8. 5-14.

Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Gut Rella, M., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Métraux, J-P., Kessmann, H. és Ryals, J. (1996): A benzothiadiazol derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10. 61-70.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. és Ryals, J. (1993): Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science.* 261. 754- 756.

Gersbeck, N., Schönbeck, F. és Tyihák, E. (1989): Measurement of formaldehyde and its main generators in *Erysiphe graminis* infected barley plants by planar chromatographic techniques. *J. Planar Chromatogr.* 2. 86-89.

Glazebrook, J. és Ausubel, F. M. (1994): Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *PNAS.* 91. 8955- 8959.

Gómez- Gómez, L., Felix, G. és Boller, T. (1999): A single locus determines the sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18. 277- 284.

Goulden, M. G. és David C. Baulcombe, D. C. (1993): Functionally Homologous Host Components Recognize Potato Virus X in *Gomphrena globosa* and Potato. *Plant Cell.* 5. 921-930.

Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K-H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. és Ryals, J. (1996): Benzothiadiazole, a Novel Class of Inducers of Systemic Acquired Resistance, Activates Gene Expression and Disease Resistance in Wheat. *Plant Cell.* 8. 629-643.

Gross, M. és Rudolph, K. (1987): Studies on the extracellular polysaccharides (EPS) produced in vitro by *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytopathol.* 118. 276-287.

- Gullner, G. és Tyihák, E. (1987): Hydrogen peroxide dependent N-demethylase activity in the leaves of normal and heat-shocked bean plants. *Plant Sci.* 52. 21-27.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R., and Schmelzer, E. (1995): Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *PNAS.* 92. 4150-4157.
- Hain, R., Reif, H., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stocker, R.H., and Stenzel, K. (1993): Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature.* 361. 153-156.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1990): Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 186. 185.
- Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. (1996): Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *Plant Cell.* 8. 1773-1791.
- Haraszty Á. (Szerk.) (1978): Növényismeret és növényélettan. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.
- Heath, M. C. (2000): Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3. 315- 319.
- Heath, M.C. (1980): Reaction of nonsusceptible to fungal pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18. 211-236.
- Heil, M. (2002): Ecological costs of induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5. 345-350.
- Heil, M. és Baldwin, I. T. (2002): Fitness costs of induced resistance - the emerging experimental support for a slippery concept. *Trends Plant Sci.* 7. 61- 67.
- Heil, M. és Bostock, R. M. (2002): Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany.* 89. 503- 512.
- Holmes, F. O. (1929): Local lesions in tobacco mosaic. *Botanical Gazette.* 87. 39-55.
- Holub, E. B., Beynon, J. L., and Crute, I. R. (1994): Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *MPMI.* 7. 223-239.
- Husztai, Z. és Tyihák, E. (1986): Formation of formaldehyde from S-adenosyl-L-(methyl- ³H) methionine during enzymic transmethylation of histamine. *FEBS Letters.* 209. 362-366.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. és Kogel, K-H. (1999): Hypersensitive Cell Death and Papilla Formation in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus Are Associated with Hydrogen Peroxide but Not with Salicylic Acid Accumulation. *Plant Physiol.* 119. 1251–1260.
- Jarosch, B., Kogel, K. H. és Shaffrath, U. (1999): The ambivalence of the barley *Mlo* locus: mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeriella graminis* f. sp. *hordei*) enhanced susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *MPMI.* 12. 508–514.

Jeney A., Gyapay, G., Lapis, K., Szende, B., Bursics, L. és Tyihák, E. (1980): Methylation-like reaction of [³H-metil]-N-5-trimethyllysine (TML) to chromatin components. *Biochem. Pharmacol.* 29. 2729-2732.

Kalász, H., Báthori, M. és Tyihák, E. (1988): Formaldehyde generation by N-demethylation. *Acta Biol. Hung.* 49. 339-344.

Kang, L., Li, J., Zhao, T., Xiao, F., Tang, X., Thilmony, R., He, S. és Zhou, J. M. (2003): Interplay of the *Arabidopsis* nonhost resistance gene *NHO1* with bacterial virulence. *PNAS.* 100. 3519- 3524.

Kauss, H. és Jeblick, W. (1995): Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H₂O₂. *Plant Physiol.* 108. 1171- 1178.

Kawalleck, P., Plesch, G., Hahlbrock, K., and Somssich, I.E. (1992): Induction by fungal elicitor of S-adenosyl-L-methionine synthetase and S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase mRNAs in cultured cells and leaves of *Petroselinum crispum*. *PNAS.* 89. 4713-4717.

Keen, N.T. (1990): Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24. 447-463.

Keppler, L.D., and Novacky, A. (1986): Involvement of membrane lipid peroxidation in the development of a bacterially induced hypersensitive reaction. *Phytopathol.* 76. 104-108.

Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S. és Ryals, J. (1994): Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32. 439- 459.

Khanna, P. és Jorns, M. S. (2001): Characterization of the FAD-containing N-methyltryptophan oxidase from *Echerichia coli*. *Biochemistry.* 40. 1441-1450.

Kim, S., Benoiton, L. és Paik, W. K. (1964): ε-Alkyllysine. Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 239. 3790-3796.

Király, Z., Barna, B. és Érsek, T. (1972): Hypersensitivity as a Consequence, Not the Cause, of Plant Disease Resistance to Infection. *Nature.* 239. 215-219.

Király, Z., El-Zahaby, H. M. és Klement, Z. (1997): Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *Jour. Phytopathol.* 145. 59-68.

Klement, Z., Farkas, G. L. és Lovrekovich, L. (1964): Hypersensitive Reaction Induced by Phytopathogenic Bacteria in the Tobacco Leaf. *Phytopathol.* 54. 474- 477.

Klement, Z., Bozsó, Z., Ott, P. G., Kecskés, M. L. és K. Rudolph (1999): Symptomless resistance response instead of the hypersensitive reaction in tobacco leaves after infiltration of heterologous pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Jour. of Phytopathol.* 147, 467-475.

Klement, Z., Bozsó, Z., Kecskés, M. L., Besenyei, E., Celleng, A. és Ott, P. G. (2003): Local early induced resistance of plants as the first line of defence against bacteria. *Pest Manag Sci.* 59. 465- 475.

Klessig, D.F., and Malamy, J. (1994): The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 26. 1439-1458.

Kobayashi, Y., Yamada, M., Kobayashi I. és Kunoh, H. (1997a): Actin Microfilaments are Required for the Expression of Nonhost Resistance in Higher Plants. *Plant and Cell Physiol.* 38. 725-733.

Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T. és Kuno, H. (1997b): Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J.* 11. 525-537.

Köhm, B.A., Goulden, M.G., Gilbert, J.E., Kavanagh, T.A., and Baulcombe, D.C. (1993): A potato virus X resistance gene mediates an induced, nonspecific resistance in protoplasts. *Plant Cell* 5. 913–920.

Laloi, C., Apel, K. és Danon, A. (2004): Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7. 323- 328.

Lawton, K. A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T. és Ryals, J. (1996): Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* 10. 71-82.

León, J., Lawton, M. A. és Raskin, I. (1995): Hydrogen Peroxide Stimulates Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiol.* 108. 1673-1678.

Léon, J., Lawton, M.A., and Raskin, I. (1995): Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108. 1673-1678.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* 79. 583-593.

Lu, M., Tang, X. és Zhou, J. M. (2001): *Arabidopsis NHO1* is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria. *Plant Cell.* 13. 437- 447.

Lui, D., Raghobama, K.G., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1994): Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *PNAS.* 91. 1888-1892.

Lund, S. T., Stall, R. E. és Klee, H. J. (1998): Ethylene Regulates the Susceptible Response to Pathogen Infection in Tomato. *Plant Cell.* 10. 371–382.

Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F. és Raskin, I. (1990): Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science.* 250. 1002-1004.

Malamy, J., Hennig, J. és Klessig, D. F. (1992): Temperature- dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *Plant Cell.* 4. 359-366.

Martin, G. B., Bogdanove, A. J. és Sessa, G. (2003): Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54. 23- 61.

Mauch-Mani, B. és Slusarenko, A. J. (1994): Systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana* induced by prediposing infection with a pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *MPMI*. 7. 378- 383.

Mauch-Mani, B. és Slusarenko, A. J. (1996): Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell*. 8. 203-212.

McDowell, J. M., Cuzick, A., Can, C., Beynon, J., Dangl, J. L. és Holub, E. B. (2000): Downy mildew (*Peronospora parasitica*) resistance genes in *Arabidopsis* vary in functional requirements for NDR1, EDS1, NPR1 and salicylic acid accumulation. *Plant J*. 22. 523-529.

McLusky, S. R., Bennett, M. H., Beale, M. H., Lewis, M. J., Gaskin, P. és Mansfield, J. W. (1999): Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Borytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant J*. 17. 523-534.

Mehdy, M.C. (1994): Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol*. 105. 467-472.

Melchers, L.S., Apotheker-de Groot, M., van der Knaap, J., Ponstein, A.S., Sela-Buurlage, M., Bol, J.F., Cornelissen, B.J.C., van den Elzen, P.J.M., and Linthorst, H.J.M. (1994): A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J*. 5. 469-480.

Mellersch, D. G. és Heath, M. C. (2001): Plasma Membrane– Cell Wall Adhesion Is Required for Expression of Plant Defense Responses during Fungal Penetration. *Plant Cell*. 13. 413–424.

Mellersch, D. G., Foulds, I. V., Higgins, V. J. és Heath, M. C. (2002): H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant J*. 29. 257-268.

Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, M., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. és Inverardi, B. (1990): Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*. 250. 1004- 1006.

Meyer, M., Schreck, R., and Baeuerle, P.A. (1993): H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J*. 12. 2005-2015.

Mitykó, J., Chambonnet, D., Adam, G., Andrásfalvy, A. és Fári, M. (1995): *In vitro* haploidy of spice and bell peppers: it's control for large-scale application. IXth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding on Capsicum and Eggplant. Budapest, Hungary. Proceedings 64-67.

Mölders, W., Buchala, A. és Métraux, J. P. (1996): Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus- infected cucumber plants. *Plant Physiol*. 112. 787- 792.

- Mysore, K. S. és Ryu, C. M. (2004): Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* 9. 97-104.
- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessmann, H. és Ryals, J. (1995): Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.* 8. 227- 233.
- Neugebauer, M., Gross, M., Nöllenburg, G., Somlyai, G. és Rudolf, K. (1989): Screening for alginate and levan defective strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* mutagenized by Tn5 transposon. *Plant Pathogenic Bacteria* (ed. Klement Z.)
- Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N. és Ohashi, Y. (1998): Antagonistic effects of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) proteins in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* 39. 500- 507.
- Nuss, L., Mahe, A., Clark, A.J., Grisvard, J., Dron, M., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (1996): Differential accumulation of PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein) mRNA in two near-isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* L. upon infection with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48. 83-89.
- Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1995): Covalent cross-linking of the *Phytophthora megasperma* oligopeptide elicitor to its receptor in parsley membranes. *PNAS.* 92. 2338-2342.
- Nürnbergger, T. és Brunner, F. (2002): Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5. 318- 324.
- O'Donnell, P. J., Jones, J. B., Antoine, F. R., Ciardi, J. és Klee, H. J. (2001): Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J.* 25. 315-323.
- O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O. és Bowles, D. (1996): Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science.* 274. 1914-1917.
- O'Donnell, P. J., Jones, J. B., Antoine, F. R., Ciardi, J. és Klee, H. J. (2001): Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J.* 25. 315-323.
- Osborn, A. E. (1996a): Saponins and plant defence - a soap story. *Trends Plant Sci.* 1. 4-9.
- Osborn, A. E. (1996b): Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell.* 8. 1821-1831.
- Osman, S. F., Fett, W. P. és Fishman, M. L. (1986): Expolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Jour. Bacteriol.* 166. 66-71.
- Paik, W. K. és Kim, S. (1974): Epsilon-alkyllysine. New assay method, purification and biological significance. *Arch. Biochem. Biophys.* 165. 369-378.
- Paik, W. K. és Kim, S. (1980): Protein methylation. Wiley and Sons, New York, 132-136.

Parker, J. E., Holub, E. B., Frost, L. N., Falk, A., Gunn, N. D. és Daniels, M. J. (1996): Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different *RPP* genes. *Plant Cell*. 8. 2033- 2046.

Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. és Ryan, C. A. (1991): A polipeptide from tomato leaves induces wound- inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*. 253. 859- 898.

Penninckx, I. A. M. A., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., De Samlanx, G. W., Buchala, A., Métraux, J. P., Manners, J. és Broekaert, F. W. (1996): Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*. 8. 2309- 2323.

Peterhansel C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R. és Schulze-Lefert, P. (1997): Interaction Analyses of Genes Required for Resistance Responses to Powdery Mildew in Barley Reveal Distinct Pathways Leading to Leaf Cell Death. *Plant Cell*. 9. 1397-1409.

Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., Hoffland, E., van Pett, J. A. és van Loon, L. C. (1996): Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*. 8. 1225- 1237.

Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., van Pett, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., és van Loon, L. C. (1998): A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10. 1571-1580.

Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., Collins, N. C., Panstruga, R. és Schulze-Lefert P. (2002): The Barley MLO Modulator of Defense and Cell Death Is Responsive to Biotic and Abiotic Stress Stimuli. *Plant Physiol*. 129. 1076–1085.

Raskin, I. (1992): Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol*. 99. 799-803.

Raskin, I., Turner, I. M. és Melander, W. R. (1989): Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *PNAS*. 86. 2214-2218.

Rasmussen, J. B., Hammerschmidt, R. és Zook, M. N. (1991): Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol*. 97. 1342- 1347.

Ross, A. F. (1961): Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology*. 14. 329- 339.

Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H- Y. és Hunt, M. D. (1996): Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*. 8. 1809- 1819.

Sárdi, É. és Tyihák, E. (1992): Effect of *Fusarium* infection on the formaldehyde cycle in parts of water melon (*Citrullus vulgaris* L.) plants. 3rd International Conference on Role of Formaldehyde in Biological Systems. Sopron, Hungary. Proceedings 145-149.

Sárdi É. (1994): Az endogén formaldehid és egyes generátorainak tanulmányozása *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*- mal fertőzött görögdinnye növényekben. Kandidátusi értekezés. Budapest, Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem. (jelenleg: Budapesti Corvinus Egyetem)

- Sárdi, É. és Tyihák, E. (1995) Measurement of formaldehyde and its main potential generators in the seeds of water-melon (*Citrullus vulgaris* L.) varieties and F1 hybrids of different *Fusarium* sensitive. *Hort. Sci. Hung.* 27. 66-70.
- Sárdi, É. és Velich, I. (1995a): Measurement of formaldehyde and its main potential generators in the leaves of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of different biotic stress resistance. *Hort. Sci. Hung.* 27. 99-103.
- Sárdi, É. és Velich, I. (1995b): Occurrence of the biochemical background of resistance at snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crops. Res. Inst., Kecskemét.* 27: 85-95.
- Sárdi É., Velich I., Hevesi M., Klement Z. (1996) The role of endogenous carbohydrates in the *Phaseolus-Pseudomonas* host-plantage interaction. 1. Bean ontogenesis and endogenous carbohydrate components. *Hort. Sci. Hung.* 28. 65-69.
- Sárdi, É. és Velich, I. (1996): The presence of Selye's stress-syndrome in the snap bean-halo blight relationship. *Annual Rep. Bean Impr. Coop. Fort Collins USA* 39. 278-279.
- Sárdi, É. és Tyihák, E. (1998): Change of biotransformation steps of formaldehyde cycle in water-melon plants after infection with *Fusarium oxysporum*. *Acta Biol.* 49. 353-362.
- Sárdi, É., Velich, I., Hevesi, M. és Klement, Z. (1999): Ontogenesis- and biotic stress dependent variability of carbohydrate content in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Z. Naturforsch.* 54c. 782-787.
- Sárdi, É. és Stefanovits-Bányai, É. (2006): Relationship between peroxidase activity and the amount of fully N-methylated compounds in bean plants infected by *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. *Acta Physiol. Plant.* 28. 523-528.
- Scheel, D. (1998): Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1. 305-310.
- Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P.A. (1991): Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10. 2247-2258.
- Schulze- Lefert, P. (2004): Knocking on the heaven's wall: pathogenesis and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7. 377- 383.
- Sela-Buurlage, M.B., Ponnsteln, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Melchers, L.S., van den Elzen, P.J.M., and Cornelissen, B.J.C. (1993): Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* 101. 857-863.
- Shannon, L. M., Kay, E. és Lew, J.Y. (1966): Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. *J. Biol. Chem.* 241. 2166-2172.
- Showalter, A.M. (1993): Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell.* 5. 9-23.
- Shulaev, V., León, J. és Raskin, I. (1995): Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell.* 7. 1691- 1701.

Singh, R., Pervin, S., Karimi, A., Cederbaum, S. és Chaudhuri, G. (2000): Activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-Arg selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res.* 60. 3305-3312.

Somssich, I.E., Bollmann, J., Hahlbrock, K., Kombrink, E., and Schulz, W. (1989): Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley cells. *Plant Mol. Biol.* 12. 227-234.

Spanu, P., és Boller, T. (1989): Ethylene biosynthesis in tomato plants infected by *Phytophthora infestans*. *J. Plant Physiol.* 134. 533–537.

Stefani, E. és Rudolph, K. (1989): Induced resistance in bean leaves pre-treated with extracellular polysaccharides from phytopathogenic bacteria. *Jour. Phytopathol.* 122. 343-350.

Sutherland, M.W. (1991): The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39. 79-93.

Szarka, E., Sárdi, É., Csilléry, G. és Szarka, J. (2007): Transmethylation and the general defense reaction of plants. *Int. Jour. Hort. Sci.* 13 (4) 35-40.

Szarka, J. és Csilléry, G. (1995): Defence systems against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper. IXth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding on *Capsicum* and Eggplant. Budapest, Hungary. Proceedings 184-187.

Szarka, J. és Csilléry, G. (2001a): General defense system in the plant kingdom. *Int. Jour. Hort. Sci.* 7 (1) 79-84.

Szarka, J. és Csilléry, G. (2001b): General defense system in the plant kingdom II. *Int. Jour. Hort. Sci.* 7 (3-4) 73-77.

Szarka, J., Sárdi, É., Szarka, E. és Csilléry, G. (2002): General defense system in the plant kingdom III. *Int. Jour. Hort. Sci.* 8 (3-4) 45-54.

Szarka, J., Szarka, E. és Csilléry, G. 2007. A New Form of General Disease Resistance Associated with Host Cell Proliferation. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 42. 273-277.

Szarka, J., Toldi, O., Szarka, E., Remenyik, J. és Csilléry, G. (2006): General Defense Reaction in the Plant Kingdom. *Acta Agr. Hung.* 54. 221-232.

Szarvas, T., János, É., Gáborjányi, R. és Tyihák, E., (1982): Increased formaldehyde formation: an early event of TMV infection in hypersensitive host. *Acta Phytopatol. Acad. Sci. Hung.* 17. 7-10.

Szatmári, A., Ott, P. G., Varga, G. J., Besenyei, E., Czelleng, A., Klement, Z. és Bozsó, Z. (2005): Characterisation of basal resistance (BR) by expression patterns of newly isolated representative genes in tobacco. *Plant Cell Rep.*

Szende, B., Tyihák, E., Kopper, L. és Lapis, K. (1970): The tumor growth promoting effect of ϵ -N-trimethyl lysine. *Neoplasma.* 17. 433-434.

Szende B., Tyihák E., Trézl L., Szőke E., László I., Kátay Gy. és Király-Véghely, Zs. (1998): Formaldehyde generators and capturers as influencing factors of mitotic and apoptotic processes. *Acta Biol. Hung.* 49. 323-329.

Szende B., Tyihák E. és Trézl L. (2001): Role of arginine and its methylated derivatives in cancer biology and treatment. *Cell Cancer International.* 1:3.

Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, Z., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Zou, G. és Katagiri, F. (2003): Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell.* 15. 317- 330.

Templeton, M. D. and Lamb, C. J. (1988): Elicitors and defence gene activation. *Plant Cell Environ.* 11. 395-401.

Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch- Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A. és Broekaert, W. F. (1998): Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *PNAS.* 95. 15107–15111.

Thomma, B. P., Eggermont, K., Tierens, K.F. és Broekaert, W. F. (1999): Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 121. 1093–1101.

Thordal- Christensen, H. (2003): Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6. 351- 357.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. és Collinge, D. B. (1997): Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11. 1187-1194.

Toldi, O., Renfors, E., Kulmala, I. és Sorvari, S. (2008): The endophyte *Pseudomonas fluorescens* provides resistance to different fungal pathogens by activating defense mechanisms in host plants through H₂O₂ signalling. In: Sorvari, S. és Pirttilä, A. M. (szerk.) 'Prospects and Applications for Plant-Associated Microbes. A Laboratory Manual, Part A: Bacteria' (in press)

Trézl, L., Hullán, L., Jászay, Zs. M., Szarvas, T., Petneházy, I., Szende, B., Bocsi, J., Takáts, Z., Vékey, K. és Tőke, L. (2003): Antagonistic reactions of arginine and lysine against formaldehyde and their reaction to cell proliferation, apoptosis, folate cycle and photosynthesis. *Molecular and Cellular Biochem.* 244 (1-2) 167-176.

Trigalet, A. és Démary D. (1986): Extracellular polysaccharides of Phytopathogenic Bacteria. *Symbiosis.* 2. 201-216.

Tyihák, E., Szende, B. és Lapis, K. (1977): Biological significance of methylated derivatives of Lysine and Arginine. *Life Sciences* 20. 358-392.

Tyihák, E., Balla, J., Gáborjányi, R. és Balázs, E. (1978): Increased free formaldehyde level in crude extract of virus infected hypersensitive tobaccos. *Acta Phytopatol. Acad. Sci. Hung.* 13. 29-31.

- Tyihák, E., Trézl, L. és Kolonits, P. (1985): The isolation of N-formyl-L-lysine from the reaction from the reaction between formaldehyde and L-lysine and its identification by OPLC and NMR spectoscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 3. 343-349.
- Tyihák, E., Király, Z., Gullner, G. és Szarvas, T. (1989): Temperature- dependent formaldehyde metabolism in bean plants. The heat shock response. *Plant Sci.* 59. 133-139.
- Tyihák, E., Rozsnyai, S., Sárdi, É., Gullner, G., Trézl, L. és Gáborjányi, R. (1994): Possibility of formation of excited formaldehyde and singlet oxigen in biotic and abiotic stress situations. *Acta Biol. Hung.* 45. 3-10.
- Tyihák, E., Trézl, L. és Szende, B. (1998): Formaldehyde cycle and the phases of stress syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851. 259-270.
- Tyihák E., Albert L., Németh Zs. L., Kátay Gy., Király-Véghely Zs. és Szende B. (1998): Formaldehyde cycle and the natural formaldehyde generators and capturers. *Acta Biol. Hung.* 49. 225-238.
- Tyihák, E., Bocsi, J., Timár, F., Rácz, G. és Szende, B. (2001): Formaldehyde promotes and inhibits the proliferation of cultured tumour and endothelial cells. *Cell Prolif.* 34. 135-141.
- Uknes, S., Mauch- Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. és Ryals, J. (1992): Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 4. 645- 656.
- Van Loon, L. C. és Van Kammen, A. (1970): Polyacrylamide disc elektrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN' II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology.* 40. 199-211.
- van Wees, S. C. M., Pieterse, C. M. J., Trijssenaar, A., Van't Westende, Y. A. M., Hartog, F. és van Loon, L. C. (1997): Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *MPMI.* 10. 716- 724.
- Velich, I. és Sárdi, É. (1997): The change of endogenous formaldehyde and its main potential generators and susceptibility to *Pseudomonas* during ontogenesis of bean. *Annual Rep. Bean Impr. Coop. Fort Collins USA.* 40. 101-102.
- Venkatappa, K. T., Tang, X., Gu, Y. Q., Martin, G. B. és Zhou, J-M. (1999): *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* induces the expression of tomato *EREBP*-like *Pti4* and *Pti5* independent of ethylene, salicylate and jasmonate. *Plant J.* 20. 475-483.
- Verberne, M. C., Verpoorte, R., Bol, J. F., Mercado- Blanco, J. és Lindhorst, H. J. M. (2000): Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology.* 18. 779-783.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Ahl- Goy, P., Staub, T., Kessmann H. és Ryals, J. (1995): 2,6-Dichloroisonicotinic acid- induced resistance to pathogens does not require the accumulation of salicylic acid. *MPMI.* 8. 228-243.

- Vernooij, B., Friedrich, L., Ahl Goy, P., Staub, T., Kessmann, H., és Ryals, J. (1995): 2,6-Dichloroisonicotinic Acid-Induced Resistance to Pathogens Without the Accumulation of Salicylic Acid. *MPMI*. 8. 228-234.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reis, R., Kolditz- Jahwar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H. és Ryals, J. (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.
- Vorwerk, S., Sommerville, S. és Sommerville, C. (2004): The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci*. 9. 203-209.
- Wagner, M. A. és Jorns, M. S. (2000): Monomeric sarcosine oxidase. 2. Kinetic studies with sarcosine, alternate substrates, and a substrate analogue. *Biochemistry* 39. 8825-8829.
- Ward, H. M. (1902): On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust *Puccinia dispersa* (Erkiss.) *Annals of Botany*. 16. 233-316.
- Whetten, R., and Sederoff, R. (1995): Lignin biosynthesis. *Plant Cell* 7. 1001-1013.
- White, R.F. (1979): Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*. 99. 410- 412.
- Yalpani, N., Shulaev, V. és Raskin, I. (1993): Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis- related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathol*. 83. 702- 708.
- Yoshimoto, M., Waki, A., Obata, A., Furukawa, T., Yonekura, Y., Fujibayashi, Y., Chang, J. C., Gross, E. A., Swenberg, J. A. és Barrow, C. S. (2004): Radiolabeled choline as a proliferation marker: comparison with radiolabeled acetate. *Nuclear Medicine and Biology*. 31. 859-865.
- Yu, D., Liu, Y., Fan, B., Klessig, D. F. és Chen, Z. (1997): Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato? *Plant Physiol*. 115. 343-349.
- Yu, I-ching, Parker, J. és Bent, A. F. (1998): Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *PNAS*. 95. 7819-7824.
- Yun, B-W., Atkinson, H. A., Gaborit, C., Greenland, A., Read, N. D., Pallas, J. A. és Loake, G. (2003): Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in *Arabidopsis* against wheat powdery mildew. *Plant J*. 34. 768-777.
- Zhou, N., Tootle, T. L., Tsui, F., Klessig, D. F. és Glazebrook, J. (1998): *Pad4* functions upstream from salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10. 1021-1030.
- Zhu, Q., Maher, E.A., Masoud, S., Dixon, R.A., and Lamb, C.J. (1994): Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio/Technology* 12. 807-812.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Sárdi Évának, hogy tudását megosztotta velem és bevezetett az általa művelt szakterület ismereteibe, elsősorban a transzmetilezéssel kapcsolatos kutatásokba.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar Genetika és Növénynevelés Tanszék vezetőinek a kísérleteim elvégzéséhez biztosított lehetőségekért és a Tanszék munkatársainak a tőlük kapott segítségért.

Hálával tartozom Csilléry Gábornak, Dr. Mitykó Juditnak és Szarka Jánosnak, hogy csatlakozhattam a növények általános védekezési rendszerét vizsgáló, számos szakterületet magában foglaló kutatáshoz.

Köszönetemet szeretném kifejezni Csilléry Gábornak, hogy a génbanknak tekinthető, *Capsicum* fajokat magában foglaló gyűjteményéhez szabad utat és útmutatást biztosított számomra, valamint nagyértékű, genetikailag pontosan nyilvántartott paprika nemesítési anyagán dolgozhattam és hogy megismertette velem a paprika nemesítésével és genetikájával foglalkozó kutatók nemzetközi fórumait.

Munkám és vizsgálataim hibalehetőségének a növény oldaláról történő lehető legteljesebb lecsökkentését a dihapliod paprika vonalakat előállító Dr. Mitykó Juditnak köszönöm.

Köszönöm Szarka Jánosnak, hogy a kórtani, tünettani, kóréletti munkák során feltárta előttem a növényi védekezés rejtelmét, átadta tapasztalatait és szemléletét, valamint hogy rendelkezésemre bocsátotta nagy szemléltető erejű fényképeit.

Köszönöm, hogy együtt dolgozhattam az Élelmiszertudományi Kar Alkalmazott Kémia Tanszékén Stefanovitsné Dr. Bányai Évával a peroxidáz enzim vizsgálata során, a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Központban Dr. Toldi Ottóval a hidrogén-peroxid kísérletekben és a Debreceni Egyetem Kertészettudományi és Növényi Biotechnológiai Tanszékén Dr. Remenyik Judittal a szalicilsav mérések során. Mindhárom együttműködés értékes tapasztalatokkal szolgált.

Köszönet illeti Dr. Kiss György Botondot, amiért lehetőséget biztosított nekem, hogy a csoportjában folyó paprika molekuláris genetikai munkákba bekapcsolódhassam. Köszönöm Dr. Jakab Júlia támogatását és a laboratórium minden munkatársának segítségét.

Végül szeretném megköszönni Családom biztatását és segítségét e munka elkészítésében.