

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

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

Doktori értekezés tézisei

Besenyei Eszter



Budapest, 2006

A doktori iskola megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési, kertészeti

vezetője: Dr. Papp János
egyetemi tanár, DSc
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM,
Kertészettudományi Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Klement Zoltán[†]
kutató professzor, MHAS
MTA, NÖVÉNYVÉDELMI KUTATÓINTÉZET

Témavezető: Dr. Barna Balázs
tudományos igazgató helyettes, DSc
MTA, NÖVÉNYVÉDELMI KUTATÓINTÉZET

Témavezető: Dr. Palkovics László
tanszékvezető, 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

.....
A témacsoport vezető jóváhagyása
Dr. Mészáros Zoltán

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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

Egy újonnan leírt, sejthalált nem okozó védekezés kialakulását tanulmányoztam alacsony (5 °C) és magas (20–30 °C) hőmérsékleten. Az elmúlt évtizedekben sokat vizsgált kórokozó baktériumok által kiváltott hiperszenzitív reakció (HR) mellett, az általános elicitorok (flagellin, peptidoglükán, Csp hideg-sokk fehérje, EF-TU elongációs faktor) által indukált rezisztenciát (basal resistance, BR) (Lovrekovich és Farkas 1965, Burgyán és Klement 1979) napjainkig a következő növényekben írták le (Gomez-Gomez 2004): *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* és *Capsicum annum*. A legtöbb közölt adat dohánynövényekkel kapcsolatos vizsgálatokból származik. A BR-t szaprotróf baktériumok mellett a hővel előlt kórokozók, *hrp* mutánsok és az inkompatibilis kórokozók elicitor-molekulái is aktiválják. Ezen a tényen alapult a feltételezés, hogy az általános védekezés korlátozza a növényi szövetbe került, szaprotróf baktériumok szaporodását. A növénykórtani mikológiában elterjedt szaprotróf megnevezést a bakteriológiában eddig szokásos szaprofiton / szaprofita fogalom szinonimjaként alkalmazom. A szaprotróf szervezetek az élettelen szerves anyagok lebontásából nyernek energiát. A BR dohányban néhány óra alatt kialakul, majd ezt követően 6–7 napig marad aktív. Két részre, egy korai és egy késői szakaszra tagolható. A BR makroszkópikus szinten tünetmentes folyamat, ezért csak közvetett módon mutatható ki. Erre alkalmas módszer egy második fertőzés lokális gátlása, vagy a HR-nekrózis elmaradása. A HR-gátlás jelensége az inkompatibilis kórokozó III. típusú szekréciós rendszerének és szaporodásának gátlása miatt következik be (Klement et al. 2003, Ott et al. 2006). Az extracelluláris térben, ahol a szövetbe jutott baktérium- és növénysejtek közvetlen fizikai kapcsolata létrejön, a BR működésének következtében számos fiziológiai változás következik be. A sejten kívül egyrészt a hidrogén-peroxid felhalmozódása figyelhető meg, továbbá újonnan indukálódott peroxidáz-, illetve kitináz-izoenzimek jelennek meg, másrészt a növényi sejtfalak szerkezetét erősítő, és a toxikus anyagok semlegesítését biztosító sejten kívüli és sejten belüli folyamatok is aktiválódtak (Bozsó 2000, Bozsó et al. 2005a, Ott 2002, Ott et al. 2006, Szatmári et al. 2006). A gazdanövényre specializálódott (kompatibilis) kórokozó előlt formája aktiválja az általános védekezést, az azonos élő patogén viszont annak ellenére, hogy hordozza a rá jellemző, általános elicitorokat, már a védekezés korai szakaszában (korai általános rezisztencia, EBR) visszaszorítja a BR-t (Keshvarzi et al. 2004, Ott et al. 2006).

A gazdanövények alacsony hőmérsékleten történő rövid idejű inkubációja elősegíti az opportunistá patogén *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*P. syringae*) kolonizációját. Az opportunistá patogének azok az „alkalomra váró”, polivirulens kórokozók, melyek ideális körülmények között nem károsítják gazdanövényeiket, de adott, a növényeket gyengítő tényezőket kihasználva már súlyos betegséget okoznak gazdaszervezeteiknek. A *P. syringae* opportunistá kórokozó hidegtűrő, 5 °C-on általában sikeresen fertőzi gazdanövényeit, 25–30 °C hőmérsékleten viszont nem okoz betegséget (Hevesi 1986). Vajon ezt a jelenséget magyarázhatja az általános védekezés vagy esetleg a hiperszenzitív reakció működése? Jelenleg kevés az információ a növényi védekezések működésének hőmérsékleti feltételeiről.

A hőmérséklet csökkenése mindamellett, hogy a növények védekezőképességét befolyásolja, számos élettani változást is okoz. Növeli a sejtek membránjában a telítetlen zsírsavak arányát, megváltoztatja a sejtek szénhidrátforgalmát, valamint poliaminok és chaperonok termelését váltja ki, melyek bizonyos fehérjék szerkezetét óvják a denaturálódástól (Mahajan és Tuteja 2005).

Célkitűzések

Az értekezés témája egyrészt a hőmérséklet – mint a növények fiziológiai állapotát meghatározó egyik legfontosabb élettelen tényező – hatásának vizsgálata az általános rezisztencia működésére. Másrészt a szaprotróf *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) és az opportunistá patogén *P. syringae* baktérium által a paprikanövények szöveteiben 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 (HR) dohánynövényekben. A tüneti vizsgálatok eredményeit a baktériumszaporodás mértékével és a növényi markergének kifejeződésével támasztom alá, majd paprikanövényeken 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 nem tisztázott. A szaprotróf *P. fluorescens*, a széles gazdanövénykörrel rendelkező, opportunista *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 és 2214 izolátumok, továbbá a szűk gazdakörű valódi patogén *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* S 21 baktériumok szaporodását nyomon követve vizsgálom az általános védekezés és a hiperszenzitív reakció sejtszámukra gyakorolt hatását.
- A tünetek kifejlődésének tanulmányozása mellett, a BR aktivitásával párhuzamba állítható jelző- (marker) fehérjék kimutatására és azonosítására törekszem. A markereket a baktériumokkal közvetlen fizikai kapcsolatot létesítő paprika apoplaszt fehérjék között keresem. A BR-marker jelöltek specifikusságának megítéléséhez ismerni kell a hőmérséklet és a fény hatását a jelzőfehérjék megjelenésére, hiszen a magas hőmérséklet gyorsítja, a növények sötétben tartása viszont gátolja a BR működését. Elemezni kívánom továbbá, hogy egyes aktivátorok, azaz a jelátviteli folyamatokban résztvevő hormonok, vagy abiotikus stresszt okozó vegyületek befolyásolják-e a markerjelöltek megjelenését.
- A specifikus BR-markerek lehetővé teszik az általános védekezés biztos kimutatását paprikában. Segítségükkel több információ nyerhető a növényi védekezési mechanizmusok szerepéről a hidegtűrő és opportunista patogén *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* vagy a szaprotróf *Pseudomonas fluorescens* baktérium és a paprikanövények kölcsönhatásában.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Élő anyagok

A kísérletekben dohány-, bab- és paprikanövényeket alkalmaztam. A BR-t hővel elölt, kórokozó *Pseudomonas* fajok vagy szaprotróf *P. fluorescens* szuszpenziójával, a HR-t élő, kórokozó *Pseudomonasok*-kal indukáltam. Két kompatibilis kapcsolat is szerepelt a kísérletek során, az egyik a bab és kórokozója, a *Pseudomonas. savastanoi pv. phaseolicola*, a másik a paprika és kórokozója, a *Xanthomonas vesicatoria* kölcsönhatása. A baktériumokat King B (King 1954) vagy LB táptalajon (Lennox 1955) tartottam fenn. A kísérletek környezeti feltételeit a KLT/04 (Ehret GmbH., Németország) növénynevelő kamra biztosította. A növények fertőzése injekciós fecskendővel vagy a levelek sejtközötti járatainak magas nyomású telítésével történt.

2.2. A BR kialakulásának és a HR-indukciós idejének meghatározása

A HR-indukciós idejét a baktériumok utólagos antibiotikus elölésével határoztam meg, azaz a fertőzött levélrészeket a fertőzés után különböző, egymást 30 perccel követő időpontokban klóramfenikollal injektáltam. A HR-indukciós ideje az utolsó olyan antibiotikus kezelés időpontja, ahol a HR még nem alakult ki (Klement és Goodmann 1967). Hasonló kísérleti rendszerben határozható meg a BR kialakulási ideje is. A BR-t kiváltó előkezelés hővel-elölt baktériumok szuszpenziójával történt, majd a HR-t okozó második fertőzés különböző, egymást 30 perccel követő időpontokban érte az előkezelt levélszövet-részeket. A BR mérhető kialakulási ideje az előkezelés és az első olyan felülfertőzés között eltelt idő, ahol a HR már nem jelent meg (Klement et al. 1999).

2.3. Az *in vitro* és *in planta* baktériumszaporodás mérése

A táptalajon kolóniát képző baktériumsejtek számát 5 ml King B táptalajból vagy megközelítőleg 5 cm² fertőzött növényi szövetből kiindulva határoztam meg. A kiindulási anyagból hígítási sort készítettem. A hígított anyagot szilárd táptalajon szélesztettem, majd az ott képződött kolóniák számának és a hígítás mértékének ismeretében számítottam ki a kiindulási anyag baktériumkoncentrációját (Rudolph 1990).

2.4. Fehérje-vizsgálati módszerek

Vákuum-infiltrálás után a vízzel telített szövetrészek centrifugálásával jutottam a paprika apoplastjának híg vizes oldatához (intercellular washing fluid, IWF). Az IWF-ben található fehérjéket egy- és kétdimenziós PAGE-módszerrel választottuk el (Lamelli 1970), Bio-Rad gélelektroforézis-rendszert alkalmazva. A markereket ezüst-festéssel, peroxidáz- és kitinázenzimek gélben kimutatható aktivitásával határoztam meg (Heukeshofen és Dernick 1985, Shevchenko et al. 1996, Kim és Hwang 1994, Zaecho et al. 1995). A markerek azonosítása LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry) tömegspektrometriai eljárással történt.

2.5. Növény genomikai vizsgálati módszerek

A BR-markergének kifejeződési mintázatának meghatározásához izoláltam a vizsgált szövetrész teljes RNS tartalmát, majd az RNS-ről cDNS-szekvenciákat állítottam elő. A cDNS mintákból kiindulva a markergénekre tervezett specifikus primerekkel valósídejű PCR-reakcióban mutattam ki a gének aktiválódásának relatív erősségét.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Az alacsony hőmérséklet hatása a BR és a HR működésére

Az 5–30 °C között inkubált dohányokban két, eltérő hidegtűrő-képességű baktériumfaj (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61, *P. syringae* 61; *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* S21, *P. phaseolicola* S21) összehasonlítására épülő kísérleti rendszert állítottam fel a védekezési reakciók működésének tanulmányozására (1. táblázat).

Figyelemre méltó volt, hogy a HR megjelenése a kórokozó *Pseudomonas*-ok többségénél 20 °C-on 10-12 óra, 5 °C-on viszont már nem órákat, hanem több napot igényelt. A *P. syringae* 61 levélszövetbe injektálása után 3-4 nappal és a *P. phaseolicola* S21 injektálása után 5-7 nappal jelent meg a szövetelhalás. A nekrozis későbbi megjelenésének az elhúzódó indukciós és látens fázis is okozója volt. Az alacsony hőmérsékleten a baktériumok hidegtűrő képességétől függően növekedett a HR-indukciós idő hossza. A *P. phaseolicola* S21 izolátumé jóval erősebben, mint a *P. syringae* 61-é. Ez döntő jelentőségű abból a szempontból, hogy a növény-baktérium kölcsönhatás végén melyik védekezési mechanizmus érvényesül. A BR kialakulási ideje mindaddig az előkezelés és az első olyan HR-t indukáló felülfertőzés között eltelt időt jelentette, amikor a BR hatására a HR már nem alakult ki.

Klement et al. (2003) és Bozsó et al. (1999) közleményéből kiderült, hogy a BR gátolja a kórokozók patogenitásért felelős *hrp* génjeinek aktivitását, azaz a BR a HR-t annak indukciós fázisában képes gátolni. Az alacsony hőmérséklet eltérő mértékben hosszabbította meg a BR kialakulásánál mérhető előkezelés és a felülfertőzés között eltelt időt. Ezt az időtartamot ugyanis jelentősen befolyásolták a felülfertőző baktériumok sajátosságai. A fenti eredmények tükrében célszerűnek tartottam, hogy a BR mérhető kialakulási idejét (BR_{det}) a felülfertőző baktérium HR-indukciós idejével korrigálni (BR_{total}) (1. 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. Az alacsony hőmérséklet így jelentősen meghosszabbította a kialakulási időt, amit hővel előlt *P. syringae* 61 vagy *P. phaseolicola* S21 szuszpenziókkal indukáltam. A BR kialakulási ideje dohányban tehát mindkét kombinációban közel azonos volt (1. táblázat).

A *tpoxNI* gént eredetileg TMV-vel fertőzött dohánylevelekből azonosították, majd Bozsó et al. (2002) a BR-t jelző géneként is leírták. Az

EBR-43 egy ortometil-transzferáz enzimet kódoló, a BR működését jelző dohánygén, mely a sejtfalakat erősítő lignin szintézisében vesz részt (Szatmári et al. 2006). A *tpoxNI* és az *EBR-43* BR markergének átíródása transzkripció szempontból 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 különböző védekezési mechanizmus felépítése során (Bozsó et al. 2002).

1. 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 valódi kialakulási ideje az előkezelés és a felülfertőzés között eltelt idő, valamint a detektáló baktérium HR-indukciós idejének összege. 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)

A BR és a HR hatékonysága jellemezhető a hővel előlt baktérium-szuszpenzióval vagy vízzel előkezelt dohány leveleibe felülfertőzőként injektált inkompatibilis baktériumtörzsek szaporodásával is. A HR folyamatának végső lépéseiben a baktériumok sejtszáma a szövetelhalás megjelenésével párhuzamosan csökken (Bozsó et al. 1999, Klement et al. 1999). 20 °C-on ez 10-12 óra alatt mindkét vizsgált izolátumnál bekövetkezett. Az 5 °C-on inkubált *P. syringae* 61 vagy *P. phaseolicola* S 21 szuszpenzióval infiltrált növényeken a kezelést követő két napon a levélszövetből kitenyészthető baktériumok száma sem változott. A HR tehát nem alakult ki és nem csökkentette a kórokozó baktériumsejtek számát sem. 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. A hővel előlt baktériummal aktivált BR független a HR-től. A BR-nek 20 °C-on baktériumszámot csökkentő hatása volt, de nem olyan radikális mértékű, mint amit a HR esetében tapasztaltam. A *P. syringae* 61 sokkal érzékenyebb volt a BR-rel szemben, mert sejtszámát a BR az összes célzott vizsgálat során erősebben – mintegy tizedére – szorította vissza, mint a *P. phaseolicola* S 21 törzs esetében. 0 °C-on az indukciót követő 2–2,5 nap alatt sem a HR, sem a BR baktériumszaporodást gátló hatása nem érvényesült. Ez azt jelenti, hogy a növényeknek alacsony hőmérsékleten az általunk vizsgált aktív védelem, BR és HR nélkül kell szembenézniük a kórokozó és nem kórokozó baktériumok kolonizációs törekvéseivel.

3.2. A paprikanövényekben azonosított CaPOX CaCHI BR–markerek. A BR és a HR szerepe a hidegtűrő opportunistá patogén és a szaprotróf baktériumok kolonizációs törekvéseiben.

A BR a dohányhoz hasonlóan paprika teszt növényekben is működik, kialakulása azonban lassabb. A dohány növényeken tapasztaltakhoz hasonlóan a sötétben inkubált növényekben csak a BR korai szakaszát lehetett kimutatni, alacsony hőmérsékleten pedig a BR nem alakult ki. A magas vagy az alacsony hőmérsékleten mért HR kialakulásában a dohány teszt növényekhez képest semmilyen mérhető különbséget nem tapasztaltam.

A *P. fluorescens*, *P. syringae* 61 és a *P. phaseolicola* S21 baktériumok szaporodását saját gazdanövényükben (paprika, bab) összevettem a BR és a HR kialakulásának lehetőségével alacsony és magas hőmérsékleten. A szaprotróf baktérium (*P. fluorescens*) aktiválta a BR-t paprikában, viszont betegséget nem okozott és a HR kiváltására sem volt képes. *In vitro* és paprikában mért szaporodásgörbéje 5 és 30 °C-on mégis, hasonló lefutású volt az opportunistá patogén *P. syringae* 61 szaporodásmenetével. Ez egyrészt a két baktériumtörzs hasonló mértékű hidegtűrő-képességére utal. Másrészt alátámasztja azt az elképzelést, hogy a teszt növények védekezése (BR és/vagy HR) 30 °C-on gyorsan kialakult és korlátozta az opportunisták és a szaprotrófok szaporodását is. 0 °C-on viszont, sem a BR-t, sem a HR-t nem lehetett kimutatni, azaz a paprikanövények nem védekeztek a sejtközötti járataikba került baktériumsejtekkel szemben. A növények védtelen helyzetét viszont az opportunistá patogén baktérium sokkal jobban a saját hasznára, szaporodásának elősegítésére fordította, mint a szaprotróf. A fent említett fajokkal ellentétben a *P. phaseolicola* S21 szaporodását, így

betegségokozó képességét saját babgazanövényében gátolta az alacsony inkubációs hőmérséklet.

A HR-gátlás mint tünet, és az *in planta* baktériumsejtszám-csökkenés mellett a BR leírásának harmadik pillére az aktivációt követően a paprika apoplasztban indukálódó markerfehérjék meghatározása volt. A magas hőmérsékleten gyorsan kialakuló BR működésével párhuzamosan két markerfehérjét azonosítottam. Az egyik kitináz-, a másik peroxidáz-aktivitású izoenzim volt (2. és 3. táblázat). Alacsony inkubációs hőmérsékleten ezek a markerek nem jelentek meg. Számos a BR szempontjából dohányban meghatározó kezelés elvégzésével győződtem meg a BR-markerek indukciójának specifikusságáról (4. táblázat).

3.3. A dolgozatban szereplő új tudományos eredmények

- 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.
- A hőmérséklet-csökkenés hatására károsodott a dohánynövények aktív védekezőképessége (BR, HR). Az 5 °C-on inkubált dohánynövények a fertőzést követő 72 órában az aktív védekezés eszközei nélkül állnak a baktériumok kolonizációs törekvéseivel szemben.
- A BR lassabban alakult ki paprikában, mint a dohánynövényekben, de a hőmérséklet és a fény hatása az általános védekezésre mindkét tesztnövényben hasonló volt.
- Az indukáló szaprotróf baktérium hatására megjelenő vagy erősebben kifejeződő BR-t jelző fehérjéket mutattam ki az injektált levelek sejtközötti járataiból. Az indukált CaPOX és CaCHI markerfehérjék peroxidáz-, illetve kitináz-aktivitást mutattak.
- Alacsony hőmérsékleten (5 °C) az aktív védekezési rendszer hiánya tette védtelenné a növényeket a hidegtűrő kórokozó szaporodásával, a betegségokozó-képesség egyik feltételével szemben.

2. 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

3. 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. Táblázat. A CaPOX és CaCHI paprikából származó markerfehérjék termelődése és a BR kialakulása eltérő indukciós feltételek között.

Kezelés	aktiválódott		
	BR	CaPOX	CaCHI
víz	-	+	+
hővel elölt <i>P. syringae</i> 61	+	+++	+++
<i>P. fluorescens</i>	+	+++	+++
<i>P. tabaci</i>	0	+++	+++
<i>P. pisi</i>	0	+++	+++
<i>X. vesicatoria</i>	-	-	-
mannitol	-	+	-
nátrium-klorid	-	+	-
paraquat	-	+	-
hidrogén-peroxid	-	+	-
szalicilsav	-	-	+
jázmonsav	-	-	-
etilén	-	-	+
BR+inkubációs hőm. 30 °C	+	+++	+++
BR+inkubációs hőm. 5 °C	-	-	-
BR +inkubáció folyamatos megvilágítással (72 óra)	+	+++	+++
BR+inkubáció folyamatos sötétben (72 óra)	-	++	-

-: nem termelődik/működik, +: gyengén, ++: közepesen, +++:erősen termelődik/működik

0: a gyorsabban indukálódott HR miatt a BR-t nem lehetett kimutatni

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

E munka megvalósítása előtt Klement et al. (1999, 2003) 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 védekezés működése védi meg a növényeket attól, hogy a felületükön epifiton módon állandóan jelen lévő szaprotróf baktériumok táplálékává váljanak.

A hőmérséklet fokozatos csökkenése hátráltatta a dohányban mért 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 indukációs hőmérsékleten a tenyésztendő baktériumsejtek számának és a specifikus BR–marker gének indukációjának meghatározásával támasztottam alá az 5 °C-on, a BR és HR működésképtelenségére utaló tüneti, a HR-gátlás elvén alapuló kísérleteket. A 20 °C-on inkubált pozitív kontrollal szemben 5 °C-on sem a védekezési reakciók baktériumszám-csökkentő hatását, sem a *tpoxNI*, peroxidáz sem az *EBR-43*, ortometil-transzferáz markergének átíródási szintjének emelkedését nem tapasztaltam. Így több oldalról is igazolt az a feltevés, hogy 5 °C-on a kísérletben szerepelt dohány növények védtelenek voltak a baktériumok fertőzésével szemben.

A dohányhoz hasonlóan a BR és a HR paprikában is kialakul 30 °C-on, viszont a BR paprikában sokkal lassabban lépett működésbe, mint a dohányban. Mindkét növényre következetesen jellemző volt, hogy 5 °C-on napokkal az indukáló kezelés után sem mutathatók ki a vizsgált védekezési reakciók.

Az extracelluláris térbe kiválasztott növényi fehérjék közvetlen fizikai kapcsolatba kerülnek az ott élő, élni próbáló baktériumsejtekkel. A BR indukációjával összhangban két extracelluláris eredetű, aktiválódott paprikaenzim egy-egy izoformáját sikerült kimutatni, majd tömegspektrometriai analízissel azonosítani. A CaPOX szelektív festés alapján egy peroxidáz–enzim, mely két, az NCBI adatbázisban AF442386.1 illetve AJ810540.1 kódszámon szereplő peroxidáz génhez közel azonos mértékben hasonlított. A CaCHI fehérjét négy kitináz–izoenzim bármilyen összetételű és mennyiségű kombinációja alkothatja. A markerek megjelenését többféle környezeti tényező és indukáló anyag hatásán tesztelve arra a következtetésre jutottam, hogy specifikusan, a BR kialakulásával összehangoltan jelennek meg. Indukációjukat a sötét

környezet vagy az alacsony hőmérsékletű inkubáció éppen úgy akadályozza, mint a BR kialakulását.

A szaprotróf baktérium szaporodását 30 °C-on a BR, az opportunistáét 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 szembenéznük. Ez a tény, továbbá az, hogy az alacsony hőmérsékletnek kitett növényekben növekszik a tápanyagforrásként szolgáló, extracelluláris szénhidrátartalom, valamint az, hogy hidegtűrő, azaz 5 °C-on is növekedni képes baktériumokat vizsgáltam, együttesen segítették a *P. syringae* és a *P. fluorescens* kolonizációját.

A paprikanövényekben meghatározott 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 kizárólag 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. 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.

5. IRODALOMJEGYZÉK

- 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., 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., Besenyi, 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.
- Burgyán, J., Klement, Z. (1979): Early induced selective inhibition of incompatible bacteria in tobacco plants. *Phytopathologica Mediterranea*, 18 153-161. 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.
- 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.
- Gomez-Gomez, L. (2004): Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Molecular Immunology*, 41 (11) 1055-1062. 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
- 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.
- 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, 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.

King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44 301-307. p.

Klement, Z., Bozsó, Z., Kecskés, M. L., Besenyei, 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., Goodman, R.N. (1967): The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Reviews of Phytopathology*, 5 17-44. p.

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 680- 685. p.

Lennox, E.S. (1955): Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, 1 190-206. p.

Ott, P. (2002): A korai indukált rezisztencia (EIR) és a hiperszenzitív reakció (HR) növényben lezajló folyamatok 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., Czalleng, 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

Rudolph, K. (1990): Plate count technique. In: Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (eds.): *Methods in Phytobacteriology*. 99. p. Budapest: Akadémiai Kiadó 568 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.

Szatmári, Á., Ott, P.G., Varga, G.J., Besenyei, E., Czalleng, 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.

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.

**6. A SZERZŐNEK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ
PUBLIKÁCIÓI**

- Besenyei, E., Hevesi, M. (2003): A *Pseudomonas savastanoi* pv. *forsythiae* pv. nov. szövetburjánzás betegséget okozó baktérium jellemzése. *Növényvédelem*, 39 (3) 123-128.
- Besenyei, E., Ott, P.G., Bozsó, Z., Czelleng, 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 Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 40 (3-4) 323-332.
- Besenyei, E., Szabó, E., Szatmári, Á., Bozsó, Z., Kondorosi, É., Medzihradzky, K.F., Csorba, A., Ott, P.G. (2006): Extracellular factors of early basal resistance induced against bacteria. *IOBC Bulletin* (Közlésre elfogadva)
- 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.
- Klement, Z., Bozsó, Z., Kecskés, M.L., Besenyei, E., Czelleng, A., Ott, P.G. (2003): Local early induced resistance of plants as the first line of defence against bacteria. *Pest Management Science*, 59 (4) 465-474. If: 0,642.
- Czelleng, A., Bozsó, Z., Ott, P.G., Besenyei, E., Varga, G.J., Szatmári, Á., Hafez, Y.M., Klement, Z. (2004): Isolation of in planta- induced genes of *Pseudomonas viridiflava*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 39 361-375.
- Bozsó, Z., Ott, P.G., Szatmári, Á., Czelleng, A., Varga, G.J., Besenyei, E., Sárdi, É., Bányai, É., Klement, Z. (2005): 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. If: 0,575.
- Ott, P.G., Varga, G.J., Szatmári, Á., Bozsó, Z., Klement, É., Medzihradzky, F.K., 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. If: 3,580.
- Szatmári, Á., Ott, P.G., Varga, G.J., Besenyei, 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. If: 1,457.

Szabó, E., Klement, É., Medzihradzky, K.F., Varga, G.J., Besenyi, E., Ott, P.G. (2006): Changes of apoplast protein composition during early basal resistance (EBR) in tobacco. *Cereal Research Communication*, 34 (1) 677-680. If: 0,157.

Czelleng, A., Bozsó, Z., Ott, P.G., Besenyi, E., Varga, G.J., Szatmári, Á., Király, L., Klement, Z. (2006): Identification of virulence-associated genes of *Pseudomonas viridiflava* activated during infection by use of a novel IVET promoter probing plasmid. *Current Microbiology*, 52 (4) 282-286. If: 1,075.

Ott, P.G., Varga, G.J., Szatmári, Á., Bozsó, Z., Besenyi, E., Czelleng, A., Szabó, E. (2006): Basal resistance of plants: from discovery to molecular characterisation. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 41 37-46.

KONFERENCIAKIADVÁNYOK:

Full paper (proceedings), magyar vagy idegen nyelvű:

Klement, Z., Bozsó, Z., Besenyi, E., Czelleng, A., Kecskés, M.L., Ott, P.G. (2003): Early induced resistance, a general, symptomless plant response to bacteria. (pp. 301-309.) In: Iacobellis NS. et al. (eds.) *Pseudomonas syringae* and related pathogens, Biology and Genetics. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston/London (708 p.)

ABSTRACT (ÖSSZEFOGLALÓ), MAGYAR– VAGY IDEGENNYELVŰ:

Besenyi, E., Hevesi, M. (2002): A Magyarországon előforduló, szövetburjánzást okozó *Pseudomonas savastanoi* baktérium jellemzése. 48. Növényvédelmi Tudományos Napok (pp. 67.) Budapest, március. 5-6.

Besenyi, E., Bozsó, Z., Ott, P.G., Czelleng, A., Szatmári, Á., Varga, G., Klement, Z. (2003): A növényi védekezési mechanizmusok elmaradása és az alacsony hőmérséklet szerepe az opportunistá patogén, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* baktérium kolonizációjára. 49. Növényvédelmi Tudományos Napok (pp. 87.) Budapest, február. 25-26.

Besenyi, E., Bozsó, Z., Ott, P.G., Czelleng, A., Szatmári, Á., Varga, G., Klement, Z. (2003): A hőmérséklet hatása a hiperszenzitív reakció (HR) és a korai indukált rezisztencia (EIR) kialakulására. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak (pp. 406-407.) Budapest, november. 6-7.

- Besenyei, E., Ott, P.G., Bozsó, Z., Czalleng, A., Szatmári, Á., Varga, G., Klement, Z. (2004): Alacsony hőmérséklet hatása a korai indukált rezisztencia kialakulására és három *Pseudomonas* faj *in vitro* és *in planta* szaporodására. 50. Növényvédelmi Tudományos Napok (pp.76.) Budapest, február. 24-25.
- Varga, G.J., Ott, P.G., Besenyei, E., Bozsó, Z., Czalleng, A., Szatmári, Á., Klement, É., Medzihradszky, K.F., Klement, Z. (2004): Korai indukált rezisztenciához kapcsolható új kitinázok dohányban. 50. Növényvédelmi Tudományos Napok (pp. 105) Budapest, február. 24-25.
- Varga, G.J., Ott, P.G., Besenyei, E., Bozsó, Z., Czalleng, A., Szatmári, Á., Klement, Z. (2004): Novel bacterially induced chitinases in tobacco with expression features different from most part of other known chitinases. International Joint Workshop on PR-proteins and Induced Resistance (pp. 96) Elsinor, Denmark, May 5-9.
- Szatmári, Á., Bozsó, Z., Besenyei, E., Varga, G.J., Ott, P.G., Czalleng, A., Klement, Z. (2004): Cloning and analysis of genes related to the early form of general defence response of plants against bacteria by subtractive hybridisation and quantitative PCR. The 14th FESPB Congress (pp.265) Cracow, Poland, August 23-27.
- Besenyei, E., Ott, P.G., Bozsó, Z., Szatmári, Á., Varga, G.J., Czalleng, A., Klement, Z. (2004): Inhibition of plant defence responses by low temperatures. 7th Conference of the European Foundation for Plant Pathology (pp. 31) University of Aberdeen, UK, September 5-10.
- Besenyei, E., Ott, P.G., Bozsó, Z., Czalleng, A., Szatmári, Á., Varga, G., Klement, Z. (2005): A környezeti hőmérséklet hatása a baktériumok által paprika növényekben indukált védekezési mechanizmusok és az ehhez kapcsolható fehérjék megjelenésére. 51. Növényvédelmi Tudományos Napok (pp. 40) Budapest, február. 23-24.
- Szatmári, Á., Bozsó, Z., Besenyei, E., Varga, G.J., Ott, P.G., Czalleng, A., Szabó, E., Puskás, L., Klement, Z. (2006): Az általános növényi védekezési reakció során aktiválódó nagyszámú gén azonosítása dohánylevélből. 52. Növényvédelmi Tudományos Napok (pp. 60) Budapest, február. 23-24.

