

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

**A növények általános rezisztenciájának szerepe a szaprotróf és
opportunistá patogén baktériumok szaporodásának megakadályozásában**

Doktori értekezés

Besenyei Eszter



Növénykórtani Tanszék
MTA Növényvédelmi Kutatóintézet
Budapest, 2006

A doktori iskola

- megnevezése:** Kertészettudományi.....
- tudományága:** Növénytermesztési és kertészeti.....
- vezetője:** Dr. Papp János
egyetemi tanár, DSc
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcstermő Növények Tanszék
- Témavezető:** Dr. Klement Zoltán[†]
kutató professzor, MHAS
MTA NÖVÉNYVÉDELMI KUTATÓINTÉZET
- Témavezető:** Dr. Barna Balázs
tudományos igazgatóhelyettes, DSc
MTA, NÖVÉNYVÉDELMI KUTATÓINTÉZET
- Témavezető:** Dr. Palkovics László
tanszékvezető egyetemi docens, PhD
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM, Kertészettudományi Kar,
Növénykórtani 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 nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása
Dr. Papp János

.....
A témavezető jóváhagyása
Dr. Barna Balázs

.....
Az témacsoport vezető jóváhagyása
Dr. Mészáros Zoltán

.....
A témavezető jóváhagyása
Dr. Palkovics László

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2006. október 3-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Bernáth Jenő, DSc

Tagjai

**Tóth Magdolna, CSc
Gáborjányi Richárd, DSc
Hornok László, MHAS**

Opponensek

**Hevesi Lászlóné, CSc
Virányi Ferenc, DSc**

Titkár

Sárdi Éva, PhD

TÁRGYMUTATÓ

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. A növények védelmi rendszere (mechanizmusok felosztása, jellemzése)	9
2.1.1. Passzív védelem.....	9
2.1.2. Aktív (indukált) védelem.....	10
2.1.2.1. Az általános növényi védekezés, basal resistance (BR)	10
2.1.2.1.1. Az általános rezisztencia dohányban azonosított molekuláris markerei	11
2.1.2.1.2. A környezeti tényezők hatása a BR kialakulására.....	14
2.1.2.2. A hiperszenzitív reakció (HR).....	14
2.1.2.2.1. A „gén a génnel szemben” elmélet.....	15
2.1.2.2.2. A HR szakaszai.....	17
2.1.2.2.3. A patogenitásért és a HR kialakulásáért felelős III. típusú szekréciós rendszer ...	17
2.1.2.2.4. A környezeti tényezők hatása a HR kialakulására.....	18
2.1.2.3. A lokális szerzett rezisztencia (LAR).....	19
2.1.2.4. A szisztemikus szerzett rezisztencia (SAR)	19
2.2. A <i>Pseudomonas</i> -fajok csoportjai és túlélési stratégiái.....	20
2.3. A baktériumos növénybetegségek tünetei	22
2.4. Az alacsony, fagyhatár fölötti hőmérséklet élettani hatása a mezofil baktériumfajok anyagcseréjére, különös tekintettel a virulenciát fokozó tényezők szintézisére.....	23
2.5. Az alacsony, fagyhatár fölötti hőmérséklet élettani hatása a magasabb rendű növényekre.....	26
2.6. A paprika ökológiai igényei, táplálkozási és gazdasági jelentősége	27
2.7. A paprika kórokozói	28
2.8. Paprikában azonosított kórfolyamatokkal kapcsolatba hozható (pathogenesis-related, PR) fehérjék	29
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
3.1. Növények.....	33
3.2. Hőmérséklet.....	33
3.3. Fény	34
3.4. Baktériumok	34
3.5. Fertőzési módszerek	35
3.6. A baktériumok HR-indukciós idejének kimutatása.....	36
3.7. A BR kimutatása, kialakulási idejének meghatározása	36
3.8. A <i>in vitro</i> és <i>in planta</i> baktériumszaporodás mérése.....	37
3.9. A sejtközötti járatokból származó, vízben oldható fehérjék (<i>intercellular washing fluid</i> , IWF) elkülönítése, sűrítése	37
3.10. Az IWF minták elválasztása poliakrilamid gélben.....	38
3.10.1. Egydimenziós PAGE.....	38
3.10.2. Kétdimenziós PAGE.....	39
3.11. Festési eljárások.....	39
3.12. A növényi génexpresszió változásának megállapítása valós idejű PCR készülék alkalmazásával.....	41
3.13. Statisztikai módszerek	42
4. EREDMÉNYEK	43
4.1. A hőmérséklet hatása a növényi védekezési mechanizmusok kialakulására.....	43
4.1.1. Az alacsony hőmérséklet hatása a <i>P. syringae</i> 61 és a <i>P. phaseolicola</i> S21 izolátumok <i>in vitro</i> szaporodására	43
4.1.2. Az alacsony hőmérséklet hatása a hiperszenzitív reakció (HR) megjelenésére	44

4.1.3.	A növényi általános rezisztencia kialakulásának és a baktériumok HR-indukciós idejének kimutatási lehetőségei alacsony hőmérsékleten.....	47
4.1.4.	Az alacsony hőmérséklet hatása a baktériumok HR-indukciós idejének hosszára	48
4.1.5.	A BR kialakulása alacsony hőmérsékleten.....	48
4.1.6.	A HR indukciós idejének befolyása a BR kialakulására	50
4.2.	A hőmérséklet hatása a <i>tpoxNI</i> (peroxidáz) és <i>EBR-43</i> (ortometil-transzferáz) BR markergének kifejeződésére	51
4.3.	A növényi védekezések baktériumszaporodást gátló hatásának változása a hőmérséklet függvényében	54
4.3.1.	A hőmérséklet hatása a HR működésével kapcsolatos baktériumsejtszám változására dohányban.....	54
4.3.2.	A hőmérséklet hatása a BR kialakulásával kapcsolatos baktériumsejtszám változására dohányban.....	55
4.4.	A hőmérséklet hatása a növénykórokozó baktérium és a növény – nem kórokozó baktérium kapcsolatok sajátosságaira.....	57
4.4.1.	Az alacsony hőmérséklet hatása a hidegtűrő, opportunista <i>P. syringae</i> 2214 szaporodására és a betegség kialakulására paprikanövényekben	57
4.4.2.	Az alacsony hőmérséklet hatása egy másik hidegtűrő, opportunista <i>P. syringae</i> 61 szaporodására King B tápoldatban és paprikanövényekben.....	59
4.4.3.	Az alacsony hőmérséklet hatása a szaprotróf <i>P. fluorescens</i> szaporodására King B tápoldatban és paprikanövényekben	59
4.4.4.	Az alacsony hőmérséklet hatása a „valódi” patogén <i>P. phaseolicola</i> S 21 szaporodására King B tápoldatban és babnövényekben.....	63
4.4.5.	A BR kialakulási ideje és a HR-típusú nekrosis megjelenése 5 és 30 °C-on paprikanövényeken	64
4.5.	Baktériumfertőzés hatására bekövetkező mennyiségi és minőségi változások a paprika apoplasztjának fehérje-összetételében	65
4.5.1.	Hővel előlt vagy élő kórokozó, illetve szaprotróf baktériumok által indukált extracelluláris fehérjemintázat-változások (natív körülmények).....	66
4.5.1.1.	A kórokozó, illetve szaprotróf baktériumok által indukált eltérő mértékű kitinázaktivitás natív megjelenése poliakrilamid gélben.....	68
4.5.1.2.	A kórokozó, illetve szaprotróf baktériumok által indukált új peroxidáz-izoenzimek natív megjelenése poliakrilamid gélben.....	71
4.5.1.3.	Az alacsony hőmérséklet hatása az IWF natív PAGE-elválasztása után kimutatott izoenzimintázat megváltozására	72
4.5.2.	Baktériumos kezeléseket követő extracelluláris változások (denaturáló PAGE)..	72
4.5.2.1.	Hővel előlt vagy élő kórokozó, illetve szaprotróf baktériumok hatására kialakult fehérjemintázat-változás	72
4.5.2.2.	A kórokozó, illetve szaprotróf baktériumok által indukált kitináz- és peroxidáz-izoenzimek denaturáló elválasztást követő megjelenése.....	75
4.5.2.3.	Az indukált kitináz- és peroxidáz-izoenzimek, BR-markerek tömegspektrometriai elemzése	76
4.5.2.4.	Az indukált kitináz- és peroxidáz-izoenzimek megjelenése az inkubációs idő függvényében.....	78
4.5.2.5.	Ozmotikus-, oxidatív-stressztényezők és biológiailag aktív molekulák hatása a kitináz-markerek aktivitására és a peroxidáz-markerek megjelenésére	78
4.5.2.6.	A környezeti tényezők hatása a kitináz-markerek aktivitására és a peroxidáz-markerek megjelenésére	80
4.5.2.6.1.	A fény hatása	80
4.5.2.6.2.	Az alacsony hőmérséklet hatása	81

4.5.2.7.	A meglévő és további lehetséges BR–markerek azonosítása kétdimenziós elektroforézissel.....	84
4.6.	A dolgozatban szereplő új tudományos eredmények	87
5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	89
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	94
	MELLÉKLETEK.....	96
	M.1. IRODALOMJEGYZÉK.....	96
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	107

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<i>avr</i>	avirulencia
BR	általános rezisztencia
cDNS	RNS-ről készített DNS másolat
CDPK	kalcium függő fehérje kináz
cfu	táptalajon kolóniát képző sejtek száma
CHI	kitináz
DAB	diamino-benzidin
DNS	dezoxiribonukleinsav
DTT	dithiotreitol
EBR	korai általános rezisztencia
EPS	a baktériumok külső poliszaharid burka
HR	hiperszenzitív reakció
<i>hrp</i>	hiperszenzitivitás és patogenitás
IWF	sejtközötti járatokból izolált folyadék
LAR	lokális szerzett rezisztencia
LBR	késői általános rezisztencia
LC–MS/MS	liquid chromatography of mass spectrometry, azaz folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometriai analízis
LEA	jellemzően az embriogenezis késői szakasza során képződő fehérje
MAPK	mitogén aktivált fehérje kináz
mRNS	hírvivő RNS
PAGE	ploiakrilamid–gélelektroforézis
POX	peroxidáz
PR	kórfolyamatokkal kapcsolatba hozható
R	a növények ellenállóképességét meghatározó gének vagy géntermékek
RNS	ribonukleinsav
SAR	szisztémikus szerzett rezisztencia
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
T–DNS	transzfer DNS, az <i>Agrobacterium tumefaciens</i> növényi sejtbe áthelyeződő DNS szakasza
TMV	dohánymozaik vírus
TTSS	a kórokozó baktériumok harmadik típusú kiválasztó rendszere
UV	ibolyántúli

1. BEVEZETÉS

A baktériumos növénybetegségek gazdasági kártételének mértéke elmarad a vírusok és a gombák által okozott betegségekéétől. Jelentőségük mégis felértékelődik, mert a növénykórokozó baktériumok elleni védekezés napjainkig megoldatlan maradt.

A kereskedelmi forgalomban még elérhető antibiotikum hatóanyagú növényvédő szereket fokozatosan visszavonják, mert használatuk antibiotikum rezisztens kórokozók megjelenéséhez vezet, és ez hatástalanná teheti egyes hatóanyagok humán- és állatgyógyászati alkalmazását.

A baktériumok táptalajon könnyen tenyészthető mikroorganizmusok, a tesztnövények fertőzése egyszerű. Így a baktériumok és a növények közötti kapcsolat, a növények védekezésének tanulmányozása az élettani és a molekuláris növénykórtani kutatások kedvelt területévé vált. Az ellenállóképesség biológiai folyamatainak megismerése mellett a kutatók legfőbb célja a kórokozó baktériumokkal szemben ellenálló növények, fajták létrehozása. Korábbi nézet szerint azok a fajták minősülnek ellenállónak, melyek a vizsgált kórokozó fertőzésére hiperszenzitív módon válaszolnak.

A növények és a szervezetükhöz társult baktériumok kölcsönhatásában különös jelentősége van az első, úgynevezett felismerési reakciónak. Az „idegen” anyagok, molekulák felismerése vagy a felismerés elmaradása dönti el, hogy a növények védekeznek vagy sem az őket táplálékként felhasználni szándékozó baktériumok ellen. Az „idegen” felismerése után a növények összetett, lokális és szisztemikus védelmi rendszert mozgósítanak a szövetekbe került baktériumok semlegesítésére. Kémiai „fegyverzettel” (oxigén szabadgyökök és antimikrobiális fehérjék termelése), illetve szerkezeti gátak kialakításával (sejtfal megszilárdítása, ligninképződés és a sejtfalfehérjék immobilizációja) akadályozzák a nem kórokozó és a kórokozó baktériumok támadását.

A növények általános rezisztenciája (BR) az „idegen” felismerésére hivatott védelmi rendszer egyik leggyorsabban kialakuló eleme. A bakteriális eredetű elicitor molekulák, konzervált részeinek növénybeni felismerésén alapul. Így nem meglepő, hogy betegséget nem okozó szaprotróf baktériumok is aktiválják. A növénykórtani mikológiában elterjedt szaprotróf megnevezést a bakteriológiában eddig szokásos szaprofiton / szaprofita fogalom szinonimjaként alkalmazom. A „szapro” görög eredetű kifejezés jelentése elkorhadt, a „troph” jelentése kedvelő. A szaprotróf szervezetek tehát az élettelen szerves anyagok lebontásából nyernek energiát.

Az opportunista patogének „alkalomra váró”, polivirulens kórokozók, melyek ideális körülmények között nem károsítják gazdanövényeiket, de adott, a növényeket gyengítő tényezőket kihasználva már súlyos betegséget okoznak gazdaszervezeteiknek. Opportunista patogén például a kajszi, a dinnye és a paprika járványos pusztulását okozó *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. A kórokozó fertőzése számára a hűvös tavaszi időjárás biztosítja a „kedvező alkalmat”.

A növények környezetében, sőt felületén élő mikrobák, köztük a baktériumok többsége rájuk nézve nem ártalmas, azonban ezek közül egyes fajok élősködő életmódra tértek át. Az élő tényezők minőségét egyrészt a mikroorganizmusok életstílusa (szaprotróf, szimbionta vagy élősködő), másrészt a táplálékul szolgáló növények genetikai tulajdonságai határozzák meg. Ennek következménye, hogy minden növénynek speciális kórokozó köre van és minden kórokozó saját gazdanövény-körrel bír. A védekezési mechanizmusok segítségével pedig a növények a legtöbb kórokozó fertőzését túlélve alapvetően egészségesek maradnak.

Célkitűzések

A növények általános rezisztenciáját a szaprotróf baktériumok is aktiválják, és ezen a tényen alapul az a feltételezés, hogy az általános védekezés korlátozza a növényi szövetbe került szaprotróf baktériumok szaporodását. A gazdanövények alacsony hőmérsékleten történő rövid idejű inkubációja elősegíti az opportunistá patogén *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*P. syringae*) kolonizációját. Ugyanez a kórokozó 25-30 °C hőmérsékleten viszont nem okoz betegséget. Vajon ezt a jelenséget magyarázhatja-e az általános védekezés vagy esetleg a hiperszenzitív reakció (HR) működése? Jelenleg kevés az információ a növényi védekezések működésének hőmérsékleti feltételeiről.

A dolgozat témája egyrészt a hőmérséklet – mint a növények fiziológiai állapotát meghatározó egyik legfontosabb élettelen tényező – hatásának vizsgálata az általános növényi védekezés működésére. Másrészt a szaprotróf *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) és az opportunistá patogén *P. syringae* baktériumok által a paprikanövények szövedeteiben provokált változások, aktivált védekezési mechanizmusok makroszkópikus és molekuláris szintű tanulmányozása. A kettős téma a következő felvetések részletes elemzését igényli.

- A hővel elölt és élő kórokozók aktiválják a dohány lokális védelmi rendszereit (Hevesi et al. 1981, Klement et al. 1999). Az a kérdés azonban nyitott, hogy működik-e a védelmi rendszer, ha a növényeket a számukra optimálisnál alacsonyabb hőmérsékleten inkubáljuk. Ezért célom az, hogy megállapítsam, hogyan módosul alacsony hőmérsékleten az általános védekezés és a hiperszenzitív reakció dohánytesztnövényekben. A tüneti vizsgálatok eredményeit a baktériumszaporodás mértékével és növényi markergének kifejeződésével támasztom alá, majd paprika–tesztnövényeken is ellenőrzöm, amely azért szükséges, mert a paprika az opportunistá patogén–gazda kapcsolat jó modellnövénye.
- A tartósan alacsony hőmérséklet hatása az eltérő hidegtűrő–képességű baktériumok *in vitro* és egy-egy saját gazdanövényében kimutatható szaporodására jelenleg még szintén nem tisztázott. A szaprotróf *P. fluorescens*, a széles gazdanövénykörrel rendelkező, opportunistá *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 vagy 2214, és a szűk gazdakörű valódi patogén *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* S 21 baktériumok *in vitro* és *in planta* szaporodása összevetésre kerül az általános védekezés és a hiperszenzitív reakció működésével.

- Az általános rezisztencia molekuláris szintű elemzéséhez a BR aktivitásával párhuzamba állítható jelző (marker) fehérjék kimutatására és azonosítására törekszem. A markereket paprikanövényekben a baktériumokkal közvetlen kapcsolatot létesítő apoplaszt-fehérjéi között keresem. A BR–marker jelöltek specifikusságának meghatározásához ismerni kell a hőmérséklet, a fény és a biológiailag aktív molekulák hatását a jelző fehérjék megjelenésére. Ezek a tényezők a BR kialakulását is segítették vagy gátolták dohányban, így amennyiben a markerként azonosítandó fehérjék termelésére is hasonló hatásuk van, azok mint, specifikus BR–markerek azonosíthatók.
- A specifikus markerek lehetővé teszik az általános védekezés biztos, HR-gátlás jelenségétől független kimutatását paprikában. Segítségükkel több információ nyerhető a növényi védekezési mechanizmusok szerepéről a hidegtűrő, opportunistá patogén *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* vagy a szaprotróf *Pseudomonas fluorescens* baktériumok és a paprika növények kölcsönhatásában.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A növények védelmi rendszere (mechanizmusok felosztása, jellemzése)

A növények passzív és aktív eszközökkel védik szervezetüket a támadó mikroorganizmusokkal szemben. A kórokozók fertőzését első lépésben passzív, a fertőzés bekövetkezése előtt előállított anyagok (kutikula, kéreg, másodlagos metabolitok) korlátozzák. Az aktív védekezés lényege, hogy a növények képesek megkülönböztetni egymástól saját anyagaikat az „idegen” szervezetek (vírusok, baktériumok, gombák stb.) molekuláitól, majd a felismerés után beindítani azt a rendszert, amivel az „idegent” hatástalanítják. Minden olyan esetben, amikor ez a felismerés késik vagy elmarad, a betegség tünetei jelentkeznek.

A patogenitás legfontosabb feltétele a kórokozó tömeges felszaporodása a gazdanövényben, ezért a hatékony és azonnali válasz, azaz a kórokozó kezdeti megfékezése, a növények egyetlen lehetősége a túlélésre.

2.1.1. Passzív védelem

A baktériumok a növényi bőrszövetet közvetlenül nem tudják áttörni (ez csak egyes kórokozó gombák tulajdonsága). A bőrszövet, az azt borító kutikula, a kéreg rétegei, valamint a másodlagos anyagcseretermékek fizikailag gátolják a kórokozó bejutását a növények szöveteibe. Így a növények felületén epifiton életmódú baktériumpopulációk a víz segítségével jutnak be a nyitott légzőnyílásokon vagy lenticellákon, esetleg a bibén vagy sebzéseken keresztül a szövetek sejtközötti járataiba. A növényi sejtbe történő behatolást a sejtfal gátolja meg. A növénykórokozó baktériumok mindig csak a sejtközötti járatokban szaporodnak (Anderson, 1982), ahol a sejteket burkoló intercelluláris folyadékban találják meg a kezdeti szaporodásukhoz szükséges tápanyagokat.

A növények a fizikai gátak mellett a kórokozók megfékezésére alkalmas vegyületek széles skáláját vonultatják fel. A szövetekben folyamatosan képződő cianogén-glükozidok, terpenoidok, fenol-tartalmú anyagok, alkaloidok és peptidek alkotják a növények kémiai fegyvertárát (Menezes és Jared, 2002).

2.1.2. Aktív (indukált) védelem

2.1.2.1. Az általános növényi védekezés, basal resistance (BR)



1. Ábra. A BR és a HR szöveti szintű megjelenése dohányleveleken

A kezelések következtében a levél bal felén a BR, jobb felén a HR alakult ki. A levél bal felét hővel előlt *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 szuszpenziójával (4×10^8 sejt/ml), jobb felét vízzel injektáltam. A levél mindkét felét az első injektálás után 6 órával élő, HR-t okozó *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 szuszpenzióval (10^8 sejt/ml) fertőztem felül.

Ha a dohány vagy bármely más növény levelét valamely HR-t nem indukáló baktériummal vagy baktérium eredetű anyag szuszpenziójával kezeljük elő, majd ugyanezt a levélrészét később inkompatibilis („nem megfelelő”), HR-t indukáló baktériummal felülfertőzzük, akkor az inkompatibilis kapcsolat nem eredményez HR-t. A HR elmaradása az előkezelés eredménye. Ez a közvetett módon, HR-gátlással kimutatható válasz a fertőzést követően legkorábban észlelt, a szöveteket támadó baktériumsejtekkel szemben kialakuló növényi védekezés (1. ábra).

A növények általános védekezését a szaprotróf (Hevesi et al. 1981), a gazdanövényre nézve idegen patogén, inkompatibilis baktériumok és a patogenitásukat vesztett (*hrp*) mutánsok is indukálják (Klement et al. 1999). Ez a válasz a bakteriális eredetű elicitor molekulák növénybeni felismerésén alapul. Elicitoroknak a mikroorganizmusokban fellelhető növényi rezisztenciát vagy betegséget kiváltó anyagokat nevezzük. A BR elicitorai közé olyan, többségükben extracelluláris és esetenként sejten belül elhelyezkedő molekulák tartoznak, amelyek mind a szaprotróf, mind a kórokozó baktériumokban megtalálhatók. A növények által felismert részeinek szerkezete pedig erősen konzervált. Az ebbe a csoportba tartozó bakteriális eredetű molekulákat, úgymint a lipopoliszaharid (LPS) (Newman et al. 2002), a flagellin (Felix et al. 1999) vagy a peptidoglikán (Felix és Boller, 2003), összefoglaló néven az angol kifejezés rövidítése alapján PAMP-nak (pathogen associated molecular patterns) nevezik (Gomez-Gomez és Boller, 2002). De elicitor aktivitása van egy *Pseudomonas*-fajból származó hideg-sokk fehérjének (Felix és Boller, 2003) vagy az EF-TU elongációs faktornak is (Kunze et al. 2004). A gazdanövényre specializálódott (kompatibilis) kórokozó előlt formája aktiválja az általános védekezést, az azonos élő patogén viszont annak ellenére, hogy hordozza a rá jellemző PAMP-okat, már a védekezés korai szakaszában (korai általános rezisztencia, EBR) visszaszorítja a BR-t (Ott et al. 2006).

Lovrekovich és Farkas (1965) kísérlete elsőként irányította a kutatók figyelmét az általános rezisztencia jelenségére. A *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* sejtek hővel előlt szuszpenziójával kezelt dohánynövényeken a kórokozóval később végzett második fertőzés tünetei nem jelentek meg. Több mint egy évtizeddel később Burgyán és Klement (1979) bizonyították, hogy az általános rezisztenciának egy korai (EBR; korábban: early induced resistance, EIR) és egy késői formája (LBR; korábban: late induced resistance, LIR) különíthető el. Optimális körülmények között az EBR a fertőzést követő néhány óra alatt kifejlődik, de sötétben tartott növényeken bizonyították, hogy aránylag rövid ideig nyújt védelmet a baktériumokkal szemben. Ennek a szerepét veszi át az LBR, amely viszont hosszabb időn át, 6-7 napig is aktív marad.

A BR makroszkópikus szinten tünetmentes folyamat, ezért csak közvetett módon mutatható ki. Erre alkalmas módszer egy második fertőzés lokális gátlása, vagy a HR elmaradása. A HR-gátlás jelensége az inkompatibilis kórokozó III. típusú szekréción rendszerének (TTSS) és szaporodásának gátlására utal (Klement et al. 2003, Ott et al. 2006). A kifogástalanul működő TTSS feltétele a HR kialakulásának vagy a betegség okozásnak. A BR részletes vizsgálata eddig a következő, eltérő rendszertani családba tartozó növényekben történt meg: *Nicotiana tabacum* (Lovrekovich és Farkas, 1965; Burgyán és Klement, 1979), *Capsicum annum* (Keshvarzi et al. 2004) *Arabidopsis thaliana* (Bozsó et al. 2002), *Medicago truncatula* (Bozsó et al. 2005 b). Az általános rezisztencia tehát „kétszeresen általános” mivel sem kiváltóit tekintve, sem a növényekre nézve nem specifikus.

2.1.2.1.1. Az általános rezisztencia dohányban azonosított molekuláris markerei

Az egyes növényi sejteket a sejtfaluk és membránjuk választja el a külső környezettől. A sejtmembrán az ionok, fehérjék és más makromolekulák számára átjárhatatlan, csak kisméretű, vízdékony, poláros molekulák (széndioxid, víz), illetve kisméretű elektromosan semleges (elektron hiánnyal vagy többlettel nem rendelkező) lipid molekulák (alkoholok) juthatnak keresztül rajta (Isenman et al. 1995). Ezért az extracelluláris térben bekövetkező változásokat (legyen az biotikus vagy abiotikus eredetű) a sejtek mindig a membrán felületi receptor molekuláival érzékelik. Jó példa erre az *Arabidopsis* FLS2 flagellint felismerő receptora (Gomez-Gomez és Boller 2002). A receptor az általa felismert molekuláról jelet továbbít a sejt belseje felé. A jelátviteli folyamat érintheti a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) kaszkádjait, ahol a jel foszforilációval jut előre. A foszforiláció másik útvonala különböző ioncsatornához és az aktív oxigénformák termelésért felelős NADPH-oxidáz

komplexhez vezet. Az eddigiekben a baktériumok felismeréséről és a sejt belsejében zajló hálózatos összekapcsolt jelátviteli rendszerről ejtettünk szót.

Részletesebben ismert a növényi szövetek gyors, 3-6 órán belül a BR-el összhangban kimutatható - a HR megjelenését megelőző - válasza, védekezési reakciója a sejt közötti járatokba került baktériumok ellenében. Szatmári et al. (2006) az általános rezisztenciával összhangban lévő transzkripciós változásokat mutatott ki dohánynövények szubtrakciós hibridizációval készített cDNS könyvtárában. A sejtfalak erősítését szolgáló fahéjsav-hidroxiláz, ortometil-transzferáz enzimeket kódoló szakaszok mellett hidroxiprolinban vagy glicinben gazdag sejtfalépítő molekulák szekvencia-részletének átíródása is növekedett az indukciót követő 3-12 órában. A baktériumokkal szemben védekező növényben egy glutation-S-transzferázt és egy epoxid-hidrolázt kódoló gén transzkripciója szintén emelkedett (Bozsó et al. 2005a; Szatmári et al. 2006). Ezek az enzimek a növényekben keletkezett toxikus anyagok semlegesítésében vesznek részt.

A hidrogén-peroxid az élővilágban azonosított aktív oxigén molekulák egyik tagja. Fokozott termelődése együtt járhat a növények kataláz (hidrogén-peroxid semlegesítés) és peroxidáz (hidrogén-peroxid termelés vagy semlegesítés) aktivitásának emelkedésével. A BR-t aktiváló baktérium-szuszpenzió injektálása után 3-4 órával mind a hidrogén-peroxid mennyisége, mind a peroxidáz-enzimek aktivitása emelkedett (Ott 2002, Bozsó et al. 2005a). A dohányban a BR működésével összhangban *tpoxNI* peroxidáz enzim génjének fokozott kifejeződését és új izoenzimek megjelenését is kimutatták (Bozsó et al. 2002, Klement et al. 2003). Klement et al. (2003) elektronmikroszkópos felvételein jól látható, hogy a BR-t aktiváló kezelések hatására termelődött hidrogén-peroxid egyrészt a sejtfalban koncentrálódik, másrészt a sejtfallal érintkező baktériumsejteket veszi körül. A sejtfalban felhalmozódott hidrogén-peroxid keresztkötések képződését katalizálja a hidroxiprolinban gazdag sejtfalfehérjék között. Ez a folyamat ott erősíti a sejtfalak szerkezetét, ahol a baktérium megjelenik az intercelluláris térben. A hidrogén-peroxid a legstabilabb molekula az aktív oxigénformák közül, mely magas koncentrációban számos élettani szempontból jelentős makromolekulát (membránokat, fehérjéket, aminosavakat, nukleinsavakat, stb.) képes károsítani. Célzott felszaporodása a baktériumsejtekkel érintkező helyeken baktériumölő hatású is lehet (Baker és Orlandi 1995, Klement et al. 2003). Közvetlen antimikrobiális hatása (Peng és Kuć 1992, Király et al. 1993) és a szöveti szilárdságot erősítő szerepe (Brown et al. 1998) mellett alacsony koncentrációban nélkülözhetetlen jelátviteli molekula. Át tud hatolni a membránokon, mivel kisméretű, elektromosan semleges, vízdoldható molekula. Más ismert másodlagos hírvivő molekulákkal együtt (szalicilsav, jázmonsav, etilén) az ellenállóképesség kialakításában részt vállaló, a kórfolyamatokkal kapcsolatba hozható ún. „pathogenesis-

related” (PR) fehérjék szintézisét indítja el a növényekben (Low és Merida 1996, Orozco-Cardenas et al. 1999, Gechev et al. 2002).

A hidrogén-peroxid katalizálta keresztkötések kialakulása mellett a sejtfalakat erősíti a szerkezetébe beépülő lignin és kallóz is. A lignin szintézise a fenil-propanoid bioszintézis úton keresztül történik. Ennek több kulcsenzimét kódoló génről – úgymint a fenil-alanin ammónia liáz (PAL) (Bozsó et al. 2005a), fahéjsav-hidroxiláz és az ortometil-transzferáz (Szatmári et al. 2006) – bizonyított, hogy átíródásuk a BR kialakulásával összhangban fokozódott. A sejtfalak megerősítése, a papillák képződése lassíthatja a kórokozók támadását, továbbá csökkentheti a tápanyagok kiáramlását a citoplazmából az intercelluláris térbe.

A dohányban kimutatott '215' és '250' jelű extracelluláris kitinázok a patogenitását vesztett élő vagy a hővel előlt kórokozók, valamint a szaprotrófok induktív hatására is megjelentek (Ott et al. 2006). A hővel előlt kórokozók vagy a patogenitásukban sérült (*hrp*) mutánsok fokozták egy kitináz enzimet kódoló gén kifejeződését babnövényekben (Jakobek és Lindgren 1993). Figyelemre méltó párhuzam, hogy a '215' és '250' jelű dohánykitinázokhoz hasonlóan kompatibilis kapcsolatban a fent említett bab esetében a kitináz-többlet termelődése szintén elmaradt (Jakobek et al. 1993). A kórfolyamatokkal párhuzamosan megjelenő növényi glükánázok és kitinázok külön-külön is gátolják a kórokozó gombák növekedését, együttes alkalmazásuk pedig szinergisztikus hatású (Mauch et al. 1988). Ugyan a növényi kitinázok közvetlen, *in vitro* baktériumgátló hatása még nem bizonyított, de egyes kitinázokkal kapcsolatban lehetséges, hogy a baktériumok elleni védekezés egyik fontos tényezői. Ennek egyik *in vivo* bizonyítékát szolgáltatta Hong és Hwang (2006), amikor az általuk korábban – a paprika *Xanthomonas vesicatoria* fertőzése után – izolált CaChi2 bázikus kitináz túltermeltették lúdfű- (*Arabidopsis thaliana*) növényekben. A kitináz túltermelő vonalakban a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 sejtszáma szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a vad típusú lúdfű szövetében. Ismert néhány kitináz megjelenése vírusfertőzés (Trudel et al. 1989) és stressz-érzékenység esetében is.

A BR működésének bizonyítása után számos kutató foglalkozott az általános elicitorok növényi felismerésével. A BR jelentőségét azonban eltérően értékelik. Abramovitch és Martin (2004) szerint a BR gyenge, a HR-nél lassabb felismerési reakció. Míg másokkal egyetértésben csoportunk szerint a BR gyors, első vonalbeli védekezési válasz. Az első aktív lépés a lehetséges kórokozók növénybeni felismerésére (Gomez-Gomez 2004) és hatékony eszköz a kórokozók tápanyaghoz jutásának, illetve elterjedésének megakadályozására (Keshvarzi et al. 2004). A fent összefoglalt eredmények képezték a hipotézisünk alapját: az általános rezisztenciának köszönhető, hogy a szaprotróf mikroorganizmusok az élő növények szöveteiben nem tudnak megtelepedni és azokat tápanyagforrásként felhasználva szaporodni.

2.1.2.1.2. A környezeti tényezők hatása a BR kialakulására

A genetikailag meghatározott tulajdonságok mellett a növények fiziológiai állapota is befolyásolja védekezésük felépítését. Az optimális hőmérséklet, tápanyag- és vízellátottság valamint a fényviszonyok a legfontosabb élettelen tényezők, melyek a növények élettani állapotát és ellenálló képességét biztosítják. Ha ezek közül bármelyik eltér az optimálistól a növényeken – kórokozó fertőzés hiányában is – az eltérés mértékének megfelelő szimptómák jelentkeznek.

A külső környezet változása éppen úgy befolyásolja a növények fehérjeszintézisét, mint az általános fehérjeszintézis-gátló fizikai módszerek és kémiai anyagok. A fehérjeszintézist gátló hő sokk– (50 °C, 13 s) vagy cikloheximid–kezelés késlelteti, vagy lehetetlenné teszi az általános rezisztencia kialakulását és kimutatását (Klement et al. 1999). Ennek következménye, hogy a növények védtelenné válnak a szövetekbe jutott baktériumokkal szemben. Ezért okozhat a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrpK*, egyébként HR–negatív mutáns, hő sokk– vagy cikloheximid–kezelést követően HR-t (Bozsó et al. 1999). Ezzel összhangban az extracelluláris kitinázok megjelenése (Ott et al. 2006) és a hidrogén-peroxid felhalmozódása is elmarad a dohányban (Ott 2002).

Burgyán és Klement (1979) és Hevesi et al. (1981) kísérletei szerint a korai szakasz, az EBR kialakulása független a fénytől, viszont a késői szakasz (LBR) sötétben tartott növényekben nem alakult ki. A hőmérséklet változása szintén jelentősen módosította a BR kialakulási idejét (Klement et al. 1999 és 2003). Míg 20 °C-on az előkezelés és a BR működését igazoló felülfertőzés között 6–8 órának kell eltelnie, addig 30 °C-on a BR gyorsabb, sőt hatékonyabb is. Ez a tendencia olyan magas hőmérséklet eléréséig folytatódhat, amely nem hat hátrányosan a növények élettani állapotára.

2.1.2.2. A hiperszenzitív reakció (HR)

A növények gyors sejtelhalással kapcsolatos védekezési mechanizmusa a hiperszenzitív reakció (HR) (2. ábra). A baktériumok által indukált HR felfedezése óta a klasszikus– és a molekuláris növénykórtan, valamint a növénynevelés területén alapvető tesztelési eljárássá vált. Az elmúlt évtizedekben számos kutatási területen foglalkoztak elicitorainak és gátló tényezőinek felderítésével. A dohányon okozott HR vizsgálatának nagy hagyománya van a kórokozó baktériumok azonosításában és az ellenállóképességet okozó tulajdonságok

felderítésében. A HR korlátozza a patogének továbbterjedését a növényi szövetben, és ezáltal meggátolja a betegség kialakulását. Növénykórokozó baktériumokkal kapcsolatos első leírása Klement Zoltán nevéhez fűződik (Klement 1963, Klement et al. 1964). A hiperszenzitív reakciót az élő baktériumok közül csak a patogének képesek indukálni, a szaprotrófok nem. Amennyiben egy adott kórokozó nem a saját gazdanövényét fertőzi, hanem más növényfajt (például a bab kórokozója a dohányt) akkor nem-gazda (non-host) rezisztenciáról beszélünk. Ha ez a kórokozó a saját gazdanövényének rezisztens változatát fertőzi, azt specifikus, „gene-for-gene” (gén a génnel szemben) rezisztenciának nevezik.

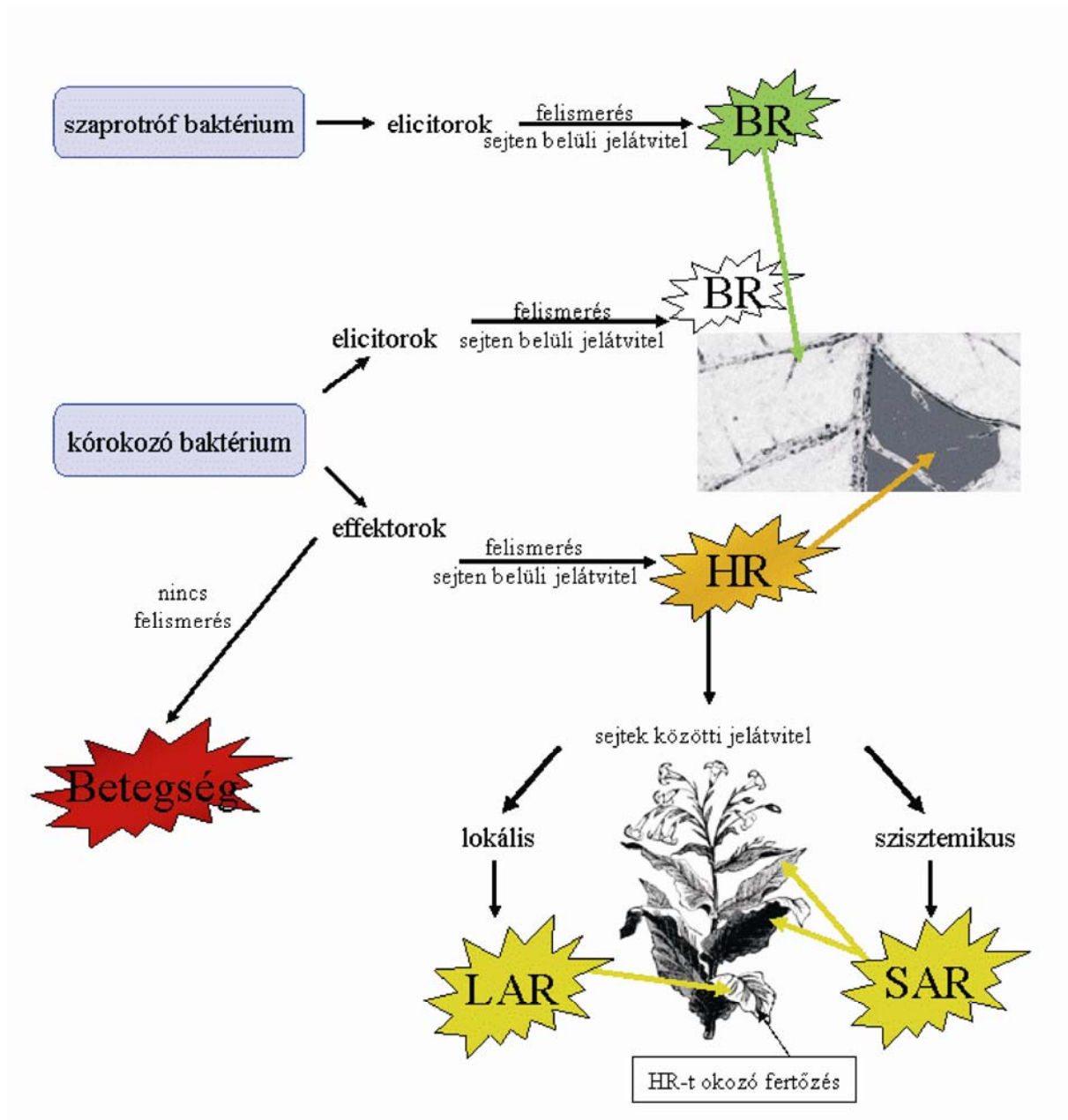
A HR folyamatában a BR működéséhez hasonló biokémiai válaszokat írtak le. Hatására aktív oxigén formák halmozódnak fel, mind lokális mind szisztémikus szinten. A növénysejtek papillát képeznek a kórokozó környezetében és a növények hidroxiprolinban gazdag fehérjék, lignin és kallóz termelésével igyekeznek megerősíteni a kórokozókkal kapcsolatba kerülő sejtfal részeket. Fenol tartalmú mikróbagátló vegyületek, ún. fitoalexinek, és más kisméretű antimikrobiális peptidek – úgymint defenzinek, lipidszállító fehérjék és tioninok – képződnek (Castro és Fontes 2005).

2.1.2.2.1. A „gén a génnel szemben” elmélet

A „*gene for gene*”, az *avr for R*” vagy „guard hipotézis” néven is említett elméletet, mely magyarázatot ad a faj- és fajtaszintű specifikusságra, a kórokozás jelenségének genetikai modellezésére dolgozták ki (Flor 1971). A patogenitás a kórokozó avirulencia- (*avr*) és a növény rezisztenciagénjeinek (*R*) kölcsönhatásával magyarázható. A baktériumok *avr* génjei olyan termékeket kódolnak, amelyek alapján a növény megfelelő *R* génjei hiperszenzitív nekrozisba torkolló védekezési reakciót indítanak a betolakodó ellen.

Ha a génpár tagjai közül az egyik, vagy mindkettő hiányzik (akár a gazda, akár a kórokozó részéről), a növény képtelen kórokozóként azonosítani a baktériumot, így nem következik be a HR, és kialakul a betegség. Ez a fogékony reakció, a kompatibilis kapcsolat. A kompatibilis kapcsolat magában foglalja a baktérium szaporodását a gazdában, továbbterjedését a környező szövetekbe, a makroszkópikus tünetek kialakulását, valamint a betegség karakterisztikus megjelenését. Mivel a rezisztencia és az avirulencia gének dominánsan öröklődnek, a legtöbb növény-mikroba kapcsolat inkompatibilis lesz (Collmer 1996).

A „guard modell” szerint az *R* gének termékei egy-egy Avr fehérje célmolekuláját őrzik a növényekben, vagyis közvetetten érzékelik az Avr fehérjék jelenlétét (Van der Biezen és Jones 1998). Bár a baktériumok és a növények korábbi evolúciós állapotában az *avr* gének



2. Ábra. A növények egymásra épülő aktív védelmi rendszere

BR: általános rezisztencia; HR: hiperszenzitív reakció; LAR: lokális szerzett rezisztencia; SAR: szisztemikus szerzett rezisztencia

által kódolt fehérjék valószínűleg a kórokozásban vettek részt, vagyis ún. virulencia tényezők voltak, szerepük mára a kórokozók gazdanövénykörének meghatározására, szűkítésére módosult.

2.1.2.2.2. A HR szakaszai

A baktériumos HR kialakulása három fázisra osztható: (i) indukciós idő, (ii) latencia fázis, (iii) a baktérium és a növénysejt kollapszusa (Klement, 1982). A legfontosabb fázis az indukció, amelynek hossza a kórokozótól és a megtámadott növénytől függően más és más. A *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* indukciós ideje szobahőmérsékleten dohányban kb. 1,5 óra, míg a *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* indukciós ideje ugyanilyen körülmények között kb. 3 óra. Az indukciós fázisban a HR megjelenése megakadályozható a fertőzött szövetrészben lévő baktériumsejtek antibiotikumos gátlásával. A latencia fázis az indukció befejezésétől a sejtkollapszus kezdetéig tart. Míg az indukciós idő alatt a kórokozónak van elsődleges szerepe, addig a tünetmentes latencia fázis már független a kórokozó jelenlététől, tehát az antibiotikum-kezelés nem gátolja a sejtkollapszust. A harmadik szakaszban látványos fenotípusos változás, a növényi sejt vagy szövet elhalása a fertőzéstől számított hat-huszonnégy óra alatt következik be. Alapvetően a baktériumok HR-indukciós idejének hossza határozza meg, hogy melyik lokális növényi védekezési reakció fogja a sejtközötti térbe jutott baktériumok szaporodását és elterjedését korlátozni (Bozsó et al. 1999). A dohányba injektált *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* S21 HR-indukciós ideje 30 °C-on hosszabb, mint a BR kialakulásához szükséges idő. A BR baktériumszaporodást és *hrp* génaktivitást gátló hatása révén a *Pseudomonas phaseolicola* S21 30 °C-on nem okozott hiperszenzitív reakciót a dohányban (Klement et al. 1999, 2003, Besenyi et al. 2005).

2.1.2.2.3. A patogenitásért és a HR kialakulásáért felelős III. típusú szekréción rendszer

A harpinok voltak az első olyan fehérjék, melyekről bizonyították, hogy a kórokozó III. típusú szekréción rendszere segítségével jutnak ki a baktériumsejtből. Bár tisztított formában a harpin is képes a HR-t aktiválni (He et al. 1993), természetes körülmények között csak élő, metabolikusan aktív baktériumsejt képes a HR kiváltására. A kórokozó baktériumok *hrp* génjeinek aktiválása és a III. típusú szekréción rendszer (TTSS, Type III Secretion System) kiépítése az indukciós idő alatt történik. A TTSS-t a *hrp* (hiperszenzitív reakció és patogenitás) gének kódolják. Így a kórokozás képességét, csakúgy mint a HR kiváltását, az ún. *hrp* gének illetve termékeik határozzák meg. Feladata abban áll, hogy a patogenitással kapcsolatos fehérjéket (Hrp és Avr) közvetlenül a gazdasejtekbe juttassa (Rosquist et al. 1994) az élő növényi sejt sejt falán és plazmamembránján keresztül (Alfano és Collmer 1997).

A III. típusú fehérjeszekrúciós rendszer egyaránt előfordul állat-, és növénykórokozó baktériumokban. Az állatok extracelluláris parazitái (*Yersinia* spp) kiválasztott fehérjéiket egyenesen a gazdasejtbe juttatják (Cornelis és Wolf-Watz 1997). A *Pectobacterium* (korábban *Erwinia*), *Pseudomonas*, *Xanthomonas* és *Ralstonia* nemzetségekből származó növénykórokozó baktériumok jelentős homológiát mutatnak az állatokban patogén *Yersinia*, *Shigella* és *Salmonella* nemzetségekkkel a III. típusú fehérjeszekrúciós rendszert kódoló *hrp* gének tekintetében. A *hrp* clusterok a *Pseudomonas*- és a *Pectobacterium*-fajokban is megtalálhatóak, 9 konzervált génje a *hrc* (hypersensitive reaction and conserved) nevet kapta (Bogdanove et al. 1996). A *hrp* gének csoportokba (clusterokba) rendeződnek, és gyakran előfordul, hogy a hozzájuk kapcsolódó avirulencia gének csoportjaival együtt plazmidokon öröklődnek, illetve horizontális géntranszfer útján szerzett ún. patogenitás szigeteket alkotnak (Hacker és Kaper 2000).

A betegségkeltés képessége tehát feltételezi a *hrp* gének teljes készletének jelenlétét, amelyek egyben a hiperszenzitív reakció kiváltásáért is felelősek, hiszen e gének effektorok szintézisét illetve transzportját irányítják. Hatásuk kettős, mivel fogékony növényben a betegség előidézésében vesznek részt, rezisztens növényben HR-t váltanak ki, ezzel határozzák meg a kórokozók a gazdanövények körét.

2.1.2.2.4. A környezeti tényezők hatása a HR kialakulására

A HR látens szakasza érzékeny a magas hőmérséklet hatására. Amennyiben az inkompatibilis kórokozóval fertőzött dohánynövényeket a fertőzés után akár négy óra hosszan 37 °C-os növénynevelő kamrába helyezték, a HR nem alakult ki (Süle és Klement 1971). Hevesi és Király (1977) a HR gátlását figyelték meg akkor is, amikor csak az indukciós szakaszt követően a látens periódus elején helyezték 37 °C-ra a dohánynövényeket. Romero et al. (2002) szerint pedig egy kereskedelmi forgalomban lévő *avrBs3* rezisztenciagént hordozó paprikafajta fogékonyvá vált az inkompatibilis *Xanthomonas vesicatoria* baktériummal szemben, ha a növényeket 25 °C helyett magasabb hőmérsékleten, 32 °C-on inkubálták.

A HR kialakulása nem függ jelentősen a fénytől. Az indukciós szakasz megvilágítástól való függetlenségét Hevesi et al. (1981) bizonyították. Kísérleteik szerint a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* szaporodásmenetét nem változtatta meg, ha a dohánynövényeket fényben vagy sötétben inkubálták.

2.1.2.3. A lokális szerzett rezisztencia (LAR)

A védelmi rendszer elemeinek egymásra épülése jól megfigyelhető a szerzett rezisztenciák esetében, amikor egy korábbi, nekrozissal járó fertőzéssel szemben a növény védelmet „szerez” és ez a védelem a tünetek elmaradásában is megnyilvánul (2. ábra). A hiperszenzitív reakció a környező növénysejtekben egyrészt hidrogén-peroxid felhalmozódást okoz, mely a lokális szerzett rezisztencia (local acquired resistance, LAR) fontos jelátviteli molekulája (Costet et al. 1999), másrészt szalicilsav-képződést indítanak el, amely a szisztémikus szerzett rezisztencia (systemic acquired resistance, SAR) beindításáért felelős (Ross 1961). Olyan szövetek sejtjeit készíti fel az esetleges későbbi fertőzések leküzdésére, melyeket nem ért közvetlen fertőzés.

Novacky (1973) kimutatta, hogy az élő *Pseudomonas pisi* alacsony sejtszámú szuszpenziójával (5×10^5 sejt/ml) kezelt dohánynövények képesek meggátolni ugyanazon baktérium sűrűbb szuszpenziója (5×10^6 sejt/ml) által kiváltott, a teljes szövetrésze kiterjedő HR-t. A fertőzés hatására kialakuló hiperszenzitív reakció után, a nekrozist körülvevő sejtekben (lokálisan) szerzett rezisztencia alakult ki a dohányban. A rezisztenciának ez a formája a nekrosis közvetlen közelében elhelyezkedő sejteket teszi ellenállóvá a későbbi fertőzésekkel szemben. A HR kialakulása után a környező szövetekben nőtt a szalicilsav koncentrációja, de a szalicilsav nem bizonyult a LAR kialakulása szempontjából esszenciális tényezőnek, mert a LAR a szalicilsavat katechollá alakító *nahG* típusú, transzgenikus dohányokban is kialakult. Costet et al. (1999) kísérletei azt is bizonyították, hogy a LAR kialakulásának alapvető feltétele az első kezelés vagy fertőzés következményeként létrejött HR. A LAR működésében nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az első, HR-t okozó fertőzés aktív oxigén formák felhalmozódást generáló hatásának, mint a szalicilsav növekvő szintjének.

2.1.2.4. A szisztémikus szerzett rezisztencia (SAR)

A növények szisztémikus, az egész növényre kiterjedő választ is adnak a lokális fertőzésekre, amely egy széles spektrumú, hetekig, hónapokig fennálló rezisztenciához vezet vírusok, baktériumok és gombák ellen egyaránt (Ryals et al. 1996). A SAR kialakulása a sikeres indukció után néhány napot vesz igénybe (Ross 1961). A rezisztenciát kiváltó jel a fertőzött levélből indul ki és a háncsrészben terjed a felsőbb levelek felé (Guedes et al. 1980). A különböző kórokozók okozta fertőzések ugyanazt a típusú szisztémikus rezisztenciát idézik

elő, ami azt támasztja alá, hogy a növény válasza a különféle kórokozókkal szemben egy közös útra terelődik (Dangl és Holub 1997; Ryals et al. 1996). A SAR érdekessége, hogy oltással is átvihető egyik növényről a másikra (Jenns és Kuć 1979). Az ellenálló uborka alanyra oltott uborka, sárgadinnye és görögdinnye egyaránt ellenállóvá lett.

A SAR kialakulásában nagy jelentősége van a szalicilsavnak. Közvetlen antimikrobiális hatással nem rendelkezik, de szöveti koncentrációjának emelkedése több növényfajban elengedhetetlenül szükséges a SAR kialakulásához (Delaney et al. 1994, Gaffney et al. 1993). A szalicilsav-hidroxiláz enzimet termelő transzgénikus dohány (*nahG*) és lúdfűnövényekben a fertőzések nem indukáltak SAR-t, sőt a növények védekezőképessége oly mértékben leromlott, hogy sok, egyébként inkompatibilis kórokozóval szemben fogékonyá váltak.

A kórokozók mellett számos abiotikus, oxidatív stressz, pl. paraquat, ózon, tömény sóoldat képes a SAR indukálására (Király et al. 1991, Sandermann et al. 1998, Strobel és Kuć 1995).

2.2. A *Pseudomonas*–fajok csoportjai és túlélési stratégiái

A növények felületéről általában sok eltérő életmódú baktériumfaj (köztük több *Pseudomonas* sp.) izolálható. A szaprotróf vagy kórokozó baktériumok epifiton módon a levelek, hajtások és a gyökérzet felszínén vészelik át a tápanyagszegény élőhelyet és a számukra kedvezőtlen időjárási körülményeket. Szaprotrof *Pseudomonas fluorescens* törzseket, melyek elhalt szerves anyagokat hasznosítanak, mind a növények felületéről, mind a talajból izoláltak. Mivel ezeken a kórokozók számára kedvezőtlen élőhelyeken jó kompetíciós képességgel rendelkeznek, biológiai védekezésre is alkalmasak lehetnek (Gamalero et al. 2004).

A növénykórokozó baktériumok szinte valamennyi gazdasági növényünket képesek megbetegíteni. A betegség tünetei azonban már csak akkor jelentkeznek, amikor a kórokozóknak sikerült áttörni a növény védekezési mechanizmusait, vagy különböző „trükköket” alkalmazva kikerülték azokat.

Az opportunisták gazdanövényükre rendkívül széles, nem specializálódtak néhány növény károsítására. Fertőzésükhöz speciális környezeti körülményekre van szükség, ezért ezeknek a speciális, adott kórokozó számára kedvező körülményeknek az elkerülése védelmet jelenthet a fertőzésükkel szemben. Az opportunistá patogén *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* kórokozó-képességének előfeltétele a magas relatív páratartalom mellett a fagypont feletti alacsony hőmérséklet. A lágyszárú növények fertőzése általában a vegetációs időszakban előforduló rövid idejű, ciklikusan ismétlődő hűvös időjárási periódusokat követi

(Hevesi 1986). Ezek a környezeti feltételek biztosítják a magas inokulum-koncentráció kialakulását a növények felületén. A *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* alapvetően a növények felületén él, ezért az epifiton populáció koncentrációja nagy jelentőségű a később fellépő betegség kialakulásában (Hirano és Upper 2000). Az új-zélandi székhelyű nemzetközi törzsgyűjtemény (Culture Collection of Plant Diseases Division) 1997-es katalógusa a következő fajokról származó izolátumokat tartalmazta: *Abelmoschus esculentus*, *Allium cepa*, *Alnus cordata*, *Bellis perennis*, *Beta vulgaris*, *Bromus willdenowii*, *Camellia sinensis*, *Centrosema pubescens*, *Citrullus lanatus*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, *Corylus avellana*, *Cotoneaster* sp., *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita maxima*, *Diospyros kaki*, *Euonymus japonica*, *Forsythia* sp., *Hordeum vulgare*, *Juglans regia*, *Lycopersicon esculentum*, *Magnolia* sp., *Malus X domestica*, *Medicago sativa*, *Oryza sativa*, *Panicum miliaceum*, *Pennisetum americanum*, *Persea americana*, *Phaseolus lunatus*, *Pinus radiata*, *Pisum sativum*, *Populus deltoides*, *Populus trichocarpa*, *Populus X euramericana*, *Populus X generosa*, *Prunus armeniaca*, *Prunus avium*, *Prunus cerasus*, *Prunus domestica*, *Prunus dulcis*, *Prunus laurocerasus*, *Prunus persica*, *Prunus salicina*, *Pyrus calleryana*, *Pyrus communis*, *Rosa* sp., *Salix fragilis*, *Salix matsudana*, *Salix X erythroflexuosa*, *Sorghum bicolor*, *Syringa vulgaris*, *Triticum aestivum*.

Gazdasági szempontból elsődleges, hogy leginkább csonthéjas növényeken okoz rákos sebeket, de almatermésű gyümölcsfákon képzett sebekből is izolálták (Mansvelt és Hattingh 1987; Malvick és Moore 1988). Gyakori gazdanövényei a cseresznye (Latorre et al. 2002), meggy (Süle és Seemüller 1987), szilva, kajszi (Klement et al. 1984), orgona (Pirone 1978) és a citrus félék (Ballio et al. 1990). De *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* fertőzést már mangóültetvényben is kimutattak (Cazorla et al. 1998).

A beteg paprikanövények levelén a hűvös periódust követően ún. zsírfoltok jelennek meg, majd a kórokozó baktériumok a virágok és hajtáscsúcsok elhalását okozzák. Azonban ha a lehülés elmarad, akkor kizárólag jelentéktelen nekrotikus foltokkal találkozhatunk. A *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* termesztett lágyszárúakon, paprika (Hevesi és Ledó 1997) és görögdinnye (Hevesi, M. szóbeli közlés) kultúrákban is okozott már járványokat Magyarországon. A különféle növényfajokról származó izolátumok gazdanövényköre azonban nem egységes. Hevesi (1986) kimutatta, hogy a paprikáról származó izolátumok a csonthéjas növényeket is fertőzték, míg a kajsziról és a cseresznyéről származó izolátumok nem kórokozói a paprikának.

Más *Pseudomonas*-fajok, úgymint a lágyrothadást okozó *Pseudomonas viridiflava* (Klement 1956) vagy a *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (Riffaud et al. 2003) betegségokozó-képessége szempontjából szintén a hűvös időjárás a kedvező.

A „valódi patogén”, azaz kompatibilis kórokozónak két aktív védekezési vonalat kell áttörnő. Az első az általános, a második a hiperszenzitív rezisztencia. Az Avr és R fehérjék szabják meg a gazdakört faj-faj és rassz-fajta szinten egyaránt. Feladatuk lehet a gazda védekezésének meghiúsítása, az apoplaszt módosítása a kolonizáció elősegítéséhez és a gazda anyagcseréjének átalakítása. Jakobek et al. (1993), Klement et al. (2003), valamint Keshvarzi et al. (2004) is megállapították, hogy a kompatibilis, gazdanövény-specifikus kórokozók képesek meggátolni az általános rezisztenciát. A baktériumok III. típusú szekréciós rendszere olyan effektor fehérjét juttat a növénybe, amelyek azzal, hogy a jelátvitelben fontos szerepet játszó MAPK jelátviteli kaszkád-rendszer gátlását okozzák, megakadályozzák az általános védekezés és a hiperszenzitív reakció kialakulását (Abramovitch és Martin 2004). A gátló fehérjék indukciójáért bizonyos specifikus *vir* géneket tesznek felelőssé, amelyeknek aktiválását a *hrp* gének irányítják.

2.3. A baktériumos növénybetegségek tünetei

A sejtközötti térben egyre nagyobb számban jelenlévő kórokozó baktériumok szabad szemmel jellegzetes tüneteket alakítanak ki a növényeken. A tünetek típusa a baktériumfajok által termelt virulencia-faktoroktól függ. A virulencia-faktorként ismertté vált baktériumeredetű toxinok többsége klorózist vagy nektrózist, a pektolitikus enzimek lágyrothadást, a cellulotikus enzimek hervadásokat, a növényi hormont termelő baktériumok tumorokat okoznak.

A Gram-negatív baktériumokban termelődő másodlagos metabolitok, toxinok nem gazda-specifikusak. Klorózist okoznak, de általában nem járulnak hozzá a baktérium növénybeli szaporodásához (Bender et al. 1999). A toxinok többnyire kisméretű peptidok, melyek diffúzió útján gyorsan terjednek a szövetekben (Gross 1991). A bakteriális toxinokat virulencia-faktoroknak tekintjük, de szerepük eddig csak részben tisztázott, hiszen a toxintermelés kimutatható néhány nem patogén *Pseudomonas syringae* törzs esetében is (Adetuyi et al. 1995). Számos toxinnak antimikrobiális hatása is ismert, amely kompetitív előnyt jelent a mikroba számára (Gross 1991, Bender et al. 1999). A syringolin ellenállóvá tette a kezelt rizsnövényeket *Pyricularia oryzae* fertőzéssel szemben (Wäspi et al. 1998).

A lágyrothadást kiváltó baktériumok (*Pectobacterium carotovora*, *Pectobacterium chrysanthemi* és a *Pseudomonas viridiflava*) kórfolyamatában a II. típusú szekréciós rendszerben kiválasztott pektinbontó enzimeké a főszerep. Ezek az enzimkomplexek hidrolizálják (poligalakturonázok), vagy β -eliminációval (pektát-liázok) elhasítják a növényi sejtfal fontos szerkezeti elemeit, az α -1-4 poligalakturon polimereket (Perombelon és Kelman

1980, Barras et al. 1994). Ezek a széles gazdakörrel bíró kórokozók leginkább a húsos, parenchimaszövetben gazdag növényeket károsítják.

Nulla és 5 °C között a baktériumok az elsődleges jégmagképzők a növényekben (Hirano és Upper 2000). A *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* törzsekben kimutatott jégmagképző fehérjék (pl.: Ina Z) szintén virulencia-tényezők. Különbőféle méretű aggregátumokat hoznak létre a baktériumsejt membránjának külső felületén, ezáltal elősegítik a jégkristályok képződését a sejtközötti térben. Így a szövetek már az indokoltnál magasabb hőmérsékleten is sérüléseket szenvednek, illetve fokozzák a fagykárokat a fertőzött növényekben (Süle és Seemüller 1987).

A baktériumnyálka vagy –burok anyagában jelenlevő extracelluláris poliszacharidok (EPS) teremtik meg az intercelluláris környezet vízzel telítettségét, azaz kialakítják a zsírfoltosságot, valamint a víz- és tápanyagmozgás gátlásával a hervadást. Az EPS két fő alkotórésze az alginát és a leván. A burok fizikailag gátolja a növényi sejtfal és a baktériummembrán közötti közvetlen érintkezést, és ezzel elkerülhető a növény hiperszenzitív védekezési válaszáinak aktiválása. Másrészt EPS-t a szaprotróf baktériumok éppen úgy termelnek, mint a patogének. Az EPS védi a baktériumsejteket a különböző környezeti stresszhatásoktól, például az UV-sugárzástól és a kiszáradástól (Penaloza-Vazquez et al. 1997). Továbbá növeli a baktérium sejtek tűrőképességét a hidrogén-peroxiddal és egyéb antimikrobiális anyagokkal szemben (Király et al. 1993, D’Haeze 2004), vagy megváltoztatja a gazda védekező-reakcióit kiváltó szignálokat (de Pinto et al. 2003, D’Haeze és Holsters 2004).

A virulencia-faktorok termelése, ennek következményeként pedig a tünetek megjelenése jelentősen függ a környezeti hőmérséklettől és a levegő relatív páratartalmától. A nedves, páras időjárás mindenképpen elősegíti a kórokozó baktériumok megtelepedését, a betegség kialakulását.

2.4. Az alacsony, fagyhatár fölötti hőmérséklet élettani hatása a mezofil baktériumfajok anyagcseréjére, különös tekintettel a virulenciát fokozó tényezők szintézisére

A növények életét, mint ahogy minden élőlényét az élő (vírusok, baktériumok és gombák fertőzése) és élettelen környezet (hőmérséklet-változás, víz- és tápanyag-ellátási zavarok, légszennyeződés, UV-sugárzás) számos tényezője befolyásolja (1. táblázat). Ezek a hatások válaszlépésekre készítetik a növényeket. A válasz és az élő környezet viszontválaszáinak rendszere a kölcsönhatás. Az élettelen tényezők esetében a hatás erősségétől, élő tényezők

1. Táblázat. A növények fiziológiai állapotát befolyásoló élő és élettelen tényezők

ÉLETTELEN TÉNYEZŐK	
HŐMÉRSEKLET	hideg-sokk, fagyás hő-sokk
VÍZ	szárazság túlzott víztartalom
TALAJ	túlzott/ alacsony tápanyagtartalom magas sótartalom
FÉNY	UV-sugárzás
SZÉL	fizikai sérülések
TERMÉSZETIDEGEN ANYAGOK	növényvédő szerek, nehézfémek

ÉLŐ TÉNYEZŐK	
KÓROKOZÓK	vírusok, baktériumok, gombák
KÁRTEVŐK	rovarok, fonálférgek, puhatestűek, rágcsálók és más növényevők, élősködő növények
KOMPETÍCIÓ	gyomnövények, allelopátia

Mahajan és Tuteja (2005) nyomán

esetében a minőségtől és erősségtől függően megváltozik a növények anyagcseréje, akár látható tünetek is megjelenhetnek rajtuk.

Minimális, optimális és maximális növekedési hőmérsékletük alapján a baktériumokat három, (i) a melegkedvelő (termofil), (ii) a mezofil és (iii) a hidegkedvelő (psychofil) baktériumok csoportjába sorolhatjuk (Berchet et al. 2000). A mezofil baktériumokon belül külön csoportot képeznek a hidegtűrők (psychro-toleráns), melyek növekedési optima ugyan 20-30 °C között van, de bármely 0 °C feletti hőmérsékleten képesek a szaporodásra (Sands et al. 1970). A hőmérsékletcsökkenés hatására a baktériumok növekedése lelassul, esetenként – fajtól függően – elpusztulnak. Az élő sejtek membránjaiban emelkedik a telítetlen zsírsavak mennyisége, azaz a membrán szerkezeti stabilitását a folyékonyságának növelése biztosítja. Sakamoto és Bryant (1997) két, telítetlen zsírsavakat képző enzim génjét (*desA* és *desB*) azonosították a *Synechococcus* sp. egyik törzsében. A csökkenő hőmérséklet nemcsak a baktériumok membrán szerkezetét módosítja, hanem megindítja a hidegsokk fehérjék (CSP) és az alkalmazkodáshoz szükséges fehérjék (CAP) szintézisét is. Számos CSP és CAP fehérjét mutattak ki *Esherichia coli* (CspA-G) és *Bacillus subtilis* (CspB) fajokban, melyek a DNS replikációban vagy az RNS szerkezetének stabilizálásában, illetőleg a transzlációban vállalnak részt (Panoff et al. 1998). Fang et al. (1997) szerint a baktérium folyamatosan, minden hőmérsékleten szintetizálná a *CspA* fehérjét, de az átíródott mRNS csak alacsony hőmérsékleten stabilizálódik. Más elképzelések szerint a *cspA* promóteréhez alacsony hőmérsékleten kötődő transzkripciós faktor aktiválja a gén átíródását. A *CspA* számos

jellegzetes, konzervált DNS-kötő helyet (CCAAT) tartalmazó gén aktivátora (*hns* és *gyrA* gének), melyek további Csp fehérjék szintézisét serkentik.

Alacsony hőmérsékleten nemcsak a sejtet burkoló, hanem a belső, riboszóma membránok szerkezete is megváltozik. Speciális RNS-kötő, translációt kezdeményező és a duplaszálú RNS szerkezetét megbontó fehérjék képződését már bizonyították (Jones és Inoyue 1996, Jones et al. 1996).

A hőmérséklet csökkenése a baktériumfajok által termelt virulencia-faktorok előállítását, valamint a III. típusú szekréciós rendszer működését is módosítja. A növénykórokozó baktériumok többségéről elmondható, hogy a virulenciájukat elősegítő anyagokat 16-24 °C között választják ki a legnagyobb mennyiségben (Smirnova et al. 2001).

Az alacsony hőmérséklet aktiválja az *Agrobacterium vir* génjeinek kifejeződését, a t-DNS gazdasejtbe juttatását, a IV. típusú szekréciós rendszert. A *vir* operon működése a Vir A/ Vir G szabályozó rendszer befolyása alatt áll. A VirA pedig Jin et al. (1993) szerint 32 °C felett inaktív. A T-DNS-t átjuttató komplex 11 VirB fehérjéből áll és valamennyi kifejeződéséhez a 20 °C körüli hőmérséklet az optimális.

A lágyrothadást okozó *Pectobacterium carotovora*, *Pectobacterium chrysanthemi* fajok 25 °C-on termelik maximális szinten a tünetek kialakításában fő szerepet játszó extracelluláris pektinbontó enzimeket. Hasonló tendenciát figyeltek meg a cellulózbontó enzimek kiválasztásában is (Smirnova et al. 2001).

A *Pseudomonas*-fajok által kiválasztott, klorózist előidéző toxinok szintézisében részt vevő gének magas hőmérsékleten gátlódnak (phaseolotoxin), vagy a toxin bioszintézisében részt vevő enzimek 28-30 °C-on nem stabilak (coronatin). Ezzel ellentétben más, szintén *Pseudomonas*-fajok által termelt toxinok (tabtoxin, syronomicin, syringolin) bioszintézisének tanulmányozásakor hasonló hőmérséklet-függést nem tapasztaltak (Bender et al. 1999).

Az alacsony hőmérséklet segíti még a jégmagképző fehérjék szintézisét is, amely lényegesen magasabb volt a 16 °C-on, mint a 24 °C-on inkubált *Pseudomonas syringae* baktériumsejtekben (Smirnova et al. 2001).

A hőmérséklet, mint szabályozó tényező fajonként eltérően hat a vizsgált növénykórokozó baktériumok EPS szintézisére. A *Pseudomonas syringae* levantermelését nem befolyásolja a hőmérséklet-változás, míg az alginát szintézise alacsony hőmérsékleten gyenge volt (Penaloza-Vazquez et al. 1997, Smirnova et al. 2001). Ugyanakkor a Hettwer et al. (1998) által vizsgált *Pseudomonas syringae* fajok levánképzése mégis 18 °C-on volt a legmagasabb.

Wei et al. (1992) és Van Dijk et al. (1999) kimutatták, hogy az *Erwinia amylovora* illetve a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 III. típusú fehérje-szekréciós rendszere 18 °C-on jóval aktívabb, mint a baktérium *in vitro* növekedése szempontjából kedvezőbb 28 °C-on.

2.5. Az alacsony, fagyhatár fölötti hőmérséklet élettani hatása a magasabb rendű növényekre

Régóta ismert az a tény, hogy a hideg-, a szárazság- és a sóstressz hasonló növényélettani változásokat vonnak maguk után (Thomashow 1998; Van Breusegem et al. 1999). A felületireceptorok által fogott jelek a sejten belül több útvonalat érintenek. Ennek keretében megemelkedik a sejteken belül a Ca^{2+} , az aktív oxigén molekulák és az inozitol-foszfátázok szintje. A normál értéknél magasabb Ca^{2+} -szintet intracelluláris Ca^{2+} -kötő fehérjék érzékelik, majd a jel foszforilációs kaszkádokon (MAPK, CDPK) és foszfátázokon keresztül jut a célgénekhez. A növény két szakaszban ún. „korai”, majd az ún. „késői” gének átírásával válaszol az abiotikus természetű kihívásokra. A „korai” gének közé azokat a transzkripciós faktorokat sorolták, melyek a „késői”, a sejt közvetlen védelmében részt vevő gének átíródását szabályozzák. A jellemző stresszérzékeny gének termékei többek között az antioxidánsok, a membránok szerkezetét stabilizáló fehérjék, chaperon-ok, az embriogenezis késői fázisában, a mag kiszáradása előtt termelődő LEA-fehérjék (late embriogenesis protein, LEA) (Mahajan és Tuteja 2005).

Az alacsony, de még fagyhatár feletti hőmérséklet egyes fajokat károsít, másokat nem. A károsodás mértéke elsősorban a növényi sejtfalat alkotó telített és telítetlen zsírsavak egymáshoz viszonyított arányán múlik. A hidegre érzékeny (ezért feltehetően fagyérzékeny) növények sejtfalában nagyobb arányban lelhetők fel a telített zsírsavak, mint a telítetlenek. Ennek következménye, hogy ezekben a növényekben a membránok magasabb hőmérsékleten válnak félfolyékonyból félkristályos állapotúvá, mint kevésbé melegigényes társaik. A 10-15 °C alatti hőmérséklet a levelek hervadását, klorózist, szélsőséges esetben az érzékeny növények szöveteinek elhalását okozhatja.

A hőmérséklet csökkenése megemeli a telítetlen zsírsavak és a glicerol-lipid észterek arányát a membránokban. Az *Arabidopsis*-ban azonosított *fad8* gén egy telítetlen zsírsavakat képző enzimet kódol (Gibson et al. 1994). A *Brassica napus* extracelluláris fehérjéit *hsp 90* chaperonok termelésével védi meg az alacsony hőmérséklet denaturáló hatásától (Krishna et al. 1995). Az alacsony hőmérséklet ezeken felül még számos gén kifejeződését fokozza, úgymint dehidrinek, lipidtranszfer fehérjék, transzlációt elősegítő faktorok és a már említett LEA-fehérjék. A Ca^{2+} ion-csatornák aktiválódnak, továbbá megemelkedik az apoplaszt szénhidrát- és poliamintartalma is.

A hőmérséklet csökkenése módosítja a növényeken belüli cukorforgalmat. A sejtközötti térben megemelkedik a cukrok koncentrációja (Knight et al. 1996). Így alacsonyabb hőmérsékleten kezdődik el a jégkristályképződés az apoplasztban. A növény egyes poliaminok, chaperonok termelésével extracelluláris fehérjéit is megvédi a denaturálódás veszélyétől. Ez a tény, illetve a növekvő telítetlen zsírsavszint együttesen megóvjja a sejtfa és a membránok szerkezetét (Mahajan és Tuteja 2005). Ez magyarázatot ad arra, hogyan akklimatizálódnak a növények és miért fokozható egyes növények fagyűrése edzéssel.

Természetesen az alacsony hőmérséklet (4–5 °C) nem kizárólag a növények adaptációját bizonyítottan segítő rendszereket befolyásolja. A hideg hatására feltehetően az optimális körülmények között szintetizált fehérjék egy része visszaszorul a hidegsokk fehérjék termelődése miatt. A fenil-propanoid bioszintézis útvonalhoz tartozó fenil-alanin-ammonia-liáz (PAL), és a színanyagok előállításában szereplő kalkon-szintáz (CHS) enzimek átíródása is fokozódott a 4 °C-on inkubált *Arabidopsis* növények szöveteiben. Fokozott működésük és a növények fagyűrő képessége között azonban nem találtak összefüggést (Leyva et al. 1995).

A dohány (*Nicotiana benthamiana*) hőigénye szempontjából már alacsonynak tekintett 15 °C-os hőmérséklet gátolta a növény–vírus kölcsönhatásra jellemző védekezési mechanizmust, az ún. „gén-csendesítést” (Szittyá et al. 2003).

A melegigényes növények (pl.: paprika, paradicsom, kukorica, sárgadinnye) alkalmazkodása a hideg léghőmérsékletre sok energiát emészt fel. Ezért a fagyponthoz közeli hőmérsékletre jellegzetes tünet-együttessel válaszolnak: törpülés, klorózis, antociánok felhalmozódása, hervadás és a kórokozókkal szembeni fokozott érzékenység (Korkmaz és Dufault 2003, Mahajan és Tuteja 2005). Hazánk kertészeti termesztését a zöldségnövények korai hajtásakor, korai kiültetésnél vagy a gyümölcsfa ültetvényekben (főleg a csonthéjas fajok esetében) a vegetációs periódus alatt fellépő hideghatás veszélyezteti. Ha a növényeket a hideghatás egyedfejlődési vagy termesztéstechnológiai szempontból kedvezőtlen állapotban (pl. virágzás, palánták kiültetése) éri, akár 10-90 %-os termés kiesést is okozhat (Korkmaz és Dufault 2003, 2004).

2.6. A paprika ökológiai igényei, táplálkozási és gazdasági jelentősége

A Markov–Haev féle osztályba sorolás alapján 25 ±7 °C hőmérséklet igényű növény. Azaz csírázaskor 30–32 °C, szikleveles állapotban és az első kötődések idején 18–20 °C az optimális hőmérséklet. A szélsőségeket tekintve 10 °C alatt egyáltalán nem fejlődik, míg

35 °C felett nincs terméskötődés. Vízigényesnek mondható, mivel szabadföldön általában 600–700 mm vízadag mellett természetesen eredményesen. A túlzott mértékű öntözését azonban el kell kerülni, mert a túlóntözés számos mikroelem relatív hiányát okozhatja. Az enzim- és kloroplasztiszt alkotó mikroelemek hiánya pedig kedvezőtlen irányban befolyásolja a növények élettani állapotát.

Táplálkozási szempontból legfontosabb az étkezési paprika valamint a fűszerpaprika C-vitamin tartalma, amelyből 150–250 mg/100 g mennyiség található a bogyóban. A hajtásból származó paprika C-vitamin tartalma kisebb, mint a szabadföldié. A bogyók karotin-tartalma jelentős (10 mg/100 g), továbbá magas B1- és B2-vitamintartalommal is rendelkeznek.

Magyarországon évente kb. 4000 ha-on folyik szabadföldi étkezési paprika és további 5–6000 ha-on fűszerpaprika termesztés. Étkezési paprikából kb. 60000 t, míg fűszerpaprikából 45–55000 t/év nyers termést takarítanak be. Ezzel hazánk a világ legjelentősebb paprikatermesztő országaihoz tartozik. Az étkezési paprika szabadföldi termesztőterülete folyamatosan csökken, míg a hajtató felület növekszik. Ez a tendencia várhatóan a jövőben is folytatódni fog.

2.7. A paprika kórokozói

A világon termesztett *Capsicum*-fajokat az Amerikai Növénypatológiai Társaság nyilvántartása szerint 18 növénykórokozó vírus, 21 gomba és 4 baktérium faj, a *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* károsítja. Ezek közül hazánkban eddig a következő két faj károsításával találkozhattunk.

A *Xanthomonas vesicatoria* fertőzésének tünetei a paprika levelén, szárán és bogyóján megjelenő, majd egyre növekvő, először vizenyős, majd fokozatosan beszáradó foltok (Klement és Kappeler 1967). A kórokozó számára a 30 °C körüli léghőmérséklet és rövid ideig tartó magas relatív páratartalom a kedvező.

Ezzel ellentétben a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* fertőzés hirtelen hőmérsékletcsökkenés (kb. 15 °C-ra) következtében lép fel. Tünetei levélfoltosság, levéltorzulás, hajtáscsúcsok, virágok és a fiatal, apró bogyók elhalása (Hevesi 1986).

A *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* baktériumot hazánkban még nem izolálták a paprikáról. A paradicsommal ellentétben a paprika szárán nem okoz hervadást és rákos

sebek sem jelennek meg. Ez a kórokozó rendkívül nagy sebességgel terjed az edénynyalábokban. Viszont a levélen és a termésen kifehéredő foltok jelennek meg.

A *Ralstonia solanacearum* melegkedvelő kórokozó. Magyarországon jelenleg karantén károsító, paprikáról még nem izolálták. A talajban hosszú távon fennmarad. A paprikán hervadást, a levelek sárgulását, összesodródását okozza. A hervadó növények edénynyalábjai sárgásbarnára színeződnek. A levelek végül lehullanak a beteg növényekről.

2.8. Paprikában azonosított kórfolyamatokkal kapcsolatba hozható (pathogenesis-related, PR) fehérjék

Jelenleg kilenc növény családban, kétszikűekben és egyszikűekben egyaránt ismert a kórfolyamatokkal kapcsolatba hozható fehérjék előfordulása (Linthorst 1991, Ryals et al. 1996, van Loon 1997).

Kórfolyamatokhoz kapcsolható (PR) fehérjéket TMV-vel fertőzött hiperszenzitíven válaszoló dohányokban mutattak ki először (van Loon és van Kammen 1970). Elsősorban az extracelluláris térben és a vakuólumokban halmozódnak fel. Többségük tömege 15–43 kDa között változik. Biokémiai funkciójuk alapján több mint tizennégy csoportjuk ismert, melyeket savas és bázikus tulajdonságú fehérjékre osztottak fel (Linthorst 1991). A PR–1 és a PR–5 a sejtmembránban található ismeretlen funkciójú fehérjék, a PR–2 β -1,3-glükánáz, a PR–3, 4, 8, 11 kitinázok, a PR–9 peroxidáz és a PR–10 ribonukleáz aktivitással rendelkezik (van Loon és Strien 1999) (2. táblázat). A PR–17 szintén ismeretlen feladatú molekula (Okushima et al. 2000). Az újabban felfedezett antimikrobiális fehérjék (antimicrobial peptides, AMPs) alacsony molekulatömegű (< 5 kDa) kórfolyamatokhoz kapcsolható fehérjék. Ilyenek a PR–12 defenzin, PR–13 tionin és a PR–14 lipid-transzfer fehérjék (Castro és Fontes 2005).

A kórfolyamatokhoz kapcsolható fehérjék közül több, így a PR–1 (Caruso et al. 1996), a PR–2 (β -1,3-glükánáz) (Mauch et al. 1988), a kitinázok (Ponstein et al. 1994, Schlumbaum et al. 1986) és a PR–5 (Liu et al. 1994) *in vitro* gombagátló aktivitással rendelkeznek. A gombák sejtfalának bontása során olyan elicitorokat képeznek, melyek aktiválják a növény védekezését (Keen és Yoshikawa 1983). A kórfolyamatokkal kapcsolatba hozható fehérjék közvetlen baktériumgátló és vírusellenes aktivitásáról nem számoltak be eddig (Linthorst et al. 1989).

A legtöbb PR fehérje (illetve mRNS-ük) szalicilsav kezeléssel is indukálható (Ward et al. 1991). Az indukcióhoz szalicilsavat nem igénylő PR fehérjék jázmonsav és etilén termelődés

hatására jelennek meg. A kórfolyamatokhoz kapcsolható fehérjék meglepően magas koncentrációt is elérhetnek a szövetekben. Típusonként akár a levél oldható sejtféherje-tartalmának 1%-át is megközelíthetik (van Loon 1997).

Több kórfolyamathoz kapcsolható fehérjét mutattak ki *Capsicum*-fajok és *Xanthomonas vesicatoria*, *Phytophthora capsici* vagy *Colletotrichum coccodes* kórokozók kompatibilis és inkompatibilis kapcsolatában (2. táblázat). Az izolált PR fehérjék változatos tulajdonságúak, illetve egy részük szerepe ismeretlen (STH2) (Hwang et al. 2005). Vannak közöttük a fertőzést követően rövid időn belül aktiválódó transzkripciós faktorok (CaZFP1, CaRAV1) (Kim et al. 2004, Kim et al. 2005), a szisztémikus rezisztenciához kapcsolható későbbi időpontokban aktiválódó fehérjék (Sar8.2, PR-1) (Kim és Hwang 2000, Lee és Hwang 2003, 2005, Kim et al. 2004, Hong et al. 2005), feltételezett proteáz enzimek (NtPrp27 (PR-17)) (Christensen et al. 2002) és defenzinek (CaDEF1) (Do et al. 2004). A *Xanthomonas*, *Phytophthora* fertőzést követően vagy higany-klorid kezelés hatására erős gombaölő hatású kitinázok és glükánázok jelentek meg a paprika levelek, illetve a száruk szöveiteiben (CaChi2 (class II), b1, b2, CaCbp1 (class I), CaBGLU) (Lee és Hwang 1996, Hong et al. 2000, Kim és Hwang 1996, 1997, Lee et al. 2001, Jung és Hwang 2001). A baktérium és gomba kórokozókkal fertőzött paprikanövényekben három peroxidáz enzim (CaPOA1, CaPOT1, CaPO1) mRNS-ét is kimutatták. Aktivitásuk szintje kórfolyamat-függő volt (Do et al. 2003). Az azonosított fehérjék többsége a paprika szállítószöveiteiben helyezkedik el (2. táblázat).

A kórfolyamatokhoz kapcsolható fehérjék megjelenését nem csak a fertőzések, hanem a környezeti tényezők változása is befolyásolhatja. Hwang et al. (2005) kimutatta, hogy a PR-4, PR-6, NtPrp27 (PR-17), STH2, Sar8.2, PR-1, PR-10 kórfolyamatokhoz kapcsolható fehérjék hideg hatásra is aktiválódnak.

2. Táblázat. A paprikában azonosított kórfolyamatokhoz kapcsolható (PR) fehérjék

NÉV	TÍPUS	INDUKCIÓ	MEGJEGYZÉS	IRODALOM
RAV1	transzkripció faktor	<i>Xv</i>	korai, SA- és E-függő	Kim et al. (2004)
CaZFP1	transzkripció faktor	<i>Xv, Pf, Ec</i>	korai, SA- és E-függő	Kim et al. (2005)
PR-1	antimikrobiális	<i>Xv, Pf, Ec</i>	bázikus, késői, SA-független	Hong et al. (2005)
PR-4	kitináz			Hwang et al. (2005)
PR-6	proteínáz-gátló			Hwang et al. (2005)
PR-17	proteáz			Hwang et al. (2005)
CaDEF1	antimikrobiális	<i>Xv</i>	bázikus, korai	Do et al. (2004)
CaBGLU	glükánáz	<i>Xv, Pc</i>	bázikus, korai, SA-független	Jung és Hwang (2001)
CaCbp1	kitinkötő fehérje (Class I)	<i>Xv, Pc, Cc</i>	bázikus, SA-független bázikus, nincs kitinkötő domén	Lee et al. (2001)
CaChi2	kitináz (Class II)	<i>Xv, Pc</i>		Hong et al. (2000)
b1	kitináz		bázikus, higany klorid	Kim és Hwang (1996, 1997)
b2	kitináz		bázikus, higany klorid	Kim és Hwang (1996, 1997)
SAR8.2	ismeretlen	<i>Xv, Pc, Cc</i>	bázikus, késői, SA-függő	Lee és Hwang (2003)
STH2	ismeretlen			Hwang et al. (2005)
CaPOA1	aszorbát-peroxidáz	<i>Xv, Pc</i>	bázikus, SA-független	Do et al. (2003)
CaPO1	peroxidáz	<i>Xv, Pc</i>	bázikus, SA-függő	Do et al. (2003)
CaPOT1	thioredoxin-peroxidáz	<i>Xv, Pc</i>	bázikus, SA-független	Do et al. (2003)

Xv: *Xanthomonas vesicatoria*
Pc: *Phytophthora capsici*
Pf: *Pseudomonas fluorescens*
Cc: *Colletotrichum coccodes*
Ec: *Escherichia coli*

SA: szalicilsav
E: etilén
korai (aktiváció): a kezelést követő 12 óra előtt
késői (aktiváció): a kezelést követő 12 óra után

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Növények

A modellnövényeket a magvetéstől felhasználásukig üvegházban, kb. 20-25 °C hőmérsékleten, 16/8 óra váltakozó fény/sötét megvilágítással neveltem. A kísérletek megvalósításakor a dohány- és a paprikanövényeket 90, illetve 60 napos, a babnövényeket primer leveles (kb. 14 napos) korukban használtam fel (3. táblázat). A tesztnövények kórokozó baktériumokkal szembeni érzékenységét a személyes közlésből származó előzetes adatokra alapozva saját kísérleteinkben is teszteltem.

3. Táblázat. A kísérletek során alkalmazott növények ellenállóképessége

Növények	Rezisztencia	Tolerancia	Forrás
<i>Nicotiana tabacum</i> (L) cv. 'Samsun'	-	-	
<i>Capsicum annum</i> (L) cv. 'Hosszú Táltos'	-	CMV	Varró P. (személyes közlés)
<i>Phaseolus vulgaris</i> (L) cv. 'Cherokee'	-	-	Sárdi É. (személyes közlés)

3.2. Hőmérséklet

A tesztnövényeket a kísérlet megkezdése előtt 20 °C-os növénynevelő kamrába helyeztem. Egy nap elteltével a kamra hőmérsékletét 5-30 °C között a kívánt hőfokra állítottam, majd újabb egy nap elteltével kezdődött el a növények kezelése. A KLT/04 (Ehret GmbH., Németország) növénynevelő kamra 0 és +80 °C között használható, a beállított hőmérsékletet $\pm 0,1$ °C pontossággal tartja.

A kamra relatív páratartalma 50-60 % között mozgott. Ez az érték meglehetősen alacsonynak bizonyult az 5 és 10 °C-on inkubált dohány, paprika és bab számára. Ilyen körülmények között a levélfelületen elpárologtatott vízmennyiséget már képtelenek pótolni a hideg, fiziológiailag száraznak tekinthető talajból. A kamra légterének relatív páratartalmát pótlólagos párástással kb. 90 %-ra emeltem. A légtérbe napi két alkalommal aeroszol formában adagoltam a vizet, így megakadályoztam a növények vízháztartásának zavarát, ozmotikus stressz kialakulását.

3.3. Fény

A kísérletek időtartama alatt a növényeket folyamatos megvilágítású nevelő kamrában inkubáltam. Ez alól kivétel az Eredmények fejezet 4.5.2.6.1. pontja, ahol a BR fehérje-markereinek megjelenését vizsgáltuk folyamatosan megvilágított, illetve sötétben tartott paprikanövényekben. Hevesi et al. (1981), Lam et al. (1998) és Chandra-Shekara et al. (2006) közleményei alapján a kezelések előtt 48 órával folyamatos megvilágítású, illetve sötét klímakamrába helyeztem a paprikanövényeket, így biztosítva számukra az elegendő adaptációs időszakot.

3.4. Baktériumok

A 4. táblázatban felsorolt *Pseudomonas*-fajokat King B táptalajon (King et al. 1954), a *Xanthomonas vesicatoria* 72 izolátumot pedig LB (Lennox 1955) agaron tartottam fenn. Tárolásuk hosszú távon LB tápoldat és 20 % glicerinn keverékében -20 °C-on fagyaszta történt (Stead, 1990).

A teszt növények inokulációját megelőzően a baktériumokat folyékony King B, illetve folyékony LB táptalajban 28 °C-on 10–12 órán keresztül aerob körülmények között, rázatva (170 rpm) szaporítottam. A törzsekből desztillált vízben szuszpenziót készítettem. A szuszpenziók töménységét spektrofotométerrel 600 nm hullámhosszon állítottam be.

4. Táblázat. A kísérletek során alkalmazott baktérium izolátumok

Baktériumizolátumok	Rövidítés	Gazdanövény	Tulajdonságok	Forrás
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 55	<i>P. fluorescens</i>	-	Nx ^r	Huang et al. (1988)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 61	<i>P. syringae</i> 61	búza, bab	vad típus, Nx ^r	Baker et al. (1987) Huang et al. (1988)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2214	<i>P. syringae</i> 2214	paprika, bab	vad típus	GSPB ¹ 2214
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> S 21	<i>P. phaseolicola</i> S 21	bab	vad típus, Rif ^r	Somlyai et al. (1986)
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> 72	<i>X. vesicatoria</i> 72	paprika	vad típus	izolálta Hevesi M. 1972

¹ Göttingener Sammlung Phytopathogener Bakterien

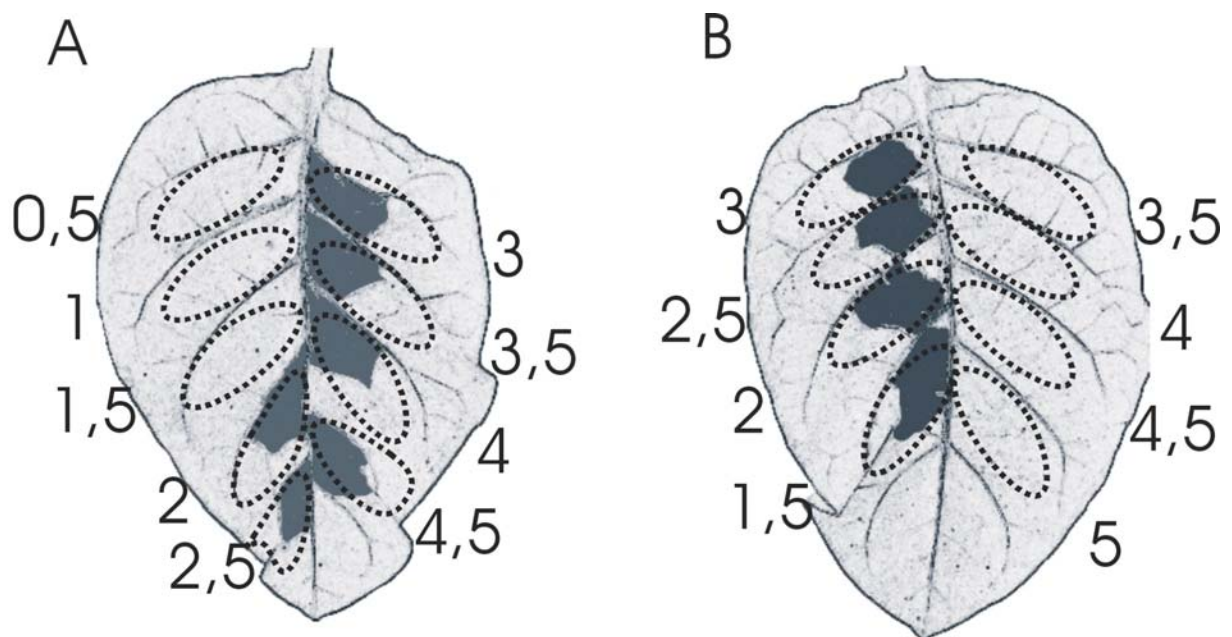
Nx^r : nalidixin sav rezisztencia

Rif^r : rifampicin rezisztencia

3.5. Fertőzési módszerek

A fertőzés módját a tesztnövények határozták meg. A dohány- és a paprikanövények leveleiben a sejtközötti tér injekciós fecskendő segítségével jól telíthető (Klement et al. 1964). Az injektálás előnye, hogy a levélszövet lehető legtöbb sejtje egy időpontban, a lehetőségekhez képest egyenlő sűrűségű baktérium-szuszpenzióval kerül kapcsolatba és emellett nem okoz erős sérüléseket a leveleken. A kísérletek során a dohánynövények középső levélemelelein elhelyezkedő 3–4, illetve a paprikanövények 4–5 teljesen kifejlett levelét használtam fel.

A babnövények primer leveleinek injektálása nehézkes volt, viszont a levelek magas-nyomású telítése a baktérium-szuszpenzióval (high-pressure technique) szintén kielégítő eredményt adott (Klement 1990).



3. Ábra. A baktériumok HR-indukciós idejének (A) és a BR kialakulási idejének (B) kimutatási modellje dohánynövényeken

A levéllemezen az erek által határolt egy-egy részterület egy-egy kísérleti időpontot reprezentál. A kísérlet 0,5–4,5, illetve 5 órán keresztül tartott. A, A levéllemez valamennyi részterületét azonos időpontban HR-t okozó baktérium-szuszpenzióval (*P. phaseolicola* S21 vagy *P. syringae* 61) injektáltam, majd különböző, az ábrán feltüntetett időpontokban ugyanezeket a részterületeket antibiotikum-oldattal kezeltem, így *in planta* gátoltam a baktériumokat. Az antibiotikum-kezelés a szaggatott vonallal jelölt területre terjedt ki. B, A levéllemez valamennyi részterületét hővel elölt baktérium-szuszpenzióval injektáltam, majd idősorban élő HR-t okozó baktérium szuszpenziójával (*P. phaseolicola* S21 vagy *P. syringae* 61) fertőztem felül. A hővel elölt baktérium-szuszpenzióval a szaggatott vonallal jelölt terület telítettem.

3.6. A baktériumok HR-indukciós idejének kimutatása

Egy-egy dohány–levéllemez a fő– és mellékerek egymástól jól elkülöníthető részekre tagolnak. Azonos időpontban a levéllemez részeibe HR-t okozó 10^8 sejt/ml töménységű baktérium–szuszpenziót injektáltam.

Ezt követően az előzőleg már injektált területekre különböző időpontokban klóramfenikol oldatot (100 µg/ml) injektáltam. Az antibiotikum oldata inaktívvá teszi a sejtközötti járatokba injektált baktériumokat, de az injektált baktérium indukciós idejét követően már nem akadályozza meg a HR megjelenését (Klement és Goodmann, 1967). Így a vizsgált baktérium HR–indukciós idejének az utolsó olyan antibiotikumos kezelés időpontját tekintetem, ahol a HR nem alakult ki (3. A. ábra).

3.7. A BR kimutatása, kialakulási idejének meghatározása

A BR tünetmentes válasz, de kialakulását követően gátolja a HR kialakulását. Ezt a tulajdonságát kihasználva fenotípusos megjelenését indirekt módon mutattam ki (Klement et al. 1999). A BR-t hővel előlt (4×10^8 sejt/ml) *P. syringae* 61 vagy *P. phaseolicola* S 21 baktériumokkal indukáltam. A baktérium–szuszpenzió sűrűségét már a hőkezelés előtt beállítottam. A hőkezelés 70 °C-on 13 percig tartott. A BR kialakulási idejének megállapításához egy teljes dohánylevelet hővel előlt baktérium–szuszpenzióval injektáltam. Ezt követően az egyes levélerek által tagolt részeket különböző időpontokban, 30 perces eltérésekkel HR-t okozó baktérium szuszpenziójával (10^8 sejt/ml) felülfertőztem (3. B. ábra). Azokon a területeken, ahol az előkezelés hatására a BR kialakult, a felülfertőzés nem okozott HR-t. Így megállapítható az előkezelés és az első olyan felülfertőzés között eltelt idő, ahol a HR már nem jelent meg.

Hasonló elveket követtem a BR kialakulásának megállapításánál paprikanövényeken. A BR-t hővel előlt (4×10^8 sejt/ml) vagy szaprotróf (10^8 sejt/ml) baktériumokkal indukáltam. A paprika leveleinél azonban egy levélen maximum két előkezelés (levélfelenként egy-egy) helyezhető el.

3.8. A *in vitro* és *in planta* baktériumszaporodás mérése

A kolóniaképző sejtszám változásának megállapítása King B tápoldatból, valamint dohány-, illetve paprikalevelek szövetéből történt. A baktériumok kiindulási koncentrációja 10^5 sejt/ml volt a táptalajokban. Öt ml tápoldatból kiindulva, mintavételenként 0,1 ml tápoldatból K-foszfát pufferben (10 mM, pH 7) 10-szeres mértékű hígítási sort készítettem.

A dohány- illetve paprikalevelek szövetéből 8-8 db, összesen kb. 5-5 cm² nagyságú levélkorongokat dörzsöltem el 1 ml K-foszfát pufferben (10 mM, pH 7). Az így kapott homogenizátumból 10-szeres mértékű hígítási sort készítettem. Minden hígítási sorozatból három hígítást és valamennyi hígítást három ismétlésben szélesztettem ki a Petri-csészékben. A kolónia-képző sejtek számát a Petri csészékben képződött kolóniák száma és a hígítás mértékének szorzata jelentette (Rudolph 1990).

3.9. A sejtközötti járatokból származó, vízben oldható fehérjék (intercellular washing fluid, IWF) elkülönítése, sűrítése

Az IWF minták izolálását a paprikalevelek sejtközötti járataiból Klement és Goodmann (1967) módszere alapján a következő módosításokkal végeztem. A kezelt növényekről levágott leveleket desztillált vízzel lemostam, majd vákuum alatt szintén desztillált vízzel telítettem. A vízzel telített leveleket a centrifugacsövek oldalához rögzítettem (Ott et al. 2006), ezt követően 4 °C-on 1340 g gyorsulással, 18 percig centrifugáltam. Az így nyert IWF-mintákat 20 000 g gyorsulással 20 percig ismét centrifugáltam, így az esetleges fizikai szennyeződésektől elválasztottam. A felhasznált IWF minták fehérjetartalmát Bradford (1976)-módszere alapján előállított Bradford-reagens (Sigma B6916) felhasználásával állapítottam meg. A vizsgálatok többségéhez ezt a nyers kivonatot használtam fel és nem tisztítottam tovább az IWF-et.

A kétdimenziós PAGE azonban szükségessé tette az IWF sűrítését. A minták térfogatának 10-szeres mértékű töményítését fagyasztásuk után vákuum-centrifugában végeztem.

Az LC-MS/MS tömegspektrometria analízis szintén nagyobb töménységű kiindulási IWF kivonatot igényelt. A kivonatokat 10 kDa pórusméretű (Microcon-10) szűrő alkalmazásával 10-szeres mértékben sűrítettem és egyben sótartalmát is csökkentettem.

5. Táblázat. A fehérjék elválasztására alkalmazott poliakrilamid gél összetétele

	elválasztó gél		gyűjtő gél
	10%-os	20%-os	4%-os
végtérfogat	2,4 ml	2,4 ml	2 ml
desztillált víz	1,3 ml	-	1,54 ml
Tris-HCL	(3M, pH 8,8) 300 µl	(3M, pH 8,8) 300 µl	(1,5 M, pH 6,8) 164 µl
akrilamid (30%, 37,5:1)	800 µl	1,6 ml	263 µl
APS (100 mg/ml)	15 µl	6 µl	19 µl
DMAPN	7,5 µl	2,5 µl	-
TEMED	-	-	4 µl
SDS (10%)	24 µl	24 µl	20 µl

(Lamelli 1970 nyomán)

APS: ammonium-perszulfát

SDS: nátrium-dodecilszulfát

TEMED: N,N,N',N',-tetrametiletiléndiamin

3.10. Az IWF minták elválasztása poliakrilamid gélben

3.10.1. Egydimenziós PAGE

Az egydimenziós poliakrilamid-gél-elektroforézishez 1 mm vastagságú 10-20 %-os töménységű gradiens gélt készítettem (5. táblázat). Az elválasztás Mini-Protean III (Bio-Rad) rendszerben történt. Egyenlő térfogatú minták alkotórészeit Tris-glicin futtató puffer (144 g/l glicin, 30,3 g/l Tris és denaturáló elválasztáskor 0,1 % SDS, pH 8,8) rendszerben választottam el.

A fehérjék elválasztása natív módon akkor zajlik, ha sem a gél, sem a futtató, illetve a minta-puffer nem tartalmaz redukáló szereket és detergenset. Egydimenziós elválasztáskor az IWF mintákat egyenlő térfogatban (mintánként 20–20 µl) vittem fel a zsebekbe. Egydimenziós natív elválasztás előtt az IWF mintákat 5:1 arányban minta-pufferrel vegyítettük (30 % glicerin, 0,35 M Tris HCl pH 6,8, 0,012 % brómfenol kék). A minták denaturáló elválasztása esetén a minta-puffert detergennel (0,01 % SDS) és redukáló szerrel (0,6 M DTT) kellett kiegészíteni. Valamint a minta és a mintapuffer keverékét 95 °C-on 5 percig inkubáltam.

A mintákat 4 °C-on állandó feszültségen választottam el (Bio-Rad 1000), az első szakaszban 120V állandó feszültségen kb. 25 percig (50–55 Vh), majd 160V feszültségen kb. 110 percig (280–310 Vh).

3.10.2. Kétdimenziós PAGE

A kétdimenziós PAGE rendszer két elválasztási lépésből áll. Az első lépés a mintában megtalálható fehérjék elválasztása izoelektromos pontjuk alapján (IEF, isoelectric focusing). A második dimenzióban az azonos izoelektromos pontú fehérjék méretük szerint választhatók el.

Az IWF minták izoelektromos fókuszálását pH 3-10 IPG (immobilized pH gradient) (Bio-Rad) csíkokban végeztük. Az aktív rehidratálás (a mintafelvitellel egy szakaszban történik) 14 órán keresztül tartott. A fókuszálás menete négy lépésből épült fel (6. táblázat). A második dimenzióban a fókuszált IWF mintákat tartalmazó csíkokat detergens és redukáló anyagokat tartalmazó oldatokban (1. oldat: 6 M urea, 4 % SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 30 % glicerin, 2 % DTT; 2. oldat: 6 M urea, 4 % SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 30 % glicerin, 2,5 % jódiacet-amid) oldatonként kétszer 10-10 percig szobahőmérsékleten rázattam. Az inkubálást követően az IPG csíkokban lévő fókuszált fehérjéket 1 mm vastagságú 10–20 %-os gradiens gélben, denaturáló körülmények között szobahőmérsékleten választottam el. Az elválasztás állandó 200 V feszültséggel 80 percig tartott (250 Vh).

6. Táblázat. Az izoelektromos fókuszálás (IEF) menete

Rehidratálás	aktív	14 óra
	az IEF menete	idő
1. lépés	250V	15 perc
2. lépés	4000 V fokozatos elérése (gyors mód)	2 óra
3. lépés	4000 V, 10000 Vh eléréséig	kb. 3 óra
4. lépés	500 V	folyamatos

3.11. Festési eljárások

A poliakrilamid géleken elválasztott fehérjéket három festési módszerrel tettem láthatóvá. A festéshez szükséges oldatokat minden esetben frissen készítettem el. A fehérjék ezüst–festése natív és denaturáló körülmények között azonos (7. táblázat). Viszont a LC–MS/MS tömegspektrometriai analízissel csak több módosítást követően kompatibilis (8. táblázat).

7. Táblázat. Az ezüst–festés menete

	Lépések	Összetétel (100 ml oldat)	Idő
1.	Rögzítés	31 ml etanol (absz.), 10 ml ecetsav (98 %)	2 óra
2.	Inkubálás	31 ml etanol (absz.), 0,31 g nátrium-tioszulfát, 4 g nátrium-acetát, 2ml glutár-aldehid	2 óra
3.	Mosás	desztillált víz	2x 10 perc
4.	Festés	0,1 g ezüst-nitrát, 28,5 µl formaldehid (35 %)	45 perc
5.	Előhívás	2,5 g nátrium-karbonát, 28,5 µl formaldehid (35 %)	3-8 perc
6.	Leállítás	1,86 g EDTA	15 perc
7.	Mosás	desztillált víz	15 perc
8.	Tárolás	desztillált víz, 4 °C	több hét

(Heukeshofen és Dernick, 1985 nyomán)

8. Táblázat. A csökkentett ecetsav tartalmú ezüst festés menete

	Lépések	Összetétel (100 ml oldat)	Idő
1.	Rögzítés	50 ml metanol , 5ml ecetsav (98%)	20 perc
2.	Mosás	50 ml metanol	20 perc
3.	Érzékenyítés	1,27 mM nátrium-tioszulfát	1 perc
4.	Mosás	desztillált víz	2x 1 perc
5.	Festés	0,1 g ezüst nitrát	20 perc
6.	Mosás	desztillált víz	2x 1 perc
7.	Előhívás	2 g nátrium-karbonát, 40 µl formaldehid (35 %)	3-8 perc
8.	Leállítás	5 ml ecetsav (98 %)	15 perc
9.	Tárolás	1 ml ecetsav (98 %)	több hét

(Shevchenko et al. 1996 nyomán)

Az enzimaktivitás kimutatására alkalmas szelektív festési eljárások, úgymint a kitinázaktivitás és a peroxidáz-aktivitás teszt bizonyos lépései azonban a kéttípusú PAGE miatt eltérnek. A kitinázaktivitás kimutatása natív PAGE után egy glikol-kitin tartalmú gélen történik. A két – az elválasztott mintákat és a glikol-kitin tartalmú fedőgél egymásra tettem és helyzetüket nehezekkel rögzítettem. A párosított géleket 37 °C-on 100 % relatív páratartalom mellett inkubáltam (9. táblázat). Ezzel ellentétben az SDS-PAGE során a kitinázok szubsztrátja a mintákat elválasztó gélbe került. Az elválasztás után a fehérjéket renaturálni kellett, ehhez 1 % Triton X 100-at használtunk (10. táblázat).

A peroxidáz izoenzimek natív és SDS-PAGE festése csak a kezdeti mosási lépés elhagyásában ill. elvégzésében tért el egymástól (11. táblázat).

9. Táblázat. A kitinázaktivitás kimutatása natív elektroforézis után fluorescens festéssel

	Lépések	Összetétel (100 ml oldat)	Idő
1.	Rögzítés	100 mM nátrium-acetát puffer (pH 5,0)	15 perc
2.	Inkubálás	gélzendvics, 100 % relatív páratartalom, 37 °C	2 óra
3.	Festés	0,01 % Fluorescent Brightner 28, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	5 perc
4.	Mosás	desztillált víz	1 óra
5.	Tárolás	desztillált víz, 4 °C, sötétben	több hét

(Kim és Hwang 1994 nyomán)

10. Táblázat. A kitinázaktivitás kimutatása denaturáló elektroforézis után fluorescens festéssel

	Lépések	Összetétel (100 ml oldat)	Idő
1.	Rögzítés, inkubálás	1 % Triton X 100, 100 mM nátrium-acetát puffer (pH 5,0), 37 °C, 50 rpm	18 óra
2.	Festés	0,01 % Fluorescent Brightner 28, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	5 perc
3.	Mosás	desztillált víz	1 óra
4.	Tárolás	desztillált víz, 4 °C, sötétben	több hét

(Kim és Hwang 1994 nyomán)

11. Táblázat. Peroxidázaktivitás kimutatása denaturáló vagy natív elektroforézist követően

	Lépések	Összetétel (100 ml oldat)	Idő
1.	Mosás	100 mM nátrium-acetát puffer (pH 4,5)	3x 5 perc
2.	Rögzítés, festés	100 mM nátrium-acetát puffer (pH 4,5), 0,5 mg/ml DAB	10 perc
3.	Előhívás	0,03 % hidrogén-peroxid	3-10 perc
4.	Leállítás	7 % ecetsav (98 %)	3 perc
5.	Tárolás	1 ml ecetsav (98 %), 4 °C	több hét

(Zaecho et al. 1995 nyomán)

3.12. A növényi génexpresszió változásának megállapítása valós idejű PCR készülék alkalmazásával

A teljes RNS kinyeréshez mintánként kb. 100 mg levéllemez darabot fagyasztottam le folyékony nitrogénben, és felhasználásukig -70 °C-on tároltam. A tisztításához Viogene Biotek Corp., (Taipei, Taiwan) gyártmányú készletet használtam. A cDNS szintézise RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania) felhasználásával történt. A reakcióhoz 2,5 µg RNS-t mértem be. A kapott cDNS-t a reakcióelegy összeállítása előtt 10-szeresére hígítottam. A valós idejű PCR reakciót iQ SYBR

Green 2x Supermix (Bio-Rad, USA) felhasználásával végeztük a cDNS és a primerek hozzáadásával (DNA Engine Opticon2 (MJ Research, USA). Minden egyes reakcióban (15 µl) 2,5 µl hígított cDNS-t használtam fel. A primerek koncentrációja 3 µM volt. A belső kontroll az aktin kifejeződésének mértéke volt.

Az EBR-43 primerei: ATGATTGGAGCGACGAGCATT (forward)
GCCTCTGGAAGTATGCACTC (reverse) (Szatmári et al. 2006)

A tpoxN1 primerei: ACAAAGGGTCTCAACACTCAAGAT (forward)
GCAACCTGCGGTTCCAATA (reverse)

Az aktin primerei: CGGAATCCACGAGACTACATAC (forward)
GGGAAGCCAAGATAGAGC (reverse) (Szatmári et al. 2006)

A PCR ciklusok valamennyi primerpár esetében azonosak voltak (95 °C, 6 min; 40 ciklus: 95 °C, 30 s; 60 °C, 1 min; mérés). A gének aktiválódási szintjét egyrészt az aktin kifejeződésének mértékéhez, továbbá a kezeletlen kontroll értékéhez viszonyítottam.

3.13. Statisztikai módszerek

A diagramokon közölt adatokat, eredményeket legalább három biológiailag független kísérletből állítottam össze. A kísérletek során két vagy három párhuzamos mérést végeztem. A szórásokat ezek alapján számoltam ki.

A fotókon rögzített eredmények (13–24. ábra.) legalább négy, biológiailag független minta eredményeit tükrözik.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A hőmérséklet hatása a növényi védekezési mechanizmusok kialakulására

A környezeti hőmérséklet csökkenése oly mértékben módosítja a kölcsönhatást növények és baktériumok között, hogy esetenként annak végső kimenetelét (betegség, betegségellenállóság) is megváltoztathatja. A hőmérséklet nemcsak a növényi védekezési válaszok gyorsaságát, hatékonyságát, hanem az ezeket kiváltó vagy gátló baktériumok életképességét, anyagcseréjükön keresztül betegségokozó-képességüket is befolyásolja.

A felhasznált tesztnövények szempontjából az 5 °C-ot tekintetem alacsony és a 30 °C-ot magas hőmérsékletnek. Az „alacsony” illetve „magas” hőmérséklet szókapcsolatokat a továbbiakban a konkrét hőmérséklet értékek szinonimjaként használom.

Első leírásától napjainkig az általános védekezés (BR) számos elicitorát kimutatták, melyek közül ebben a dolgozatban a hővel elölt kórokozó és a szaprotróf baktériumok szuszpenzióját alkalmaztam (Klement et al. 2003). A BR (HR-gátlás) és a HR kialakulási idejét két baktériumfaj egy-egy izolátumának felhasználásával párhuzamosan határoztam meg. Egyik a nemzetközi szakirodalomban sűrűn alkalmazott *P. syringae* 61 törzs, mely korábbi vizsgálatokban 5–18 °C hidegtűrőnek bizonyult (Hevesi 1986, van Dijk et al. 1999, Latorre et al. 2002), a másik a *P. phaseolicola* S21. A *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* fajra jellemző, hogy hideg időszakok után okoz betegséget. Ezzel ellentétben a szakirodalom napjainkig nem írta le, hogy a *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* betegségokozó képességét fokozná a 10 °C alatti, alacsony hőmérséklet. Következtetéseimet a két rendszerből származó adatok összevetése után vonom majd le.

4.1.1. Az alacsony hőmérséklet hatása a *P. syringae* 61 és a *P. phaseolicola* S21 izolátumok *in vitro* szaporodására

A párhuzamos vizsgálatokban szereplő *P. syringae* 61 és *P. phaseolicola* S21 hidegtűrő-képessége tehát eltért egymástól. Feltevéseimet az alábbiakban ismertetendő *in vitro* baktérium-szaporodás vizsgálatok is alátámasztották. A két baktériumfaj *in vitro* szaporodási optimumát 20 és 30 °C közé teszik (Smirnova et al. 2001). Kísérleti körülményeink között mindkét izolátum növekedése szempontjából a 30 °C volt a legkedvezőbb. A hőmérséklet

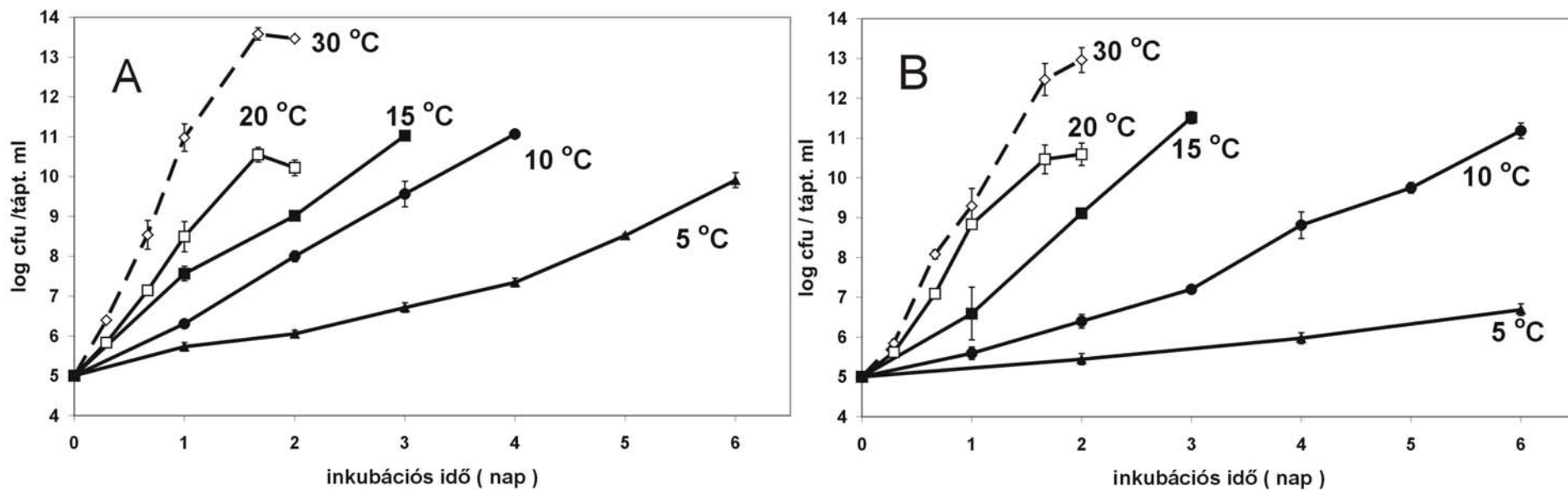
csökkenése fokozatosan csökkentette a baktériumok szaporodási rátáját (4. ábra). A két faj izolátumai 15 és 30 °C között hasonló ütemben szaporodtak – bár a *P. syringae* 61 szaporodása kissé gyorsabb volt – így ugyanannyi inkubációs idő alatt a baktériumszám hasonló abszolút értéket ért el. A *P. syringae* 61 izolátum 5 és 10 °C-on sokkal gyorsabban szaporodott, mint a *P. phaseolicola* S21 (4. A. és B. ábra). Tehát a két izolátum szaporodása 10 °C-on eltávolodott egymástól. Az abszolút értékben kifejezhető különbség négy nap inkubálás után 10 °C-on százszoros, 5 °C-on hat nap elteltével pedig ezerszeres volt a *P. syringae* 61 javára. Tehát a *P. syringae* 61 az ideális tápanyag–ellátottsági körülményeket modellező táptalajban hidegtűrőbb volt a *P. phaseolicola* S21 izolátumnál.

4.1.2. Az alacsony hőmérséklet hatása a hiperszenzitív reakció (HR) megjelenésére

A BR egyik tulajdonsága egy másik védekezési válasz, a HR gátlása (Burgyán és Klement 1979). Ezt a tulajdonságát használta fel csoportunk az általános védekezés közvetett kimutatására, ezért azonos körülmények között a HR hőmérsékletfüggését is figyelemmel kellett kísérnem. A HR kialakulásának sebessége a gazdanövénytől, az indukáló baktérium–izolátumoktól és a hőmérséklettől egyaránt függ.

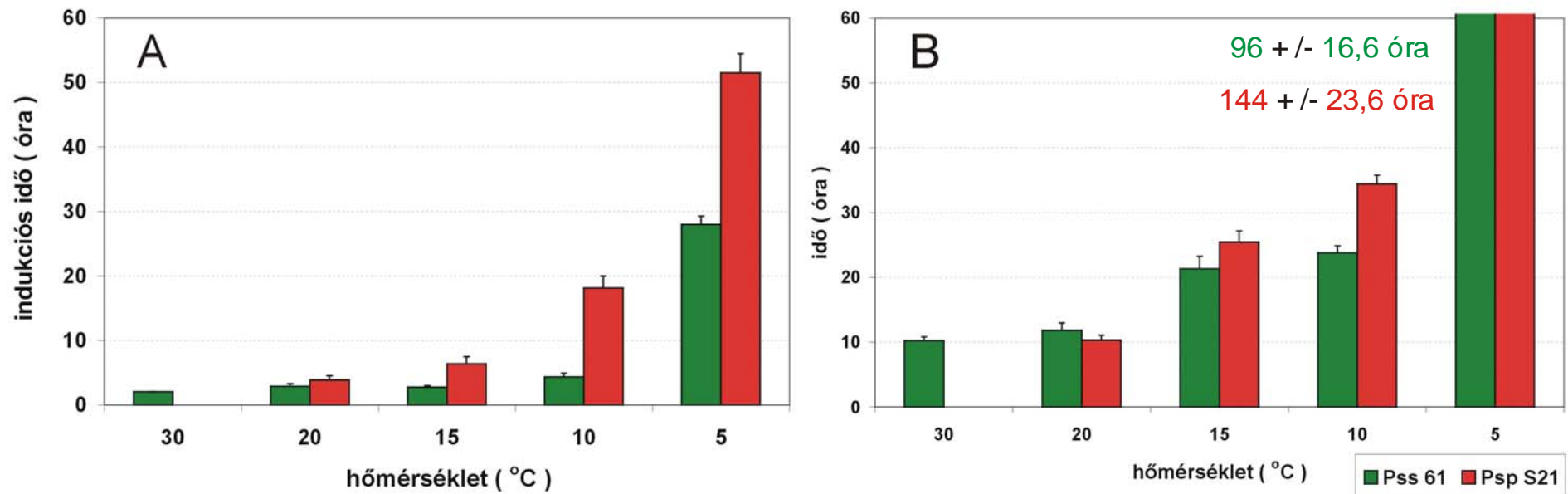
A vizsgált izolátumok által okozott hiperszenzitív nekrozis a hőmérsékletcsökkenés hatására egyre később alakult ki (5. B. ábra). Klement et al. (1999) közleményéből ismert, hogy a *P. phaseolicola* S21 30 °C-on nem okoz HR-t a dohányban, 20 °C-on viszont az injektálása után 10 órával következett be a szövetek elhalása. A *P. phaseolicola* S 21 indukálta HR megjelenését 20 °C-on átlagosan két órával gyorsabbnak mértem, mint ha *P. syringae* 61 szuszpenziót injektáltam a levélbe. A *P. syringae* 61 izolátum injektálása után 15–10 °C között 21–23 óra, a *P. phaseolicola* S21 esetében 25–35 óra közötti időtartam szükséges a HR kialakulásához. Figyelemre méltó volt, hogy a HR megjelenése 5 °C-on már nem órákat, hanem több napot igényelt. A *P. syringae* 61 levélszövetbe injektálása után 3–4 nappal, a *P. phaseolicola* S21 injektálása után pedig 5–7 nappal jelent meg a szövetelhalás (5. B. ábra).

Ezek az eredmények és más szakirodalmi adatok alapján megállapítható (Hevesi és Király 1977), hogy a környezet optimális körülményektől eltérő alacsony vagy magas hőmérséklete, mely az adott növény számára szélsőséges, egyaránt késlelteti a HR kialakulását és a folyamatához kötődő szövetnekrozis megjelenését.



4. Ábra. A hőmérséklet csökkenése lassította a *P. syringae* 61 (A) és a *P. phaseolicola* S21 (B) izolátumainak *in vitro* szaporodását

A baktérium-szuszenziókat kémcsövekben 5, 10, 15, 20 és 30 °C-on tartottam az inokulációt követően. A kísérlet 6 napig vagy addig az időpontig tartott, amíg a baktériumok koncentrációja megközelítette a 10^{11} cfu/ táptalaj ml értéket.



5. Ábra A hőmérséklet csökkenése növelte a *P. syringae* 61 és a *P. phaseolicola* S21 törzsek dohányban mért HR-indukciós idejét (A) és a HR megjelenését (B)

A dohányleveleket a *P. syringae* 61 és a *P. phaseolicola* S21 törzsek baktérium-szuszpenziójával (10^8 sejt/ml) injektáltam. Az indukciós idő meghatározásakor a fertőzött területet rendszeres időközönként klóramfenikollal kezeltem.

4.1.3. A növényi általános rezisztencia kialakulásának és a baktériumok HR-indukciós idejének kimutatási lehetőségei alacsony hőmérsékleten

Minden inkompatibilis kórokozó baktérium szuszpenziójának injektálása után a növény érzékeli a baktériumok BR elicitorait és a HR kiváltásában szereplő effektor tényezőket. A BR a HR kialakulását kizárólag annak első, indukciós fázisában gátolhatja meg, ezért a baktériumok HR-indukciós idejének, valamint a BR kialakulási idejének a hossza meghatározó tényező abban, hogy végül melyik reakció jut érvényre. Ha egy baktérium HR-indukciós ideje hosszabb, mint a HR-rel párhuzamosan indukált BR kialakulási ideje – ez teljesül a *P. phaseolicola* S21 izolátumra 30 °C-on – akkor a BR képes megakadályozni a nekrosis kialakulását (Klement et al. 1999).

A hőmérséklet csökkenésével párhuzamosan a HR egyre később jelent meg (5. B. ábra). A kísérletekben szereplő inkompatibilis baktériumtörzsek 5 °C-on 48 óráig biztosan nem okoztak HR-t, még a hidegtűrőbb *P. syringae* 61 sem. Ezért 20 °C alatt a baktériumok HR-indukciós idejének meghatározását úgy gyorsítottam, hogy miután antibiotikum-kezeléssel hatástalanítottam a sejtközötti járatokba injektált baktériumsejteket, az eredmények értékeléséig 20 °C-on inkubáltam a növényeket. A továbbiakban egy-egy példát is ismertetek a kísérleti kombinációkból. A 10 °C-on inkubált dohányokat *P. syringae* 61 szuszpenzióval injektáltam, majd a fertőzött területek egy-egy részét különböző időpontokban klóramfenikol antibiotikummal kezeltem. A klóramfenikol kezelés után a növények 20 °C-os növénynevelő kamrába kerültek. A HR elmaradását vagy megjelenését 24 óra múlva értékeltem.

A HR indukciós ideje és látens fázisa is növekedett alacsony hőmérsékleten. Ez bizonytalan eszközzé tette a HR-t a BR kialakulási idejének megállapításában. Ezért néhány változtatást vezettem be a BR kialakulási idejének meghatározásakor (6. ábra).

A 20 °C alatt végzett vizsgálatok esetében a következő módon jártam el. A hóvel előlt baktériummal előkezelt dohányokat a második injektálást (felülfertőzés) követően 20 °C-os növénynevelő kamrába helyeztem, azért, hogy a HR gyorsabban láthatóvá váljék. A kimutatási módszer módosításánál figyelembe vettem, hogy a BR a HR-t az indukciós idő alatt gátolja (Klement et al. 1999). Így a dohányok kizárólag akkor helyezhetők 20 °C-ra, ha a felülfertőző baktérium HR-indukciós fázisa lezajlott. A 20 °C hőmérsékletet azért választottam, mert ezen a hőmérsékleten a HR látens fázisa gyorsan lezajlik, így az adatok torzulásának veszélye nélkül, gyorsabban értékelhető, pontos vizsgálati eredmények nyerhetők. Kísérleti példánk: a 10 °C-on inkubált hóvel előlt *P. syringae* 61 szuszpenzióval

injekciózott dohányokon a fertőzött területek egy–egy részét különböző időpontokban élő *P. syringae* 61 szuszpenzióval fertőztem felül. A *P. syringae* 61 indukciós ideje 10 °C-on 4 óra (lásd később). Ezért a növények 4 órával a felülfertőzés után kerültek 20 °C-ra. A HR megjelenését vagy elmaradását 24 óra múlva értékeltem.

4.1.4. Az alacsony hőmérséklet hatása a baktériumok HR–indukciós idejének hosszára

A baktériumok HR–indukciós idejének hossza – az izolátumok *in vitro* szaporodási rátája mellett – fontos adatokkal szolgált arról, hogy a vizsgált baktériumok mennyire érzékenyek a hőmérséklet változására. Az inkompatibilis kapcsolat szereplői által meghatározott körülmények között az indukciós idő hossza a HR kialakulásának döntő paramétere (Bozsó et al. 1999). A *P. syringae* 61 izolátum dohányban mért HR–indukciós ideje – 30 és 10 °C között 1–4 óra – fokozatosan, kis mértékben emelkedett. 5 °C-on viszont az izolátum indukciós ideje jelentősen, mintegy 27 órára nőtt. A *P. phaseolicola* S 21 indukciós idejét sokkal nagyobb mértékben befolyásolta a hőmérséklet csökkenése. A HR-indukciós idő 20 °C-on 3,5, 15 °C-on 8 óra, 15 °C alatt pedig már a sokszorosára nőtt. 10 °C-on a 18, míg 5 °C-on az 50 órát is meghaladta (5. A. ábra).

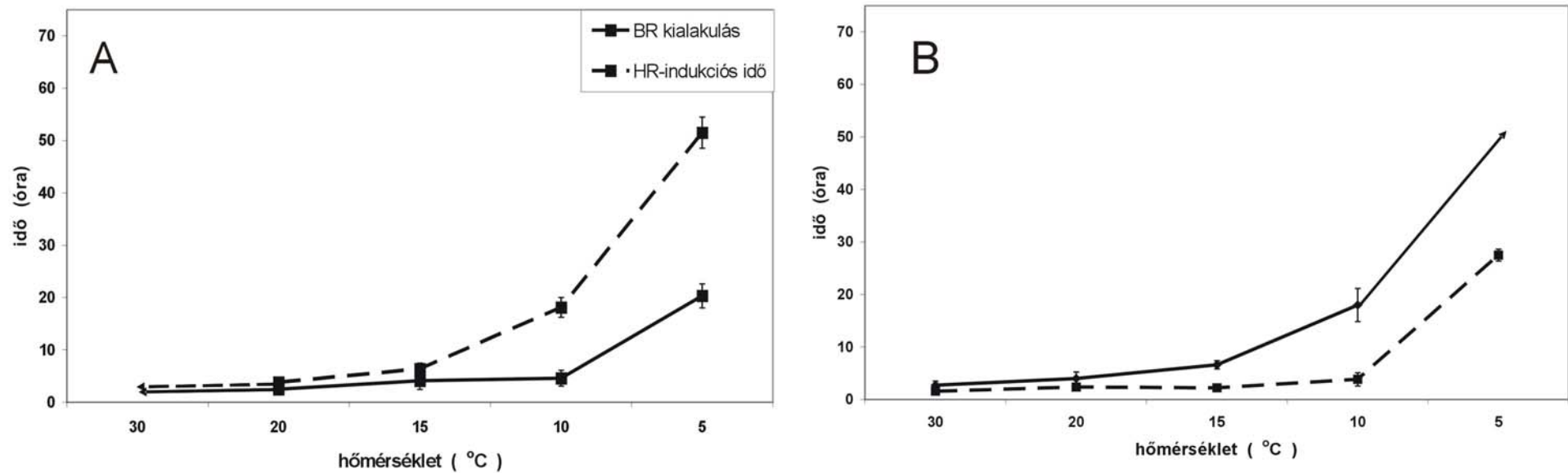
Alacsony hőmérsékleten az elhalás hosszabb idő alatt fejlődött ki, mint magas hőmérsékleten, ezt egyrészt az izolátumok hosszabb indukciós ideje, másrészt a HR további, a dohány élettani állapotától erősebben függő szakaszainak meghosszabbodása együttesen magyarázza.

Az összehasonlított izolátumok közül a *P. syringae* 61 indukciós ideje a 30 °C kivételével valamennyi időpontban rövidebb volt, mint a *P. phaseolicola* S21 izolátumé. Ez az összefüggés összhangban áll azzal, hogy a két baktérium közül a *P. syringae* 61 izolátum a hidegtűrőbb.

4.1.5. A BR kialakulása alacsony hőmérsékleten

A BR hőmérsékletfüggését dohánynövényeken határoztam meg 5–30 °C között. A BR kialakulási ideje az előkezelés és az első olyan HR-t indukáló felülfertőzés között eltelt időt jelenti, amikor a BR hatására a HR már nem alakult ki. Ez az idő 30 °C-on általában 1–2 órával rövidebb, mint a 20 °C-on inkubált dohánynövényekben (Klement et al. 2003).

A hővel előlt *P. phaseolicola* S21 izolátummal indukált és az azonos élő baktérium szuszpenziójával detektált BR kialakulási ideje 20 °C-on 2,5–3,5 óra. Alacsonyabb hőmérsékletű környezetben, 10 °C-on ez az időtartam 4,5–6 órára emelkedett. A HR–gátlást



6. Ábra. A hőmérséklet csökkenése növelte az EBR kialakulási idejét és a detektáló baktériumtörzsek HR-indukciós idejét dohánynövényekben

A nyílban végződő adatpontok a görbék tendenciájából következtethető, nem mérhető értékekre mutatnak. (A): előkezelés: hővel elölt *P. phaseolicola* S21 (4×10^8 sejt/ml), felülfertőzés: *P. phaseolicola* S 21 (10^8 sejt/ml) (B): előkezelés: hővel elölt *P. syringae* 61 (4×10^8 sejt/ml), felülfertőzés: *P. syringae* 61 (10^8 sejt/ml)

5 °C-on legkorábban az előkezelés után 20 órával mutattam ki (6. A. ábra).

A *P. syringae* 61 törzssel tesztelt BR kialakulása 30–15 °C között 1,5 órától 8 órára növekedett. 15 °C alatt viszont már 18 óra telt el az előkezelés és az első olyan felülfertőzés között, ahol a HR gátlódott. HR-gátlást 5 °C-on csak a fiatal levelekben (2.-3. levélemelet) mutattam ki, ennek legkorábbi időpontja az előkezelést követő 48 óra volt (6. B. ábra). Ez azt jelenti, hogy alacsony hőmérsékleten gyakorlatilag napokig nem mutatható ki baktériumok által indukált védekezés a dohánynövényekben.

Világosan látható, hogy 10 és 5 °C-on a párhuzamos kísérletekben a *P. phaseolicola* S21 javára jelentős eltérés volt az összehasonlított izolátumok BR kialakulási ideje között (6. A., B. ábra). Ebből azt a téves következtetést lehetne levonni, hogy alacsony hőmérsékleten a BR a hővel előlt *P. phaseolicola* S21 injektálása után gyorsabban kialakul, mint az összehasonlításban szereplő másik hővel előlt izolátum hatására. A két kísérleti kombinációban mért BR kialakulási idők közötti különbség forrása a detektálásra használt két izolátum eltérő HR-indukciós ideje, mivel az előkezelésnél alkalmazott előlt baktérium valószínűleg nem befolyásolta a BR kialakulását. Ezt bizonyítottam a kísérlet más, harmadik kombinációjával, ahol a dohányleveleket hővel előlt *P. phaseolicola* S21 (4×10^8 sejt/ml) törzssel kezeltem elő, a felülfertőzést viszont a *P. syringae* 61 (10^8 sejt/ml) törzssel végeztem. Ennek eredménye megegyezett a 6. B. ábrán látható értékekkel, ahol szintén a *P. syringae* 61 volt a felülfertőző baktérium.

4.1.6. A HR indukciós idejének befolyása a BR kialakulására

A HR elhúzódó látens szakasza meghosszabbította és bizonytalanabbá tette az alacsony hőmérsékletre tervezett kísérletek megvalósítását. Ezt a problémát a dohányok 20 °C-ra helyezésével szüntettem meg. A hőmérséklet csökkenésével párhuzamosan a baktériumok HR-indukciós ideje is egyre hosszabb lett (5. A. és 6. A., B. ábra). A hosszú HR-indukciós idő (esetünkben 5 °C-on 28 vagy 51,5 óra) alatt a növényeknek még van idejük az általános védekezés felépítésére, a BR biokémiai hátterének megteremtésére. A HR indukciós idejének hossza döntő jelentőségű abból a szempontból, hogy a növény–baktérium kölcsönhatás végén melyik védekezési mechanizmus érvényesül. Ennek jelentőségét korábban Bozsó et al. (1999) és Klement et al. (1999) magas hőmérsékleten inkubált, illetve *hrp* mutánsokkal fertőzött dohánynövényeknél felismerték. Alacsony hőmérsékleten a baktériumok HR-indukciós ideje erősen elnyúlik, a 20 °C-on órák alatt lejátszódó folyamat 5 °C-on már napokat igényelt.

12. Táblázat. A BR HR–indukciós idővel korrigált kialakulási ideje dohánynövényeken 5-30 °C között

	Ps+Ps	Pp+Pp
Hőmérséklet (°C)	„valódi” BR kialakulási idő (óra)	
30	4,28	nincs adat
20	6,39	6,33
15	8,83	10,5
10	21,83	22,72
5	nincs adat	71,83

A BR HR–indukciós idővel korrigált kialakulási ideje az előkezelés és a felülfertőzés között eltelt idő, valamint a detektáló baktérium HR–indukciós idejének összege. Az 5. és a 6. ábrán mért értékek átlagát összegeztem. Ps+Ps: előkezelés hővel előlt *P. syringae* 61 (4×10^8 sejt/ml) felülfertőzés *P. syringae* 61 (10^8 sejt/ml) Pp+Pp: előkezelés: hővel előlt *P. phaseolicola* S21 (4×10^8 sejt/ml) felülfertőzés *P. phaseolicola* S 21 (10^8 sejt/ml)

Ezért az alacsony hőmérsékleten egyre növekvő HR–indukciós idő alatt, egyre hosszabb idő áll rendelkezésre a BR kialakulására. Bár kevés az arra vonatkozó eredmény, hogy a BR az indukció mely lépésében gátolja a HR folyamatát, Klement et al. (2003) és Bozsó et al. (1999) közleményéből kiderült, hogy a BR gátolja a kórokozók patogenitásért felelős *hrp* génjeinek aktivitását. A fenti eredmények tükrében célszerűnek tartottam, hogy a BR HR–indukciós idejével korrigált kialakulási idejének (BR_{total}) az előkezelés és a felülfertőzés között eltelt idő és a detektáló baktérium HR–indukciós idejének adott hőmérsékleten mért összegét tekintsem (12. táblázat). Azaz a $BR_{det} = BR_{total} - IT$, ahol a kísérletekből származó adatok a BR_{det} , amely az előkezelés és a felülfertőzés között eltelt időt jelenti, és az IT, amely a kimutatásra felhasznált izolátum HR–indukciós ideje (6. A. és 6. B. ábra).

A BR kialakulási ideje dohányban tehát mindkét kombinációban közel azonos volt (12. táblázat). Az alacsony hőmérséklet jelentősen meghosszabbította a kialakulási időt. A hőmérséklet mellett azonban más tényezők is módosíthatják ezt. A teszt növények kora, továbbá az indukáló baktérium vagy baktériumeredetű anyag szuszpenziójának töménysége szintén befolyásolta a BR kialakulási idejét.

4.2. A hőmérséklet hatása a *tpoxNI* (peroxidáz) és *EBR-43* (ortometil-transzferáz) BR markergének kifejeződésére

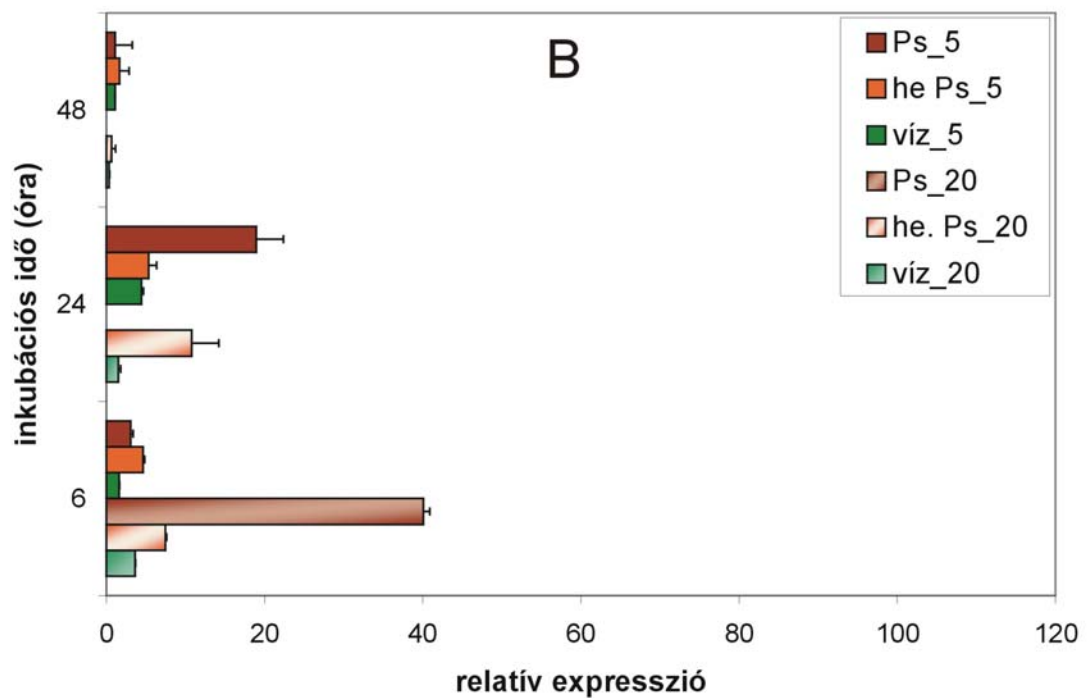
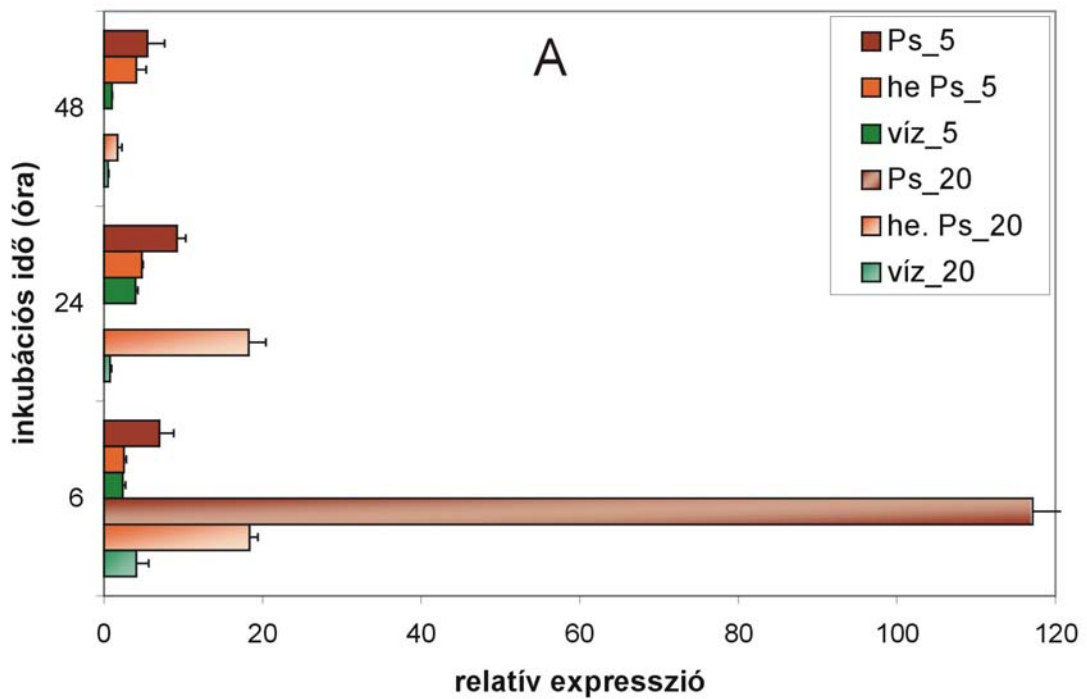
A növényekből azonosított peroxidáz enzimeknek több lehetséges feladatát is leírták. A hidrogén-peroxid semlegesítése mellett a növényi sejtfalak szerkezetének utólagos

erősítésében éppen a hidrogén-peroxid termelésével veszik ki a részüket. A redox folyamatokban játszott szerepén túl a hidrogén-peroxidot jelátviteli molekulaként is számon tartják (Baker és Orlandi 1995, Király et al. 1993 és Brown et al. 1998). Az egészséges növények szövetei éppen úgy tartalmaznak peroxidáz izoenzimeket, mint beteg társaik. Langrimini és Rothstein (1987) az egészséges dohány leveléből is öt peroxidáz izoenzimet mutatott ki. A *tpoxNI* gént eredetileg TMV-vel fertőzött dohánylevelekből klónozták (Hiraga et al. 1999), majd Bozsó et al. (2002) különféle dohány–baktérium kölcsönhatásból mutatta ki, sőt a BR-t jelző génként írták le. Két vizsgált gén átíródásának mértékét a fenti kísérletekkel azonos rendszerben követtem figyelemmel. Az élő *P. syringae* 61 a fertőzést követően 12–14 órával HR-t okozott, így 20 °C-on 24 és 48 órás minták nem nyerhetők ebből a kezelésből.

A *tpoxNI* peroxidáz enzimet kódoló gén kifejeződése 20 °C-on a BR-t aktiváló kezelést követően 6 és 24 óra múlva már a 18-szorosára nőtt. Az mRNS mennyisége a HR-t okozó *P. syringae* 61 injektálása után 6 órával volt a legmagasabb, a kontroll érték 120-szorosa (7. A. ábra). Az 5 °C-on tartott dohánynövényekben a *tpoxNI* gén termelődése a kísérlet teljes, két napos időtartama alatt alacsony, a 20 °C-on mért kifejeződési szinthez képest elhanyagolható volt. A vízkezelés hatására mindkét hőmérsékleten a *tpoxNI* gén gyenge indukcióját mutattam ki.

Az *EBR-43* egy ortometil-transzferáz enzimet kódoló, a BR működését jelző dohány gén (Szatmári et al. 2006). Az ortometil-transzferázok a fenil-propanoid bioszintézis út elemei, a kumarinok előállításán keresztül a sejtfalakat erősítő lignin szintézisében vesznek részt.

A BR-t indukáló kezelést (hővel előlt *P. syringae* 61 injektálása) követő 6 és 24 óra elteltével 20 °C-on a gén átíródása magasabb szintű volt, mint 5 °C-on. Az injektálás után 48 órával az *EBR-43* génről képzett mRNS-ek mennyisége 5 és 20 °C-on is gyakorlatilag a kontroll szintjére zuhant vissza. A HR-t indukáló (élő *P. syringae* 61) kezelés mindkét hőmérsékleten az *EBR-43* gén nagyobb indukcióját okozta, de az azonos kezelések 5 °C-on mért értékei soha nem haladták meg a 20 °C-on mért adatokat (7. B. ábra). Így a *tpoxNI* és az *EBR-43* BR-marker gének transzkripciója is alátámasztotta, hogy az alacsony hőmérséklet gátolja a baktériumok indukciós hatására működésbe lépő BR és HR kialakulását. A vizsgált gének a HR-t indukáló kezelések hatására a BR indukciónál nagyobb mértékben aktiválódtak. Ez a tény feltételezi, hogy a dohánynövények hasonló vagy azonos jelátviteli folyamatokat alkalmaznak a két védekezési mechanizmus felépítése során (Bozsó et al. 2002).



7. Ábra. BR-t és HR-t indukáló kezelések hatása a *topxN1* (A) és *EBR-43* (B) gének relatív expressziójának mértékére

A dohány leveleiben a BR-t a *P. syringae* 61 4×10^8 sejt/ml töménységű hővel előlt (**he Ps**), a HR-t 10^8 sejt/ml töménységű élő *P. syringae* 61 (**Ps**) szuszpenziójával indukáltam. A jelmagyarázatban szereplő számok a vizsgált dohányok inkubációs hőmérsékletét jelzik. Az esetleges sérülések kontrolljaként vízzel is injektáltam a növényeket.

4.3. A növényi védekezések baktériumszaporodást gátló hatásának változása a hőmérséklet függvényében

A BR és a HR hatékonysága is jellemezhető a hővel előlt baktérium–szuszpenzióval vagy vízzel előkezelt dohány leveleibe injektált inkompatibilis baktériumtörzsek szaporodásával. A növényeket éppen úgy, mint az előző, a BR–marker géneket tanulmányozó kísérletben két hőmérsékleten, 20 °C-on vagy 5 °C-on inkubáltam. A 20 °C a kísérletben a HR és a BR gyors kialakulásának és a baktériumsejtszámot csökkentő hatásának pozitív kontrollja.

4.3.1. A hőmérséklet hatása a HR működésével kapcsolatos baktériumsejtszám változására dohányban

A növények a HR folyamatának végső lépéseiben a nekrotizálódott területeken lokalizálják a sejtközötti járatokba került növénykórokozó baktériumokat. Ilyenkor a baktériumok sejtszáma a szövetelhalás megjelenésével párhuzamosan csökken (Bozsó et al. 1999, Klement et al. 1999). *P. syringae* 61 és *P. phaseolicola* S 21 izolátumok szuszpenzióját injekciótam dohánynövények leveleibe.

A *P. syringae* 61 szuszpenziójával injekciózott levélszövetben 20 °C-on a kezdeti – az indukció után 3–6 órával mért – sejtszám csökkenés után a szilárd táptalajon tenyészthető baktériumsejtszám újra elérte a magas kiindulási értéket. Az injekciózott levélszövet a kezelés után 12–15 órával elhalt. A táptalajon telepeket képező *P. syringae* 61 sejtek száma ennek következtében radikálisan csökkent (8. B. ábra). Ha a dohány levelét *P. phaseolicola* S 21 szuszpenzióval injektáltam, akkor az injekciózás után 3 órával fokozatosan egyre kevesebb élő sejtet mutattam ki a levélszövetből. A nekrozis a *P. syringae* 61 injektálása után mérhető időtartamnál korábban, már 10–12 óra elteltével láthatóvá vált, és kialakulásával párhuzamosan egyre több *P. phaseolicola* S 21 sejt pusztult el (8. A. ábra).

Az 5 °C-on inkubált *P. syringae* 61 vagy *P. phaseolicola* S 21 szuszpenzióval infiltrált növényeken a kezelést követő két napon HR–típusú nekrozis nem jelent meg. A két nap alatt a levélszövetből kitenyészthető baktériumok száma sem változott lényegesen. A HR tehát nem alakult ki és nem csökkentette a kórokozó baktériumok számát sem (8. C. ábra). A szöveti szintű elhalások *P. syringae* 61 kezelés után 3–4 nappal vagy *P. phaseolicola* S 21 kezelés után 4–7 nappal jelentek meg a növényeken.

4.3.2. A hőmérséklet hatása a BR kialakulásával kapcsolatos baktériumsejtszám változására dohányban

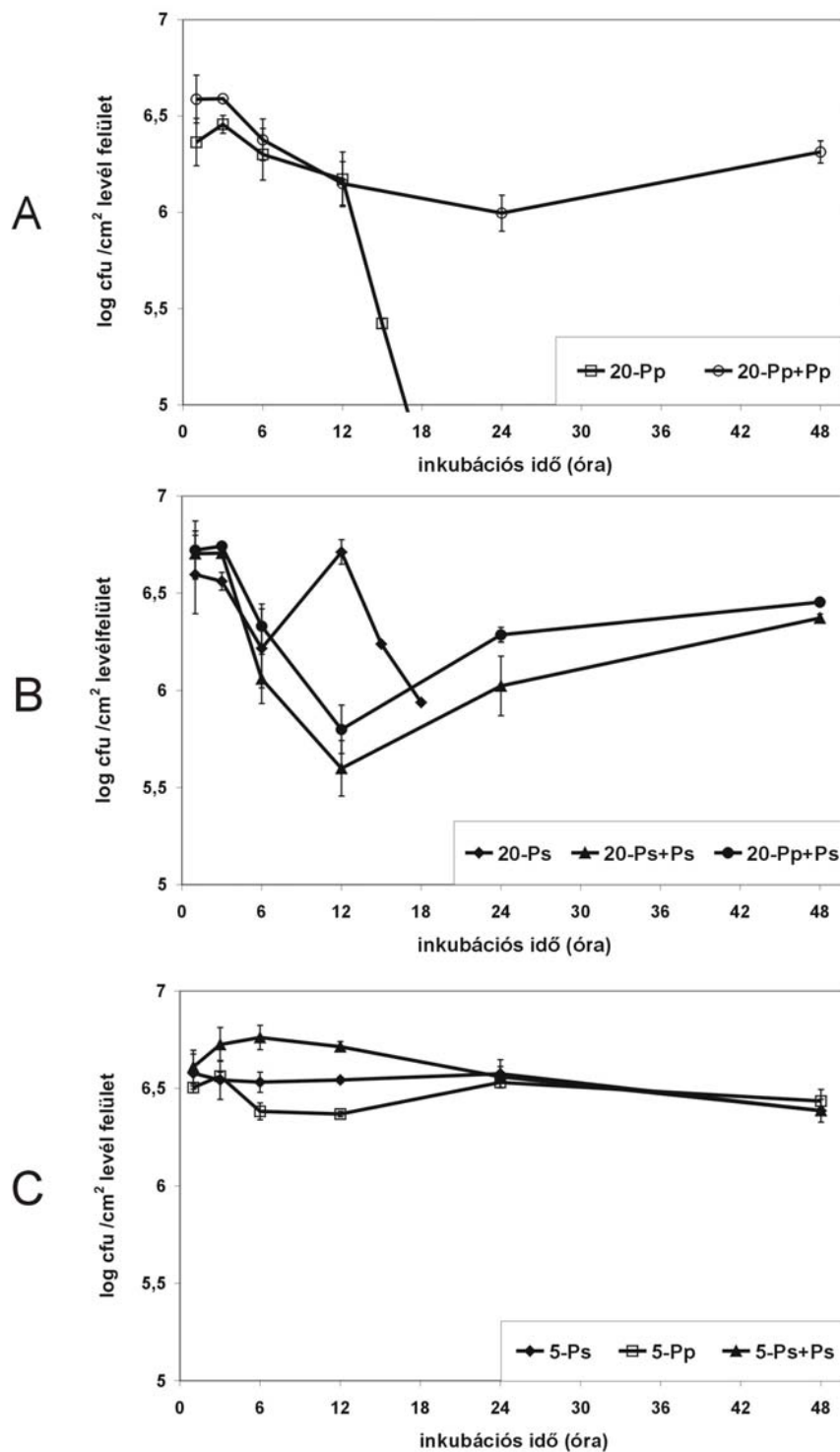
A hővel előlt baktériummal aktivált BR a HR-től függetlenül működő védekezési reakció. A BR baktériumszámot csökkentő hatása nem olyan radikális mértékű, mint amit a HR esetében tapasztaltak (Ott 2002). A BR-t hővel előlt *P. syringae* 61 vagy *P. phaseolicola* S 21 baktérium–szuszpenzióval indukáltam. A felülfertőző baktérium–szuszpenziót (élő *P. syringae* 61 vagy *P. phaseolicola* S 21) pedig az előkezelés után 15 órával injektáltam a levelek sejtközötti járataiba, mert a BR aktivitása ebben a 12–18 órás az időszakban a legerősebb (Klement et al. 2003).

A BR működésének következtében különböző mértékben ugyan, de mindkét baktérium a *P. syringae* 61 és a *P. phaseolicola* S 21 sejtszáma is csökkent a 20 °C-on inkubált dohánynövények leveleiben. Ez a baktériumszaporodást gátló hatás a *P. syringae* 61 törzssel kezelt növényeken az injektálását követő 3–12 órában volt a leghatékonyabb (8. B. ábra).

Meglepő módon a BR kevésbé befolyásolta a felülfertőző *P. phaseolicola* S 21 izolátum szaporodását, melynek koncentrációja 24 órával a felülfertőzés után a legmagasabb mért érték ötödére esett vissza (8. A. ábra). Ehhez képest a *P. syringae* 61 izolátum sejtszáma viszont már a felülfertőzést követő 12. órában a tizedére csökkent.

Az 5 °C-on inkubált növényekben a BR-t indukáló kezelés után a *P. syringae* 61 baktérium sejtszáma nem változott. A csak vízzel előkezelt dohányok levelében is mindkét izolátum koncentrációja stagnált (8. C. ábra).

Összegezve elmondható, hogy a *P. syringae* 61 sokkal érzékenyebb volt a BR-re, mint a *P. phaseolicola* S 21 törzs, mert sejtszámát a BR az összes célzott vizsgálat során erősebben – mintegy tizedére – szorította vissza. Öt °C-on az indukciót követő 2–2,5 nap alatt sem a HR, sem a BR baktériumszaporodást gátló hatása nem érvényesült. Mind a hővel előlt baktériumos, mind a vizes előkezelés után a felülfertőzött dohányleveleket nézve azonos eredményt kaptam, azaz a vizsgált baktériumok sejtszáma egyik kezelési kombinációban sem változott szignifikánsan. Ez azt jelenti, hogy a növényeknek alacsony hőmérsékleten az általam vizsgált aktív védelem, BR és HR nélkül kell szembenézniük a kórokozó és nem kórokozó baktériumok kolonizációs törekvéseivel. Az itt vizsgált kórokozók a gátlás hiányában mégsem szaporodtak a dohány szövetében. Ennek oka az alacsony inkubációs hőmérséklet éppen úgy lehet, mint az inokulum magas koncentrációja. A magas inokulum koncentráció alkalmazása azonban elengedhetetlenül szükséges a védekezési mechanizmusok baktériumsejtszám csökkentő hatásának kimutatásához. Fennáll továbbá az a lehetőség is, hogy jóllehet az ismert védekezési mechanizmusokat nem tudtuk kimutatni, valamilyen, eddig



8. Ábra. A hőmérséklet hatása a *P. syringae* 61 és a *P. phaseolicola* S21 baktériumok sejtszámára a BR és a HR működése során, illetve a védekezési reakciók hiányában

A növények inkubációs hőmérséklete (20 és 5 °C) a jelmagyarázatokban „20” vagy „5” számokkal szerepel. A dohány leveleit 4×10^8 sejt/ml töménységű hővel előlt *P. syringae* 61 (B) vagy *P. phaseolicola* S21 (A) szuszpenzióval, a kontrollnövényeket pedig vízzel kezeltem elő. Az előkezelt területeket azonos törzsek élő, 10^8 sejt/ml töménységű szuszpenziójával fertőztem felül (A, B, C). A következő kombinációkat alkalmaztam: Ps: előkezelés: víz, felülfertőzés: élő *P. syringae* 61, Pp: előkezelés: víz, felülfertőzés: élő *P. phaseolicola* S21, Ps+Ps: előkezelés: hővel előlt *P. syringae* 61, felülfertőzés: élő *P. syringae* 61, Pp+Ps: előkezelés: hővel előlt *P. phaseolicola* S21, felülfertőzés: élő *P. syringae* 61, Pp+Pp: előkezelés: hővel előlt *P. phaseolicola* S21, felülfertőzés: élő *P. phaseolicola* S21

nem azonosított védekezési és/vagy tápanyag-szolgáltatási tényező mégis inkompatibilissé (egymásnak nem megfelelővé) teszi ezeket a kórokozó–dohány modelleket. Ezért az izolátumokkal saját (egymásnak megfelelő) gazdanövényeiket is fertőztük alacsony és magas hőmérsékleten.

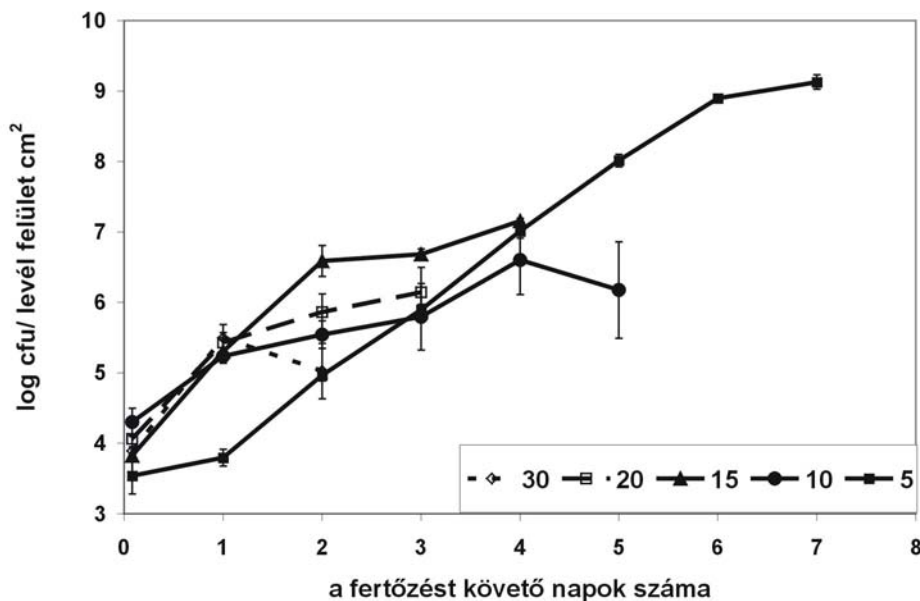
4.4. A hőmérséklet hatása a növénykórokozó baktérium és a növény – nem kórokozó baktérium kapcsolatok sajátosságaira

A külső környezet hőmérsékletének csökkenése a kórokozó baktériumok anyagcseréjét éppúgy megváltoztatja, mint a növények kondícióját. A baktériumok anyagcseréjének megváltozása miatt módosul a III. típusú szekréción rendszer (TTSS) működése és a virulencia faktorok termelése is (Smirnova et al. 2001). A TTSS szerkezetét felépítő fehérjék, és a rajta keresztül a növénysejtekbe juttatott fehérjék nélkül a kórokozó baktériumok nem képesek betegséget okozni vagy a hiperszenzitív reakciót aktiválni. A virulencia faktoroknak minősülő toxinok, pektin bontó vagy az EPS szintézisében és kiválasztásában részt vevő enzimek termelése pedig a baktériumok életképességét határozzák meg a növények sejtközötti járataiban. A baktériumok felületi molekulái (PAMP), melyek a BR elicitorai, viszont a hideg környezetbe került baktérium sejteken is fellelhetőek. Vajon hogyan alakul a kórokozó vagy a nem kórokozó baktériumok és növények kölcsönhatása, amennyiben hidegtűrő baktériumfaj jut a sejtközötti járatokba?

4.4.1. Az alacsony hőmérséklet hatása a hidegtűrő, opportunistá *P. syringae* 2214 szaporodására és a betegség kialakulására paprikanövényekben

Az opportunistá patogén *P. syringae* pv. *syringae* baktérium polivirulens, sok–gazdanövényes kórokozó. Fertőzése a lágyszárú növényeken (pl.: paprika, görögdinnye, sárgadinnye) a tenyészidőszak folyamán előforduló ciklikus hideg időszakok után okoz jelentős járványokat, melyek a termés súlyos károsodásával, elvesztésével járnak (Hevesi 1986). Fásszárú gazdanövényein (elsősorban csonthéjasok) pedig a hideg telek teremtenek kedvező körülményeket a betegség kialakulásához (Klement et al. 1984).

A *P. syringae* 2214 izolátum tenyészthető sejszámának változását 5 és 30 °C között öt eltérő hőmérsékleten vizsgáltuk meg paprika–gazdanövények leveleiben. A *P. syringae* 2214 *in planta* szaporodása 30 °C-on viszonylag gyenge, mintegy tízszeres mértékű volt. A következő



9. Ábra. Az alacsony hőmérsékleten elősegítette a *P. syringae* 2214 szaporodását paprikanövényekben

A paprikanövények leveleit a *P. syringae* 2214 izolátum 10^6 sejt/ml töménységű szuszpenzióval injekcióztuk. A fertőzött növényeket 5, 10, 15, 20 és 30 °C-os növénynevelő kamrában tartottuk. A mintavétel minden hőmérsékleten a levelek elrűgásáig tartott (kivéve 5 °C).

kísérletben a növénynevelő kamra hőmérsékletét 10 °C-al alacsonyabbra, azaz 20 °C-ra állítottam. Ekkor az opportunistá patogén baktérium sejtszáma már százszorosára nőtt a levélszövetben. Azokban a növényekben, melyeket 5–15 °C között inkubáltam, a fertőzést követő negyedik napon az 1 cm² levélfelületben kimutatható baktériumszám 10^4 -ről 10^7 -re emelkedett, azaz a kiindulási érték ezerszeresére nőtt (9. ábra). A baktériumszaporodás mértéke 5 °C-on volt a legnagyobb. Az inokulációt követő 7. napon az 1 cm² levélfelületre vetített baktériumsejtszám elérte a 10^9 -t.

Míg 5 °C-on a fertőzés után 7 nappal az egész injekciózott levélfelület elhalt, addig a többi hőmérsékleten a levelek elsárgultak és a levélerek nekrotizálódtak. Különbség csak a tünetek megjelenésének idejében volt. A hőmérséklet csökkentésével párhuzamosan a tünetek fokozatosan egy-egy nappal később jelentek meg.

Mindezek tekintetében felvetődött a kérdés, hogy kizárólag az opportunistá patogén baktériumok vagy esetleg más kevésbé hidegtűrő kórokozók, akár szaprotróf baktériumok is képesek lehetnek-e 5 °C-on elterjedni a növények szöveteiben. Továbbá fontos kérdés az is, hogy a növényi védekezések hiánya elegendő oka-e a hidegtűrő baktériumok elterjedésének.

4.4.2. Az alacsony hőmérséklet hatása egy másik hidegtűrő, opportunistá a *P. syringae* 61 szaporodására King B tápoldatban és paprikanövényekben

Bár a *P. syringae* 61 izolátum *in vitro* szaporodását egy korábbi ábrán (4. A. ábra) már ismertettem, itt a könnyebb összehasonlítás kedvéért kevesebb adattal új ábrát készítettem. A *P. syringae* 61 izolátum *in vitro* és *in planta* szaporodását 5 és 30 °C hőmérsékleten hasonlítottam össze. Ez a vizsgálat bizonyította, hogy nem kizárólag a fokozottan virulens *P. syringae* 2214 izolátum, hanem egy nem paprikára specializálódott, de ennek ellenére a növényen betegséget okozó törzs is élt a környezeti hőmérséklet adta lehetőséggel, és alacsony hőmérsékleten betegséget okozott. Ez a fokozottan virulens izolátumhoz hasonló sajátossága pedig alkalmassá tette az opportunistá kórokozónövény kapcsolat modellezésére paprikában is. A *P. syringae* 61 izolátum napjainkig számos nemzetközi közleményben több növénybaktérium kapcsolat kórokozó modellje volt, így kísérleti rendszerbe építését gyengébb virulenciája ellenére is célszerű tartottam.

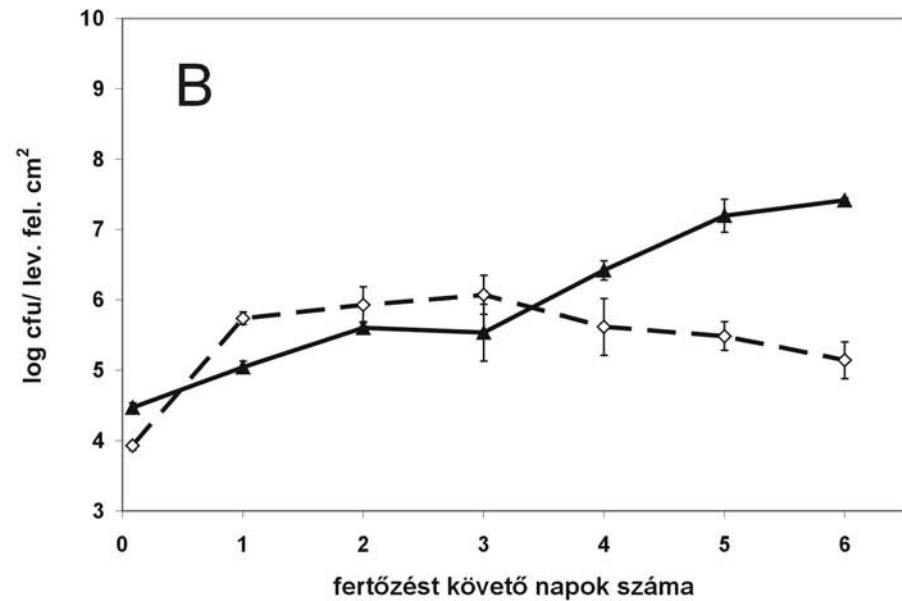
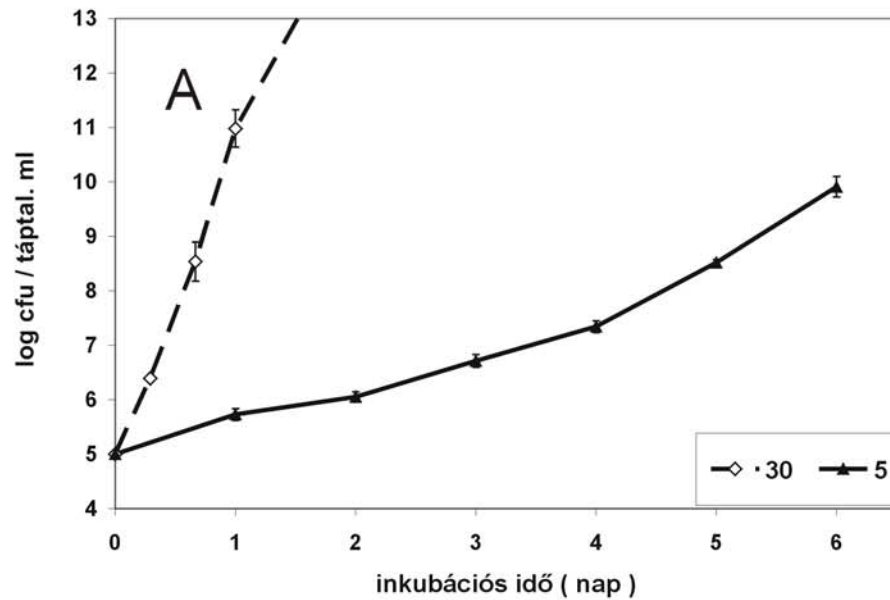
Az opportunistá patogén baktérium King B tápoldatban 30 °C-on sokkal gyorsabban szaporodott, mint 5 °C-on (10. A. ábra). *In vitro* optimális növekedési hőmérséklete 30 °C volt. Ezzel ellentétes tendenciát mutatott a kórokozó *in planta* szaporodása, mert a fertőzött paprika levelekben a hat napos kísérlet alatt a baktériumszám fokozatosan ezerszeresére emelkedett 5 °C-on (10. B. ábra). Viszont 30 °C-on a kezdeti, egy napos emelkedés után a szövetből kimutatható baktériumsejtek száma csökkent.

4.4.3. Az alacsony hőmérséklet hatása a szaprotróf *P. fluorescens* szaporodására King B tápoldatban és paprikanövényekben

Míg 5 °C-on az előzőekben ismertetett hat napos kísérlet folyamán az egységnyi levélfelületre vonatkoztatott *P. syringae* 61 sejtszáma ezerszeresére (10. B. ábra), addig a *P. fluorescens* sejtszáma csupán százszorosára emelkedett (11. B. ábra). Bár ez elég jelentős változás egy szaprotróf baktérium esetében, mégis egy nagyságrenddel kisebb volt az opportunistá patogén baktérium szaporodásánál és ez a baktérium tüneteket sem okozott a paprikanövényeken.

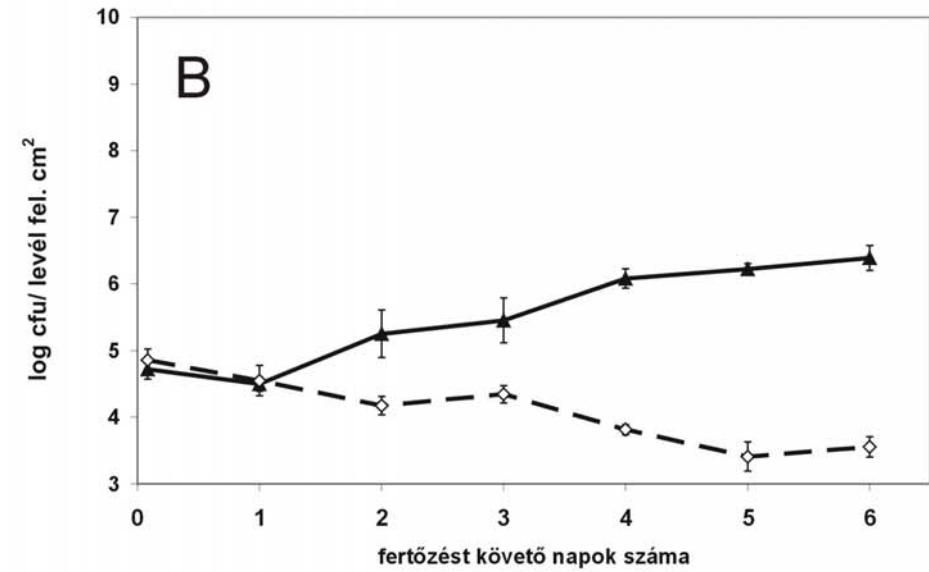
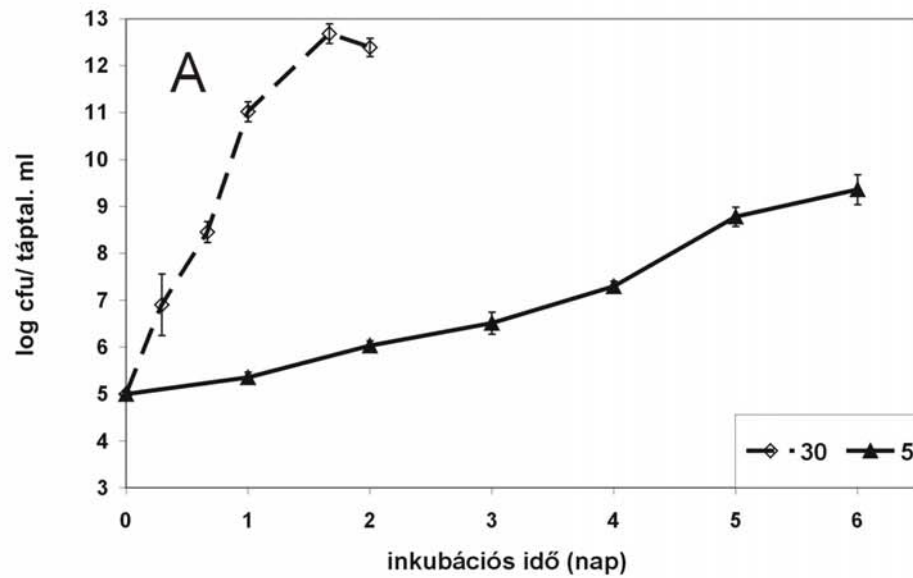
30 °C-on a *P. fluorescens* törzs sejtszáma végig folyamatosan csökkent, és a *P. syringae* 61 törzsnél tapasztalt inkompatibilis kapcsolatra jellemző, kezdeti (1-24 óra) sejtszámemelkedés is elmaradt. A két faj *in vitro* szaporodásgörbéje között gyakorlatilag nem volt különbség.

A szaprotróf baktérium aktiválja a BR-t, viszont betegséget nem okoz, és a HR kiváltására nem képes. A *P. fluorescens* baktérium *in vitro* és *in planta* szaporodásgörbéje mégis, közel



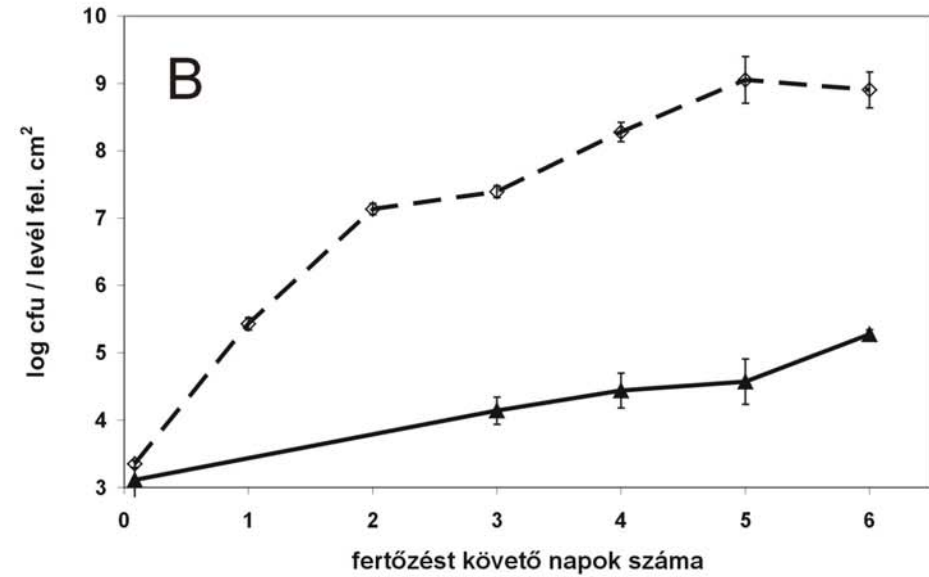
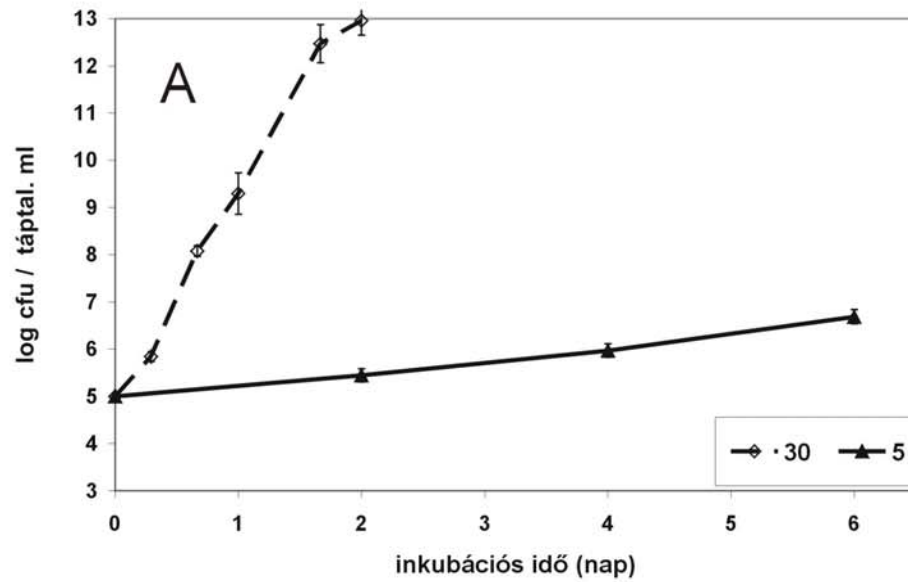
10. Ábra. Az alacsony hőmérséklet gátolta a *P. syringae* 61 *in vitro* (A) és serkentette *in planta* (B) szaporodását

A baktérium *in vitro* szaporodását King B táptalajban (A), *in planta* pedig paprikanövényekben ellenőriztem. A növények leveleit a *P. syringae* 61 10^6 sejt/ml töménységű szuszpenzióval injekcióztam (B). A fertőzött növényeket 5 és 30 °C-os növénynevelő kamrában inkubáltam.



11. Ábra. Az alacsony hőmérséklet gátolta a *P. fluorescens* *in vitro* (A) és serkentette az *in planta* (B) szaporodását

A baktérium *in vitro* szaporodását King B táptalajban (A), *in planta* pedig paprikanövényekben ellenőriztem. A növények leveleit a *P. fluorescens* 10^6 sejt/ml töménységű szuszpenzióval injekcióztam (B). A fertőzött növényeket 5 és 30 °C-os növénynevelő kamrában inkubáltam.



12. Ábra. Az alacsony hőmérséklet gátolta a *P. phaseolicola* S21 *in vitro* (A) és *in planta* (B) szaporodását

A baktérium *in vitro* szaporodását King B táptalajban (A), *in planta* pedig babnövényekben ellenőriztem. A növények leveleit a *P. phaseolicola* S21 10^6 sejt/ml töménységű szuszpenzióval injekcióztam (B). A fertőzött növényeket 5 és 30 °C-os növénynevelő kamrában inkubáltam.

azonos volt 5 és 30 °C-on is az opportunistá patogén *P. syringae* 61 szaporodásmenetével. Ez egyrészt a két baktériumtörzs hasonló mértékű hidegtűrő-képességére utal (10. és 11. ábra), másrészt alátámasztja azt az elképzelést, hogy a tesztnövények 5 °C-on nem védekeztek a sejt közötti járataikba injektált baktériumsejtekkel szemben. A növények védtelen helyzetét az opportunistá patogén baktérium viszont sokkal inkább a saját hasznára fordította, mint a szaprotróf.

4.4.4. Az alacsony hőmérséklet hatása a „valódi” patogén *P. phaseolicola* S 21 szaporodására King B tápoldatban és babnövényekben

„Valódi” patogénnek, azaz kompatibilis kórokozónak tartjuk a *P. phaseolicola* S 21 növénykórokozó baktériumot, mert ismert gazdanövényköre szűk, továbbá a jó kondícióban lévő bab- és szójanövényeken éppen úgy megtelepszik, mint a kedvezőtlen körülmények között élőkön.

In vitro és *in planta* szaporodásához, valamint a kórokozó-képessége kiteljesítéséhez a 30 °C-os hőmérséklet sokkal kedvezőbb volt, mint az 5 °C. Ebben a kórokozó-növény kölcsönhatásban az 5 °C mindkét résztvevő, mind a növény, mind a baktérium számára kedvezőtlennek bizonyult. A *P. phaseolicola* S 21 sejtszáma 5 °C-on *in vitro* nem emelkedett, és betegség sem alakult ki a növények fertőzését követően.

A „valódi” patogén *P. phaseolicola* S 21 sikerét a specifikus kórokozó-képességének köszönheti. A hideg, 5 °C körüli hőmérséklethez lassan alkalmazkodott, ezért a babnövényeken csak rendkívül lassan szaporodott. Azonos korú növényben 30 °C-on gyorsan – 4–5 nap alatt elterjedt – és a betegség tünetei is megjelentek, tehát a növény védekező-mechanizmusai vagy nem aktiválódtak, vagy a *P. phaseolicola* S 21 visszaszorította azokat (13. táblázat).

Ezek a tények megengedik azt a következtetést, hogy bár a *P. fluorescens* nem kórokozó, a *P. syringae* 61 pedig kórokozó baktérium, mégis túlélési stratégiájuk tekintetében hasonlóak (13. táblázat). Mind a hasonlóságokat, mind a különbségeket kiemeli a szaprotrófok és az opportunisták között az a kísérlet, melynek során a *P. fluorescens* sejtekbe *hrp* géncsoportot és bizonyos ShcA chaperont hordozó plazmidot transzformáltak és fejeztettek ki. Így az addig szaprotróf életmódú baktérium gyenge HR-t okozott dohányon (van Dijk et al. 2002).

13. Táblázat. A hőmérséklet hatása a kórokozó és a szaprotróf modell baktériumok *in planta* szaporodására saját gazdanövényeik levelében.

Hőmérséklet	Baktériumszaporodás minősége	
	<u>Alacsony</u> (5 °C)	<u>Magas</u> (30 °C)
„valódi” patogén. <i>P. phaseolicola</i> S21	$2,7 \times 10^5$ gátolt	10^9 nem gátolt
opportunista <i>P. syringae</i> 61	$4,1 \times 10^7$ nem gátolt	$1,4 \times 10^5$ gátolt
szaprotróf <i>P. fluorescens</i>	$3,8 \times 10^6$ nem gátolt	5×10^3 gátolt

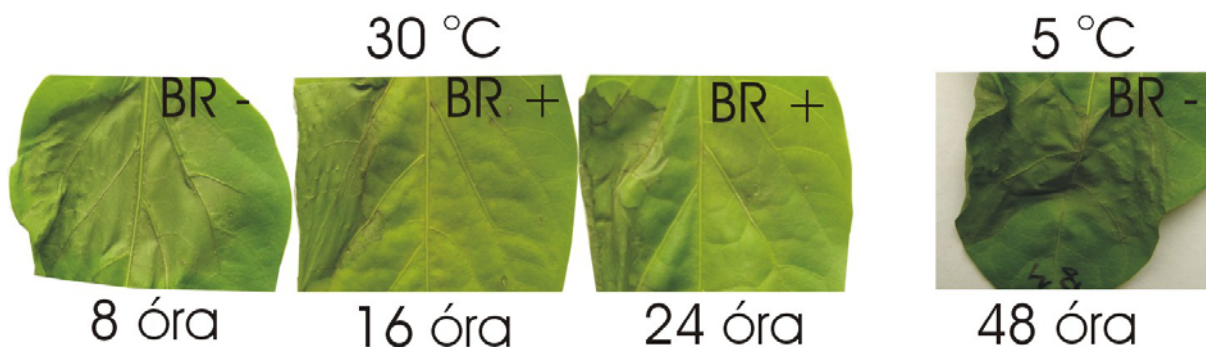
A táblázat megfelelő soraiban az adott baktériumok sejtszáma szerepel. Az értékeket a növények fertőzése után 6 nappal mértük.

4.4.5. A BR kialakulási ideje és a HR-típusú nekrozis megjelenése 5 és 30 °C-on paprikanövényeken

A paprikában éppen úgy működnek a baktériumok által kiváltott növényi védekezési válaszok, mint dohányban. A 'Hosszú Táltos' fajtán az injektálást követő 18–24 órában több „valódi” patogén *Pseudomonas*-faj szuszpenziója (5×10^7 – 10^8 sejt/ml) okozott HR-t 30 °C-on. Többek között így viselkedett a *P. phaseolicola* S 21, a *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*P. pisi*) és a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* NCAIM B.016001 (*P. tabaci*). Ha a leveleket *P. syringae* 61 vagy 2214 törzsek szuszpenziójával infiltráltam, a szövetelhalás korábban, az injektálást követően 10–12 óra elteltével jelent meg. Paprikanövényekben a BR kialakulásához az előkezelés és a felülfertőzés között 14–16 óra szükséges 30 °C-on (13. ábra). Az előkezeléssel (hővel előlt vagy szaprotróf baktérium szuszpenziója) aktivált BR ezeket az opportunistáknak által okozott szövetelhalásokat esetenként csak az előkezelést követő 24 óra elmúltával akadályozta meg, később, mint a „valódi” patogének által okozott HR-t. Amennyiben az opportunisták kórokozó–paprika kapcsolatát inkompatibilisnek tekintjük, az előkezelés és az első HR-gátlást mutató felülfertőzés időpontjának növekedését okozhatta az általunk vizsgált opportunisták rövid HR-indukciós ideje. A *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolátumok 10^7 sejt/ml szuszpenziója is nekrozist okozott, ami szintén alátámasztja ezt a feltételezést. Ugyanakkor a kompatibilis kapcsolat sajátosságait figyelembe kell venni. A késői általános védekezés (LBR) ugyanis

dohányon a fertőzést követő 24–48 óra múlva lép működésbe és képes a kompatibilis kórokozó hosszú távú gátlására (Burgyán és Klement 1979, Lovrekovich és Farkas 1965). Az opportunisták levélbe juttatása következtében létrejött elhalások bár alacsony sűrűségű baktérium–szuszpenzió is indukálta és gyorsan megjelentek nem tekinthetők teljes biztonsággal sem HR-nek, sem a kompatibilis kapcsolat során kialakuló normoszenzitív nekrozisnak. Erre a felvetésre a paprika rezisztenciafolyamatai során zajló molekuláris változások adhatják meg a választ.

A két modellnövény, a dohány és a paprika nemcsak rendszertani szempontból hasonló, hanem hőmérséklet igényük is megegyezik. Ezeknek ismeretében nem meglepő, hogy a két növényben aktivált BR és HR kialakulása hasonló mértékben függött a hőmérséklettől. Így a dohányhoz hasonlóan az indukáló kezeléseket követő 72 óra alatt 5 °C-on sem az általános, sem a hiperszenzitív védekezés nem alakult ki.



13. Ábra. A BR kialakulásának kimutatása 30 és 5 °C-on paprikanövényeken

A levelek jobb felét szaprotróf baktérium (*P. fluorescens*) szuszpenziójával (10^8 sejt/ml) bal felét vízzel injektáltuk. A levél mindkét felét az első injektálás után 8, 16, 24, 48 órával élő, HR-t okozó baktérium (*P. syringae* pv. *pusi*) szuszpenziójával (5×10^7 sejt/ml) fertőztem felül.

4.5. Baktériumfertőzés hatására bekövetkező mennyiségi és minőségi változások a paprika apoplasztjának fehérje–összetételében

A baktériumok a növényi sejtekkel határolt, légcserét szolgáló sejtközöti járatokban élnek. A sejtközöti tér rövidtávon megfelelő mennyiségű tápanyagot és vizet biztosít a baktériumsejtek életben maradásához (Anderson 1982). A sejtközöti járatokba bejutott, illetve bejuttatott baktériumsejtek kórfolyamathoz kapcsolható, ún. PR fehérjék termelését váltják ki a növényekben.

A hővel előlt, az élő szaprotróf vagy a kórokozó baktériumsejtek patogenitásukban sérült mutánsai a BR, az inkompatibilis kórokozók pedig a BR és a HR folyamatait párhuzamosan, egymás mellett, indítják el. Ezek a védekezési mechanizmusok azonban nem egy időpontban lesznek hatékonyak, működőképeseek.

A paprikalevelek sejtközötti teréből izolált vízben oldható fehérjék (IWF) extracelluláris elhelyezkedésűek, tehát közvetlen kapcsolatban álltak a BR-t és, vagy a HR-t indukáló baktériumsejtekkel. A növény védekezése során az IWF összetétele, a benne oldott fehérjék egymáshoz viszonyított aránya is megváltozik. Új fehérjék jelennek meg, egyes fehérjékből több, másokból kevesebb termelődik (Lee és Hwang 1996). A sejtközötti téréből izolált IWF természetesen minőségileg és mennyiségileg is kevesebb fehérjét tartalmaz, mint egy teljes levélkivonat. Ezért az IWF PAGE elválasztása – az intracelluláris növényi fehérjétől elkülönítve – lehetővé tette a finomabb változások kimutatását a fehérjemintázatokban.

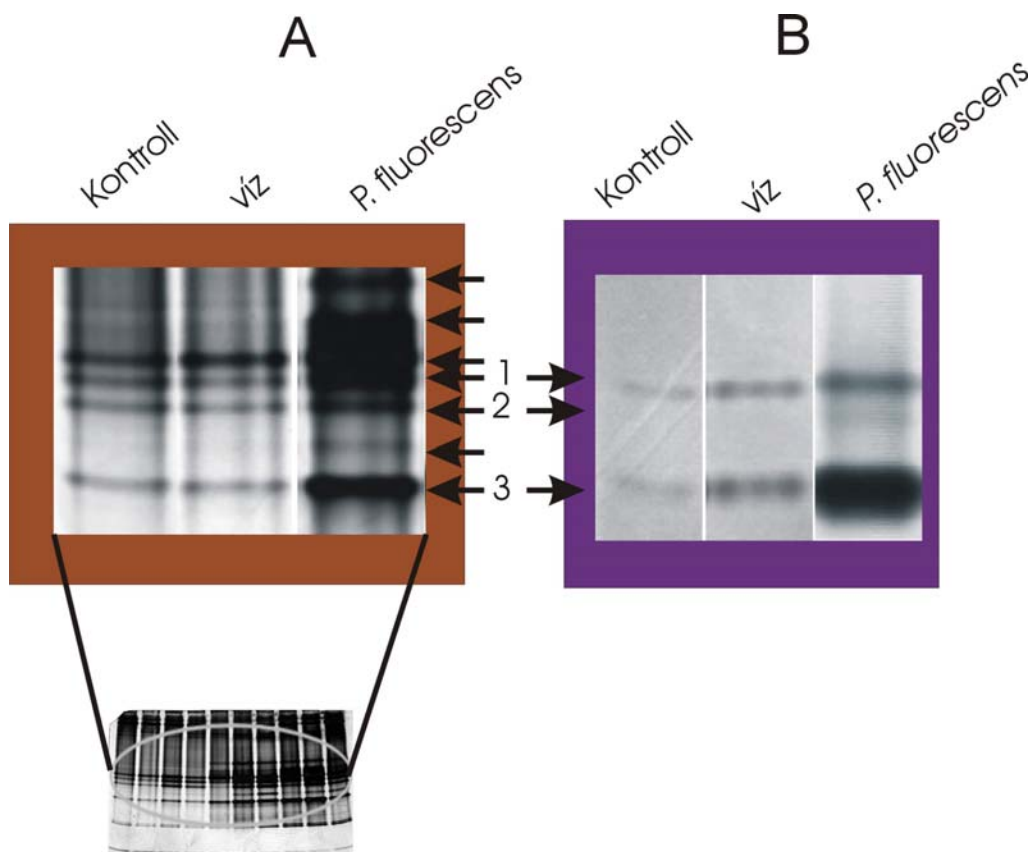
Célom az általános rezisztencia során megjelenő indukált paprika fehérjék kimutatása, az indukció specifikusságának meghatározása volt. A BR működésével összhangban indukálódó fehérjéket a későbbiekben akkor alkalmazhatjuk a védekezést jelző molekulaként (marker), ha sebzésre, illetve különféle abiotikus stressztényezőkre nem, vagy a BR működésével, mint pozitív kontrollal, összevetve alacsonyabb szinten termelődnek.

A BR-markerek azonosításával, lehetséges szerepének meghatározásával a védekezés módja, molekuláris részletei és működésének korlátai is megismerhetők. A fertőzött levelekből nyert IWF fehérjemintázata megerősítheti a feltevést, hogy adott körülmények között a paprikanövények és az opportunistá *P. syringae* izolátumok kapcsolata inkompatibilis. A növények fehérjeszintézisét általánosan gátló hősook- és cikloheximid-kezelések mellett, a tesztnövények szempontjából alacsony hőmérséklet is a lehetséges általános rezisztenciát gátló tényezők között van. Ugyanakkor a paprika fejlettségi állapotának megfelelő optimális hőmérsékletnél alacsonyabb hőmérséklet nem gátolta sem a szaprotróf, sem a két vizsgált opportunistá patogén *P. syringae* izolátum intenzív szaporodását a fertőzött levelekben.

4.5.1. Hővel előlt vagy élő kórokozó, illetve szaprotróf baktériumok által indukált extracelluláris fehérjemintázat-változások (natív körülmények)

A paprikanövényeken a BR-t szaprotróf (*P. fluorescens*) vagy hővel előlt kórokozó (*P. syringae* 61) baktérium-szuszpenzióval, a HR-t *P. phaseolicola* S21, *P. tabaci*, *P. pisi* baktériumokkal indukáltam. Az opportunistá kórokozó a *P. syringae* 61 izolátum volt, a kompatibilis kapcsolatot pedig *X. vesicatoria* 72 izolátummal modelleztem. A hővel előlt *P.*

syringae 61 törzset 4×10^8 sejt/ml, az élő kórokozókat 10^6 sejt/ml koncentrációban injektáltam. Az alacsony sűrűségű (10^6 sejt/ml) baktérium-szuszpenzió használatát az indokolta, hogy így a molekuláris vizsgálatokkal párhuzamosan a baktériumok *in planta* szaporodását is követhetem (10. B. és 11. B. ábra). Novacky (1973) kimutatta, hogy az élő *P. pisi* alacsony (5×10^5 sejt/ml) koncentrációban gátolta a későbbi felülfertőzés (5×10^5 sejt/ml) által okozott HR kialakulását. Ezt a módszert a saját kísérleti modellhez igazítva azt tapasztaltam, hogy a korábbi kísérleteimnél alacsonyabb, 10^6 sejt/ml koncentrációjú *P. fluorescens* szaprotróf baktérium szuszpenziója, amely nem okoz szövetnekrózist, az előkezelés után 16 órával részlegesen, 24 óra elmúltával teljesen meggátolta a *P. pisi* (5×10^7 sejt/ml) által okozott HR-t. Tehát alacsony koncentrációjú baktérium-szuszpenzió is elegendő lehet a BR szöveti szintű tanulmányozásához.



14. Ábra. A baktériumkezelés hatása az egyes fehérjék mennyiségére a paprika IWF-ben

Az IWF-mintákat $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubált növények leveleiből a kezelés, illetve a fertőzés után 48 órával izoláltam. A paprikaleveleket *P. fluorescens* baktérium 10^6 sejt/ml sűrűségű szuszpenziójával injektóztam. Az elválasztás után a géleket ezüst-nitráttal (A) festettem, a baktériumkezelés hatására erősödő fehérjecsíkokat nyilakkal jelöltem. A kitináz-aktivitású fehérjék helyét a fluoreszkáló gél sötét udvarai mutatják (B). A kitináz-aktivitású fehérjék helyét mindkét gélen számokkal jelöltem (1-3).

A kezeletlen mintákhoz viszonyítva az élő és hővel elölt baktériumok szuszpenziójával kezelt paprikalevelekből nyert IWF mintákban azonos változásokat tapasztaltunk. A 14. ábrán nyilakkal jelöltem azokat a csíkokat, ahol a kezelés hatására a fehérje mennyisége emelkedett. Ha a paprikanövényeket kompatibilis kórokozóval (*X. vesicatoria*) injektáltuk, az elválasztott IWF-ben akkor is ugyanaz a hét sáv festődött erősebben. A baktérium–szuszpenziók kontrolljaként alkalmazott vízkezelés a baktériumok indukáló hatásához képest elhanyagolhatónak bizonyult.

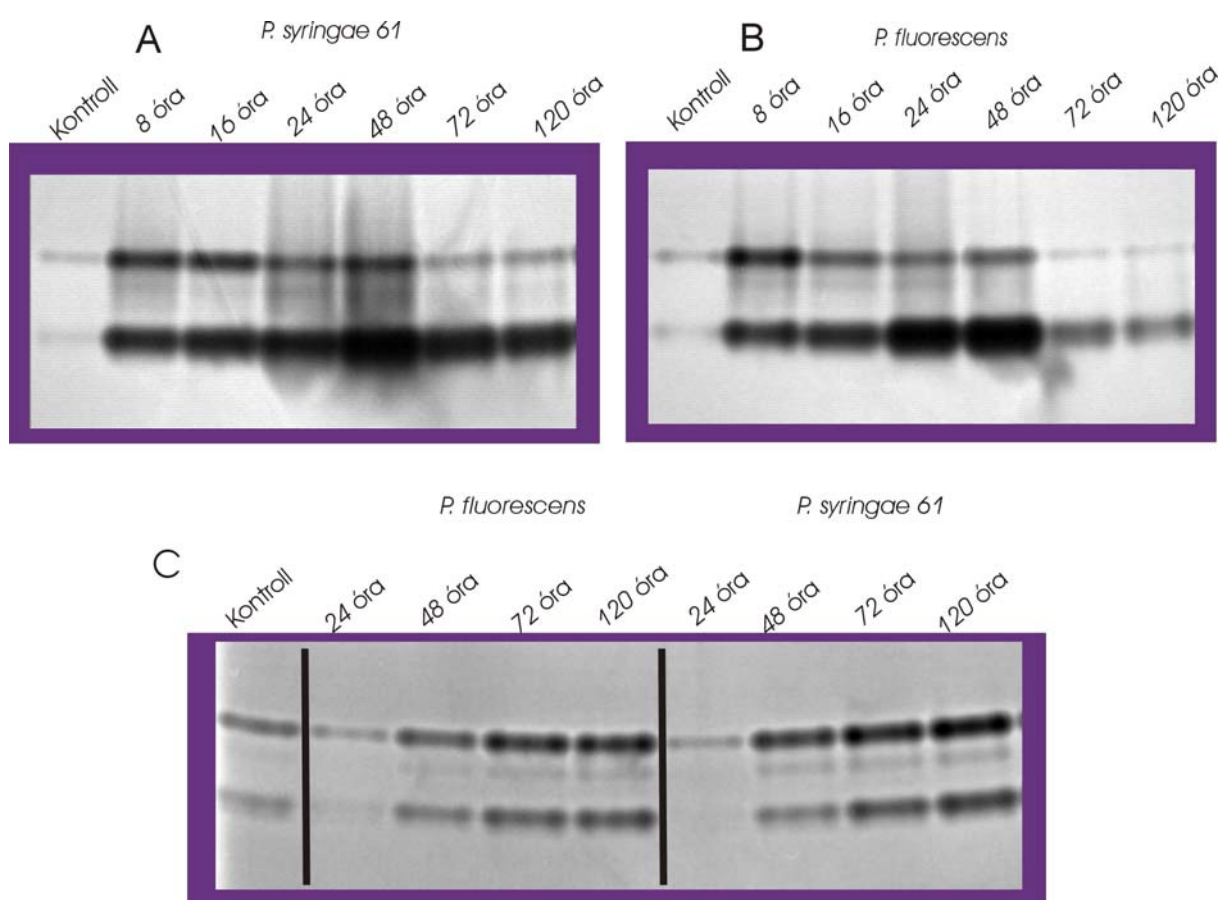
Az IWF natív PAGE–elválasztása után az ezüst-nitráttal festett géleken tehát nem azonosítottam új, indukált, speciálisan a BR működéséhez kapcsolható fehérjét(ek). Így figyelmem két, elektroforézist követően az aktivitásuk alapján gélben is kimutatható enzimescsoport, a kitinázok és a peroxidázok felé fordult. Több korábbi kutatási eredmény alapján összpontosítottunk e két csoportra. Varga G.J. (Doktori értekezés 2006) és Ott et al. (2006) kitináz–aktivitású BR–markereket azonosított dohány IWF-ből. Lee és Hwang (1996) és Hong et al. (2000) közleményeiben foglalkozott az IWF-ben és a teljes paprikaszövet nyers kivonataiban kimutatható kompatibilis és inkompatibilis baktériumok, abiotikus stresszek és biológiailag aktív molekulák által indukált kitinázokkal. Másrészt Bozsó et al. (2002 és 2005a) *P. fluorescens*-t és más nem patogén baktériumokat injekciózott dohánylevélbe, majd az injektálás után a dohánylevélben kimutatott indukált peroxidáz izoenzimek és a *tpoxNI* gén növekvő transzkripciójáról bizonyította be, hogy a BR markerei. Koreai kutatók különféle, többé–kevésbé ismert funkciójú kórfolyamatokkal kapcsolatos peroxidáz géneket paprikában is azonosítottak (Do et al. 2003).

4.5.1.1. A kórokozó, illetve szaprotróf baktériumok által indukált eltérő mértékű kitinázaktivitás natív megjelenése poliakrilamid gélben

A 14. ábrán nyilakkal jelölt hét csík közül háromban kitináz–aktivitású fehérjék is voltak. A 2. sáv megjelenése nem állítható egyértelműen párhuzamba a BR vagy a HR kialakulásával, mert esetenként kompatibilis baktérium fertőzése után is megjelent (nincs ábrázolva). Ezenfelül alacsony hőmérsékleten, ahol a fenti védekezéseket nem tudtam kimutatni, a 2. sávban erősebb kitinbontó aktivitást mutattam ki, mint 30 °C-on (15. A., B. ábra).

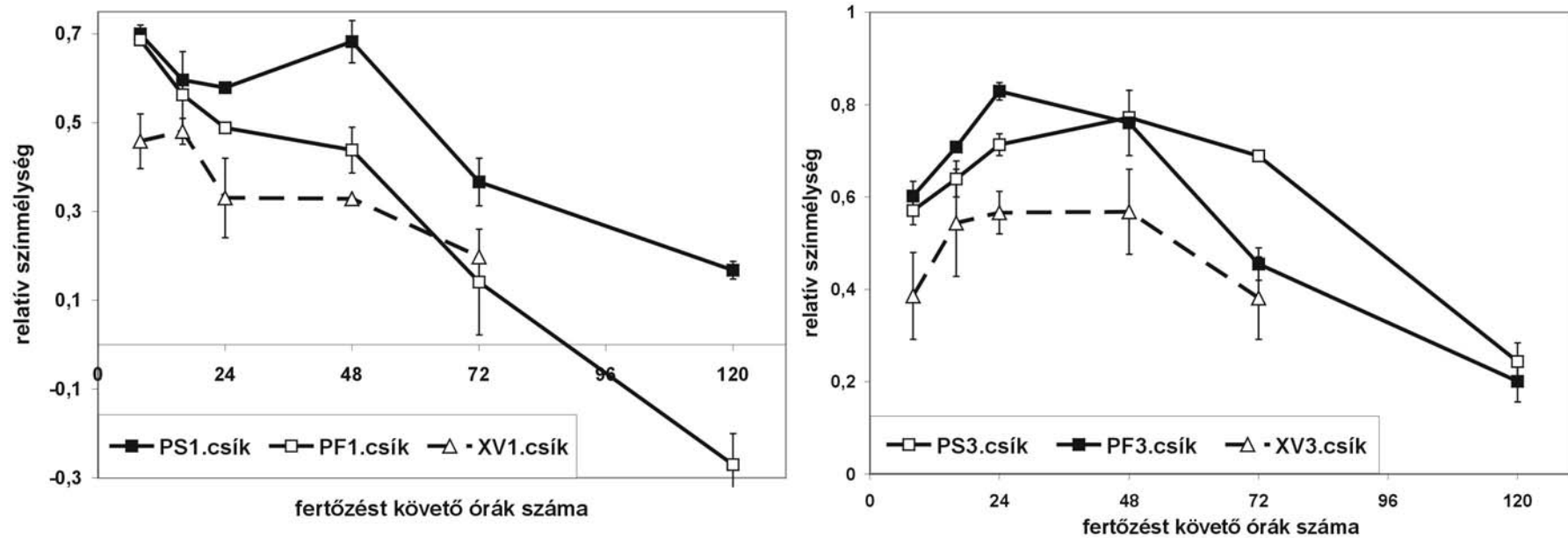
Az 1. és a 3. sávot valamennyi IWF mintában, a kezeletlen paprikalevelekből éppen úgy kimutattuk, mint a baktérium–fertőzések hatására. De a különböző „életstílusú” baktériumok különböző mértékben növelték meg az 1. és 3. sáv kitináz–aktivitását. A mesterséges fertőzést követő 8–120 óra között 5 illetve 6 időpontban hasonlítottuk össze az 1. és 3. sávban a

kitinázaktivitás mértékét (15 A., B. ábra). A fotókon rögzített 1. és 3. sávokra vonatkozó eredményeket denzitometriás méréssel is megerősítettem (16. ábra). A fertőzést követő 8–48 órában a *P. syringae* 61 váltotta ki a legnagyobb mértékű kitinázaktivitás-változást (15. B. és 16. ábra). Sorrendben másodikként a *P. fluorescens* (15. A. és 16. ábra), majd a kompatibilis *X. vesicatoria* (16. ábra) követte. A kitinázok nyomán az aktivitásgéleken sötét foltok keletkeztek. Ezek denzitometriás kimutatása alapján a *P. syringae* 61 és a *P. fluorescens* fertőzés kitinázaktivitást növelő hatása azonos mértékű volt. A fertőzést követő 72, illetve 120 órában viszont a *P. fluorescens* hatása megszűnt, a kitinázaktivitás a kezeléseket követően három nappal



15. Ábra. A kórokozó és szaprotróf baktériumok hatása a paprika IWF-ben termelődött kitinázok mennyiségére

A paprikaleveleket 10^6 sejt/ml sűrűségű baktérium-szuszpenziókkal injekcióztam. Az IWF mintákat 30 (A, B) vagy 5 °C -on (C) inkubált növények leveleiből a kezelés, illetve a fertőzés után több időpontban izoláltam. A kontroll IWF-et a fertőzést követő 3. nap vettem. A minták elválasztása után meghatároztam a kitináz-aktivitású fehérjék helyzetét.



16. Ábra. A kórokozó és szaprotróf baktériumok hatása a paprika IWF-ben termelődött kitinázok mennyiségére

A kitinázaktivitás relatív erősségét (színmélység) a fluoreszkáló gélben, denzitométer segítségével határoztam meg. Az egyes gélek közötti különbség kimutatására minden géltre ugyanazt az erős pozitív kontrollmintát (standard) vittem fel. Az ábrán feltüntetett értékek, azaz a relatív színmélység (RS), a pozitív standard (S) és a kezeletlen kontrollhoz (K) viszonyított értékek. Azaz $RS = \frac{M}{S} - \frac{K}{S}$, ahol az M a mért értékeket jelenti és a standard értékét önkényesen '1'-nek tekintettem.

izolált kontroll értéke alá esett. A *X. vesicatoria*, a 72 órás minta kivételével, minden mintavételi időpontban a vízkezeléshez viszonyítva magasabb, de a BR (*P. fluorescens*) vagy a HR (*P. syringae* 61) hatásánál alacsonyabb kitinázaktivitás–emelkedést okozott (16. ábra). Ezen eredmények alapján lehetséges, hogy a vizsgált kitinázok csoportjában van(nak) olyan enzimek, melyek a BR folyamatával kapcsolatba hozhatók, de kompatibilis kapcsolatban nem, vagy gyengén termelődnek.

4.5.1.2. A kórokozó, illetve szaprotróf baktériumok által indukált új peroxidáz– izoenzimek natív megjelenése poliakrilamid gélben

A peroxidáz–enzimek aktivitásának változása, esetleg új izoenzimek megjelenése a fehérjék elektroforézise után a gélben kimutatható. A szelektív festéshez diamino-benzidint (DAB) használtam, amely a gélben lévő elválasztott peroxidázok és a hozzáadott H₂O₂ jelenlétében barna polimert képez (Nadolny és Sequeira 1980).

A paprika–IWF-ben maximum 8–10, egyrészt konstitutív, másrészt baktériumok által indukált peroxidáz–aktivitású izoenzimsávot lehetett kimutatni (17. ábra).

A *P. fluorescens* szuszpenzióval aktivált BR működése három új peroxidáz–izoenzim megjelenésével párosult. Az új peroxidázok relatív vándorlási távolsága alacsony, a 10–20 % töménységű gradiens–gél legfelső régiójában található. Először a fertőzés után 16–24 órával tűntek fel, aktivitásuk 5 nap elteltével csökkent (ábra nem mutatja). Az új izoenzimek akkor is megjelentek, ha növényeket *P. syringae* 61 vagy *P. tabaci* szuszpenzióval fertőztük. A kompatibilis kórokozó (*X. vesicatoria*) fertőzése után 16 órával gyengén mutathatók ki, viszont a 24 órás IWF–mintából már teljesen eltűntek (17. ábra).

Egy negyedik peroxidáz–izoenzim azzal a tulajdonságával hívta fel magára a figyelmet, hogy a kórokozó baktériumok hatására represszálódott, azaz sem kompatibilis, sem inkompatibilis kölcsönhatás során nem lehetett kimutatni. Hasonló körülmények között gátlódó izoenzimet Bozsó (2000) is megfigyelt kórokozó baktériummal fertőzött dohányból izolált IWF-ben.

Új peroxidáz izoenzimek termelődése vagy fokozott működése eredményezheti a H₂O₂–szint csökkenését és emelkedését is a sejtközötti járatokban. Éppen ezért egy izoenzimgátlásnak is kettős hatása lehet (Bolwell és Wojatszek 1997).

4.5.1.3. Az alacsony hőmérséklet hatása az IWF natív PAGE–elválasztása után kimutatott izoenzimintázat megváltozására

A növények hirtelen, a korábbi nevelési körülményekhez képest alacsony (5 °C) hőmérsékletre helyezése gátolta a BR és a HR kialakulását. Ez a gátlás jól kifejeződött az izolált IWF–mintázatokban is. Az alacsony hőmérsékleten tartott növényekben a kitinázaktivitás növekedése, valamint az új peroxidáz–izoenzimek megjelenése csak napokkal későbbre tehető, vagy meg sem történt (15. C. ábra, 17. B. ábra).

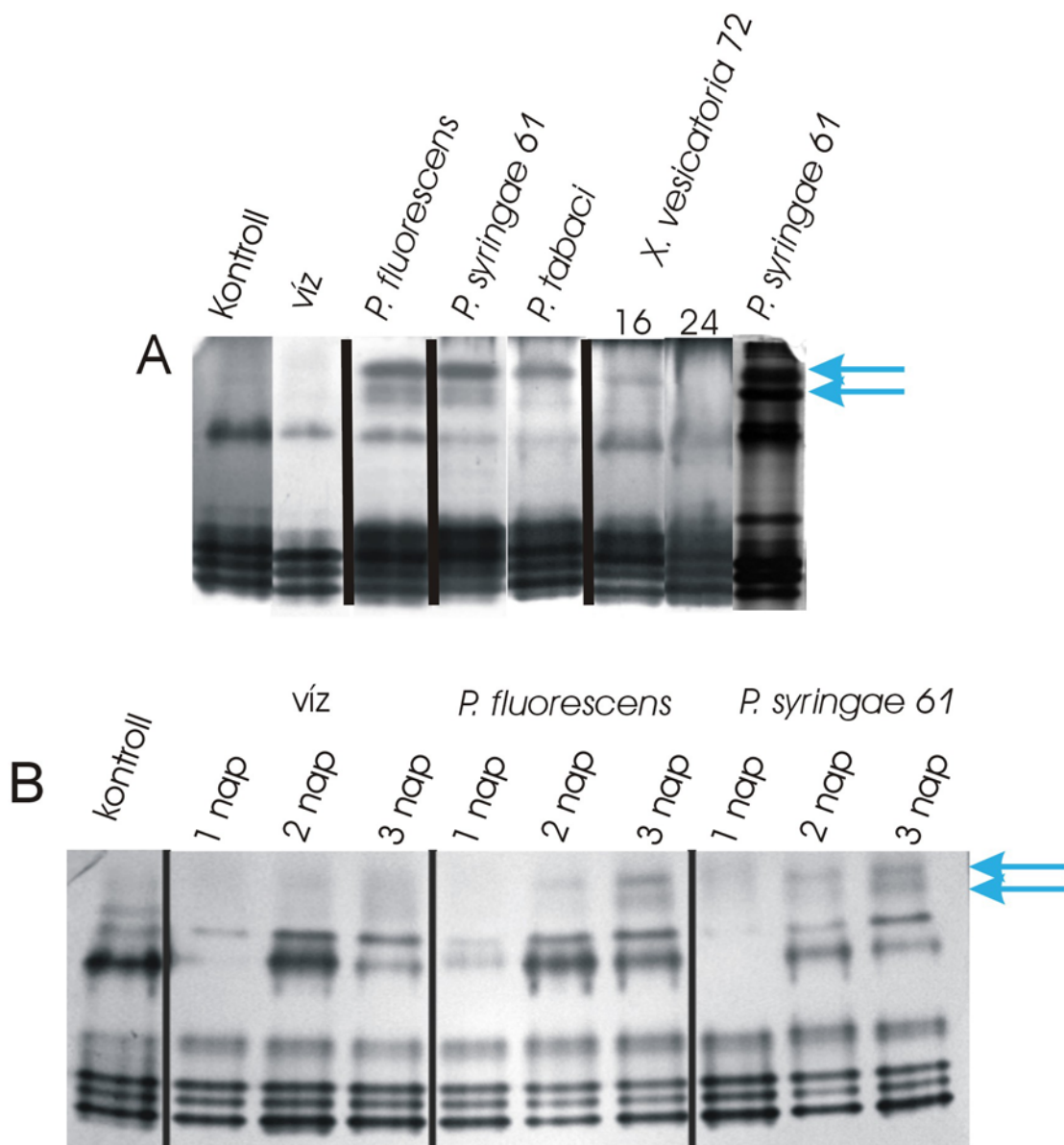
A kitinázaktivitás az 1. és 3. sávokban mind a *P. fluorescens*, mind a *P. syringae* 61 injektálása után 5 nappal érte el azt a szintet, amelyet 30 °C-on már 8 óra után kimutattunk (15. ábra). Az 5 °C-on inkubált növényekben a három peroxidáz izoenzim közül kettő (BR–markerek) a *P. fluorescens* és a *P. syringae* 61 fertőzés után két nappal gyengén megjelent, három nap elteltével pedig még intenzívebben festődtek meg. A harmadik BR–markerként azonosított izoenzim alacsony hőmérsékleten csupán elmosódottan látszott. A képet tovább árnyalta, hogy legerősebben a kezeletlen kontrollban festődött meg, tehát termelését önmagában az 5 °C-os hőmérséklet is aktiválta. (17. ábra).

4.5.2. Baktériumos kezeléseket követő extracelluláris változások (denaturáló PAGE)

Az IWF-ben oldott fehérjéket denaturált állapotban is elválasztottam. A fehérjék ilyen típusú elválasztása alkalmas a natív körülmények között vizsgált, a paprika védekező–rendszeréhez kapcsolható kitináz– és peroxidáz–izoenzimek méretének meghatározására. Másrészt a hozzáadott SDS negatív töltésűvé teszi a minták fehérjéit, így nem csak savas, hanem bázikus molekulák is bejutnak a gél szerkezetébe, majd elválasztódnak. Így nagyobb esélyt láttam arra, hogy specifikus BR–markereket azonosítsak.

4.5.2.1. Hővel elölt vagy élő kórokozó, illetve szaprotróf baktériumok hatására kialakult fehérjemintázat–változás

Éppen úgy, mint a natív PAGE-t megelőzően, a BR-t szaprotróf (*P. fluorescens*) vagy hővel elölt kórokozó (*P. syringae* 61) baktérium–szuszpenziójával, a HR-t, *P. tabaci* vagy *P. pisi* baktériumokkal indukáltam a paprikalevelekben. Az opportunistá kórokozó a *P. syringae* 61



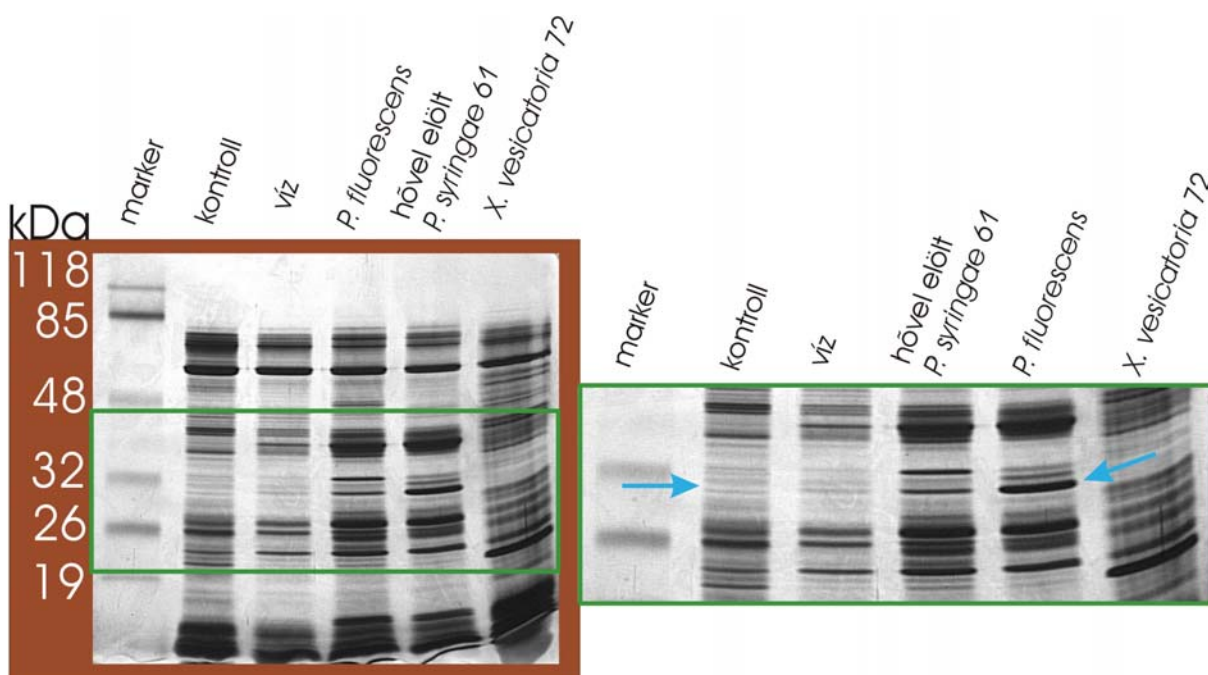
17. Ábra. A kórokozó és szaprotróf baktériumok által indukált új peroxidáz izoenzimek a paprika IWF-ben

A nyilak a markerek helyét jelölik, a felső egy csíkot, az alsó kettőt. Az IWF-mintákat 30 (A) vagy 5 °C-on (B) inkubált növények leveleiből a kezelés, illetve a fertőzés után 16 és/vagy 24 órával (A), illetve 1-3 nappal (B) izoláltam. A *X. vesicatoria* szuszpenzióval injekciózott növényekből a 16 óras IWF mintát is szerepeltettem (A). A peroxidáz-izoenzimeket az elektroforézis után DAB és H₂O₂ hozzáadásával hívtam elő. Az A. ábra két pályáján a *P. syringae* 61 kezelés azonos IWF minta, melyet diamino-benzidinnel (DAB) (bal) vagy ezüsttel (jobb) festettem. A kontroll-mintákat a fertőzést követő 3. nap izoláltam (A, B). A paprikaleveleket 10⁶ sejt/ml sűrűségű baktérium-suszpenzióval injekcióztam.

izolátum volt, a kompatibilis kapcsolatot pedig a *X. vesicatoria* 72 izolátummal modelleztem. A hővel elölt *P. syringae* 61 törzset 4×10⁸ sejt/ml koncentrációban injektáltam, az élő kórokozók koncentrációját 10⁸ sejt/ml-re emeltem. A töményebb baktérium-suszpenzió

alkalmazásától erősebb, ezáltal könnyebben kimutatható növényi választ vártam, mivel Hevesi (1981) és Ott (2002) kimutatta, hogy a BR kialakulása, vagyis a HR-gátlás erőssége és gyorsasága éppúgy függ az aktiváló, mint a detektáló baktérium-szuszpenzió töménységétől.

A kezeletlen mintákhoz viszonyítva az élő és a hővel elölt baktériumok szuszpenziójával aktivált BR során egy 30 kDa nagyságú indukált fehérjét azonosítottam (18. ábra). A kísérletek során alkalmazott az élő, inkompatibilis kórokozók (*P. tabaci* vagy *P. pisi*), továbbá az opportunista kórokozó is indukálta a 30 kDa fehérje termelését. A kezeletlen növényből izolált IWF-ben ez a molekula nem mutatható ki, a kompatibilis *X. vesicatoria* a vízkezeléshez hasonlóan gyengén aktiválta ezt a fehérjét. A 30 kDa nagyságú fehérje megjelenése az IWF-mintában megfelelően összhangban volt a BR működésével, tehát a védekezés jelző molekulája, markere.



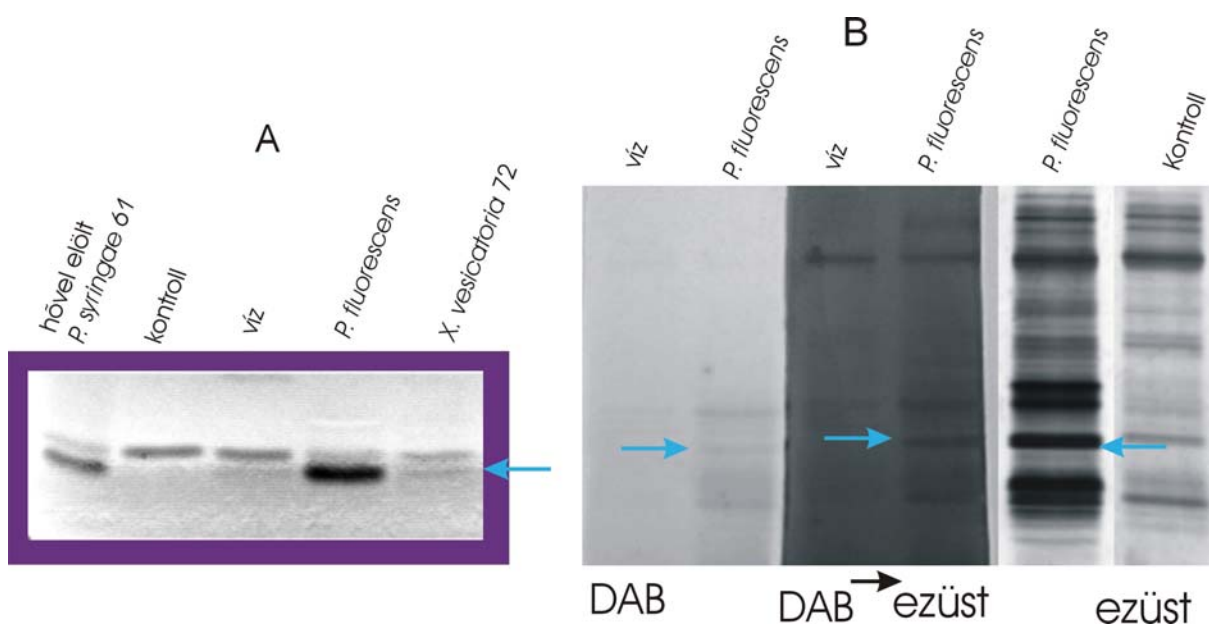
18. Ábra. A baktériumok által indukált fehérje-mintázatváltozás a paprika IWF-ben

Az IWF-mintákat 30 °C-on inkubált növények leveleiből a kezelés, illetve a fertőzés után 24 órával izoláltam. A paprikaleveleket az élő baktériumok 10^8 sejt/ml, vagy a hővel elölt *P. syringae* 61 4×10^8 sejt/ml sűrűségű szuszpenziójával injekcióztam. Az elválasztás után a géleket ezüst-nitráttal festettem. A nyílak a markerfehérjék helyét jelölik.

4.5.2.2. A kórokozó, illetve szaprotróf baktériumok által indukált kitináz- és peroxidáz-izoenzimek denaturáló elválasztást követő megjelenése

A paprikalevelekből nyert IWF natív PAGE-mintázatában kitináz- és peroxidáz-enzimeket mutattam ki (4.5.1.2. fejezet). A BR kialakulásakor új peroxidáz-izoenzimek képződtek, a kitinázok aktivitása pedig ugrásszerűen megnőtt. Denaturáló PAGE után a kitináz- (Kim és Hwang 1994) és a peroxidáz-enzimek aktivitása (Zacheo et al. 1995) is kimutatható. A két fent említett közleménytől eltérően, mivel ezekkel a módszerekkel nem kaptam festődést, az enzimaktivitások kimutatásához kénytelen voltam a redukáló szereket (mekapto-etanol vagy DTT) a mintapufferből elhagyni.

Az IWF-minták SDS-PAGE-elválasztása során egy kitináz-aktivitású fehérjesávot találtam (19. A. ábra), amelynek kifejeződése megfelelt a specifikus BR-markerekkel szemben támasztott elsődleges követelményeknek (ld. a 18. ábrán nyíllal jelölt 30 kDa méretű, ezüst-festéssel kimutatott fehérje). A kitináz-marker mérete kb. 22-26 kDa közé tehető. Ennél pontosabb megállapítás a redukáló szer elhagyása miatt nem lehetséges.



19. Ábra. Kitináz- és peroxidáz-enzimek, mint BR-markerek megjelenése SDS tartalmú géleken

Az IWF-mintákat 30 °C-on inkubált növények leveleiből a kezelés, illetve a fertőzés után 24 órával izoláltam. A paprikaleveleket az élő baktériumok 10^8 sejt/ml, vagy a hővel előlt *P. syringae* 61 4×10^8 sejt/ml sűrűségű szuszpenziójával injekcióztam. Az elválasztás után a glikol-kitin tartalmú géleket fluoreszcens festékekkel (A), a peroxidáz-aktivitás megállapítására pedig DAB-el festettem (B). A (B) ábra középső géljén a mintákat az első DAB festés után, ezüsttel is megfestettem. A nyilak a kitináz- (A) vagy a peroxidáz-markerek (B) helyét jelölik.

A peroxidáz-aktivitást alig tudtam kimutatni az SDS-PAGE-t követően (19. B. ábra). De így is azonosítottam egy izoenzimet, amely azonos minták párhuzamos elválasztása, továbbá tömegspektrometriai eredmények alapján az ezüst-festéssel kimutatott 30 kDa nagyságú fehérjével azonos.

4.5.2.3. Az indukált kitináz- és peroxidáz-izoenzimek, BR-markerek tömegspektrometriai elemzése

Az indukálódó BR-markerek tömegspektrometriai elemzését együttműködő partnereink, a Szegedi Biológiai Központ Tömegspektrometriai Laboratóriumának munkatársai végezték el. A 30 kDa nagyságú peroxidáz izoenzim LC-MS/MS analízise után kapott peptidtömegek és szekvenciák alapján a TIGR paprikagén-adatbázis TC3709 jelű génjéről írható fehérje szekvenciára hasonlított a legjobban (41 %-os értékkel). A TC3709 az NCBI szekvencia-adatbázis két paprika-peroxidáz-génjével is azonos. A rövidebb láncú, kevesebb aminosavat tartalmazó, így alacsonyabb tömegű fehérje (AF442386.1) szekvenciája néhány aminosav-eltéréssel szinte teljesen ráilleszthető a másik, nagyobb méretűre (AJ810540.1) (14. táblázat). Do et al. (2003) munkája szerint az AF442386.1 és AJ810540.1 peroxidázok eltérő expressziós mintázattal kompatibilis és inkompatibilis kórokozók, *X. vesicatoria* baktérium és *Phytophthora capsici* gomba fertőzése következtében is indukálódnak. Abiotikus tényezők közül a szalicilsav és a hidrogén-peroxid gyenge induktív hatását mutatták ki (15. táblázat). A kitináz BR-marker analízise során a 14. táblázatban feltüntetett kódszámú hipotetikus paprikafehérjék szekvenciáira illeszthető peptideket azonosítottunk. Ezek a fehérjék más növényekből azonosított PR-3, Class IV. szőlő- és Class II. paprikakitináz, továbbá egy extracelluláris paradicsomkitináz prekuzora is hasonlítottak (14. táblázat). Ezek közül a paprikakitinázt indukáló abiotikus (etilén) és biotikus tényezők (inkompatibilis és kompatibilis *X. vesicatoria* és *Phytophthora capsici*) egy része ismert (15. táblázat). Az analízis során talált kitinázokra jellemző peptidek egy része az erősen konzervatívnak tartott kitináz szekvenciákra illeszkedtek. Így egyes a paprikából származó peptidek az általános rezisztencia dohányban azonosított kitináz-markerében is megtalálhatók, az illeszkedés mértéke 15 % volt, azaz a mindössze 61 aminosavból álló szekvencia részlet 15 %-át érintette.

14. Táblázat. A BR–markerekhez illeszthető TIGR–adatbázisból származó létező vagy hipotetikus extracelluláris paprikafehérjék.

saját kód	méret (kDa)	enzim-aktivitás	aminosav-azonosság %	hipotetikus fehérje ^a (TIGR)	hasonló, már azonosított fehérje (NCBI/Swiss-Prot)	hasonló fehérje forrása	Irodalom
CaPOX EC 1.11.1.7.	32	peroxidáz	41	TC3709	AF442386.1 (teljes)	paprika	Do et al. (2003)
			36		AF442386.1 (teljes)	paprika	Do et al. (2003)
			39		AJ810540.1 (teljes)	paprika	Do et al. (2003)
CaCHI EC 3.2.1.14.	22-24	kitináz	48	TC3666	Q7XB39 (64 %-os részlet)	szőlő	
			48	TC3667	Q43151 (61 %-os részlet)	bodza	
			22	TC4206	O82552 (81 %-os részlet)	paprika	Hong et al. (2000)
			16	TC3587	Z15139.1/Q05540 (79 %-os részlet)	paradicsom	Danash et al. (1993)

^ahipotetikus fehérje: adott DNS–adatbázisban *in silico* azonosított nyitott leolvasási keretből származó fehérje, melynek létezése biológiai rendszerben még nem bizonyított

15. Táblázat. A TIGR–adatbázisból származó hipotetikus fehérjék és a létezésüket támogató irodalmi adatok összevetése.

		SZÁMÍTOTT		IRODALOM				
saját kód	hipotetikus fehérje (TIGR)	méret (kDa)	pI	méret (kDa)	pI	aktiváló baktériumok	aktiváló gombák	aktiváló abiotikus tényezők
CaPOX	TC3709 Do et al. (2003)	36,129	7,54	36,07	8,8	<i>Xc</i>	<i>Pc, Cg</i>	SA, H ₂ O ₂
CaCHIs	TC3666	15,072	4,65	-	-	-	-	-
	TC3667	15,095	4,8	-	-	-	-	-
	TC4206 Hong et al. (2000)	23,106	6,1	25,161	9,39	<i>Xc</i>	<i>Pc</i>	E
	TC3587 Danash et al. (1993)	26,439	4,7	27	4,3	-	<i>Cf</i>	-

Xc: *Xanthomonas vesicatoria*

Pc: *Phytophthora capsici*

Cg: *Colletotrichum gloeosporoides*

Cf: *Cladosporium fulvum*

SA: szalicilsav

E: etilén

4.5.2.4. Az indukált kitináz- és peroxidáz-izoenzimek megjelenése az inkubációs idő függvényében

A paprika-IWF-ben található peroxidáz-izoenzimek aktivitásukat a denaturálás után kismértékben nyerték vissza, ezért kimutatásuk nehézkes volt. Ezért a 30 kDa méretű peroxidáz-marker tesztelését a továbbiakban ezüst-festéssel és nem az enzimaktivitásának vizsgálatával folytattam.

A CaPOX a *P. fluorescens* injektálása után 8 órával kimutatható volt a kezelt növényekből származó IWF-ben (20. A. ábra). Sőt, ezt a fehérjét még a BR-t kiváltó kezelés után öt nappal is megtaláltam.

Bár a BR-t indukáló kezelés után 8 órával kapott natív PAGE-mintázat erős aktivitása alapján elvártam volna, az azonos időpontban vett mintában a CaCHI nem jelent meg. Ebben az esetben sajnos az aktivitás mértéke, vagy a termelődött fehérje mennyisége a kimutathatóság határa alatt maradt. A CaCHI legkorábban az indukáló kezelést követő 16. órában mutatható ki a paprika-IWF-ben. A SDS-gélben megnyilvánuló kitinázaktivitás mértékében a fertőzést követő három időpontban – 16, 48 óra – mennyiségi különbséget nem mutattam ki (20. B. ábra).

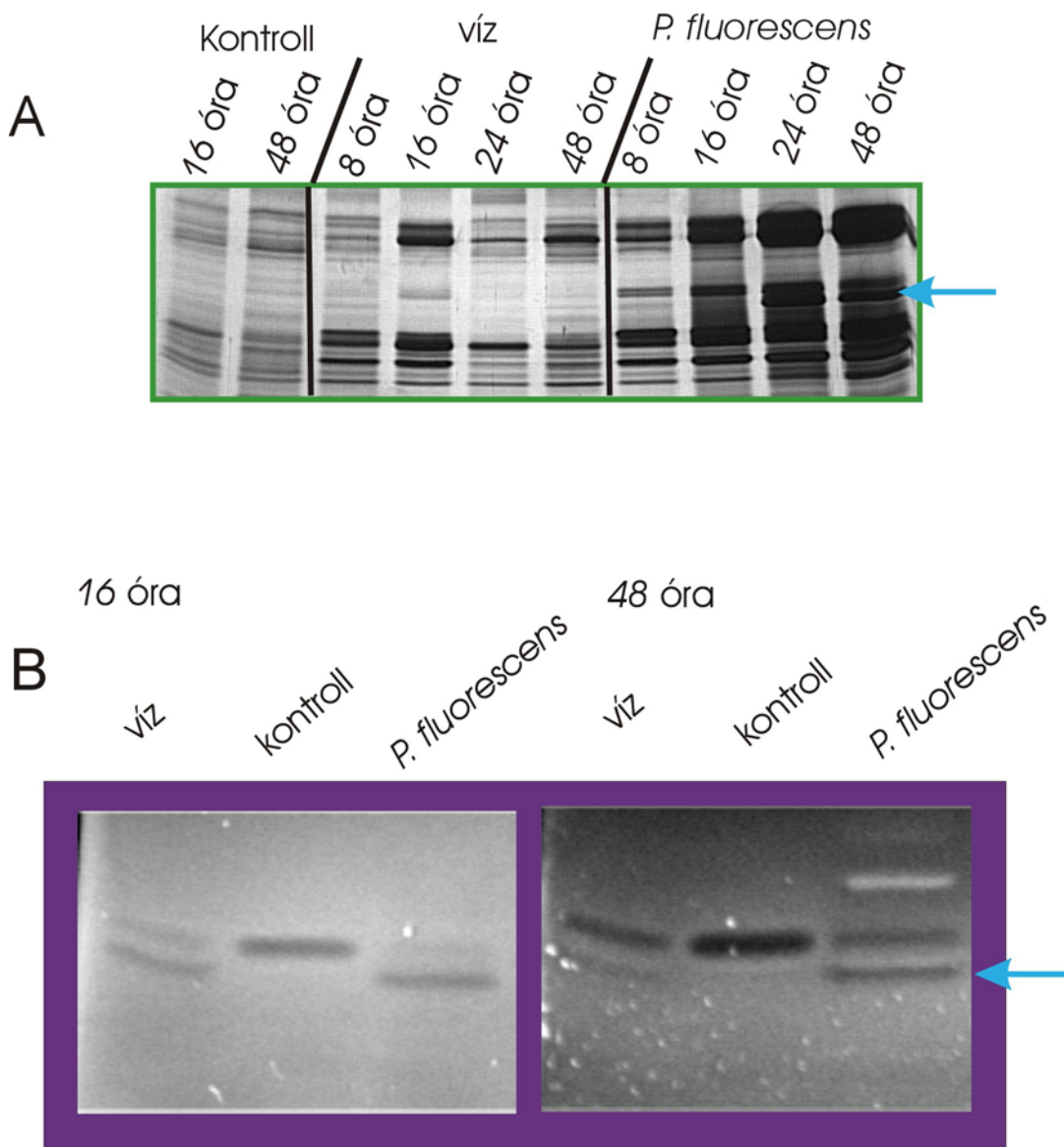
4.5.2.5. Ozmotikus-, oxidatív-stressztényezők és biológiailag aktív molekulák hatása a kitináz-markerek aktivitására és a peroxidáz-markerek megjelenésére

Egy védekezési reakció jelzőmolekulái csak akkor tekinthetők igazán megbízhatónak, ha kizárólag az adott védelmi rendszerrel hozhatók kapcsolatba, azaz vagy a védekezés következményei, vagy a rendszer kialakításában vesznek részt. Ezért számos oxidatív- vagy ozmotikus- stresszt okozó, valamint biológiailag aktív anyagok oldatát injektáltuk a paprikalevelekbe. A kezelések után 16 és 48 óra elteltével elkészítettem az IWF-kivonatokat. Elválasztásuk után értékeltém BR-markereink megbízhatóságát. Aktivációnak csak az olyan kezelést minősítettem, ahol a fehérjék a vízkezelésnél erősebben jelentek meg.

A CaPOX-ot – 16 órával a kezelések után – kizárólag a paraquatkezelés aktiválta. A többi, más típusú stresszaktivátor-kezelés, hatástalan volt. Később, 48 óra elmúltával a CaPOX már több, a mannitol-, a nátrium-klorid-, a paraquat- és a hidrogén-peroxid-kezelések hatására is gyengén megjelent (21. A. ábra).

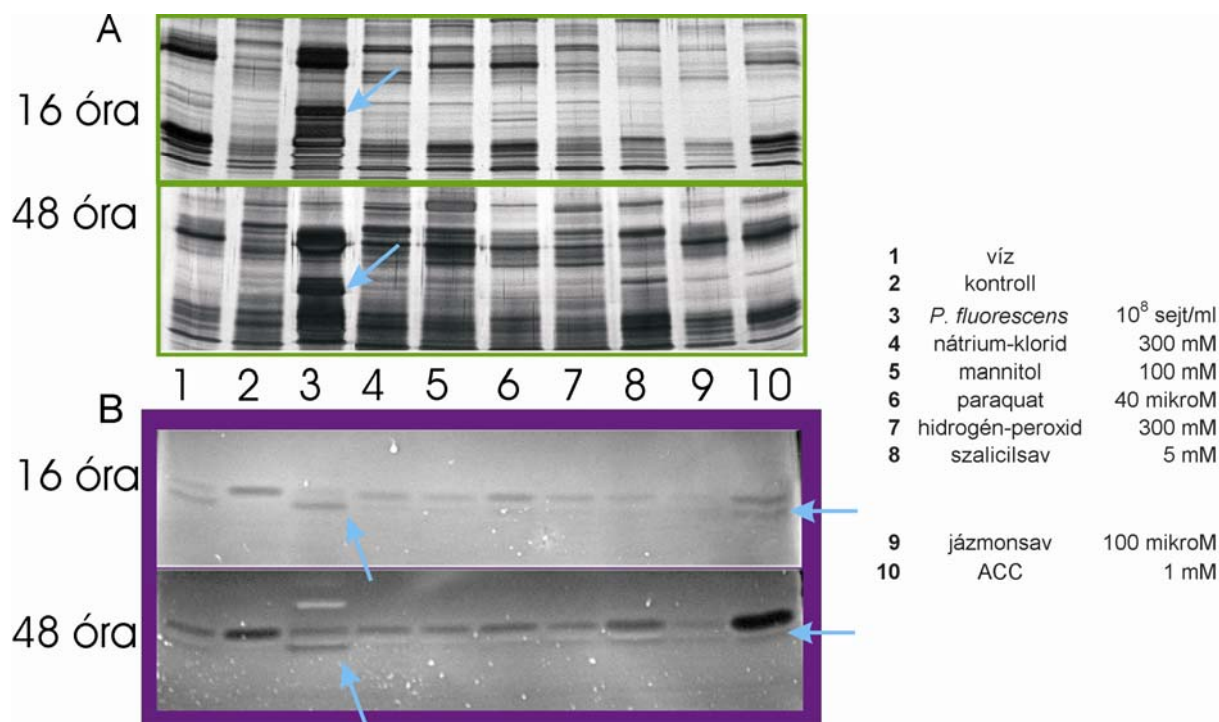
A CaCHI-marker megbízhatóságát glikol-kitin tartalmú gélen teszteltük. A kitinázfehérjére a CaPOX-al ellentétben a növényi hormonoknak gyenge aktiváló hatásuk volt. A kezelést

követő 16 és 48 órában a szalicilsavnak, valamint az etilén-prekurzor, ACC-molekulának gyenge kitinázaktivitás növelő hatása volt (22. B. ábra). Az alkalmazott stresszaktivátorok és biológiailag aktív anyagok a CaCHI kitináz- és a CaPOX peroxidáz-aktivitását gerjesztő hatása a pozitív kontroll, a *P. fluorescens* kezelés hatásánál gyengébbnek bizonyult.



20. Ábra. Kitináz- és peroxidáz-izoenzimek, mint BR-markerek megjelenése az inkubációs idő függvényében.

Az IWF-mintákat 30 °C-on inkubált növények leveleiből a kezelés, illetve a fertőzés után 8–48 óra között, több időpontban izoláltam. A paprikaleveleket *P. fluorescens* baktérium 10^8 sejt/ml sűrűségű szuszpenziójával injekcióztam. Az elválasztás után a peroxidáz-markert ezüst-nitráttal (A), a glikol-kitin tartalmú géleket fluorescens festékkel (B) festettem. A nyilak a CaPOX- (A) illetve, a CaCHI- (B) markerek helyét jelölik.



21. Ábra. Kitináz- és peroxidáz-enzimek, mint BR-markerek oxidatív-, ozmotikus-stresszek és biológiailag aktív molekuláktól független indukciója

Az IWF-mintákat 30 °C-on inkubált növények leveleiből a kezelést, illetve a fertőzést követő 16 és 48 óra múlva izoláltam. A paprikaleveleket az élő baktériumok 10⁸ sejt/ml, vagy a hővel elölt *P. syringae* 61 4×10⁸ sejt/ml sűrűségű szuszpenziójával injektáltam. Az elválasztás után a peroxidáz-markert ezüst-nitráttal (A), a glikol-kitin tartalmú géleket fluoreszcens festékkel (B) festettem. A nyilak a CaPOX- (A) és a CaCHI- (B) markerek helyét jelölik.

4.5.2.6. A környezeti tényezők hatása a kitináz-markerek aktivitására és a peroxidáz-markerek megjelenésére

4.5.2.6.1. A fény hatása

A dohányban kimutatott BR fényigénye alapján két szakaszra osztható. A korai szakasz (EBR) kialakulása, HR-gátló hatása független a fénytől. A késői szakasz (LBR) sötétben tartott növényekben nem alakul ki, a HR-gátlás sem jön létre (Burgyán és Klement 1979).

A BR-t kiváltó kezelés előtt két nappal sötét növénynevelő kamrába helyezett paprikanövényekben az indukció ellenére kizárólag az általános védekezés korai formája (EBR) alakult ki, a késői formát (LBR) az indukciót követő 48 és 72 órában a HR-gátlással nem lehetett kimutatni. Ezzel párhuzamosan a fertőzés után 16 órával izolált paprika-IWF-

ben a CaPOX- és a CaCHI- markerek a megvilágítottság minőségétől függetlenül megjelentek. Az eltérő fényviszonyok hatását mindkét BR-marker megjelenésén összehasonlítottuk a fertőzést követő 48 és 72 órában is (22. ábra). A hővel előlt *P. syringae* 61 baktérium szuszpenziójával injektált növények egy részét a kísérlet teljes ideje alatt megvilágítottam, más részét pedig sötét növénynevelő kamrába helyeztem. A kísérletben mind a CaPOX, mind a kitináz-marker kifejeződése fényfüggő volt (22. A. és B. ábra). A sötétben tartott növényekből a BR kezelés után 72 órával izolált IWF kb. ugyanannyi CaPOX-markert tartalmazott, mint a vízkezelés után, de nagyságrendekkel kevesebbet, mint a folyamatosan megvilágított növényekből származók. A CaCHI kitináz pedig a sötétben tartott paprika növényekben nem lehetett indukálni.

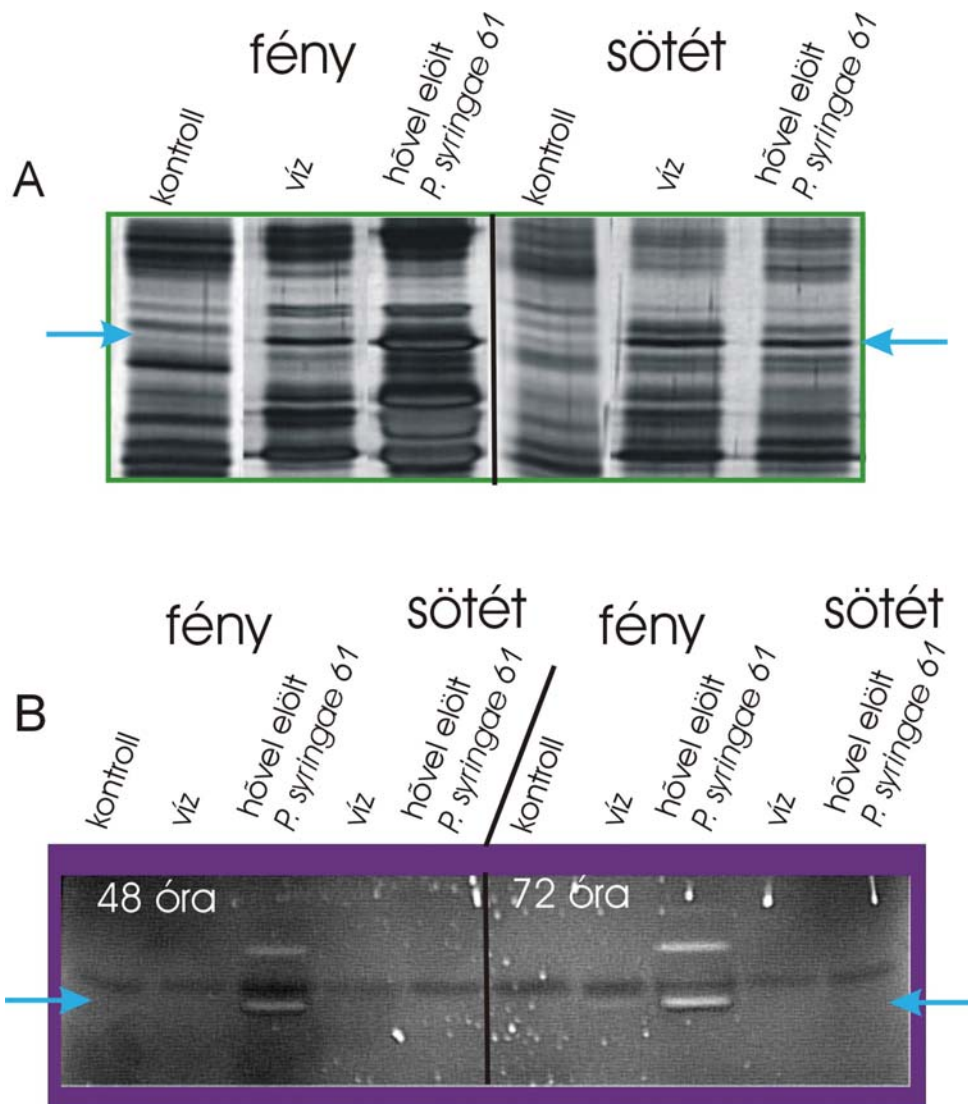
A fényen vagy sötétben tartott dohánynövényekben kimutatott BR-t jelző kitinázok kifejeződése is a paprikamarkerekhez hasonlóan viselkedett. (Ott et al. 2006). A fényviszonyok tehát rendkívül fontos tényezők az általános rezisztencia működésében.

4.5.2.6.2. Az alacsony hőmérséklet hatása

A növények, alacsony hőmérsékletre (5 °C) helyezése gátolta a BR és a HR kialakulását. Az ilyen körülmények között tartott növényekben mindkét BR-marker kifejeződését teszteltem. A *P. fluorescens*-szuszpenzióval kezelt növények IWF-mintázata is igazolta a tüneti vizsgálatok eredményeit. Alacsony hőmérsékleten az indukció ellenére a HR-gátlás nem alakult ki. A markerek a kísérlet 5 napos időtartama alatt nem halmozódtak fel kimutatható mennyiségben a paprika-IWF-ben (23. ábra).

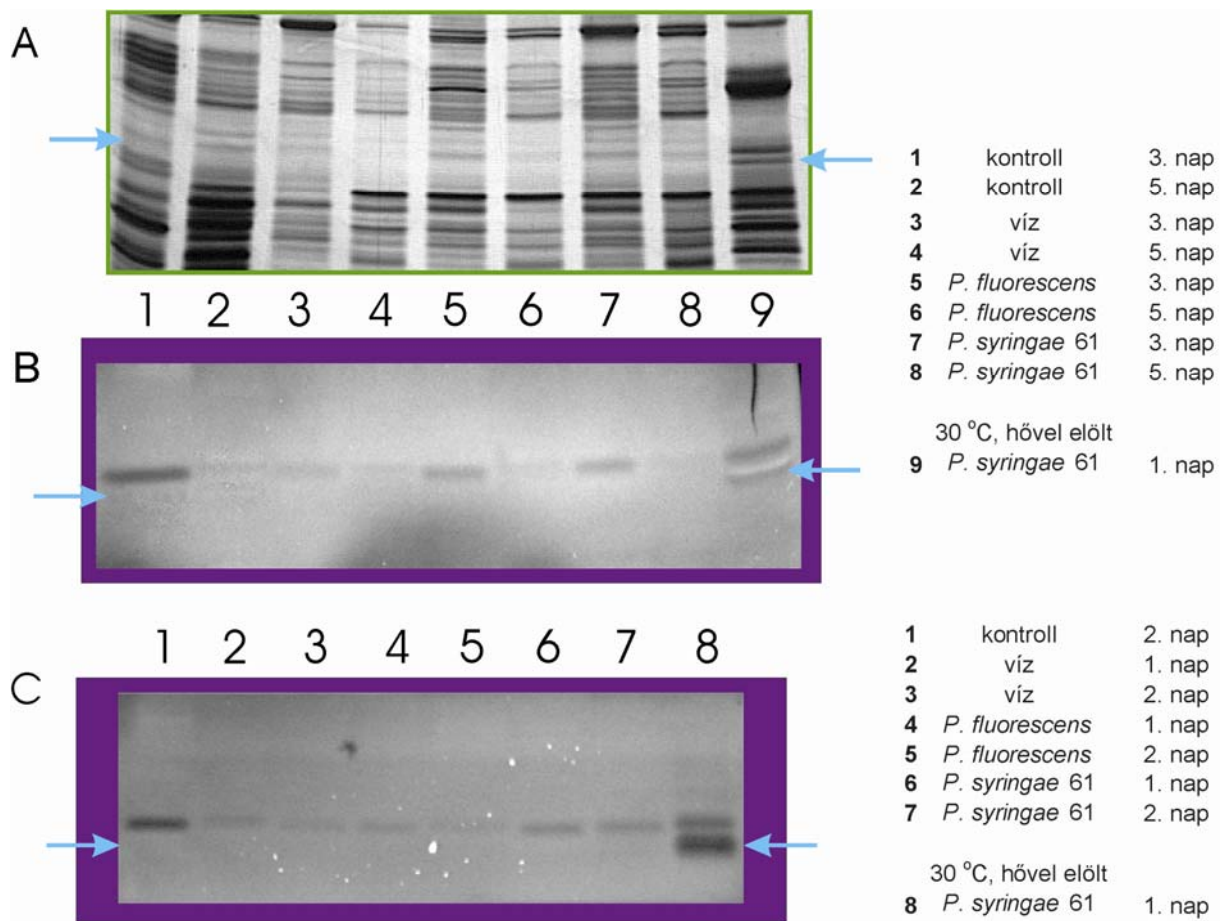
Nemcsak a szaprotróf, hanem az opportunistá patogén *P. syringae* 61 baktérium szuszpenziójával is injektáltuk a paprikaleveleket. De a 30 °C-on párhuzamosan inkubált növényekről származó mintában kimutatható CaPOX (23. A. ábra) és CaCHI fehérjék megjelenése itt is elmaradt (23 B. és C. ábra).

Ezek az eredmények megerősítik a natív PAGE alapján alkotott képet. A BR és a HR hiánya olyan rést nyit a növények védekezési rendszerében, melyet a hidegtűrő baktériumok kihasználnak, és megtelepedhetnek a szövetekben.



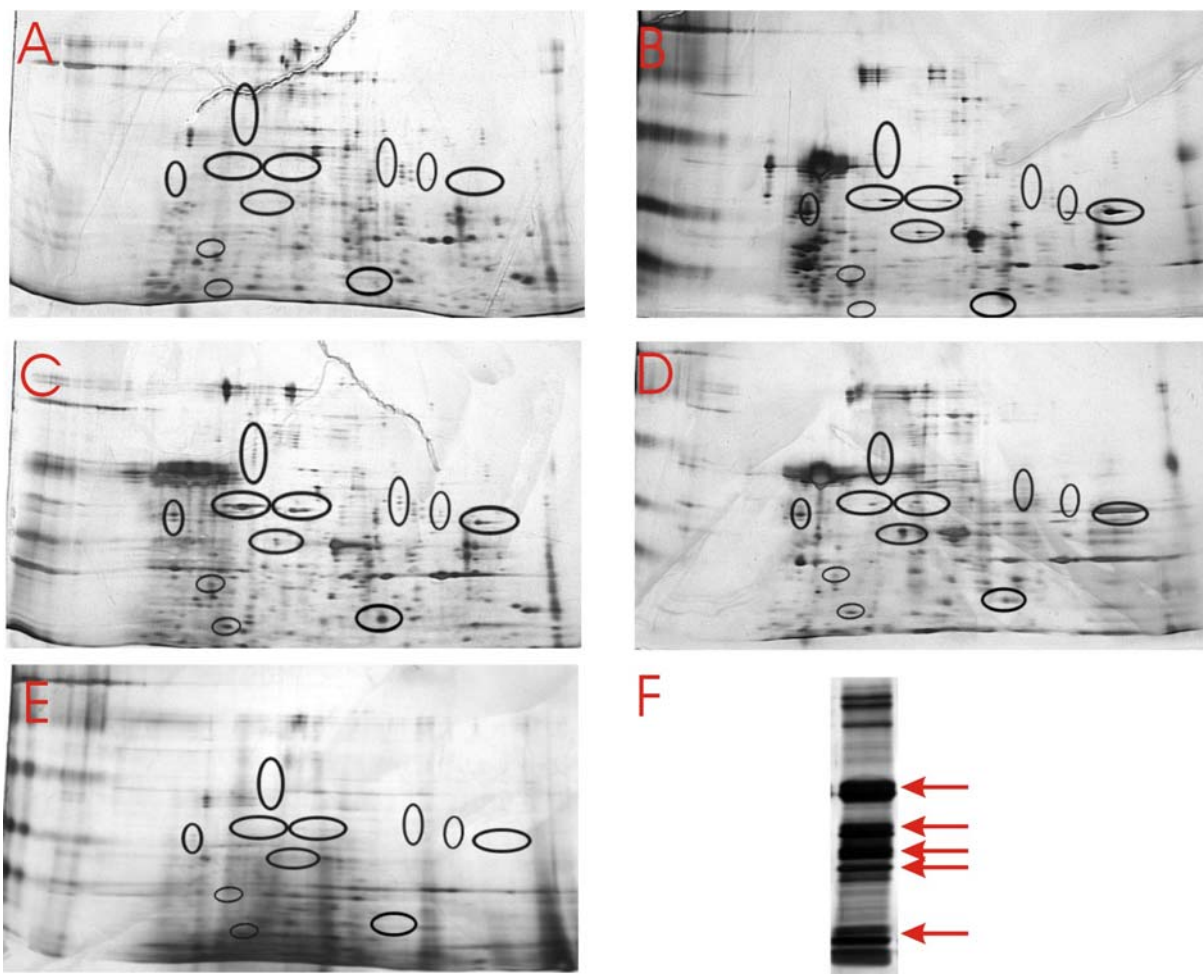
22. Ábra. Kitináz- és peroxidáz-enzimek, mint BR-markerek fényfüggő megjelenése

Az IWF-mintákat 30 °C-on inkubált növények leveleiből a kezelést, illetve a fertőzést követő 72 (A), illetve 48 és 72 óra múlva (B) izoláltam. A paprikaleveleket a hővel elölt *P. syringae* 61 baktérium 4×10^8 sejt/ml sűrűségű szuszpenziójával injektáltam. Az elválasztás után a peroxidáz-markert ezüst-nitráttal, a glikol-kitin tartalmú géleket fluoreszcens festékekkel (B) festettem. A nyilak a CaPOX- (A) és a CaCHI- (B) markerek helyét jelölik.



23. Ábra Kitináz- és peroxidáz-enzimek, mint BR-markerek hőmérsékletfüggő megjelenése

Az IWF-mintákat 5 °C-on inkubált növények leveleiből a kezelést, illetve a fertőzést követő 1-5 nap elteltével izoláltam. A paprikaleveleket az élő baktériumok 10^8 sejt/ml, vagy a hővel előlt *P. syringae* 61 4×10^8 sejt/ml sűrűségű (pozitív kontroll, 30 °C) szuszpenziójával injektáltam. Az elválasztás után a peroxidáz-markert ezüst-nitráttal, a glikol-kitin tartalmú géleket fluoreszcens festékekkel (B, C) festettem. A nyilak a CaPOX- (A) és a CaCHI- (B, C) markerek helyét jelölik.



24. Ábra. BR–markerek megjelenése az IWF kétdimenziós elválasztását követően

Az IWF–mintákat 30 °C-on inkubált növények leveleiből a kezelés, illetve a fertőzés után 24 órával izoláltam, vákuum–centrifugával tízszeresére töményítettem. A kontrollok kezeletlen (A) és vízzel injektált (B) növényekből származnak. A paprikaleveleket hővel elölt *P. syringae* $61\ 4 \times 10^8$ sejt/ml (C), vagy élő baktériumok (*P. fluorescens*, D; *X. vesicatoria*, E) 10^8 sejt/ml sűrűségű szuszpenziójával injektáltam. Az elválasztás után a géleket ezüsttel festettem. Az (F) ábra a (D) egydimenziós képe.

4.5.2.7. A meglévő és további lehetséges BR–markerek azonosítása kétdimenziós elektroforézissel

Az IWF-ben oldott fehérjék egydimenziós, méret szerinti elválasztása két, a BR kimutatására alkalmas enzim meghatározásához juttatott közelebb. A CaPOX már ismert szereplője volt a kórokozó és paprika kölcsönhatásának. De az új, paprikából eddig nem ismert kitináz–izoenzim azonosításához még több információra volt szükség. Többet információt a kérdéses kitináz–aktivitású fehérje izoelektromos pontjának meghatározásától vártam.

A baktérium közvetlen környezetét kialakító extracelluláris tér egydimenziós fehérjeképében több olyan régió is előfordult, ahol a közel azonos méretű fehérjék mennyisége

megnövekedett (24. F. ábra). Akár új fehérjék is képződhetnek, de ennek pontos feltárására az egydimenziós rendszer nem felelt meg. Az IWF kétdimenziós elektroforézise, azaz először az izoelektromos pont, majd azt követően a molekulák mérete szerinti elválasztás lehetővé tette az azonos méretű, de eltérő izoelektromos pontú fehérjék elkülönítését.

A kezeletlen növényből izolált vízoldható, extracelluláris fehérjék kétdimenziós mintázata már minden összehasonlítás nélkül, önmagában is rendkívül érdekes. Az ezüst-festéssel láthatóvá tett fehérjék túlnyomó többsége kis méretű (30 kDa alatt), és alacsony pH-jú, éppen úgy, mint maga az apoplast. Az ötféle kezelés eredményeként a BR kialakulásával összhangba hozható indukálódó fehérjéket keresve, 11 területet jelöltem meg a géleken (24. ábra, 16. táblázat). Az egyes régiók egy vagy több fehérje megjelenését is jelölhetik. Így összességében 21 indukálódó fehérjét jelölő folt megjelenését követtem figyelemmel. Gélbeni elhelyezkedésük alapján a fehérjék tömege és izoelektromos pontja is becsülhető (25. ábra).

Specifikus BR-markereket összesen 6 régióban találtam, fele-fele arányban savas és bázikus tulajdonságúakat. Az 1. régió fehérjei azonos izoelektromos pontú, közel azonos, kb. 48-53 kDa méretű molekulák. A 2-5. régiók 27-36 kDa nagyságú savas fehérjéket jelöltek. A 6., 7. és a 8. régióban kb. 32-37 kDa nagyságú bázikus fehérjék helyezkedtek el. Becsült paramétereik alapján valamelyikük a korábban meghatározott CaPOX-markert. A 9., 10. és 11. régió egy-egy fehérjét jelölt 15-26 kDa tartományban. Közülük a 11. mérete (26 kDa) és

16. Táblázat. A BR kétdimenziós–elektroforézissel azonosítható markerei

Régiók	foltok (db)	kontroll	víz	he. <i>Pss</i>	élő <i>Pf</i>	élő <i>Xv</i>	gélbeni helyzetéből becsült	
							méret (kDa)	pI
1	6	-	-	+	+	-	48-53	5,5
2	1	-	+	+++	+	-	36	6,25
3	1	-	+	+++	+	-	36	5,45
4	2	-	+	++	+	+	32-34	4,5
5	2	-	+	+	++	-	27-30	5,9
6	3	-	-	++	+	-	34-37	7,5
7	2	-	-	+	-	-	33-35	8,1
8	1	-	++	+	++	-	34	8,5
9	1	-	-	+++	++	-	19	7,25
10	1	-	-	++	++	-	15	5,25
11	1	-	-	+	+	-	26	5

-: nem látható folt a gélen, + – +++: az aktiváció növekvő fokát a keresztek növekvő számával jelöltem

izoelektromos pontja (pI 5) megfelelt az egydimenziós elektroforézissel kimutatott CaCHI fehérje adatainak (16. táblázat).

4.6. A dolgozatban szereplő új tudományos eredmények

A következő pontokban foglalom össze a téma fontosabb, új tudományos eredményeit:

Pontosítottam a hővel előlt baktériumokkal indukált BR kialakulási idejének meghatározását, azaz az általános rezisztencia kialakulási ideje az előkezelés és a felülfertőzés között eltelt idő és a kimutatására szolgáló baktérium HR-indukciós idejének az összege. Így bizonyítottam, hogy a BR kialakulásának sebességét kizárólag a vizsgált növény biológiai jellemzői befolyásolják és nem függ az indukáló baktériumfajtól.

A hőmérsékletcsökkenés hatására károsodott a dohánynövények aktív védekezőképessége. A BR-kialakulás a hőmérséklet csökkenésével párhuzamosan egyre több időt igényelt. Alacsony hőmérsékleten a hiperszenzitív reakció (HR) indukciós és látens fázisa is bizonyítottan hosszabb lett. Az 5 °C-on inkubált dohánynövények a fertőzést követő 72 órában az aktív védekezés eszközei nélkül állnak a baktériumok kolonizációs törekvéseivel szemben. Ezt megerősítette, hogy a *tpoxNI* peroxidáz és az *EBR-43* ortometil-transzferáz BR markergének kifejeződése 5 °C-on gyenge. Ugyanakkor az a tény is alátámasztja, hogy 5 °C-on a BR baktérium-szaporodást gátló hatását sem lehetett kimutatni.

A BR lassabban alakult ki paprikában, mint a dohány-tesztnövényekben, de a hőmérséklet és a fény hatása az általános rezisztenciára mindkét tesztnövényben hasonló volt.

Az indukáló szaprotróf baktérium hatására megjelenő vagy erősödő BR-t jelző fehérjéket mutattam ki az injektált levelek sejtközötti járataiból. Az izolált CaPOX és CaCHI markerfehérjék peroxidáz- illetve, kitinázaktivitást mutattak. A markerek specificitását igazolta, hogy abiotikus stresszekre nem termelődtek, fényérzékeny pédig csak a védekezés késői szakaszában váltak. Az alacsony hőmérséklet a paprika aktív védekezési rendszerét szintén késleltette.

Alacsony hőmérsékleten (5 °C) a hidegtűrő szaprotróf és az opportunista kórokozó baktériumok sejtszáma hat nap alatt a kiindulási koncentráció százszorosára–ezerszeresére emelkedett. A késedelmes BR és HR, továbbá a szaprotróf és az opportunista kórokozók

szaporodása nem csupán párhuzamos események, **hanem az aktív védekezési rendszer hiánya tette védtelenné a növényeket a hidegtűrő kórokozó szaporodásával szemben.**

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Jelen értekezés kettős céllal íródott, keretein belül egyrészt minél részletesebben kívántam tárgyalni az alacsony hőmérséklet hatását a növények és a baktériumok kölcsönhatására, ezen belül pedig a BR és a HR működésére. Másrészt a BR kialakulását specifikusan jelző paprikafehérjéket kerestem. Az azonosított markereket pedig segítségül hívtam annak a kérdésnek a megválaszolásához, miért képesek a magas hőmérsékleten tartott paprikanövények ellenállni az opportunistá patogén *P. syringae* pv. *syringae* támadásának, és miért válik ugyanez a baktérium sikeres kórokozóvá alacsony hőmérsékleten?

1. A hőmérséklet csökkenése *in vitro* és *in planta* is jelentősen, mégpedig ellentétes irányba módosította a szaprotróf és az opportunistá baktériumok szaporodását. A King B tápoldatban tapasztalt csökkenő szaporodással szemben a 30 °C-on inkubált paprikanövényekhez képest a hőmérséklet csökkenéssel párhuzamosan, egyre magasabb volt a tenyészhető *P. fluorescens*, *P. syringae* 2214 és 61 izolátumok sejtszáma a mesterségesen fertőzött levelekben. Ez a természetben előforduló jelenség akkor különösen érdekes, ha összevetjük a *P. phaseolicola* S21-nek „megfelelő” bab gazdanövény fertőzésekor kapott ellentétes tendenciájú adatokkal. Vagyis a magas hőmérsékleten inkubált babnövények *P. phaseolicola* S21 izolátummal fertőzött leveleiben más klasszikus növénykórokozó baktériumokkal megegyezően intenzív baktériumszaporodást tapasztaltam. Azokban a bablevél mintákban, amelyek alacsony hőmérsékleten inkubált növényekről származtak, a kórokozó baktérium szaporodása a szaprotróf baktérium sejtszámának szintjére süllyedt vissza. Az opportunistá kórokozó vagy a szaprotróf baktérium 5 °C-on mért gyors *in planta* szaporodása laboratóriumi körülmények között is reprodukálható. Hevesi (1986) elsőként írta le, hogy a környezeti hőmérséklet erős ingadozásakor bekövetkező lehűlések után a *P. syringae* pv. *syringae* zsírfoltosságot okoz a fűszerpaprika levelén. Ez a jelenség két oldalról is megközelíthető, egyrészt a baktérium, másrészt a növény oldaláról.

A *P. syringae* pv. *syringae* baktériumfaj hidegtűrő természetét irodalmi adatok és *in vitro* kísérleteink is alátámasztották (van Dijk et al. 1999). Ez a kórokozó nemcsak eltűri a más baktériumok számára már kedvezőtlen paramétereket, hanem III. típusú szekréción rendszerének működését és virulenciafaktorainak szintézisét is kifejezetten segíti a kb. 20 °C-os környezeti hőmérséklet. Smirnova et al. (2001) és Bender et al. (1999) összefoglaló munkáikban más hasonlóan viselkedő *Pseudomonas*-fajokról is beszámoltak. Az *in planta* baktériumszaporodás vizsgálataim eredményei és a tünetek megjelenése tükrözték a 20 °C körül meglévő erős virulenciát. Eddig azonban csak nagyon kevés irodalmi adat volt a

Pseudomonas-fajok patogenitásáról alacsonyabb hőmérsékleten (Ballio et al. 1990; Süle és Seemüller 1987; Hevesi és Ledó 1997). 5 °C körüli hőmérsékleten a baktériumokban már a hidegsokk tényezők szintézise kerül előtérbe, ezért a virulenciát meghatározó tényezők termelése feltételezhetően visszaszorul. Ezt támasztja alá az is, hogy az 5 °C-on inkubált, *P. syringae* 2214 vagy 61 izolátummal fertőzött paprikanövényeken a virulenciafaktorok által okozott klorózisok nem jelentek meg. 5 °C inkubációs hőmérsékleten ezért nagy valószínűséggel a patogenitásért felelős tényezők elemzése vezethet eredményre.

Ez a kérdés azonban egy másik oldalról, a növény, a baktériumfertőzéskor működésbe lépő növényi válaszok oldaláról is megközelíthető. Az itt bemutatott munka során ennek a megközelítési módnak részletes kidolgozására vállalkoztam. E munka megvalósítása előtt Klement et al. (1999, 2003) csak 20 és 30 °C-on vizsgálták az általános rezisztencia és a hiperszenzitív reakció kialakulását. Különösen érdekes ez a szempont, ha figyelembe vesszük, hogy az általános rezisztencia védi meg a növényeket attól, hogy a felületükön epifiton módon állandóan jelenlévő szaprotróf baktériumok táplálékává váljanak.

2. Az alacsony hőmérsékletű környezetbe (5 °C) helyezett dohány- és paprika-tesztnövények szervezetében a baktériumok által indukált általános rezisztencia és hiperszenzitív reakció kimutatását több módszerrel vittem véghez. Az 5–30 °C között, esetenként akár ötféle hőmérsékleten inkubált dohányokban két, eltérő hidegtűrő-képességű baktériumfaj összehasonlítására épülő kísérleti rendszert állítottam fel a védekezési reakciók működésének tanulmányozására.

A hőmérséklet fokozatos csökkenése hátráltatta a BR kialakulását, amit a HR-gátló képesség egyre későbbi kimutathatósága igazolt. A hőmérséklet csökkenése növelte a baktériumok HR-indukciós idejét majd a látens szakasz megnyújtásával fokozottan tovább növelte a HR kialakulási idejét is. 5 °C-on gyakorlatilag sem a 20–30 °C-on már néhány óra alatt kialakuló BR-t, sem a HR-t nem lehetett kimutatni. Az azonos rendszerben 5 és 20 °C-on a tenyésztendő baktériumsejtek számának és a specifikus BR-marker gének indukciójának meghatározásával támasztottam alá az 5 °C-on a BR és HR működésképtelenségére utaló tüneti, HR-gátlás elvén alapuló kísérleteket. A 20 °C-on inkubált pozitív kontrollal szemben 5 °C-on sem a védekezési reakciók baktériumszaporodást korlátozó hatását, sem a *tpoxNI* peroxidáz sem az *EBR-43* ortometil-transzferáz markergének átíródási szintjének emelkedését nem tapasztaltam. Így több oldalról is igazoltnak látszik a feltevés, hogy 5 °C-on a kísérletben szerepelt dohánynövények védtelenek voltak a baktériumok fertőzésével szemben.

A dohányhoz hasonlóan a BR és a HR paprikában is kialakult 30 °C-on, viszont a BR paprikában sokkal lassabban jött létre, mint a dohányban. Mindkét növényre következetesen jellemző volt, hogy napokkal az indukáló kezelés után sem mutatható ki védekezési reakció

5 °C-on.

3. A levélszövetbe került baktériumok a levelek intercelluláris járataiban élnek. Az extracelluláris térbe kiválasztott növényi fehérjék közvetlen fizikai kapcsolatba kerülnek az ott élő, élni próbáló baktériumsejtekkel. Tekintettel arra, hogy dohányban már sikerült kimutatni (Ott et al. 2006), paprikában is jó esély volt arra, hogy BR során indukálódó extracelluláris fehérjék a védekezés markerei legyenek. A BR indukciójával összhangban két extracelluláris elhelyezkedésű enzim egy-egy izoformájának aktiválódását sikerült kimutatnom. A CaPOX tömegspektrometriai analízis és elektroforézis után kimutatható szelektív enzimek alapján egy peroxidáz-enzim, mely két az NCBI adatbázisban AF442386.1 illetve AJ810540.1 kódszámon szereplő peroxidáz génhez közel azonos mértékben hasonlított. A CaCHI fehérjesáv aktivitása a tömegspektrometriai analízis során nyert peptidek, vagyis szekvenciáik illeszkedése alapján négy kitináz-enzim bármilyen kombinációjából származhat.

A növényekben azonosított peroxidázoknak többféle szerepük lehet. A hidrogén-peroxid koncentrációjának változtatásával szabályozzák a növényi sejtek redox állapotát, és a hidrogén-peroxidhoz kötött jelátviteli folyamatokat. A kórokozók támadásakor peroxidázok katalizálják a keresztkötések kialakulását az erre alkalmas sejtfalalkotó peptidmolekulák között (Brown et al. 1998).

Inkompatibilis vagy kompatibilis kórokozó gombák, sőt baktériumok és vírusok fertőzése után számos növényfajban bizonyították egyes kitináz-izoenzimek indukcióját (Boller 1985; Trudel et al. 1989). Ezek egyik lehetséges funkciója a kitintartalmú gombák sejtfalának bontása. A baktériumokra gyakorolt hatásuk jelen pillanatban még nem tisztázott, de esetleges lizozimaktivitásuk ellenük is hatásos fegyver lehet (Varga G.J., Doktori értekezés. 2006). Hong és Hwang (2006) *X. vesicatoria* kórokozó baktérium elleni rezisztenciát mutatott ki a CaChi2 gént túltermelő *Arabidopsis thaliana* növényekben.

A CaPOX és a CaCHI fehérjéket a szaprotróf és az inkompatibilis és az opportunistá patogén baktériumok is indukálták. Kísérleti eredményeinkkel ellentétben az irodalomban paprikában azonosított hasonló szekvenciájú peroxidáz (CaPOA1 és CaPO1) és kitináz (CaChi2) enzimek indukciója kompatibilis *Xanthomonas vesicatoria* fertőzése után is bekövetkezett. Kompatibilis és inkompatibilis kapcsolatban azonban a gének expressziós mintázata jelentősen eltért egymástól. A közös indukció ténye arra utal, hogy a növények a BR és a HR működése során közös eszközöket és közös jelátviteli utakat is használnak (Bozsó et al. 2002). A CaPOX és CaCHI fehérjék abiotikus stresszt okozó cukor- és sóoldatok, jelátviteli molekulák és növényi hormonok hatására kevésbé indukálódó fehérjék. A CaPOX indukciója hidrogén-peroxid képződést generáló paraquat kezelés után emelkedett. A CaCHI

kitinázaktivitása pedig etilén- és szalicilsav-kezelések hatására két nap elteltével nőtt meg. Az inkompatibilis és kompatibilis *Xanthomonas vesicatoria* baktérium és paprika kölcsönhatásban már azonosított gének transzkripcióját is hasonló kezelések fokozták. Do et al. (2003) hidrogén-peroxid-oldat paprikára permetezésekor kimutatták a CaPOA1 és CaPO1 peroxidázgének mRNS-ének fokozott átíródását. Hong et al. (2000) pedig az etilén indukáló hatásáról számolt be a CaChi2 kitináz klón esetében. Az indukciót követő korai időpontokban a CaPOX és CaCHI fehérjék aktivációja fénytől független, míg az indukció után két-három nappal a sötétben tartott növényekben nem termelődtek. A fent említett paraméterek a dohányból azonosított '215' és '250' jelű kitinázok indukciójával összhangban vannak (Ott et al. 2006), ezért a CaPOX és a CaCHI paprikából izolált fehérjék a BR specifikus markerei. Így alkalmasak a BR hőmérsékletfüggésének jellemzésére és a szaprotróf baktériumok kolonizációs lehetőségeinek, és az opportunistáéknak védekezést elkerülő stratégiájának igazolására.

4. 30 °C-on a növényi sejtek közötti térbe került szaprotróf baktériumok kizárólag a BR-t aktiválják. Az opportunistáéknak viszont általános elicitoráikkal a BR-t, és ezzel egyidejűleg specifikus effektor molekuláikkal feltételezhetően a HR-t is kiváltják.

A szaprotróf baktérium szaporodását a BR, az opportunistáéknak pedig a BR és a HR együttes, időben egymást követő hatása mérsékelte, és véglegesen a HR akadályozta meg. Viszont 5 °C-on a baktériumoknak, legyenek kórokozók vagy sem, egyik védekezési mechanizmus korlátozó hatásával sem kell szembenézniük. Ez az egyik oka, hogy mind a szaprotróf *P. fluorescens*, mind az opportunistáéknak *P. syringae* 61 szaporodott az alacsony hőmérsékleten inkubált növényekben. Szaporodásuk másik oka, hogy olyan mezofil baktériumokról van szó, melyek 5 °C-on is szaporodnak. A harmadik ok abban keresendő, hogy a szövetek sejtközötti járataiban fellelhető szabad vízkészlet tartalmazza a legkevesebb oldott anyagot a növények szervezetében. Ezért a hőmérséklet csökkenésekor ez a vízkészlet fagy meg elsőként. Hogy csökkentsék a fagyás veszélyét, a környezeti hőmérséklet csökkenésével a növények más anyagok mellett elsősorban cukrokat transzportálnak a sejtközötti járatokba (Knight et al. 1996). A szaprotróf baktériumok, mivel nem rendelkeznek patogén specifikus effektorokkal, feltételezhetően ezt a többlet cukormennyiséget használták fel szaporodásukhoz. Továbbá ez a szénhidrát-többlet az opportunistáéknak szaporodását ugyanolyan mértékben segítette.

A paprikanövényekben azonosított BR-markerek meghatározása több, új kutatási irányt is nyit. A markerek a BR működésének azonosítását teszik lehetségessé akkor, ha a kísérleti körülmények között a HR, és ennek következtében a HR-gátláson alapuló BR kimutatás nem működik. Ilyen körülmény nem csak a növények szempontjából alacsony, hanem éppen

ellenkezőleg, a magas hőmérséklet is lehet. Például egy *Xanthomonas vesicatoria* törzs 32 °C-on nem okozott HR-t paprikanövényekben, továbbá egyes *Pseudomonas*-fajok inokulációja következtében sem alakult ki HR 37 °C-on dohányban.

A baktériumok a növényi szövetek sejtközötti járataiban élnek ezért, közvetlenül a baktériumok metabolizmusát gátló fehérjék azonosítására itt van a legnagyobb esély. Az apoplaszt fehérjék kétdimenziós elválasztása során, a két már azonosított markeren kívül újabb BR–marker jelöltek bukkantak fel. Ezek meghatározása és feladatuk tisztázása pedig további információkat szolgáltat a BR működéséről, és új lehetőségeket nyithat a rezisztencianemesítés terén.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elmúlt évtizedekben sokat vizsgált, a baktériumok által kiváltott hiperszenzitív reakció (HR) mellett tanulmányoztam egy újonnan leírt, sejtthalált nem okozó védekezés, az általános védekezés (basal resistance, BR) kialakulását is alacsony (5 °C) és magas (20-30 °C) hőmérsékleten. Az általános elicitorok által indukált BR-t napjainkig a következő növényekben írták le: *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* és *Capsicum annum*. A szaprotróf baktériumok mellett a hővel előlt kórokozók, *hrp* mutánsok és az inkompatibilis kórokozók elicitor molekulái is aktiválják. Míg a HR az inkompatibilis kórokozókat gátolja, a BR biológiai jelentősége abban áll, hogy a növények többsége a felületükön élő számos baktérium támadása ellenére feltételezhetően éppen az általános védekezés képességének a birtokában marad egészséges. A dohány-tesztnövényeken 30 °C-on gyorsan, néhány órán belül kimutatható BR 5 °C-on nem alakult ki. Hatékonyságát, vagy alacsony hőmérsékleten éppen ellenkezőleg, a védekezési képesség hiányát, a kitenyészthető *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* és a *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* baktériumsejtek száma, továbbá a *tpoxN1* (peroxidáz) és az *EBR-43* (ortometil-transzferáz) BR-specifikus markergének magas vagy alacsony relatív kifejeződése is alátámasztotta.

Az értekezés egy másik érdekes, a klasszikus kompatibilis kórokozó-gazdanövény kapcsolattól eltérő modellre is összpontosít. Az opportunistá patogén *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gyakori, epifiton baktériumfaj. Kórokozóképessége kizárólag hűvös időjárású periódusok után érvényesül. Részt vesz a kajszigutaütés betegség kialakításában, és egyes izolátumai sok lágyszárú növényt, például a paprikát is fertőzik. A 30 °C-on inkubált opportunistá patogén gazdanövényében, a paprikában a baktériumokkal közvetlen kontaktusba kerülő, extracelluláris BR-marker fehérjét azonosítottam. Az azonosított CaPOX (peroxidáz) – és CaCHI (kitináz)–markerek megjelenésével összhangban a szaprotróf *Pseudomonas fluorescens* sejttségének csökkenése és a HR-gátláson alapuló teszt is igazolta a BR kialakulását. A BR-marker-fehérjék termelődését abiotikus anyagok, úgy mint mannitol, nátrium-klorid, paraquat és hidrogén-peroxid is serkentették. Az opportunistá patogén fertőzésének következménye, hogy a BR és a HR folyamatai is elkezdődnek a növényekben. Öt °C-on még öt nappal az indukáló kezelés után sem lehetett a BR-specifikus peroxidáz- és kitináz-fehérjéket, a BR-t vagy a lassabban kialakuló HR-t kimutatni. Ezért a hidegtűrő, opportunistá kórokozónak alacsony hőmérsékleten nem kellett felvennie a harcot a növény védelmi rendszerével, azaz a kompatibilis kórokozókra jellemző módon megtelepedett a paprikaszövetben. A növények hőmérsékleti igénye tehát nem kizárólag fejlődésük szempontjából fontos, hanem védekezésük kialakulását és hatékonyságát is meghatározza.

SUMMARY

This study has highlighted the temperature dependency of basal resistance (BR), this new type of plant defence, which does not cause cell death and hypersensitive reaction (HR) at low (5 °C) and warm temperatures (20-30 °C). Basal resistance (BR) and hypersensitive reaction (HR) operate in tobacco and pepper as well as in some other model plants (e.g. *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*). BR is induced by the elicitors of non-pathogenic heat-killed and live pathogenic bacteria in the early phase of infection, whereas HR acts only against incompatible pathogens. BR has great biological significance in protecting the plants against saprophytic bacteria. At 30 °C, BR was induced in tobacco leaves within a few hours, but below 10 °C it was greatly delayed and at 5 °C usually no BR response could be detected within 2-3 days. The *tpoxNI* (peroxidase) and EBR-43 (orthometil-transferase) genes were strongly activated during the BR. The expression patterns of these BR-marker genes and the changes colony forming unit (CFU) of challenge bacteria (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*) in tobacco leaves were influenced by the temperature. These temperature-effected responses were similarly observed during HR. Cold-tolerant, opportunistic pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*P. syringae*) usually lives epiphytic on plant surface and causes apoplexy disease on apricot and “cold-weather” disease on many plants, e.g. on pepper. Plant and bacterial cells are in close connection in the apoplast. We isolated two BR-related, induced apoplast proteins from pepper plants kept at 30 °C after inoculation with *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*). The CaPOX (peroxidase) and CaCHI (chitinase) markers were weakly induced also by abiotic substances e.g. sodium-chloride, mannitol, hydrogenperoxide and paraquat. The appearance of CaPOX and CaCHI, together with the decreasing of CFU of *P. fluorescens* and the HR-inhibition test serve as evidence of BR activity in pepper. In contrast to warmer temperatures, at 5 °C neither the BR induced by *P. fluorescens* nor the HR induced by the opportunistic pathogen *P. syringae* operates in pepper plants. In these conditions *P. fluorescens* has multiplied slowly, but *in planta* multiplication of *P. syringae* was more intensive. There is no response against bacteria in plants at low temperature thus cold-tolerant pathogens can infect plants. This way low temperature also has been characterised as an inhibitory factor for both BR and HR. The optimal temperature conditions are very important in the ontogenesis and development of defence responses in plants.

MELLÉKLETEK

M.1. IRODALOMJEGYZÉK

- Abramovitch, R.B., Martin, G.B. (2004): Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 1–9. p.
- Adetuyi, F.C., Isogani, A., Giorgio, D., Ballio, A., Takemoto, J.Y. (1995): Saprophytic *Pseudomonas syringae* strain M1 of wheat produces cyclic lipodepsipeptides. *FEMS Microbiology Letters*, 131 63–65. p.
- Alfano, J. R., Collmer, A. (1997): The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology*, 179 5655–5662. p.
- Anderson, A.J. (1982): Preformed resistance mechanisms. In: Mount and Lacy (eds.), *Phytopathogenic Prokaryotes*. 119–136. p. New York, London: Academic Press 506. p.
- Baker, C.J., Atkinson, M.M., Collmer, A. (1987): Concurrent loss in Tn5 mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* of the ability to induce the hypersensitive response and host plasma membrane K⁺/H⁺ exchange in tobacco. *Phytopathology*, 77 1268–1272. p.
- Baker, C.J., Orlandi, E.W. (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 33:299–321. p.
- Ballio, A., Bossa, F., Collins, A., Gall, M., Iacobellis, N.S., Paci M., P. Pucci, Scaloni, A., Segre A., Simmacol M. (1990): Structure of syringotoxin, a bioactive metabolite of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *FEBS Letters*, 269 (2): 377–380. p.
- Barras, F., Van Gijsegem, F., Chatterjee, A.K. (1994): Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, 32 201–234. p.
- Bender C.L., Alarcon-Chaidez, F., Gross, D.C. (1999): *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63 (2) 266–292. p.
- Berchet, V., Boulanger, D., Gounot, A.M. (2000): Use gel electrophoresis for the study of enzymatic activities of cold-adapted bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 40 105–110. p.
- Besenyi, E., Ott, P.G., Bozsó, Z., Czalleng, A., Szatmári, Á., Varga, G.J., Klement, Z. (2005): Low temperature delay and inhibition of a plant defence mechanism: early basal resistance in tobacco. *Acta Phytopatologica et Entomologica Hungarica*, 40 (3-4) 323–332. p.
- Bogdanovae, A.J., Beer, S.V., Bonas, U., Boucher, C.A., Collmer, A., Coplin, D.L., Cornelis, G. R., Huang, H.-C., Hutchenson, S. W., Panopoulos, N. J., Van Gijsegem, F.. (1996): Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Microbiology*, 20 681–683. p.
- Boller, T. (1985): Induction of hydrolases as a defence reaction against pathogens. (247–262. p.) in: Key, J.L., Kosuge, T., Liss, (eds.) *Cellular and Molecular Biology of plant Stress*. New York: A.R. Inc. (nem ismert) p.
- Bollwell, G.P., Wojatszek, P. (1997): Mechanisms for generation of reactive oxygen species in plant defence – a board perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51 347–366. p.

- Bozsó, Z. (2000): Baktériumos fertőzés indukálta korai növényi védekezési reakciók és azok kölcsönhatásai. PhD értekezés. Budapest: Szent István Egyetem (jelenleg: Budapesti Corvinus Egyetem)
- Bozsó, Z., Besenyei, E., Ott, P.G., Czelleng, A., Klement, Z. (2002): Cloning and characterization of peroxidases associated with generalized defense reactions of plants against bacterial pathogens. *Acta Biologica Szegediensis*, 46 (3-4) 139-141. p.
- Bozsó, Z., Ott, P.G., Kecskés, M.L., Klement, Z. (1999): Effect of heat and cycloheximide treatment of tobacco on the ability of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp/hrmA* mutants to cause HR. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55 215-223. p.
- Bozsó, Z., Ott, P.G., Szamári, Á., Czelleng, A., Varga, G.J., Besenyei, E., Sárdi, É., Bányai, É., Klement, Z. (2005 a): Early detection of bacterium induced basal resistance in tobacco leaves with diamino-benzidine (DAB) and dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). *Journal of Phytopathology*, 153 596-607. p.
- Bozsó, Z., Szatmári, Á., Kondorosi, É., Kondorosi, Á., Klement, Z. (2005 b): Genomszintű transzkripció változások baktérium fertőzést követően kialakuló általános növényi védekezési reakció során *Medicago truncatula* növényben. 51. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest 2005. február 22-23. 39. p.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principles of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72 248-254. p.
- Brown, I.R., Trethowan, J., Kerry, M., Mansfield, J., Bolwell, G.P. (1998): Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose in papillae formed during the interactions between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant Journal*, 15 333-343. p.
- Burgyán, J., Klement, Z. (1979): Early induced selective inhibition of incompatible bacteria in tobacco plants. *Phytopathologica Mediterranea*, 18 153-161. p.
- Caruso, F.L., Caporale, C., Chilosi, G., Vacca, F., Bertini, L., Magro, P., Poerio, E., Buonocore, V. (1996): Structural and antifungal properties of a pathogenesis-related protein from wheat kernel. *Journal of Protein Chemistry* 15 35-44. p.
- Castro, M.S., Fontes, W. (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters*, 12 11-16. p.
- Cazorla, F.M., Torés, J.A., Olalla, L., Pérez-García, A., Farré, J.M., de Vicente, A. (1998): Bacterial apical necrosis of mango in southern Spain: A disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytopathology*, 88 614-620.
- Chandra-Shekara, A.C., Gupte, M., Navarre, D., Raina, S., Raina, R., Klessig, D., Kachroo, P. (2006): Light-dependent hypersensitive response and resistance signaling against Turnip Crinkle Virus in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 45 320–334. p.
- Christensen, A.B., Cho, B.H., Naesby, M., Gregersen, P.L., Brandt, J., Madriz-Ordenana, K., Collinge, D.B., Tordal-Christensen, H. (2002): The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, 3 135–144. p.
- Collmer, A. (1996): Bacterial avirulence proteins: where is the action? *Trends in Plant Science* 1 209-210. p.
- Cornelis, G.R., Wolf-Watz, H. (1997): The *Yersinia*: a bacterial system for subverting eucaryotic cells. *Molecular Biology*, 23 861-867. p.

- Costet, L., Cordelier, S., Dorey, S., Baillieul, F., Fritig, B., 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. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 12 655–662. p.
- D’Haeze, W. (2004): Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Molecular Microbiology*, 52 485-500. p.
- D’Haeze, W., Holsters, M. (2004): Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends in Microbiology*, 12 555-561. p.
- Danash, N., Wagemarkers, A.M., van Kan, J.A.L., de Wit, P.J.M.G. (1993): Molecular characterisation of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato. *Plant Molecular Biology*, 22 1017-1029. p.
- Dangl, J., Holub, E. (1997): La dolce vita: a molecular feast in plant - pathogen interactions. *Cell* 91: 17-24. p.
- De Pinto, M.C., Lavermicocca, P., Evidente, A., Corsaro, M.M., Lazzaroni, S., De Gara, L. (2003): Exopolysaccharides Produced by Plant Pathogenic Bacteria Affect Ascorbate Metabolism in *Nicotiana tabacum*. *Plant and Cell Physiology*, 44 (8) 803-810. p.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J. (1994): A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266 1247-1250. p.
- Do, H.M., Hong, J.K., Jung, H.W., Kim, S.H., Ham, J.H., Hwang, B.K. (2003): Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annum*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 16 (3) 196-205. p.
- Do, H.M., Lee, S.C., Jung, H.W., Sohn, K.H., Hwang, B.K. (2004): Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (*CADEFI*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annum*. *Plant Science*, 166 1297–1305. p.
- Fang, L., Jiang, W., Bea, W., Inouye, M. (1997): Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37 °C by mRNA stabilization. *Molecular Microbiology*, 23 355-364. p.
- Felix, G., Boller, T. (2003): Molecular sensing of bacteria in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (8) 6201–6208. p.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T. (1999): Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, 18: 265–276. p.
- Flor, H.H. (1971): Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9, 275-296. p.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1993): Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261 754-756. p.
- Gamalero, E., Lingua, G., Capri, F.G., Fusconi, A., Berta, G., Lemanceau, P. (2004): Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 48 79–87. p.

- Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inzé, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., Minkov, I. (2002): Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Science*, 59 708–714. p.
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K., Somerville, C. (1994): Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast Omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 106 1615-1621. p.
- Gomez-Gomez, L. (2004): Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Molecular Immunology*, 41 (11) 1055-1062. p.
- Gomez-Gomez, L., Boller, T. (2002): Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, 7 (6) 251-256. p.
- Gross, D.C. (1991): Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Annual Reviews of Phytopathology*, 29 247-278. p.
- Guedes, M.E., Richmond, S., Kuć, J. (1980): Induced systemic resistance to anthracnose in cucumber as influenced by the location of the inducer inoculation with *Colletotrichum lagenarium* and onset of flowering and fruiting. *Physiological Plant Pathology*, 17 229-233. p.
- Hacker, J., Kaper, J. B. (2000): Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*, 54 641-679. p.
- He, S.Y., Huang, H.C., Collmer, A. (1993): *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Harpin_{PSS} : a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, 73 1255-1266. p.
- Hettwer, U., Jaeckel, F.R., Boch, J., Meyer, M., Rudolph, K., Ullrich, M.S. (1998): Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola*. *Applied Environmental Microbiology*, 64 3180–3187. p.
- Heukeshofen, J., Dernik, R. (1985): Simplified method for silver staining of proteins in polyacrilamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6 103-112. p.
- Hevesi, M. (1986): A pszeudomonaszos levélfoltosság hazai előfordulása fűszerpaprikán és a védekezés lehetőségei. Doktori értekezés. Budapest: MTA Növényvédelmi Kutatóintézet
- Hevesi, M., Király, Z. (1977): Expression of tissue necrosis in hypersensitive plants as influenced by environmental conditions. In: Király Z. (ed.) Current Topics in Plant Pathology. 243-248. p. Budapest: Akadémiai kiadó, (nem ismert) p.
- Hevesi, M., Ledó, H.D. (1997): Expression of different degrees of resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in pepper lines. In : Rudolph, K., Burr, T.J., Manesfield, J.W., Stead, D., Vivian, A., von Kietzell, J. (eds.) *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens*. (640-644 pp.) Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers 663. p.
- Hevesi, M., Mehriar, F. F., Klement, Z. (1981): Suppression of challenge bacteria in tobacco leaves in the early and late period of induced (acquired) resistance caused by *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 16 (3-4) 355-364. p.
- Hiraga, S., Ito, H., Matsui, H., Honma, M., Ohashi, Y. (1999): cDNA sequences for two novel tobacco peroxidase isoenzymes. *Plant Physiology*, 120 1205-1207.

- Hirano, S.S., Upper, C.D. (2000): Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3) 624-653. p.
- Hong, J.K., Hwang, B.K. (2006): Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, CACHi2, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the CACHi2-overexpressing *Arabidopsis*. *Planta*, 223 (3) 433-448. p.
- Hong, J.K., Jung, H.W., Kim, Y.J., Hwang, B.K. (2000): Pepper gene encoding a basic class II chitinase is inducible by pathogen and ethephon. *Plant Science*, 159 39-49. p.
- Hong, J.K., Lee, S.C., Hwang, B.K. (2005): Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. *Gene*, 356 169-180. p.
- Huang, H.C., Schuurink, R., Denny, T.P., Atkinson, M.M., Baker, C.J., Yucel, I., Hutchenson S.W., Collmer, A. (1998): Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gene cluster that enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco plants. *Journal of Bacteriology*, 170 (10) 4748-4756. p.
- Hwang, E.W., Kim, K.A., Park, S.C., Jeong, M.J., Byun, M.O., Kwon, H.B. (2005): Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions. *Journal of Bioscience*, 30 (5) 657-667. p.
- Isenman, L., Liebow, Ch., Rothman, S. (1995): Transport of proteins across membranes - a paradigm in transition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1241 341-370. p.
- Jakobek, J.L., Lindgren, P.B. (1993): Generalised induction of defence responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive reaction. *The Plant Cell*, 5 49-56. p.
- Jakobek, J.L., Smith, J.A., Lindgren, P.B. (1993): Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell*, 5 57-63. p.
- Jenns, A., Kuć, J. (1979): Graft transmission of systemic resistance of cucumber to anthracnose induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, 69 753-756. p.
- Jin, S., Song, Y.N., Deng, W.Y., Gordon M.P., Nester E.W. (1993): The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. *Journal of Bacteriology*, 175 6830-6835. p.
- Jones, P.G., Inouye, M. (1996): RbfaA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Molecular Microbiology*, 21 1207-1218. p.
- Jones, P.G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W., Inouye, M. (1996) Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 76-80. p.
- Jung, H.W., Hwang, B.K. (2001): Pepper gene encoding a basic b-1,3-glucanase is differentially expressed in pepper tissues upon pathogen infection and ethephon or methyl jasmonate treatment. *Plant Science*, 156 23-34. p.
- Keen, N.T., Yoshikawa, M. (1983): β -1,3 endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiology*, 71 460-465. p.
- Keshavarzi, M., Soyulu, S, Brown, I., Bonas, U., Nicole, M., Rossiter, J., Mansfield, J. (2004): Basal defenses induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 17 (7) 805-815. p.

- Kim, S.H., Hong, J.K., Lee, S.C., Sohn, K.H., Jung, H.W., Hwang, B.K. (2004): CAZFP1, Cys2/His2-type zinc-finger transcription factor gene functions as a pathogen-induced early-defense gene in *Capsicum annuum*. *Plant Molecular Biology*, 55 883–904. p.
- Kim, S-Y., Kim, Y-C., Lee, J-H, Oh, S-K., Chung, E., Lee, S., Lee, Y-H., Choi, D., Park, J.M. (2005): Identification of a CaRAV1 possessing an AP2/ERF and B3 DNA-binding domain from pepper leaves infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8ra by differential display. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1729 (3) 141-146. p.
- Kim, Y. J., and Hwang, B. K. (1997): Isolation of a basic 34-kilodalton b- 1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50:103-115.
- Kim, Y.J., Hwang, B.K. (1994): Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45 195-209. p.
- Kim, Y.J., Hwang, B.K. (1996): Purification, N-terminal amino acid sequencing and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuric chloride. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 48 417-432. p.
- Kim, Y.J., Hwang, B.K. (2000): Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia Plantarum*, 108 51–60. p.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44 301–307. p.
- Király, Z., El-Zahaby, H., Galal, A., Abdou, S., Ádám, A., Barna, B., Klement, Z. (1993): Effect of free radicals on plant pathogenic bacteria and fungi and on some plant diseases. 9–19. p. In: Mózsik, Gy., Emerit, I., Fehér, J., Matkovics, B., Vincze Á. (eds.) *Oxygen free radicals, reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance and scavengers in the natural sciences*. Budapest, Hungary: Akadémia Kiadó n. p.
- Király, Z., Érsek, T., Barna, B., Ádám, A., Gullner, G. (1991): Pathophysiological aspects of plant disease resistance. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 6: 233-250. p.
- Klement, Z. (1956): A zöldbeprika baktériumos lágyrothadása. *Növénytermelés*, 5 71-76.
- Klement, Z. (1963): Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas*. *Nature*, 199 299-300. p.
- Klement, Z. (1982): Hypersensitivity. In: Mount and Lacy (eds.), *Phytopathogenic Prokaryotes*. 149-177. p. New York, London: Academic Press 506. p.
- Klement, Z. (1990): Tissue infiltration by high pressure. In: Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (eds.) *Methods in Phytobacteriology*, 103-104. p. Akadémiai kiadó, Budapest 568 p.
- Klement, Z., Bozsó, Z., Kecskés, M.L., Besenyey, E., Czalleng, A., Ott, P.G. (2003): Local early induced resistance of plants as the first line of defence against bacteria. *Pest Management Science*, 59 465-474. p.
- Klement, Z., Bozsó, Z., Ott, P.G., Kecskés, M.L., Rudolph, K. (1999): Symptomless resistant response instead of the hypersensitive reaction in tobacco after infiltration of heterologous pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Phytopathology*, 12 479-489. p.
- Klement, Z., Farkas, G., Lovrekovich, L. (1964): Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54 474–477. p.

- Klement, Z., Goodman, R.N. (1967): The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Reviews of Phytopathology*, 5 17-44. p.
- Klement, Z., Kappeler, K. (1967): *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson-nal mesterségesen fertőzött fűszerpaprika fajták és törzsek ellenállósága. 17. Növényvédelmi Tudományos Értekezlet, Budapest február 20-24.
- Klement, Z., Rozsnyay, D.S., Báló, E., Pánczél, M., Prileszky, Gy. (1984): The effect of cold on development of bacterial canker in apricot trees infected with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiological Plant Pathology*, 24 237-246 p.
- Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R. (1996): Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, 8 489-503. p.
- Korkmaz, A., Dufault, R. (2003): Short-term cyclic cold temperature stress on watermelon yield. *Horticultural Science*, 37(3) 487-489. p.
- Korkmaz, A., Dufault, R. (2004): Differential cold stress duration and frequency treatments on muskmelon and field growth and yield. *European Journal of Horticultural Science*, 69 12-20. p.
- Krishna, P., Sacco, M., Cherutti J.F., Hill, S. (1995): Cold-induced accumulation of hsp 90 transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 107 915-923. p.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., Felix, G. (2004): The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, 16 (12) 3496-3507. p.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680- 685. p.
- Lam, H-M., Hsieh, M-H., Coruzzi, G. (1998): Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16 (3): 320–334. p.
- Langrimini, L.M., Rothstein, S. (1987): Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology*, 84 438-442. p.
- Latorre, B.A., Lillo, C., Rioja, M.E. (2002): Effects of temperature, free moisture duration and inoculum concentration on infection of sweet cherry by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytoparasitica*, 410-419. p.
- Lee, S.C., Hwang, B.K. (2003): Identification of the pepper SAR8.2 gene as a molecular marker for pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Planta*, 216 387–396. p.
- Lee, S.C., Hwang, B.K. (2005): Identification and deletion analysis of the promoter of the pepper SAR8.2 gene activated by bacterial infection and abiotic stresses. *Planta*, (in press)
- Lee, S.C., Kim, Y.J., Hwang, B.K. (2001): A pathogen-induced chitin-binding protein gene from pepper: its isolation and differential expression in pepper tissues treated with pathogens, ethephon, methyl jasmonate or wounding. *Plant Cell Physiology*, 42 (12) 1321-1330. p.
- Lee, Y.K., Hwang, B.K. (1996): Differential induction and accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in the intercellular space and leaf tissues of pepper by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* infection. *Journal of Phytopathology*, 144 79-87. p.

- Lennox, E.S. (1955): Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, 1 190-206. p.
- Leyva, A., Jarillo, J.A., Salinas, J., Martinez-Zapater, J.M. (1995): Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology*, 108 39-46. p.
- Linthorst, H.J.M. (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Review of Plant Science*, 10 123-150. p.
- Linthorst, H.J.M., Meuwisse, R.L.J., Kauffmann, S., Bol, J. (1989): Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GPR and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. *The Plant Cell*, 1 285- 291. p.
- Liu, D., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1994): Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91 1888-1892. p.
- Lovrekovich, L., Farkas, G. (1965): Induced protection against wildfire disease in tobacco leaves treated with heat-killed bacteria. *Nature*, 205 823-824. p.
- Low, P., Merida, J. (1996): The oxidative burst in plant defence: Function and signal transduction. *Physiologica Plantarum*, 96 533–542. p.
- Mahajan, S., Tuteja, N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444 139-158. p.
- Malvick, D.K., Moore L.W. (1988): Population dynamics and diversity of *Pseudomonas syringae* on maple and pear trees and associated grasses. *Phytopathology*, 78 1366-1370. p.
- Mansvelt, E.L., Hattingh, M.J. (1987): *Pseudomonas syringae* associated with apple and pear buds in South Africa. *Plant Disease*, 71 789-792. p.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Boller, T. (1988): Antifungal hydrolases in pea tissue. 2. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3 glucanase. *Plant Physiology*, 88 936-942. p.
- Menezes, H., Jared, C. (2002): Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132 1–7. p.
- Newman, M.A., von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M.J., Dow, J.M. (2002): Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria *The Plant Journal*, 29 (4) 487-495. p.
- Novacky, A., Acedo, G., Goodman, R.N. (1973): Prevention of bacterially induced hypersensitive reaction by living bacteria. *Physiological Plant Pathology*, 3 133-136. p.
- Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H. (2000): Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 42 479-488. p.
- Orozco-Cardenas, M., Ryan, C.A. (1999): Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96 6553–6557. p.
- Ott P. (2002): A korai indukált rezisztencia (EIR) és a hiperszenzitív reakció (HR) növényben lezajló folyamatának és kölcsönhatásainak jellemzése. PhD értekezés. Budapest: Szent István Egyetem (jelenleg: Budapesti Corvinus Egyetem)

- Ott, P. G., Varga, G. J., Szatmári, Á., Bozsó, Z., Klement, É., Medzihradzky, K. F., Besenyei, E., Czelleng, A., Klement, Z. (2006): Novel extracellular chitinases rapidly and specifically induced by general bacterial elicitors and suppressed by virulent bacteria as a marker of early basal resistance in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 19 (2) 161-172. p.
- Panoff, J.M., Thammavongs, B., Gueguen, M., Boutibonnes, P. (1998): Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cyrobiology*, 36 75-83. p.
- Penaloza-Vazquez, A., Kidambi S.P., Chakrabarty A.M., Bender C.L. (1997): Characterization of the alginate biosynthetic gene cluster in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Journal of Bacteriology*, 179 4464-4472. p.
- Peng, M., Kuć, J. (1992): Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*, 82 696-699. p.
- Perombelon, M.C.M., Kelman, A. (1980): Ecology of the soft - rot *Erwinias*. *Annual Reviews of Phytopathology*, 18 361-387. p.
- Pirone, P.P. (1978): Diseases and pests of ornamental plants, 5th ed. New York: John Wiley & sons. n. p.
- Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Sela-Buurlage, M.B., van den Elzen, P.J.M., Melchers, L.S., Cornelissen, B.J.C. (1994): A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiology*, 104 109-118. p.
- Riffaud, CM.H, Glaux, C., Guilbaud, C., Domoniguez, H., Prior, P., Morris, C.E. (2003): Epidemiological clues for developing methods of control of bacterial blight of cantaloupe caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. In: *Pseudomonas syringae and Related Pathogens, Biology and Genetic*. 3-15. p. London/Boston/New York: Kluwer Academic Publishers 708. p.
- Romero, A.M., Kousik, C.S., Ritchie, D.F. (2002): Temperature sensitivity of the hypersensitive response of bell pepper to *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 92 197-203. p.
- Rosquist, R., Magnusson, K.-E., Wolf-Watz, H. (1994): Target cell contrast triggers expression and polarised transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO Journals*, 13 964-962. p.
- Ross, A.F. (1961): Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, 14 340-358. p.
- Rudolph, K. (1990): Plate count technique. In: Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (eds.): *Methods in Phyto bacteriology*. 99. p. Budapest: Akadémiai Kiadó 568 p.
- Ryals, J., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. and Hunt, M. D. (1996): Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8 1809-1819. p.
- Sakamoto, T., Bryant, D:A. (1997): Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Molecular Microbiology*, 23 1281-1292. p.
- Sander mann, H., Ernst, D., Heller, W., Langebartels, C. (1998): Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science*, 3 47-50. p.
- Sands, D.C., Schroth, M.N., Hildebrand D.C. (1970): Taxonomy of phytopathogenic *Pseudomonads*. *Journal of Bacteriology*, 101 9-23. p.

- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U., Boller, T. (1986): Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, 324 365-367. p.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68 850-858. p.
- Smirnova, A., Li, H., Weingart, H., Aufhammer, S., Burse, A., Finis, K., Schenk, A., Ullrich, M.S. (2001): Thermoregulated expression of virulence factors in plant associated bacteria. *Archives of Microbiology*, 176 393-399. p.
- Somlyai, G., Hevesi, M., Bánfalvi, Zs., Klement, Z., Kondorosi, Á. (1986): Isolation and characterisation of non-pathogenic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* induced by Tn5 transposon insertions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 29 369-380. p.
- Stead, D.E. (1990): Preservation of bacteria. In: Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (eds.): *Methods in Phytobacteriology*. 275-278. p. Budapest: Akadémiai Kiadó 568. p.
- Strobel, N.E., Kuć, J. (1995): Chemical and biological inducers of systemic resistance to pathogens protect cucumber and tobacco plants from damage caused by paraquat and cupric chloride. *Phytopathology*, 85 1306-1310. p.
- Süle, S., Klement, Z. (1971): Effect of high temperature and the age of bacteria on the hypersensitive reaction of tobacco. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 6 119-122. p.
- Süle, S., Seemüller, E. (1987): The role of ice formation in the infection of sour cherry leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytopathology*, 77 173-177. p.
- Szatmari, Á., Ott, P.G., Varga, G.J., Besenyi, E., Czelleng, A., Klement, Z., Bozsó, Z. (2006): Characterisation of basal resistance (BR) by expression patterns of newly isolated representative genes in tobacco. *Plant Cell Reports*, 25 (7) 728-740. p.
- Szittyá, Gy., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, Á., Lakatos, L., Bánfalvi, Zs., Burgyán J. (2003): Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO Journal*, 22 (3) 633-640. p.
- Thomashow, M.F. (1998): Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiology*, 118 1-8.
- Trudel, J., Audy, P., Asselin, A. (1989): Electrophoretic forms of chitinase activity in Xanthi-nc tobacco healthy and infected with tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2 (6) 315-234. p.
- van Breugsegem, F., Slooten, L., Stassart, J.M., Botterman, J., Moens, T., van Montagu, M., Inze, D. (1999): Effect of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 50 71-78. p.
- Van der Biezen, E. A., Jones, J. D.. (1998): Plant disease-resistance proteins and the gene-for gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, 23 454-456. p.
- van Dijk, K., Fouts, D.E., Rehm, A.H., Hill, A.R., Collmer, A., Alfano, J.R. (1999): The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (Type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner. *Journal of Bacteriology*, 181 1790-1797. p.
- Van Dijk, K., Tam, V.C., Records, A.R., Petnicki-Ocwieja, T., Alfano, J.R. (2002): The ShcA protein is a molecular chaperone that assists in the secretion of the HopPsyA effector from the type III (Hrp) protein secretion system of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Microbiology*, 44(6) 1469-1481. p.

- van Loon, L.C. (1997): Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103 753-765. p.
- van Loon, L.C., Strien, E.A. (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55 85-97. p.
- van Loon, L.C., van Kammen, A. (1970): Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN. *Virology* 40: 199-211. p.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.P., Ryals, J.A. (1991): Coordinate gene activity response to agents that induced systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 3 1085-1094. p.
- Wäspi, U., Blanc, D., Winkler, T., Rüedi, P., Dudler R. (1998): Syringolin, a novel peptide elicitor from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that induces resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 11 (8) 727-733. p.
- Wei, Z.M., Sneath, B.J., Beer, S.V. (1992): Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. *Journal of Bacteriology*, 174 1875-1882. p.
- Zacheo, G., Belve-Zacheo, T., Pacoda, D., Orlando, C., Durbin, R.D. (1995): The association between heat-induced susceptibility of tomato to *Meloidogyne incognita* and peroxidase activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46 491-507. p.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Tisztelettel és szeretettel emlékszem Klement Zoltán Professzor Úrra, akitől témavezetőként ezt a nagyon érdekes és izgalmas feladatot kaptam. Hálával tartozom neki, mert a munka teljes időszakára megteremtette a szükséges szellemi és anyagi háttérrel, valamint töretlenül hitt abban, hogy képes vagyok elérni a kitűzött céljainkat.

Köszönetemet szeretném kifejezni a bakteriológiai csoport tagjainak, legközelebbi munkatársaimnak: Bozsó Zoltánnak, Czalleng Arnoldnak, Ott Péternek, Szabó Erikának, Szatmári Ágnesnek és Varga Gabriellának. Munkám során lehetőségeikhez mérten szakmai és emberi téren is a segítségemre voltak. Bízom benne, hogy az együtt eltöltött évek alatt munkatársakból barátokká váltunk.

Köszönet illeti jelenlegi témavezetőimet, Barna Balázst és Palkovics Lászlót és az MTA Növényvédelmi Kutatóintézet vezetőségét és munkatársait, különösen az utolsó egy év során nyújtott támogatásukért.

Végezetül, de nem utolsó sorban az egész családomnak, különösen Szüleimnek, Bátyámnak és Férjemnek tartozom hálával, akik végig mellettem álltak, kitartásra biztattak a nehéz pillanatokban. Remélem, hogy büszkén olvasták ezt a munkát és érzik, hogy Nekik is részük volt benne.