

A NÖVÉNYEK ÁLTALÁNOS VÉDEKEZÉSI RENDSZERÉNEK BIOKÉMIAI ÉS GENETIKAI VIZSGÁLATA

Doktori értekezés tézisei

Szarka Eszter

Témavezető
Dr. Sárdi Éva
tudományos főmunkatárs

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, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

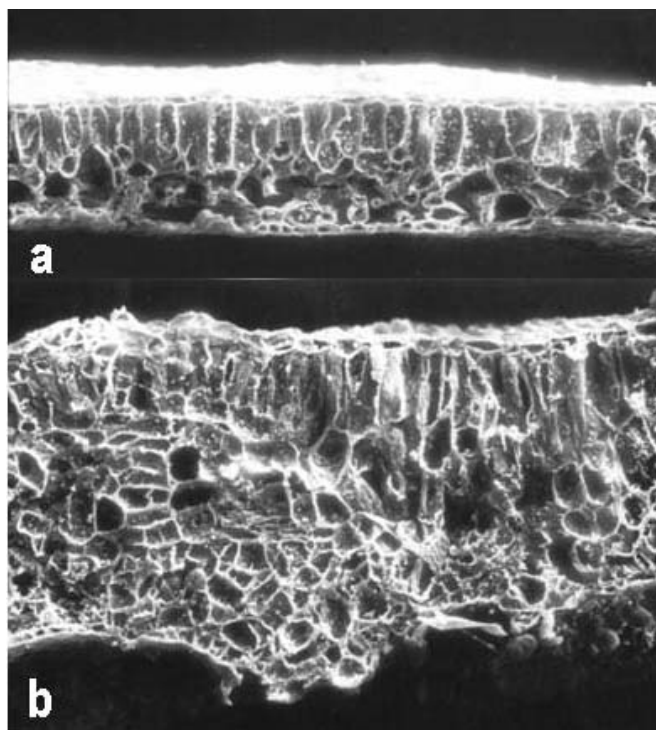
.....
Dr. Tóth Magdolna
Az iskolavezető jóváhagyása

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

1. Bevezetés

A genetika és növénykórtan szakterületét magában foglaló rezisztencianemesítés 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 reakció, mint úgy nevezett rezisztencia válasz felülbírlása volt. Ezzel párhuzamosan egy másik, általuk felismert növényi tulajdonság, az *általános védekezési rendszer* (Szarka és Csilléry, 1995) 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, sejtszétváláson alapuló szövettömörödésben megnyilvánul meg (1. ábra).



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

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 védeettséget adó *Bs-2* specifikus rezisztenciagént 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, tünettan és biokémiai alapon egyértelműen elhelyezhessük a meglévő rendszerezésben és kijelenthessük, hogy egy olyan védekezési formával állunk szembe, 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 betegségellenállóságban 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. Anyagok és módszerek

A felhasznált növényanyag

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.

Az inokuláláshoz alkalmazott baktériumok

Az inokuláláshoz a *X. c. pv. vesicatoria* baktérium magyarországi gyűjtésből származó, közepes agresszivitású izolátumát használtuk. A baktérium 48 órás tenyészetéből készítettük a 10^8 sejt/ml koncentrációjú inokulumot.

Az inokuláció eszköze és az inokulálás módszere

Erős vegetatív növekedési szakaszban lévő növények nyolcadik-kilencedik, 80%-os fejlettségű, de még növekedésben lévő levelét inokuláltuk. 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 baktérium szuszpenzióból a levelek sejtközötti járataiba. Ezzel a módszerrel a levélen belüli átcsoportosulások mutathatók ki a fertőzött folt irányába a szomszédos, baktériummal nem érintkező szövetrészekből. A másik esetben a teljes levéllemezt infiltráltuk baktérium szuszpenzióval. Ezzel a levélen belüli transzport lehetőségét zártuk ki.

A levéllemezből a fonák felől, a sztómákon keresztül préseltük be az inokulumot olyan injekciós fecskendővel, melynek végére tű helyett átfűrt radírgumit erősítettünk a megfelelő tömítés érdekében és a levél sértésének elkerülése végett.

A *gds* és *Bs-2* gén ép, illetve sérült növényi sejtekben való működésének összehasonlítása érdekében egy kis pontban, infiltrálódást okozó mechanikai nyomást gyakoroltunk a szövetekre. Ezt követően oly módon végeztük az inokulálást, hogy a mechanikailag sértett szövetrész a mintegy 2 cm átmérőjű inokulált szövetfolt közepén helyezkedjen el.

A genetikai vizsgálatok során alkalmazott kórtünetrendszer

Az inokulációt követő 7-8. napon a fogékony növények leveleinek *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal infiltrált szövetrészei vizenyőssé váltak. A domináns *Bs-2* specifikus rezisztencia gén kódolta növényi válasz enyhe lilás elszíneződésben, esetleg szövetelhalásban nyilvánult meg, a fertőzést követő 3-4. napon. 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.

A mintavétel

A növényi védekezési reakciók 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. A teljes levél infiltrálásakor a levél egészének homogenizálásával készítettük a mintákat.

A biokémiai és élettani vizsgálatok módszerei

A biokémiai módszerek közül kromatográfiás eljárással vizsgáltuk a szénhidrát vegyületeket (Sárdi és mtsai, 1996), a különböző metilezett vegyületeket és a formaldehidet (Gersbeck és mtsai, 1989), valamint a szalicilsavat (Raskin és mtsai, 1989 alapján), a peroxidáz enzimaktivitást (Shannon és mtsai, 1966) és a hidrogén-peroxid koncentrációt (Toldi és mtsai, 2008) pedig spektrofotometriás módszerrel mértük.

3. Eredmények és következtetések

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.

3.1. Az általános védekezési rendszer működésének gazdaságossága

A fertőzés hatására bekövetkező élettani változások kimutatására egyik legalkalmasabb vegyület a növény energetikai alapját képező glükóz, melynek mennyiségi változását a fertőzött és a szomszédos, nem fertőzött szövetrészekben is vizsgáltunk. 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 szövetváltozásokkal.

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 hirtelen lecsökkent, de egy óra elteltével visszaállt. Ez feltehetően a szomszédos szövetekből érkező glükóz transzportnak köszönhető. Ezek alapján a hatékony helyi válaszokra képes specifikus védekezési reakció egyszeri és energiatakarékos.

A *gds* gén biztosította általános védekezési rendszer a specifikus reakcióval ellentétben folyamatosan működik, ezért glükóz felhasználása is nagyobb volt. Ezt a szomszédos, nem fertőzött szövetekből érkező folyamatos glükóztranszport is bizonyította. A sejtfalerősítés illetve sejtnagyobbodás folyamatához szükséges nagyobb glükózfogyasztást viszont bőségesen ellentételezi az a tény, hogy a megtámadott szövetek nem pusztulnak el.

Mivel a kísérletben azonos méretű mesterségesen fertőzött levélfelületet vizsgáltunk, így csak a három növényi reakció egységnyi fertőzött szövetrésze eső energia igényét lehet meghatározni, nem pedig a felhasznált cukor abszolút mennyiségét. Ezek alapján, az általános védekezési reakció szénhidrát felhasználása nagyobb ugyan, mint a specifikus reakcióé, de természetes fertőződés esetén a *gds* gén reakciója csak az infekciós pont körüli 10-15 sejtre korlátozódik, így ez lényegesen gazdaságosabb, mint a több mm-es lézióval járó hiperszenzitív reakció.

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

A fogékony, *Bs-2* és *gds* gént tartalmazó növények fertőzésre adott, hidrogén-peroxid (H_2O_2) koncentrációban kifejezett válasza jól mutatja a különböző reakciók közti alapvető eltéréseket.

A **fogékony** növényekben a kísérlet 10 órás időtartama alatt, a vártak megfelelően, nem észleltünk jelentős változásokat a H_2O_2 mennyiségében. A megbetegített fogékony növényekben a H_2O_2 csak később, a lassú szövetpusztulás során szabadul fel, a védekezésben nem vesz részt.

A specifikus ***Bs-2*** gént tartalmazó növényekben a H_2O_2 koncentráció a fertőzést követő 30. percben elérte a maximum értéket, mely a kontroll mintákban mért mennyiséghez képest négyszeres növekedést jelentett. Ezt követően a H_2O_2 tartalom folyamatosan csökkent és 8 óra alatt elérte a kiindulási értéket. Tehát az eddigi ismereteknek megfelelően, nyomonkövethető volt a specifikus rezisztenciagénekre jellemző hiperszenzitív kórtünetekkel járó hidrogén-peroxid felhalmozódás.

Ezzel szemben, a ***gds*** gént tartalmazó növényekben a H_2O_2 mennyisége a fertőzést követően nem mutatott változást a kontroll növényekhez képest a mérések adott időtartamán belül. Vagyis, a *gds* gén által biztosított védekezés során, elmaradt a H_2O_2 által közvetített oxidatív kitérés.

A H_2O_2 a növény-mikroba illetve gazda-kórokozó kapcsolatokban, mennyiségétől függően hol a növény 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 egymás utánisága a kórtani vizsgálatok során már beigazolódott (Szarka és mtsai, 2002).

A *gds* gén esetében a hatékony védekezés során nem képződik nagymennyiségű H_2O_2 . A növény általános védekezési reakcióját áttörő kórokozó pusztítása következtében, fogékony gazda-patogén kapcsolatban viszont lassú H_2O_2 termelődés indul be. A kórokozó okozta specifikus stressz kivédésére, az evolúció során a gazdanövényben specifikus védekezési reakció alakult ki. Ez, az evolúciósan legfiatalabb reakció csak a fogékony fázisban bekövetkezett pusztulásra utaló H_2O_2 , mint jelzőmolekula hatására lép működésbe. A specifikus védekezési reakció így válik az általános védekezési rendszer hibajavító egységévé és a két reakció egymásra épülve így alkotja a betegségellenállóság egységes egészét.

3.3. A szalicilsav szerepe az általános védekezési rendszerben

A szalicilsav (SA) számtalan növény és kórokozó kapcsolatban általánosan előforduló jelzőmolekula, mely 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. Ez a nekrotikus léziók méretének

csökkenésében nyilvánul meg. Ezek ismeretében a szövetpusztulás nélküli védekezési reakciót kódoló *gds* gén és a biológiailag aktív, szabad SA kapcsolatának vizsgálatát tűztük ki célul.

Míg a fertőzés következtében a ***Bs-2*** gént tartalmazó paprikavonalban a kontrollhoz (1,19 µg/g friss tömeg) képest igen erős SA szint csökkenést (0,61-0.001 µg/g friss tömeg) észleltünk, addig a *gds* gént tartalmazó növényekben az inokulálást követően a SA mennyisége a HPLC érzékenysége alatt volt a kísérlet teljes időtartama alatt, továbbá a fertőzetlen és a vizes kontrollban nem tudtuk szabad SA-at kimutatni. A SA vizsgálata alapján megállapíthatjuk, hogy a *gds* gén esetében a SA, mint jelzőmolekula, nem vesz részt a védekezés szabályozásában.

Ismert, hogy a szalicilát-hidroxiláz nevű enzimet kódoló *NahG* gént tartalmazó, SA-hiányos transzgenikus növények, a kórokozókkal szemben fogékonyabbakká válnak. E tény mellett az újdonság erejével hat az a jelenség, hogy a *gds* gén igen alacsony SA-szint mellett, vagy annak teljes hiányában is tökéletesen működik.

Szintén az irodalomból ismert, hogy burgonyában az *Rx* gén (Köhm és mtsai, 1993) és *Arabidopsis* esetében a *nd1* gén (Yu és mtsai, 1998) magas SA szint mellett biztosítanak tünetmentes, széles spektrumú rezisztenciát. Figyelemre méltó, hogy ezzel szemben a *gds* gén igen alacsony szabad SA-szint mellett, vagy annak hiányában biztosít széles spektrumú, tünetmentes rezisztenciát.

3.4. Az általános védekezési rendszer jellemzése peroxidáz enzimaktivitás alapján

A *gds* gén által kódolt sejt- és szövetmegtartással járó általános védekezési reakció során nem észleltünk változást a H₂O₂-tartalomban. Kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy a sejtmegtartással 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, reakciótipustól 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. 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 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-háromszorosa lett a kontrollban mért értéknek.

A vizsgált reakciótípusokat illetően a POD aktivitás beindulásának időpontjában, de főleg mértékében nagy különbség figyelhető meg, melyek összhatásának feltehetően alapvető stratégiai jelentősége van a hatékony védekezésben. A *gds* gént tartalmazó, kiemelkedő antioxidáns kapacitással rendelkező növényekben a káros gyökök semlegesítését végző POD jelentős mértékben járul hozzá a fertőzött szövetek pusztulással szembeni védelméhez.

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

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

A **fogékony** és a **Bs-2** gént tartalmazó paprika vonalban a kolin és a formaldehid mennyiségének változása közt nem volt szoros összefüggés. Az alacsony ingerküszöbű és nagy reakciósebességgel bíró *gds* gént tartalmazó növényekben, az inokulálás pillanatában beinduló demetileződés következtében a kolin és a formaldehid mennyisége szoros, ellentétes irányú változást mutatott. A kolin gyors demetileződésének következtében a formaldehid mennyisége azonnal növekedésnek indult, és egy órán belül elérte a maximum értéket. Ezzel a védekezési reakció alaplépése lezajlott. A formaldehid mennyisége ezek után csökkenni kezdett és beindult a kolin mennyiségének lassú növekedése.

A kolin mennyiségének változása során az első órában megfigyelhető minimum érték, illetve az antimikrobiális hatású formaldehid mennyiségének ugyanekkor tapasztalt csúcserő arra enged következtetni, hogy a *gyors átalakulás*nak jelentős szerepe lehet a növényeket ért stressz kivédésében.

3.6. A *gds* gén és a *Bs-2* gén kölcsönhatásának genetikája

A paprika rezisztencianemesítésben történő hasznosítása érdekében kezdtük el a *X. c. pv. vesicatoria* baktériummal szemben alkalmazott, specifikus *Bs-2* gén és a *gds* gén külön-külön történő megismerését követően, a két gén kölcsönhatásának tanulmányozását (Csilléry és mtsai, 2007). A *gds* gén és *Bs-2* gén öröklődésmenetének vizsgálatát szintén a biokémiai kísérletekhez használt DH vonalakon végeztük.

A recesszív *gds* gént (*Bs-2⁺/Bs-2⁺ gds/gds*) és a domináns *Bs-2* gént (*Bs-2/Bs-2 gds⁺/gds⁺*) homozigóta állapotban tartalmazó DH vonalaink keresztezésével előállított F1 hibridek (*Bs-2/Bs-2⁺ gds/gds⁺*), meglepetésünkre nem azt a fenotípust mutatták, amit a *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, vagyis F1 nemzedékben a domináns génnel szemben a recesszív gén fenotípusa is megjelent, annak ellenére, hogy heterozigóta állapotban volt. A két gén kölcsönhatásának vizsgálatát az F2 nemzedékben folytattuk és az F1 nemzedék kórtüneteire az F2 nemzedék kettős homozigóta (*Bs-2/Bs-2 gds/gds*) egyedeinek reakciója adta meg a választ.

Genetikai vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy akár homozigóta, akár heterozigóta állapotban van a domináns *Bs-2* gén, fenotípusa csak halványlila elszíneződésként jelenik meg, ha a *gds* gén heterozigóta állapotban jelen van, mert a *gds* gén szövetmegtartó képessége így is érvényesül. Amennyiben a recesszív *gds* gén homozigóta állapotban van, szinte teljesen elnyomja a domináns *Bs-2* gén működését, melyre csak az erek menti szövetek lilás elszíneződése utal.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a két gén egymástól függetlenül kombinálódik, nincs közöttük 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 egy időben, 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.

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

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 lilás 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 növényi sejtek sérülésének a *gds* és a *Bs-2* gén működésére gyakorolt hatását vizsgálva újabb összefüggéseket ismertünk meg a két gén betegség ellenállóságban betöltött szerepét illetően. 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.

Az általános védekezési reakció a fentiek alapján képes betölteni a növényi immunrendszer szerepét, míg a specifikus rezisztencia reakciók csak a hibajavító szerepét töltik be a növények betegségellenállóságának 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 betegségellenállósággal bíró fajták állíthatók elő.

4. Az új tudományos eredmények összefoglalása

A paprikában leírt, új tudományos felismerésnek számító, általános védekezési rendszert kódoló *gds* gén örökléstani és kórélettani sajátosságainak biokémiai folyamatok alapján történő jellemzését az alábbiakban foglalom össze. A növények, így a paprika általános védekezési rendszeréről még keveset tudunk, ezért a *X. c. 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 szövetelváltozásokkal.

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 kitérésre 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* demetiliződés 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 nagydózisú 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.

Idézett irodalmak

- Csillery, G., Mityko, J., Szarka, E. and 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.
- Gersbeck, N., Schönbeck, F. and 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.
- 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.
- Raskin, I., Turner, I. M. and Melander, W. R. (1989): Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *PNAS.* 86. 2214-2218.
- Sárdi, É., Velich, I., Hevesi, M. and 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.
- Shannon, L. M., Kay, E. and Lew, J. Y. (1966): Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. *J. Biol. Chem.* 241. 2166-2172.
- Szarka, J. and 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., Sárdi, É., Szarka, E. and Csilléry, G. (2002): General defense system in the plant kingdom III. *Int. Jour. Hort. Sci.* 8 (3-4) 45-54.
- Toldi, O., Renfors, E., Kulmala, I. and 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)
- Yu, I-ching, Parker, J. and Bent, A. F. (1998): Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *PNAS.* 95. 7819-7824.

Az értekezés témaköréből készült publikációk jegyzéke

Folyóiratcikkek

IF-os folyóiratcikk

É. Sárdi, E. Szarka, G. Csilléry and J. Szarka. Biochemical Examination of the General Defense System of Plants by OPLC. Journal of Planar Chromatography, Vol. 19. May/June 2006. 233-237.

Nem IF-os folyóiratcikkek

Szarka, J., Sárdi, É., Szarka, E. and Csilléry, G. General defense system in the plant kingdom III. International Journal of Horticultural Science, 8 (3-4) 2002. 45-54.

J. Szarka, O. Toldi, E. Szarka, J. Remenyik and G. Csilléry. General Defense Reaction in the Plant Kingdom. Acta Agronomica Hungarica, 54 (2), 2006. 221-232.

Szarka, J., Szarka, E. and Csilléry, G. 2007. A New Form of General Disease Resistance Associated with Host Cell Proliferation. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 42 (2), 2007. 273-277.

Szarka, E., Sárdi, É., Csilléry, G. and Szarka, J. Transmethylation and the general defense reaction of plants. International Journal of Horticultural Science, 13 (4) 2007. 35-40.

Konferencia kiadványok

Magyar nyelvű, teljes

Szarka E., Csilléry G., Szarka J. és Sárdi É. A növénynevelés és környezeti hatásai. Proceedings of the 11th Symposium on Analytical and Environmental Problems. Szeged, Hungary, 27 September 2004. 335- 338.

Magyar nyelvű, összefoglaló

Sárdi É., Szarka E., Csilléry G. és Szarka J. A paprika általános védekezési rendszerének biokémiai vizsgálata. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak. Budapest, 2003. november 6-7. 112-113.

Szarka E., Stefanovits-Bányai É. és Sárdi É. A növényi betegségellelnállóság egységes egésze II. X. Növénynevelési Tudományos Napok. Budapest, 2004. febr. 18-19. 157.

Szarka E., Sárdi É., Csilléry G. és Szarka J. A magyar fűszerpaprika új korszaka I. Általános és specifikus védekezési rendszerek a rezisztencianemesítésben. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak. Budapest, 2005. október 19-21. 356-357.

Timár Z., Kapitány J., Szarka E., Mitykó J., Földi T., Balogh M., Gutermuth Á., Szarka J., Csilléry G. és Kiss Gy. B. A magyar fűszerpaprika új korszaka II. A hagyományos és molekularis alapú nevelés eredményei és lehetőségei. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak. Budapest, 2005. október 19-21. 358-359.

Szarka J., Szarka E., Gutermuth Á. és Csilléry G. Gyors sejtpusztulásban és sejtosztódásban megnyilvánuló növényi reakciók szerepe a rezisztencianemesítésben. 52. Növényvédelmi Tudományos Napok. Budapest, 2006. február. 23-24. 59.

Timár Z., Mitykó J., Gutermuth Á., Szarka E., Balogh M., Földi T., Csilléry G., Szarka J. és Kapitány J. A magyar fűszerpaprika új korszaka. XII. Növénynevelési Tudományos Napok. Budapest, 2006. márc. 7-8. 31.

Szarka E., Gutermuth Á., Timár Z., Földi T., Csilléry G. és Szarka J. Általános és specifikus védekezési rendszerek a rezisztencianemesítésben. XII. Növénynevelési Tudományos Napok. Budapest, 2006. márc. 7-8. 33.

Szarka J., Szarka E., Nagy B. és Csilléry G. A növények általános védekezési rendszerének és specifikus védekezési rendszereinek kapcsolata. 53. Növényvédelmi Tudományos Napok. Budapest, 2007. február. 20-21. 21.

Nemzetközi konferencia, full paper

Csilléry, G., Szarka, E., Sárdi, É., Mitykó, J., Kapitány, J., Nagy, B. and Szarka, J. The unity of plant defense. Genetics, breeding and physiology. XIIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant. Noordwijkerhout, The Netherlands, 17-19 May 2004. 147-153.

Sárdi, É., Szarka, E., Stefanovits-Bányai, É., Csilléry, G. and Szarka, J. Biochemical Examination of the General Defense System of Plants by OPLC Method. International Symposium on Planar Separations. Planar Chromatography. Visegrád, Hungary, 23-25 May 2004. 585-592.

Csilléry, G., Mitykó, J., Szarka, E. and 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, Sept. 5-7. 2007. 59-69.

Nemzetközi konferencia, abstract

Sárdi, É., Szarka, E., Csilléry, G., Szarka, J. and Stefanovits-Bányai, É. Possible role of formaldehyde cycle in the general defense system of plants. 6th International Conference on Role of Formaldehyde in Biological Systems. Methylation and Demethylation Processes. Pécs, Hungary, October 13-16, 2003. 64.

Sárdi, É., Szarka, E., Stefanovits-Bányai, É., Szarka, J. and Csilléry, G. Study of the biochemical background of the general defense system by OPLC method. International Symposium for HPTLC. Lyon, France, October 15-18, 2003. 304-311.

Szarka, E., Szarka, J and Csilléry, G. The Role of the General Defense Reaction in the Resistance Breeding of Pepper against the *Xanthomonas vesicatoria* Bacterium. 18th International Pepper Conference. Palm Springs, California, May 21-23, 2006. 8-9.

Szarka, J., Szarka, E. and Csilléry, G. The General Defense Reaction of Plants. Plant Resistance Symposium. Non-specific and Specific Innate and Acquired Plant Resistance. Budapest, Hungary, August 31-September 3, 2006. 78.

Szarka, E., Kiss, Gy. B., Mitykó, J., Balogh, M., Földi, T., Szarka, J. and Csilléry, G. Breeding of multiresistance in vegetables. Indian-Hungarian Binational Seminar on „Biology of Biotic and Abiotic Stress in Higher Plants”. Szeged, Hungary, September 27-28, 2006.