

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**A KORAI ÁLTALÁNOS REZISZTENCIÁHOZ KAPCSOLHATÓ ÚJ
FEHÉRJÉK ÉS FELHASZNÁLÁSUK A REZISZTENCIÁT KIVÁLTÓ
BAKTÉRIUM KOMPONENSEK MEGHATÁROZÁSÁRA**

Doktori értekezés

Készítette: Varga Gabriella

FVM Szőlészeti és Borászati Kutatóintézete

Kecskemét, 2006

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi

tudományága: Növénygenetika, biotechnológia és nemesítés

vezetője: Dr. Virányi Ferenc
az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar,
Növényvédelmi Tanszék

témavezető: Dr. Klement Zoltán†
Kutató Professor (MTA rendes tagja)
MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

Dr. Ott Péter
Tudományos főmunkatárs
MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

<u>Fontosabb rövidítések jegyzéke</u>	5
<u>1. BEVEZETÉS</u>	7
<u>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</u>	9
<u>2.1. Az általános rezisztencia és párhuzamok a különböző élőlények általános védekezésében</u>	9
<u>2.2. A korai általános rezisztencia helye a növényi rezisztenciaformák rendszerében</u>	12
<u>2.3. A korai általános rezisztencia jellemző tulajdonságai</u>	13
<u>2.4. A növényi védekezés aktív fehérje komponensei</u>	16
<u>2.4.1. A kitinázok szerepe a növényi védekezési mechanizmusokban</u>	17
<u>2.4.2. A kitinázok hatása a baktériumokra</u>	19
<u>2.5. Általános rezisztenciát indukáló baktérium alkotóelemek</u>	21
<u>2.5.1. A baktériumsejt felszínén található általános elicitorok</u>	21
<u>2.5.2. A baktériumsejt belsejéből izolált elicitor aktivitású molekulák</u>	25
<u>2.6. Az indukált növényi védekezést gátló baktérium stratégiák</u>	27
<u>2.6.1. A TTSS és az effektorok</u>	27
<u>2.6.2. A IV típusú transzportrendszer (T4SS)</u>	28
<u>2.7. Az agrobaktériumos golyvásodás jelentősége és az ellene való védekezés lehetőségei</u>	29
<u>3. Anyagok és módszerek</u>	31
<u>3.1. Növények</u>	31
<u>3.2. Kezelés baktériumokkal</u>	31
<u>3.3. Sejtközötti folyadék kinyerése</u>	32
<u>3.4. A sejtközötti folyadék sűrítése membránszűrőkkel</u>	32
<u>3.5. A sejtközötti folyadék fehérjéinek poliakrilamidgél-elektroforézise</u>	33
<u>3.6. Tömegspektrometriás meghatározás</u>	33
<u>3.7. Enzimaktivitás mérése</u>	34
<u>3.7.1. Kitináz aktivitás</u>	34
<u>3.7.2. Lizozim aktivitás</u>	35
<u>3.8. Az EBR tüneti kimutatása</u>	35
<u>3.9. RNS kivonás és cDNS szintézis</u>	35
<u>3.10. A kitináz gén mRNS szintjének vizsgálata valós idejű (Real-Time) PCR módszerrel</u>	36
<u>3.11. A fehérjék folyadék közegben történő szétválasztása izoelektromos töltésük szerint</u>	36
<u>3.12. Az agrobaktériumos golyvásodás elleni védekezés indukciója <i>in vitro</i> dohány növényekben</u>	37
<u>3.13. Elicitorok</u>	37
<u>3.14. Az eredmények kiértékelése</u>	38

<u>4. EREDMÉNYEK</u>	39
<u>4.1. A dohány sejtközötti folyadékában biotikus stresszválaszhoz köthető fehérjék bemutatása</u>	39
<u>4.2. A fehérjék indukciós sajátosságai</u>	42
<u>4.2.1. A fehérjék indukciója abiotikus stresszhatások esetén</u>	42
<u>4.2.2. A fehérjék indukciója jelátviteli útvonalakban résztvevő kémiai anyagokkal</u>	44
<u>4.3. Az EBR-rel korreláló, sejtközötti folyadékban megjelenő fehérjék meghatározása</u>	46
<u>4.4. Az EBR215/250 kitinázok az EBR molekuláris markerei</u>	49
<u>4.5. Az EBR elicitorainak meghatározása</u>	51
<u>4.5.1. A baktériumsejt külső felszínéhez kapcsolható elicitor molekulák</u>	51
<u>4.5.2. A baktériumsejt belsejében található elicitorok</u>	62
<u>4.6. A kitinázok lizozim aktivitásának vizsgálata</u>	66
<u>4.7. Flagellinnel indukált növényi védekezési mechanizmus hatása az agrobaktériumos golyvásodásra</u>	68
<u>4.8. Új tudományos eredmények</u>	71
<u>5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK</u>	73
<u>5.1. Az EBR215/250 a dohány specifikusan baktérium-fertőzésre kifejeződő fehérjéi</u>	73
<u>5.2. Az EBR215/250 újonnan leírt, eddig ismeretlen kitinázok</u>	74
<u>5.3. Az EBR215/250 bakteriolitikus hatású enzimek</u>	75
<u>5.4. Az EBR elicitorainak meghatározása</u>	78
<u>5.4.1. A lipopoliszacharid nem vált ki korai általános rezisztenciát</u>	78
<u>5.4.2. A peptidoglükán gyengén indukálja a korai általános rezisztenciát</u>	79
<u>5.4.3. Az elf26 peptid dohányban gyenge, de értékelhető reakciót vált ki</u>	80
<u>5.4.4. A vizsgált elicitorok közül a csp22 és a flg22 peptid indukálta a legerősebb korai BR-t</u>	81
<u>5.5. Az flg22 elicitor által kiváltott reakció hatása <i>Agrobacterium tumefaciens</i> fertőzésre</u>	83
<u>6. ÖSSZEFOGLALÁS</u>	87
<u>SUMMARY</u>	88
<u>7. MELLÉKLETEK</u>	89
<u>7.1. Irodalmi hivatkozások</u>	89
<u>7.2. A kísérletek során használt poliakrilamidgél összetétele</u>	102
<u>7.3. Az akrilamidgélek festése ezüst-nitráttal</u>	103
<u>7.4. Peptidoglükán elicitor-kombinációk</u>	104
<u>7.5. Az agrobaktériumos-fertőzés kísérletekben használt MS-táptalaj</u>	105
<u>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</u>	106

Fontosabb rövidítések jegyzéke

<i>avr</i>		avirulencia gén
BR	<i>basal resistance</i>	általános rezisztencia
BTH		benzo-thiadiazol
CSP	<i>cold shock protein</i>	hideg sokk fehérje
csp22		22 aminosav hosszúságú CSP peptid
EBR	<i>early basal resistance</i>	korai általános rezisztencia
EFR		EF-Tu receptor
EF-Tu		Elongációs faktor Tu
elf26		26 aminosav hosszúságú EF-Tu peptid
flg22		22 aminosav hosszúságú flagellin peptid
FLS2	<i>flagellin sensing 2</i>	flagellin érzékelő receptor 2
g		gramm
HR		hiperszenzitív reakció
<i>hrp</i>		hiperszenzitív reakció és patogenitás
kDa		kilo dalton
LBR	<i>late basal resistance</i>	késői általános rezisztencia
LPS		lipopoliszacharid
LRR	<i>leucin reach repeats</i>	leucinban gazdag ismétlődések
m/z		tömeg/töltés
MALDI-TOF		<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>	Mitogén aktivált protein kináz
MH ⁺		protonált molekula ion
ml		milliliter
MS	<i>mass spectrometry</i>	tömeg spektrometria
MS/MS		fragmentációs spektrum
MS-Fit		keresés MS spektrumra (tömegtérkép spektrumra)
MS-Pattern		MS-mintázat
MS-Tag		keresés MS/MS spektrumra (PSD-re)
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>	patogénhez kapcsolt molekuláris mintázat
PCD	<i>programmed cell death</i>	programozott sejthalál
PSD	<i>post source decay</i>	forrás utáni bomlás
PG		peptidoglükán
PR- fehérje	<i>pathogenesis related protein</i>	patogenezishez kapcsolt fehérje
R		rezisztencia gén/fehérje
RLK	<i>receptor-like kinase</i>	receptor-szerű kináz
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>	szisztémikus szerzett rezisztencia
T4SS	<i>type four secretion system</i>	négyes típusú szekréción rendszer
T-DNS		transzfer DNS
TLR	<i>Toll-like receptor</i>	Toll-szerű receptor
TTSS	<i>type three secretion system</i>	három típusú szekréción rendszer
<i>vir</i>		virulencia
µg		mikrogramm
µl		mikroliter

1. BEVEZETÉS

A növények környezetében számos mikroba él, melyek a szöveikbe is bekerülhetnek. A növények belseje vírusok, gombák és baktériumok számára nyújthat életteret. A mikroorganizmusok folyamatosan támadják a növényt, olykor súlyos járványokat okozva, legtöbbjük azonban mégsem találja meg a növény szöveiben az optimális körülményeket. Sikertelenségüknek általánosan három oka van: (1) a preformált védekezés strukturális és toxikus gátjai akadályozzák a fertőzést, (2) egyes környezeti feltételek hiánya a növényen belül, vagy (3) a mikroorganizmus felismerését követően kialakuló indukált védekezési mechanizmusok lokalizálják a kórokozót.

A baktériumok által indukált védekezési mechanizmusok kutatásában úttörő szerepet játszottak Klement Zoltán és munkatársai az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében. A fitopatogén baktériumok által okozott hiperszenzitív reakció (HR) első leírása óta (Klement et al., 1964) megszámlálhatatlan kísérletben próbálták megtalálni e jelenség összetevőit, és ezeket felhasználni a növénykórtan és növénynevelés területén. Azonban több mint negyven év elteltével is szép számmal akadnak még feltérképezetlen területek. Az ezredforduló óta HR mellett a kutatók érdeklődése egyre inkább kiterjedt a kórokozókkal szembeni védelemben alapvető szerepet játszó általános rezisztenciára (*basal resistance*, BR). A BR leírása (Klement et al., 1999) és a korszerű molekuláris technikák lehetőséget adtak munkacsoportunknak egy sokáig mellőzött, de nagy jelentőségű növényi védekezés biokémiai és molekuláris jellemzésére.

A felismerés és betegség ellenállóság kialakulása között igen bonyolult jelátviteli hálózat működik. Annak ellenére, hogy sokat tudunk a növényi védekezések kimeneteleiről, mégis mindmáig tisztázatlan, hogy melyek azok a faktorok, melyek a BR során gátolják a baktériumokat (Espinosa and Alfano, 2004). A BR alatt bekövetkező élettani, kórtani és molekuláris mechanizmusokat munkacsoportunk több megközelítésben vizsgálta. A dohány sejtközötti folyadékának fehérje összetételében megfigyelhető változásokból kiindulva mutatjuk be a BR egyik megnyilvánulását, a baktériumos fertőzés korai szakaszában fellépő korai általános rezisztenciára (*early basal resistance*, EBR) összpontosítva.

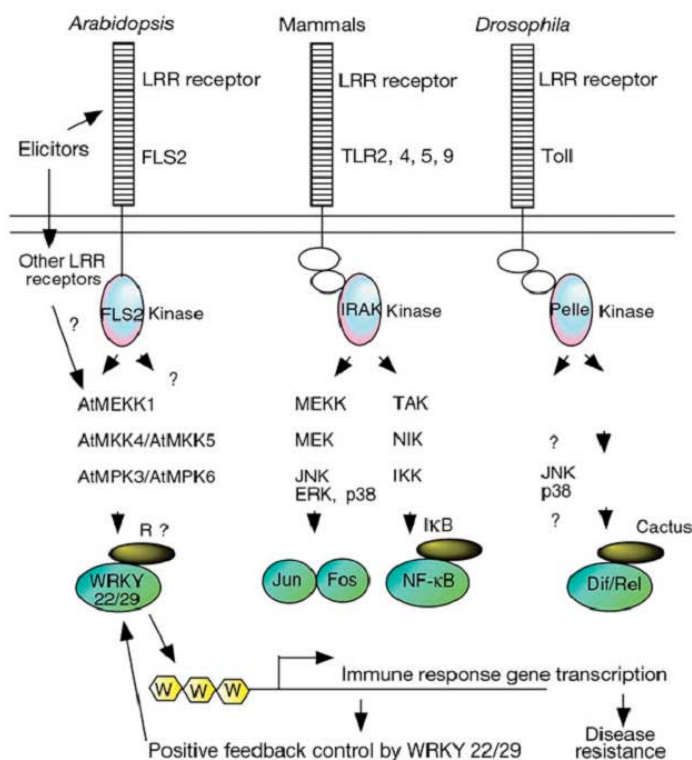
A témában Ott (2002) doktori téziseiben számos eredményt közölt, melyekben többek között arra világított rá, hogy az EBR alatt fehérjeváltozások következnek be a dohány sejtközötti folyadékában. Jelen dolgozat célja az „úttörő” munka folytatása volt. Célkitűzéseink az említett dolgozat eredményei, az EBR egyre hangsúlyosabb nemzetközi jelentősége és kutatási irányvonalai alapján fogalmazódtak meg:

1. A korábban kimutatott fehérjék EBR-hez kapcsoltságának megerősítése és új fehérjék kijelölése. Az EBR-hez kapcsolt fehérjék további indukciós tulajdonságainak vizsgálata, különös tekintettel a PR-fehérjéket kiváltó hatások tanulmányozására;
2. Az EBR-rel szoros korrelációban álló fehérjék meghatározása aminosav-sorrendjük alapján. A fehérjék azonosításával következtetni, amennyiben lehetséges, a rezisztenciában betöltött feltételezhető szerepükre. Az EBR-hez kapcsolt fehérjék molekuláris markerként való alkalmazásának megalapozása, melynek kulcsfontosságú része, hogy kvantitatív módszerek segítségével értékelhető legyen kifejeződésük. Az EBR fehérje-markereinek felhasználásával a védekezést kiváltó baktérium komponensek (elicitorok) azonosítása;
3. Az EBR-rel korrelációt mutató fehérjék funkcionális vizsgálata, mely a rezisztenciában aktív (pl. bakteriolitikus, bakteriosztatikus) komponensként való részvételüket próbálja alátámasztani;
4. A szőlészet területén az agrobaktériumos golyvásodás jelenleg is veszélyes kórokozó. Ellene nincs kidolgozott, hatékony növényvédelmi eljárás, a megelőzésen kívül. Kísérleteink célja az EBR alkalmazási lehetőségeinek felmérése e gazdasági szempontból is jelentős betegség ellen.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az általános rezisztencia és párhuzamok a különböző élőlények általános védekezésében

Az élővilágban az életben maradás feltétele az idegen szervezet felismerése. A felismerés képezi alapját az általános rezisztenciának (BR) és teremt lehetőséget a fertőzést megkísérlő mikroorganizmusok elpusztítására. Működése hozzájárul ahhoz, hogy a mikroorganizmusok nagy számához képest viszonylag kevés azon kórokozók száma, amelyek tünetet okoznak az élő szervezetben. Emlősökben, ízeltlábúakban és immár növényekben is bizonyított az általános védekezés jelenléte (Medzhitov and Janeway, 1997; Khush and Lemaitre, 2000; Cohn et al., 2001). Az általános védekezés egyes elemeinek hasonlósága az élőlények különböző csoportjaiban arra utal, hogy e védelem az evolúció korai szakaszában alakulhatott ki. A külső jegyeket és a belső működést tekintve a törzsfajlás egymástól messze sodorta ezeket az élőlénycsoportokat, mégis az alapvető védekezési reakció megőrzött számos hasonlóságot (Szatmári és Klement, 2003). A legtöbb közös vonást az általános védekezésben a támadó mikroorganizmust felismerő rendszerben találjuk (1. ábra) (Asai et al., 2002, Nürnberger and Brunner, 2002). A mikrobákra jellemző molekuláris mintázatokat PAMP-ként (*pathogen associated molecular patterns*) rövidítjük, amelyek általánosan konzervált és kifejeződő, nem specifikus idegen-jelzők. Ezeket – közvetlenül vagy más molekulák közvetítésével – a mintázat felismerő receptorok érzékelik és védekezéshez kapcsolható gének aktivációját és antimikrobiális vegyületek képzését váltják ki. A *Drosophilában* Toll receptornak (Imler and Hoffmann, 2001), míg emlősökben, a sejten kívüli részben található leucinban gazdag ismétlődések hasonlósága miatt, Toll-szerű receptornak (*Toll-like receptor*, TLR) nevezik őket (Aderem and Ulevitch, 2000; Underhill and Ozinsky, 2002). Ahogy a receptorok szerkezetében, a felismert molekuláris mintázatokban is találunk közös pontokat. A baktériumok sejtfalának peptidoglükán- és a Gram-negatív baktériumok sejtfalának lipopoliszaharid (LPS) alkotóeleme és a baktériumok mozgását elősegítő ostor építőköve, a flagellin fehérje képviselik a legismertebb molekuláris mintázatokat, melyek megjelenése a szervezetben mikrobiális veszélyre figyelmeztet. Emlősökben az LPS-t a TLR4, a flagellint pedig a TLR5 ismeri fel és jelátviteli útvonalak aktiválásával indítja be a veleszületett immunitást (Nürnberger et al., 2004). *Drosophilában* két jelátviteli útvonal közvetíti a Gram-pozitív és a Gram-negatív baktériumok specifikus felismerését. A Toll útvonal aktivátorai az LPS és a Gram-pozitív típusú peptidoglükán, míg az Imd (immun deficiencia) útvonal a Gram-negatív baktériumok peptidoglükánját ismeri fel (Leulier et al., 2003).



1. ábra Patogénhez kötött molekuláris mintázatok (PAMP) felismerése a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád közvetítésével (Asai et al., 2002)

A növénykutatások eredményei sokáig az LPS-ről számoltak be, mint egyetlen olyan elicitor molekuláról, mely mind a három (*Arabidopsis*, emlős, *Drosophila*) szervezetben alkalmas jelet szolgáltat az idegen organizmus felismerésére. Az emlős és ecetmuslica receptorok homológ szekvenciái és az azonos elicitorok ismeretének ellenére a növénybiológusok érdeklődése a téma iránt csak akkor fokozódott, amikor bebizonyosodott, hogy a flagellin védekezésre utaló választ vált ki *Arabidopsis*-ban (Felix et al., 1999). A flagellint felismerő FLS2 receptor (*Flagellin Sensing 2*) szerkezeti analógiája az emlős és *Drosophila* TLR és Toll receptoraival (Gomez-Gomez and Boller, 2000) új megvilágításba helyezte a növényi védekezést.

A növényi általános védekezésben számos momentum jobb megértése végett olyan fogalmakhoz és definíciókhoz kellett nyúlni, amelyek az emlős immunbiológia részeit képezik. Így pl. a védekezést kiváltó mikroorganizmus komponenseket, korábban már említettük, PAMP-nak nevezik. A növénybiológiában elicitoroknak azokat a molekulákat nevezik, amelyek bármiféle reakciót ki tudnak váltani a növényi szervezetben. A biotikus elicitorokon kívül ide tartoznak az abiotikus elicitorok is, melyek mesterséges eredetű, kémiai molekulák. Így az elicitorok közül azon molekulák elkülönítésére, amelyek a növényi

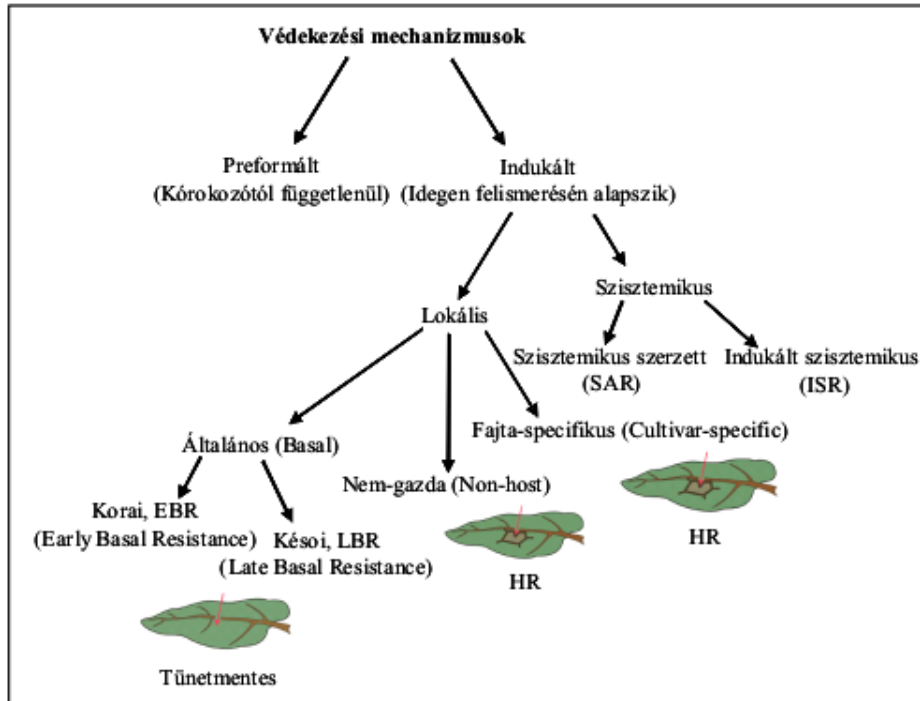
általános védekezést indukálják, az emlős-immunbiológiai nevezéktan alapján, szintén a PAMP, vagy az általános elicitor elnevezést használják (Oh and Collmer, 2005).

Az 1. ábrán láthatók az általános védekezés ismert és vélt komponensei. Az összehasonlító ábrák egyre bővülő tagokkal mutatják be a felismerő és a jelátviteli mechanizmust, a lánc végén viszont változatlan a logikus következmény: immunválasszal kapcsolatos gén transzkripció → betegség ellenállóság. Nem hagyható figyelmen kívül, hogy a növényekben a hiperszenzitív sejtelhalás és az állatokban a programozott sejtihal működésileg és fogalmilag hasonlóan mondható (Lam et al., 2001). A védekezésben aktívan résztvevő komponensek igencsak különböznek a bemutatott három szervezetben, hiszen a rezisztencia hatást az emlősökben részben a keringési rendszer és specializált sejtek közvetítik, míg a növényekben a mikroba felismerés és a védekezés minden sejt egyedi megnyilvánulásaként értékelhető, egyes esetekben szisztémikus kémiai jelek közreműködésével. A növényi védekezés hatásmechanizmusában több elem együttes ereje állítja meg a mikroorganizmus terjedését, és a védekezési formák (Lásd 2.2. fejezet) aktív résztvevői között több átfedés is ismert. Többek között a reaktív oxigénformák, mint a hidrogén-peroxid és a szuperoxid helyi (Bozsó et al., 1999) illetve szisztémikus (Bell and Charlwood, 1980) felhalmozódása, hidrolitikus enzimek (Boller and Kende, 1979), proteináz inhibitorok (Green and Ryan, 1972), defenzinek (Terras et al., 1992), valamint fitoalexinek (Hammerschmidt, 1999), nitrogén-oxid és flavonoidok (Bell and Charlwood, 1980) termelődése. Ezeket a nem-gazda és a fajta-specifikus rezisztenciával kapcsolatos HR során aktiválódó tulajdonságok azonban ritkán hozhatóak összefüggésbe a BR-rel (Espinosa and Alfano, 2004).

A párhuzamok felállítása mellett kulcskérdés maradt a növényi és állati immunitás közötti evolúciós kapcsolat feltárása. Az összehasonlító genomanalízisek a növények és állatok kialakulásához vezető törzsfajlás több oldalára világítottak rá (Meyerovitz, 2002). Helyes lehet pl. az a következtetés, hogy a növények és az állatok utolsó közös őse az idegen felismeréséhez Toll/TLR rokon szerkezetekkel rendelkezett, ami megmagyarázná ennek a rendszernek a széleskörű elterjedtségét. A flagellin-receptorok (FLS2 és TLR5) érzékelő részében, valamint a receptorok aktiválásában részt vevő egységekben fellelhető csekély mértékű szekvencia-hasonlóság azonban arra is utalhat, hogy a két flagellin-érzékelő rendszer kialakulása egymástól függetlenül ment végbe az evolúció során (Gomez-Gomez, et al., 1999; Gomez-Gomez and Boller, 2000; Donnelly and Steiner, 2002). Ahhoz, hogy a közeljövőben pontos választ kaphassunk erre a kérdésre, a növények és az állatok immunmechanizmusában a közös elemek részletesebb, összehasonlító vizsgálata szükséges.

2.2. A korai általános rezisztencia helye a növényi rezisztenciaformák rendszerében

Az EBR besorolása a többi növényi védekezési mechanizmus közé egy rövid áttekintést igényel az egyes formák között. Az indukált védekezések közül azt, amelyik – a preformált védekezéssel vállvetve – az általános elicitorok közreműködésével a növény sejtközötti járataiban megállítja a nem növény- és nem-patogén mikroorganizmusok szaporodását, és közreműködik az inkompatibilis illetve kompatibilis baktériumok megfékezésében (Ott et al., 2006) általános (*basal*) rezisztenciának nevezzük. Az elnevezésben az „általános” szó több megközelítésben is helytálló, mivel számos, eltérő rendszertani családba tartozó növényben igazolták működését, így *Nicotiana tabacum*-ban (Lovrekovich és Farkas 1965, Burgyán és Klement, 1979), *Capsicum annuum*-ban (Keshvarzi et al. 2004), *Arabidopsis thaliana*-ban (Bozsó et al., 2002), *Medicago truncatula*-ban (Bozsó et al., 2005 b), valamint adott növényben nem csak egy kórokozó meghatározott rassa, hanem a mikroorganizmusok széles köre ellen is védettséget nyújt. Az általános rezisztencia korábbi elnevezései pl.: korai indukált rezisztencia (*early induced resistance*, EIR) (Burgyán and Klement, 1979), lokális indukált rezisztencia (Sequeira, 1983), veleszületett védekezés (*innate immunity*) (Nürnberger et al., 2004). A növények meg tudják védeni magukat a más növényen betegséget okozó mikroorganizmusoktól is, vagyis amelyeknek nem gazdanövényei (*non-host/species resistance*) (Thordal-Christensen, 2003). A preformált-, az általános- és a nem-gazdanövény rezisztenciát átlépő baktériumok egyes törzseivel szemben ún. fajta-specifikus rezisztenciával védekezik a növény (*pathogen race/host plant/cultivar-specific/gene-for-gene resistance*) (Espinosa and Alfano, 2004; Nürnberger et al., 2004). Ez utóbbi rezisztencia formák ismertebb neve a hiperszenzitív reakció (HR). A BR és a HR is a növény veleszületett tulajdonsága, ezért az „innate immunity” kifejezés csak BR-re való használata megtévesztő lehet. A nem-gazdanövény és a fajta-specifikus rezisztencia működése gyors lefutású sejtelhalással (PCD, *programmed cell death*) jár, így fékezvén meg a baktériumok szaporodását, terjedését (Nürnberger et al., 2004). Bár a PCD leggyakrabban a nem-gazda rezisztencia látható jele is (Mysore and Ryu, 2004), csak a fajta-specifikus rezisztenciánál ismert a hagyományos értelemben vett, „gén génnel szemben” elven alapuló HR. Ebben az esetben a HR kialakulását a kompatibilis baktérium *Avr* (avirulencia) génterméke és a gazdanövény *R* (rezisztencia) géntermékének kölcsönhatása okozza (Flor, 1955). Az eddig felvázolt védekezési reakciók a baktérium fertőzési helyén, lokálisan hatnak (2. ábra). A PCD-vel járó védekezési reakciók hatása, általában a szalicilsav közvetítésével, szisztemizálódhat is, vagyis a sejtelhalástól távolabbi növényi részeken is megfigyelhető a rezisztencia (Ryals et al., 1994).



2. ábra A korai általános rezisztencia (EBR) besorolása a növényi védekezési mechanizmusok közé (Varga et al., 2005 a)

Elfogadott, hogy az indukált, lokális védekezési formákat az indukáló baktérium komponens alapján is nevezik, mivel más-más baktérium komponensek az induktorok. Vagyis a BR-t az általános elicitorok, az ún. PAMP-ok felismerése miatt „PAMP-mediated resistance”-nek, a nem-gazda- és fajta-specifikus rezisztenciát az *Avr* géntermékek közreműködésének következtében „AVR protein mediated resistance”-ként is ismerhetjük (Nürnberger and Brunner, 2002). Ez azonban nem mindig helytálló, mivel kimutatták, hogy a flagellin, az egyik legismertebb BR elicitor, aktiválja a nem-gazda rezisztenciához köthető *NHO1* gént (Li et al., 2005). Vagyis feltételezhető, hogy nemcsak a védekezés kimenetele, de az indukáló baktérium komponensek között is átfedés lehet.

2.3. A korai általános rezisztencia jellemző tulajdonságai

A korai általános rezisztencia (EBR) a növények indukált, lokális, aktív védekezési mechanizmusa (2. ábra), mely a természetben a védekezés első vonalaként megállíthatja a nem-növénykórokozó és szaprotróf baktériumok szaporodását (Klement et al., 2003). Az EBR tünetmentes, még sejt-szinten sem jár a HR-re jellemző sejtelhalással vagy más szubmikroszkópos tünettel (Ott et al., 1997), és a növény számára a védekezésnek ez a

formája nem olyan energiaigényes, mint a HR (Ott, 2002). Indukciójában nem vesznek részt specifikus elicitorok (pl. Avr fehérjék), hanem a mikroorganizmusokban általánosan jelen lévő sejtalkotó elemek, molekulák (PAMP-ok) felismerésén alapszik (Gomez-Gomez and Boller, 2002) (Lásd 2.6. fejezet). Így a legkülönbözőbb mutáns baktériumok is indukálják, pl. melyek nem-működő *hrp* („HR and pathogenicity”) rendszerrel rendelkeznek. A *hrp* gén-csoportban találhatóak a patogenitás szabályozásában részt vevő gének (Xiao et al., 1994), de a gén-csoport nagyobb hányada a III. típusú transzport rendszer elemeit, avirulencia- és effektor fehérjéket kódoló géneket foglal magába (He et al., 1993; Gopalan et al., 1996) (Lásd 2.6. fejezet). A kórokozó baktériumok *hrp* rendszere pl. a sejtek elölésével (hő, antibiotikum, sugárzás, stb.) vagy genetikailag, a *hrp* rendszerben lévő mutációval tehető inaktívvá. Előfordul azonban hogy aktív, működőképes *hrp* rendszerrel rendelkező baktérium nem okoz sejtelhalást pl. magas hőmérséklet mellett (Klement et al., 1999). EBR-t olyan hővel elölt baktérium is indukál, ami egyébként betegséget okozna, pl. a dohányban kompatibilis *Pseudomonas tabaci* (Burgyán and Klement, 1979). A kompatibilis baktériumok meghatározott gazdanövényeikben, és csakis azokban, képesek mind a BR, mind a HR hatástalanítására, vagy az aktív védekezési komponensek kivédésére (Espinosa and Alfano, 2004).

A BR során dohányban egy korai (EBR, Burgyán and Klement, 1979) és egy késői (*late basal resistance*, LBR; korábbi elnevezés: késői indukált rezisztencia – *late induced resistance*, LIR) (Lovrekovich and Farkas, 1965; Sequeira and Hill, 1974) immunválasz figyelhető meg. BR indukáló baktériummal történő fertőzést követően már a 2.-6. órától működik legalább 24 órán keresztül. Gátolja nem csak a baktériumok növénybeni szaporodását, hanem a HR-ért és patogenitásért felelős ún. *hrp* gének aktivitását is (Bozsó et al., 1999; Ott, 2002). Az indukciót követő 24.-48. órára kialakul az LBR, ami a későbbi fertőzésektől is megvédi a növényt (Lovrekovich and Farkas, 1965). Az EBR környezeti tényezőktől való függését bizonyítja, hogy alacsony hőmérsékleten elhúzódik illetve gátlódik a kialakulása (Besenyey et al., 2005). A fény is befolyásolja működését (Ott, 2002), de kevésbé, mint az LBR esetében, hiszen a sötétben tartott növényekben az LBR nem mutatható ki (Burgyán and Klement, 1979; Hevesi et al., 1981). A levelek kora is befolyásolja az EBR kialakulását és intenzitását (Ott, 2002).

Valószínű, hogy EBR előkezelést követően a védelem alatt álló növényi szövetbe injektált nem-gazda (inkompatibilis) baktérium szaporodása és *hrp* rendszere gátlódik (Klement et al., 2003). Ez utóbbi látható jele, hogy az EBR elemei által gátolt vagy károsodott *hrp* rendszerű baktérium nem vált ki PCD-t, és így az elhalás elmarad. Az EBR későbbi, inkompatibilis fertőzésre gyakorolt gátló tulajdonságát felhasználva lehet az EBR-t –

közvetetten – kimutatni. A HR-gátlást felhasználva mutatták ki, hogy a környezet hőmérséklete is hatással van az EBR kialakulására (Klement et al. 2003). 20 °C-on az EBR HR-gátlással való kimutatása az indukciót követően 6-8. órával lehetséges, 30 °C-on viszont 2-3 óra is elég az EBR kialakulásához. A későbbi, HR-indukáló fertőzéssel szembeni preventív hatáson kívül az EBR működését számos fiziológiai és molekuláris változás jelzi. Az aktiválódott gének nyomonkövetésével mutatta be Szatmári és mtsai. (2006) az EBR összetett védekezési faktorait. A *hrp* mutáns baktérium hatására 3-12 órával az indukciót követően növekedett a sejtfalerősítő mechanizmus tagjainak, fahéjsav-hidroxiláz, ortometil-transzferáz, hidroxiprolinban vagy glicinben gazdag sejtfalépítő fehérjék génjeinek átíródása. A jelátviteli útvonalakban részt vevő molekulák (szalicilsav, metil-jazmonát, etilén prekursor) a védekezésre utaló géneket nem indukálták. Az EBR-t kiváltó baktériumnál alacsonyabb szintű stimulációt detektáltak a növényvel „speciális kapcsolatban” álló *Agrobacterium tumefaciens* (Lásd 2.6. fejezet), golyvásodást nem okozó törzsével végzett kezelést követően. A kompatibilis *Pseudomonas tabaci* előkezelés által előidézett génműködésbeli változások nem tértek el szignifikánsan a vízzel injektált kontroll esetében észlelt génaktivitás változásoktól (Szatmári et al., 2006). Az általános védekezés alatt indukálódó nagyszámú gén aktivációja vagy represszációja jelzi, mennyire összetett ez a védekezési forma (Schenk et al., 2001; Navarro et al., 2004; Bozsó et al., előkészületben). A védekező növényben szabadgyökök, aktív oxigénformák is károsíthatják a baktériumokat, ám ez a növényre is toxikus. Ezek semlegesítésében résztvevő enzimek, a glutation-S-transzferáz és az epoxid-hidroláz gének transzkripciója szintén fokozódott (Szatmári et al., 2006). Az EBR során hidrogén-peroxid is termelődik, az injektálást követően már 3-4 órával, igaz nem olyan mennyiségben, mint a HR során. Káros hatásának kivédésére, az EBR-rel összhangban emelkedett a kataláz és a peroxidáz (hidrogén-peroxid termelés/semlegesítés) szint, valamint a *tpoxNI* peroxidáz gén átíródása, és további izoenzimek megjelenését mutatták ki (Bozsó et al., 2002; Klement et al., 2003; Bozsó et al., 2005a). Az EBR során emelkedik a fehérjeszintézis mértéke is. A hővel elölt kórokozók vagy a patogenitásukban sérült (*hrp*) mutánsok fokozták egy kitináz enzimet kódoló gén kifejeződését bab növényekben (Jakobek and Lindgren, 1993). A baktériumok a kórokozás során sosem jutnak be a növényi sejt belsejébe. A védekezésnek tehát a sejtfalon kívül és a sejtfalban (lásd: sejtfalerősítésben részt vevő enzimek) kell kifejtenie a hatását. Ott (2002) az EBR során a dohány sejtközi folyadékában új fehérjék megjelenéséről is beszámolt.

2.4. A növényi védekezés aktív fehérje komponensei

A hiperszenzitív reakció az egyik leghatékonyabb növényi védekezés, mely során számos fehérjét kódoló növényi gén aktiválódása figyelhető meg. Ezek lehetnek: strukturális fehérjék, másodlagos anyagcsere enzimek vagy patogenezishez-kapcsolt ('pathogenesis-related', PR) fehérjék stb. Az oldható fehérjék legnagyobb hányadát a PR-fehérjék teszik ki. Az előfordulási helyeiken (vakuólum, sejtfal, sejtközötti állomány) lévő alacsony pH-nak vagy az enzimes lebomlásnak sajátos fizikokémiai tulajdonságaik révén állnak ellen. Első leírásuk óta (Van Loon and Kammen, 1970) több fehérjét írtak le, egy- és kétszikűekből egyaránt. A dohányból izolált PR-fehérjéket tíz családba sorolták az aminosav-sorrendjükben fellelhető szekvencia-hasonlóságok alapján (összefoglalás: Utrechti Egyetem Biológiai Kar, <http://www.bio.uu.nl/~fytopath/tabacco.htm>). Megjelenésük jellemző velejárója a vírus-, baktérium- és gombafertőzésre adott válasznak (Van Loon, 1985; Bol et al., 1990; Bowles, 1990; Linthorst, 1991; White and Antoniw, 1991). Meg kell jegyezni azonban, hogy jó néhány PR-fehérje termelődése különböző kémiai indukció esetén is jellemző, úgy mint poliakril savval (Dumas et al., 1987), nehézfém sókkal (De Tapia, 1986), szalicilsavval (White, 1979; Yalpani et al., 1991) vagy levegő szennyező anyagokkal (Ernst et al., 1992; Didierjean et al., 1993) történő kezelésre. Egyes PR-fehérjék indukciója figyelhető meg növényi hormonok, mint auxin (Christ and Mösinger, 1989; Hughes and Dickerson, 1991) vagy citokinin (Van Loon, 1983; Memelink et al., 1990), hatására. A stresszhormonnak tartott etilén is hatékony PR-fehérje induktornak bizonyult (Van Loon, 1983; Boller et al., 1983; Memelink et al., 1990; Keefe et al., 1990; Hughes and Dickerson, 1991; Eyal et al., 1992; Mauch et al., 1992). A kémiai anyagokon kívül az ozmotikus- vagy só stressz is kiválthat PR-fehérje indukciót, némely esetben az abszcizinsav közreműködésével (King et al., 1986; Grosset et al., 1990; Nelson et al., 1992). PR-fehérjék akkumulálódása nem csak valamilyen külső hatás következménye lehet. Egészséges növényekben is kimutatták a gyökérből és a szenescens levelekből, valamint az egyedfejlődés egyes szakaszainak kísérő enzimeiként, például a virágzó részekből is (Fraser, 1981; Hornok and Király, 1984; Felix and Meins, 1986; Memelink et al., 1990; Leung, 1992; Hamel and Bellemare, 1995). Ha ennyi, kórokozómentes, körülmény is kiválthat PR-fehérje felhalmozódást, indokolt a kérdés: helytálló-e a „patogenezishez-kapcsolt” jelző használata? Megjelenésük vitathatatlan a kórokozókvaló összefüggésben, így ebből a szempontból indokolt e jelző. A patogén-indukcióra működésbe lépő növényi védekezés – és ennek következtében kialakuló esetleges sejtelhalás – során anyagcsere változások figyelhetők meg, aminek jól ismert következményei az etilén, az abszcizinsav stresszhormonok és a szalicilsav akkumulálódása és vándorlása (Yalpani et al.,

1991; Malamy and Klessig, 1992; Métraux et al., 1990), valamint az auxinok és citokininek közötti egyensúly megbomlása. Ezek alapján nem meglepő, hogy ezek az anyagok önmagukban is kiváltják a PR-fehérjék termelődését (Stintzi et al., 1993). A „patogenezishez-kapcsolt”-ság és a kórokozó nélküli indukció szoros összefüggése miatt, az elnevezés fedí a valóságot, és fontos szerepük lehet a növényi védekezésben.

Itt említjük meg a növényi védekező mechanizmus fokozására használt Bion® készítményt. A szer hatóanyaga, a benzo-thiadiazol (BTH), a szalicilsav kémiai analógja. *Erwinia amylovora* ellen almában (Baysal et al., 2002), peronoszpóra ellen napraforgóban (Bán et al., 2004), *A. tumefaciens* és *Diplocarpon rosae* ellen rózsában (Suo and Leung, 2001), valamint más növényekben is vizsgálták az „immunstimulátort”. Almában a BTH által kiváltott reakcióban a glükozidáz és PR-kitináz enzimek mennyisége 64%-al növekedett, és ezzel párhuzamosan hasonló mértékben gátlódott az *Erwinia amylovora* szaporodása (Abo-Elyousr et al., 2006). Hiperszenzitív dohány növényekben a BTH és szalicilsav kezelés eredményesen csökkentette a TMV okozta lokális léziók számát, azonban a fogékony növényekben ez a hatás nem volt megfigyelhető (Kálmán és Gáborjányi, 1998). BTH kezelés hatására kimutattak védekezéshez kapcsolható peroxidáz, glutation-S-transzferáz (Thomson et al., 1999), kitináz és β -1,3- glükánáz (Burketova et al., 1999; Burketova et al., 2003) termelődést is.

2.4.1. A kitinázok szerepe a növényi védekezési mechanizmusokban

A PR-fehérjék közül a kitinázokkal (EC. 3.2.1.14) kiemelten foglalkozunk. Ezek a növény összes szervében és szövetében megtalálhatóak, főként a vakuólumban és az apoplastban. Nagy és változatos enzimescsoport, melynek tagjai nem csak a tér- és időbeli lokalizációjukban különböznek, hanem a szerkezetükben és a célmolekula-sajátosságaikban is (Collinge et al., 1993). A kitinázokat az alapján, hol bontják a kitint, két fő csoportba sorolhatjuk: a kitin lánc nem redukáló végét hasító kitinázok az exo-kitinázok, a lánc belsejében lévő β -1,4-kötéseket bontóak pedig az endo-kitinázok (Kasprzewska, 2003). A növényekből izolált kitinázok szerkezetük, szubsztrát-sajátosságaik, bontási mechanizmusuk és a fehérje-bontó enzimekkel szembeni ellenállóságuk alapján hét osztályba sorolhatóak (Kasprzewska, 2003). Fizikokémiai és enzim-aktivitási tulajdonságaikat figyelembe véve a növényi kitinázok a PR-fehérjék négy családjába lettek besorolva. A növényi kitinázoknak ilyen szintű diverzitása felveti a szerepükkel kapcsolatos kérdést.

A legtöbb PR-fehérje jellemző tulajdonsága a kórokozókra kifejtett káros hatás: a PR-1 és PR-5 család tagjai a plazma-membránt (Niderman et al., 1995; Abad et al., 1996), míg a

β -1,3-glükánázok (PR-2) és a kitinázok (PR-3, PR-4, PR-8 és PR-11 családok) a gombák sejtfalát roncsolják (Boller et al., 1983; Kauffmann et al., 1987; Legrand et al., 1987). A legtöbb magasabbrendű gomba sejtfalának alkotói, a β -1,3- glükánok és a kitin (N-acetil-glükózamin egységekből felépülő poliszacharid), az utóbbi két enzim szubsztrátjai.

A többi PR-fehérjéhez hasonlóan, a kitinázok sem köthetőek kizárólagosan csak kórokozó jelenlétéhez (1. táblázat, Varga et al., 2005 b). Az 1. táblázatban feltüntetett sokféle indukciós tulajdonságaiknak köszönhetően a védekezésben/betegségben betöltött szerepük megfejtése tovább bonyolódik. Általánosságban elmondható, hogy inkompatibilis kapcsolat a kitinázok gyors, erős és szisztémikus felhalmozódását eredményezi. Kompatibilis kapcsolatban megjelenésük legtöbbször nem jellemző, vagy ha mégis, indukciójuk kisebb mértékű és jóval lassabb az előzőnél (Meier et al., 1993).

1. táblázat PR kitinázokat indukáló kezelések

Növény	Kezelés	Forrás
Bab	Etilén	Mauch and Staehelin, 1989
Uborka	TNV (Tobacco Necrosis Virus)	Iseli et al., 1996
	Csírázás	Majeau et al., 1990
Édes burgonya	Rovar-okozta sebzés	Hou et al., 1998
Dohány	TMV (Tobacco Mosaic Virus)	Brunner et al., 1998
Fenyő	Szalicilsav	Davis et al., 2002
	Jázmonsav	
Napraforgó	Acetil-szalicilsav (aszpirin)	Jung et al., 1993
Búza	Etilén	Botha et al., 1998
	Mechanikai sérülés	
Rozs	Hideghatás	Hon et al., 1995
Mogyoró	UV	Herget et al., 1990

Az előzőekből kiderül, hogy a kitinázok a növény sokféle stimulusra adott válaszában megtalálhatóak. Ezzel párhuzamosan, bizonyított antifungális hatásukat (Collinge et al., 1993) is figyelembe véve a kitinázok a növény aktív vagy passzív védekezésének fontos részét képezik. Ezt erősítő kimutatták, hogy az *Arabidopsis* levelében a peroxidáz és exokitináz kifejeződés negatív korrelációban áll a virulens *P. syringae* pv. *tomato* szaporodásával (Traw et al., 2003).

A védekezés során megismert jelentőségüket és megjelenési helyüket tekintetbe véve feltételezhető, hogy az extracelluláris kitinázok egy gyors, indukált reakció részei. Ennek során direkt hatásuk, hogy gátolják a sejtközi járatokba behatoló gombák növekedését, és – indirekt módon – az eközben a gombák sejtfalából leszakadó rövid kitin és glükán egységek további kitinázok és más védekezési elemek számára szolgáltatnak elicitorokat (Fritig et al., 1998). Ebből következik, hogy a vakuólumban lévő kitinázok funkciója a fertőzés későbbi szakaszában realizálódik, amikor a sejt kollapszus következtében kiáramlanak a sejtközi

térbe (Mauch and Staehelin, 1989). Mindazonáltal, *in vitro* módszerekben a leghatékonyabb gomba sejfal-bontó hatás nem egyetlen kitináz vizsgálata esetén, hanem β -1,3-glükánázokkal szinergisztikusan volt jellemző (Roberts and Selitrennikoff, 1988; Mauch et al., 1988).

Az intenzív kitinázokkal foglalkozó kutatások és az eddig megismert tulajdonságaik ellenére, a védekezési reakciókban betöltött valódi szerepük meghatározása mindmáig spekuláció maradt. A kitináz gének működésében módosított transzformáns növények mégis jó megközelítésnek tűnnek kórokozókkal szembeni magasabb fokú ellenállósággal rendelkező növények létrehozásához. Néhány esetben beszámoltak fokozott kitináz-termelő transzgenikus növényekről (Jones, et al., 1988; Linthorst et al., 1990; Neuhaus et al., 1991). Dohányban és repcében konstitutívan kifejeztetett bab kitináz hatására egy fokozottabb állandó-kitináz aktivitást értek el, aminek következtében *Rhizoctonia solani* elleni erősebb rezisztencia alakult ki (Broglie et al., 1991). A paprika bázikus kitináz, a *CACi2* gén kifejeztetése *Arabidopsis*-ban szintén védettséget nyújtott *P. syringae* pv. *tomato*val szemben, valamint erős ozmotikus stressz toleranciát is mutattak a transzgenikus növények (Hong and Hwang, 2005). Ezek alapján úgy látszik, hogy a kitináz gének módosítása, feltehetően más antifungális hatású génekkel kombinálva, hatékony módja lehet legalább néhány kórokozó elleni rezisztencia kialakításának, s ezáltal a természetbe kijuttatott peszticidek csökkentésének (Collinge et al., 1993).

2.4.2. A kitinázok hatása a baktériumokra

Elterjedt vélekedés, hogy a PR-kitinázok csak gombafertőzésekkel szemben lehetnek hatékonyak. Az is ismert azonban, hogy nem csak gomba-fertőzésre, de a baktériumokra adott növényi válaszban is fontos szerepet kell hogy játszanak, hiszen számos vizsgálat mutatta ki jelenlétüket növény-baktérium kapcsolatban (2. táblázat, Varga et al., 2005 b).

Több endokitináz, főként a magas izoelektromos ponttal rendelkezők, lizozim aktivitást is mutatnak (Bernier et al., 1971; Boller et al., 1983; Jollés and Jollés, 1984; Bernasconi et al., 1987; Roberts and Selitrennikoff, 1988; Trudel et al., 1989; Majeau et al., 1990; Brunner et al., 1998), és ezáltal a baktériumok sejtfalában található peptidoglükánt (N-acetil-glükózamin egységekből, N-acetil-muraminsavból és ahhoz kapcsolódó rövid peptid láncból álló poliszacharid) is emészthetik. A kitináz-, kitináz/lizozim aktivitás erőssége és egymáshoz való arányuk változatos és az egyes kitinázok jellemző tulajdonsága, ami ezeknek az enzimeknek a gombák és baktériumok ellen kifejtett védekezésben betöltött kettős szerepét jelzi (Fritig et al., 1998).

2. táblázat Baktérium fertőzés által indukált kitinázok. hpi, kezeléstől a sejtközötti folyadék kinyeréséig eltelt órák száma (hours post inoculation); HR+/HR-, adott növényen hiperszenzitív reakciót okozó/nem okozó baktérium törzs

Növényfaj	Indukáló baktérium	Detektálás időpontja	Vizsgálat szintje	Forrás
Alma	<i>Erwinia amylovora</i> , <i>Pseudomonas tabaci</i> HR+, <i>E. amylovora hrp</i> mutáns HR-	6 hpi, (maximuma 48 hpi)	mRNS	Venisse et al., 2002
Bab	<i>P. tabaci</i> HR+, hővel előlt <i>P. tabaci</i> HR-	4 hpi	mRNS	Jakobek and Lindgren, 1993
	<i>P. fluorescens</i> (Pf101)HR-, <i>Escherichia coli</i> (DH5&) HR-, <i>P. tabaci hrp</i> mutáns HR-	8 hpi		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>angulata</i> , pv. <i>glycinea</i> , pv. <i>tomato</i> , pv. <i>pisii</i> , pv. <i>tabaci</i> HR+	6 hpi	mRNS	Jakobek et al., 1993
	<i>P. s. phaseolicola</i> 10 ⁸	20-24 hpi		
	<i>P. s. phaseolicola</i> 10 ⁵	48-72 hpi		
	<i>P. s. phaseolicola</i> , hővel előlt HR-	8 hpi+H ₂ O 8 hpi	mRNS	Voisey and Slusarenko, 1989
	<i>P. s. phaseolicola</i> HR+	6 hpi		
<i>P. s. phaseolicola</i>	24 hpi			
Dohány	<i>P. solanacearum</i> (GMI1000) HR+	4 hpi	mRNS	Godiard et al., 1990
<i>Arabidopsis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> (8004; 147 HR+)	24 hpi (maximuma 48 hpi)	mRNS	Lummerzheim et al., 1993

3. táblázat. A dohány PR-8 fehérjék: kitináz/lizozimok (Stintzi és mtsai. (1993) után magyarra fordítva). int, intracelluláris; ext, extracelluláris

Név	Osztály	Mol. Súly (kDa)	Izoelektromos pont (pH)	Kifejeződés helye	Relatív specifikus aktivitás (%)	
					Kitináz	Lizozim
chi 34	Ia	34	>7	int	100	10
chi 32	Ia	32	>7	int	100	10
chi 28	Ia	28	>7	ext	30	10
P	IIa	27	(5.3)	ext	20	0
Q	IIa	28	(5.8)	ext	20	0
lys 28a	III	28	4.4	ext	10	0
lys b1	III	28	8.3	ext	10	80
lys b2	III	28	8.3	ext	20	100

A kitináz/lizozimok (EC 3.2.1.17) (3. táblázat) (Stintzi et al., 1993), *in vitro* tesztekben a baktériumokra kifejtett káros hatásuk miatt, a baktériumos fertőzések során lehetnek a védekezés aktív komponensei. A dohányból és uborkából izolált PR-kitinázok lizozim aktivitását vizsgálták *Micrococcus lisodeicticus* sejtek és 4-metil-umbelliferil-kitotrióz szubsztrátokon alapuló módszerekkel (Brunner et al., 1998; Majeau et al., 1990). A kitinázok és β -1,3-glükánázok esetében gyakran használt transzformációs kísérletekhez hasonló vizsgálatok (Lásd 2.4.1. fejezet) nem folytak, így *in vivo* hatásuk máig sincs tisztázva egyértelműen. Mára már csökkent az intenzitása a kitinázokkal kapcsolatos kísérleteknek, de feltehető a kérdés, mi volt az oka, hogy a kitináz/lizozim enzimek nem kerültek előtérbe baktériumos betegségek elleni rezisztencia kialakításában?

2.5. Általános rezisztenciát indukáló baktérium alkotóelemek

A felismeréshez a „kémiai kulcsot” azok a molekulák, ún. elicitorok jelentik, amelyek a mikroorganizmusból szabadulnak fel a növényi szervezetbe kerülésükkor (Lamb and Dixon, 1997). Ezt a megállapítást a gombákkal kapcsolatos munkák támasztották alá. A gombák külső felszínére általánosan jellemző, változatos molekulák között a glükán-, a kitin- és kitozán rövidlancú szacharidokat, glikopeptideket és glikoproteineket valamint az ergoszterolt kell megemlíteni (Boller, 1995). Annak ellenére, hogy erre a sokféle molekulára más és más intenzitású választ kaptak, tehát feltételezhetően jelzik a növény számára az „idegen” fenyegetését, hosszú éveken át nem sikerült megtalálni a kapcsolatot az elicitorok érzékelése, a védekezési reakciók indukciója és a rezisztencia vagy betegség kialakulása között.

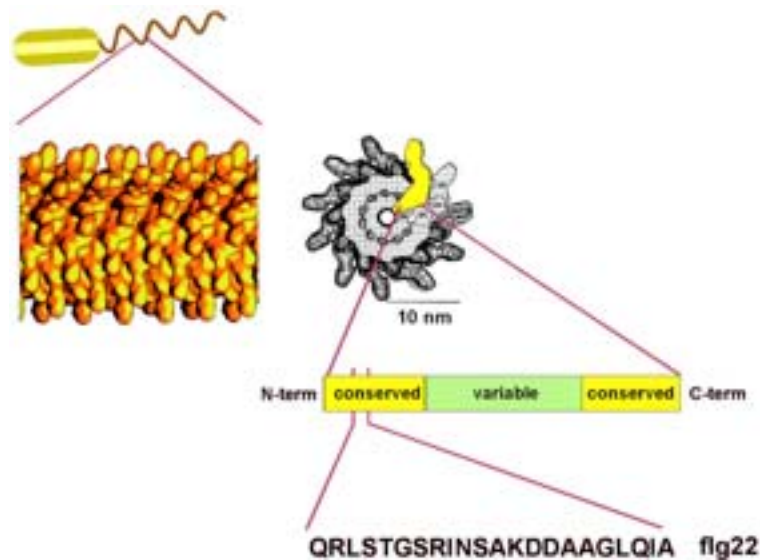
Az általános rezisztenciában a felismeréshez köthető specifikus géntermékek (mint pl. a HR-nél az Avr fehérjék) még nem ismertek, de a felismerés itt is döntő. A természetben a nem növény-kórokozó- és a nem-patogén mikroorganizmusok csoportja népesebb, mint a növény-patogéneké, így a felismerést olyan mintázatokra, elicitorokra kell alapozni, amelyek egyértelmű jelei a mikrobiális veszélynek (Espinosa and Alfano, 2004). E feltételnek olyan molekulák felelnek meg leginkább, amelyek a baktérium sejten kívül találhatóak meg. Ilyen baktérium eredetű extracelluláris elicitorok, pl. az LPS (Mazzucchi and Pupillo, 1976) (Lásd 2.5.1. fejezet) és a harpin (He et al., 1993). Ez utóbbi azonban csak a III. típusú transzportrendszerrel rendelkező baktériumokból választódhat ki a sejten kívülre. A hőstabil harpin fehérjét a tüzelhalást okozó, *E. amylovoraból* (Wei et al., 1992) és *P. syringae* pv. *syringae*, opportunista kórokozóból (He et al., 1993) izolálták. Az izolált különböző harpin molekulákban 22 – az elicitor aktivitásban szerepet nem játszó – aminosavtól eltekintve, nem voltak egymással homológ szekvenciák (Wei et al., 1992; He et al., 1993). Azonban az a tény, hogy a növényekben védekezési reakciót váltanak ki a *hrp* mutáns vagy III típusú transzport rendszerrel nem rendelkező/működő baktériumok (pl. szaprotrófok, hővel elölt baktériumok) (Lovrekovich and Farkas, 1965; Jakobek and Lindgren, 1993), a harpinok érzékelésén kívül egy másik felismerő mechanizmus működését sejteti, amelyre Klement és mtsai. (1997) valamint Lindgren (1997) munkái világítottak rá.

2.5.1. A baktériumsejt felszínén található általános elicitorok

A baktérium sejt külsején lévő általános, növényben védekezést kiváltó elicitor molekulának, legelőször a *Pseudomonas* baktériumok sejt falának lipopoliszacharid és lipopoliszacharid-fehérje komplexet nevezték meg (Mazzucchi and Pupillo, 1976). A lipopoliszacharidok (LPS) amfifil óriás molekulák, amelyek hidrofil heteropoliszacharidból (O-antigén, O-lánc, stb.) és

hozzá kovalensen kapcsolódó lipofil egységből (lipid A) állnak (Silipo et al., 2005). Az O-oldallánc cukor összetétele és azok egymáshoz való aránya különbözik az egyes fajok között (Anderson, 1984). Az O-antigén a gerincesek antitest-alapú, adaptív immunrendszerének erős antigénje. Viszont a lipid-A rész, mely igen konzervatív a különböző baktériumokban, az emlősök veleszületett (*innate*) immunitásának leghatékonyabb elicitora, így a PAMP-ek alapmodelljének is nevezik (Miyake, 2004). Az LPS egyik ismert hatása növényben egy későbbi fertőzés okozta HR kialakulásának gátlása (Sequeira et al., 1972; Mazucchi and Pupillo, 1976; Hodson et al., 1996; Newman et al., 1997; Kecskés et al., 1999). A HR-gátláson kívül az LPS réparepcében (*Brassica campestris*) a β -1,3-glükánáz gén indukcióját okozta (Newman et al., 1995), míg dohányban aktív oxigénformák felhalmozódását (Meyer et al., 2001) és a *hrp* gének kifejeződésének gátlását (Minardi, 1995) írták le az elicitor-kezelésre. Mára már ismert, hogy nem csak a lipopoliszacharidok, de a lipooligoszacharidok (O-láncot nem tartalmazó, ún. nyers LPS) is hasonló, induktív hatással vannak a növényre (Silipo et al., 2005). Az LPS által kiváltott reakciók sokfélék, de a növényi felismerési mechanizmust, az érzékelő receptort és az általa közvetített jelátviteli útvonalat(kat) továbbra is homály fedi.

A flagellum fontos szerepet játszik a baktériumok mozgásában. Ez a sejtközi járatokban végzett mozgáshoz is, de még inkább a növény felszínéről a természetes nyílásokon keresztüli bejutáshoz szükséges. A flagellummal rendelkező, de mozgásában funkcióvesztett *P. viridiflava* mutáns *Arabidopsis*-ban a vad típusú baktériumhoz képest csökkent virulenciát, míg a szövetközi fertőzése (infiltrálása), azzal azonos virulenciát mutatott (Czelleng, 2005). A flagellum flagellin fehérje „építőkövekből” áll. A flagellin terminális régiói, melyek a különböző baktérium fajokban azonos aminosav sorrendet mutatnak, a flagellum belső része felé néznek és itt kapcsolódnak össze, csőszerű képződményt alkotva (3. ábra). A változatos, középső rész a szál külső oldalát borítja. Egy flagellum szál több mint tízezer flagellin molekulából áll (Boller et al., 2004).



3. ábra A flagellum alegységei: a flagellin fehérje és az elicitor aktivitással rendelkező flagellin peptid (flg22) konzervált aminosavsorrendje (Boller et al., 2004). N-term, a fehérje amino-treminális része; C-term, a fehérje karboxi-terminális része; conserved, a baktérium-fajtól független konzervált régió; variable, változatos régió

A flagellum felszíni részét képező hipervariábilis fehérjeszakasz az emlősök adaptív immunrendszerének elsődleges célpontja, de néhány dolgozat a növénybeni felismeréséről is beszámolt (Shimizu et al., 2003; Taguchi et al., 2003). Ezekben az esetekben a glikoziláció, vagyis a flagellin fehérjék egyik poszt-transzlációs megváltozása segítette vagy meggátolta a flagellin molekula felismerését a növény által. Ezzel ellentétben, a konzervált régióból származó peptid érzékelése az állatok és növények általános védekezésének működését stimulálja (Zipfel and Felix, 2005).

Paradicsom és *Arabidopsis* sejtuszuspenzióban végzett kísérletekben a *P. syringae* fajtól izolált flagellin védekezésre utaló válaszokat, aktív oxigénformák illetve etilén felhalmozódását váltotta ki. Ezek az indukált reakciók egyértelműen utalnak a sejtek védekezésére (Boller, 1995, Lamb and Dixon, 1997). A flagellin amino-terminális konzervált régió 15 aminosavjából álló szintetikus peptid (flg15) erősebb reakciót váltott ki, mint a tisztított forma. A peptid hosszúságától függően változott a kiváltott reakciók erőssége. A 15-22 aminosav hosszúságú peptidek bizonyultak a legaktívabbnak (Felix et al., 1999). Intakt *Arabidopsis* csíranövényekben a flg22 peptid (3. ábra) növekedés-gátlást okozott. Ezt a fenotípusos tulajdonságot használták a genetikai vizsgálatok alátámasztására. A közleményben a flg22 peptid által kiváltott kallóz felhalmozódásról és védekezéshez kapcsolható PDF1.2 gén valamint PR-fehérje (PR-1, PR-5) gének indukciójáról számolnak be. Megállapították, hogy a flagellin érzékelésért az *Arabidopsis*-ban az V. kromoszómán található

domináns gén felelős (Gomez-Gomez et al., 1999). A flg22 peptid érzékelését követően közel ezer gén esetében fokozott aktivitás és kétszáz gén működésében gátlás következett be. Az indukált gének java része receptor-szerű kináz (RLK), *R* gén, transzkripciós szabályozók és lehetséges antimikrobiális hatással bíró elemek volt (Zipfel et al., 2004). Tucatnyi változást írtak le a peptid hatására, de HR-t, mint indukált sejtelhalást csak kevés esetben találhatunk (Taguchi et al., 2003). Tehát a flagellin (általában) a tünetmentes BR-t váltja ki növényben, és PCD nélkül gátolja a baktériumokat a szaporodásban (Zipfel et al., 2004). A flagellin által kiváltott jelátviteli útvonal megismeréséhez a kezdeti lépést az V. kromoszómán lokalizált receptor gén, az *FLS2* (*Flagellin Sensing 2*) meghatározása jelentette. Erre a génre mutáns *Arabidopsis* növényekben nem detektáltak védekezésre utaló válaszokat flagellinnel való kezelést követően (Gomez-Gomez and Boller, 2000). Az *FLS2* az állatokból meghatározott flagellin érzékelőhöz, a TLR5 receptorhoz hasonlóan leucinban gazdag ismétlődéseket tartalmazó (LRR) receptor kináz, mely a flagellinnel közvetlen kapcsolatot létrehozva indít be egy mitogén aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád rendszert (Chinchilla et al., 2006). A foszforilációs lépések végén transzkripciós faktorok aktiválásával működésbe lépnek a növényi védekezés aktív komponenseit adó gének (Asai et al., 2002). A konzervált régióban található aminosavsorrend teljesen megegyezik a különböző baktériumokban, legyen szó növény, vagy nem növény kórokozóról, ezért tekinthető ideális elicitornak ez a peptid (Felix et al., 1999). Azonban kivételek mindig akadnak, így itt is. Az *A. tumefaciens* és a *Shinorhizobium meliloti* kapcsolata a növényekkel „különlegesnek” mondható, hiszen az *Agrobacterium*, egyedülálló módon képes géneit a növénybe juttatni és ott kifejeztetni, míg az utóbbi, szimbiotikus kapcsolatokban fordul elő. Bár a növényekkel való kapcsolatuk más mechanizmusok útján alakul ki, abban mégis hasonlítanak, hogy a növényi védekezés komponensei nem akadályozzák meg káros vagy éppen hasznos tevékenységüket. E két, növényekkel speciális („társ”) kapcsolatban lévő baktériumot itt, a flagellint tárgyaló résznél azért fontos említeni, mert ezek flagellinjének konzervált régiójában (flg15-22) több különbséget is kimutattak a többi vizsgált baktériumhoz képest. Ugyanazon régió alapján szintetizált flg15_{A. tum.} és flg15_{R. mel.} peptidek növénybe juttatásakor semmilyen védekezéssel együtt járó reakciót nem mutattak ki (Felix et al., 1999). Az *Agrobacterium* és a rizóbiális szimbióta baktériumok között lévő szoros evolúciós kapcsolatból kiindulva, nem lehet véletlen, hogy ez a két törzs ebben hasonlít egymásra (Wood et al., 2001). *N. benthamiana* növényekben a flagellin és a *P. fluorescens* által indukált BR a növényi szállító szövetek csökkent szállítási képességével járt együtt (Oh and Collmer, 2005). A BR-t mutató levélereken nem mutattak ki festődést a szállító szövetekbe juttatott festékanyag hatására. A festék a kompatibilis baktériummal fertőzött levelek ereibe akadálytalanul jutott el. A szállító

edénynyalábok festődésén alapuló módszert a BR-t elnyomó effektor fehérjék jellemzésére alkalmazták (Oh and Collmer, 2005).

A peptidoglükán (PG) mind a Gram-negatív, mind a Gram-pozitív baktériumok sejtfalának alkotóeleme. Az utóbbi csoportban megközelítőleg tízszeres a sejtfalban mért PG mennyiség a Gram-negatívokéban mérthez képest (Rosenthal and Dziarski, 1994). A PG N-acetil-glükózamin egységekből – a rovarok páncélját és a gombák sejtfalát képző kitin alkotóeleme – valamint N-acetil-muraminsavból és ahhoz kapcsolódó rövid peptid láncból áll. A peptid lánc általában D-alaninból, D-glutaminsavból és mesodiaminopimelin savból áll, ez utóbbi helyett a Gram-pozitív bacillusokban és a Gram-negatív baktériumokban lizin található. Ez a három aminosav együtt ritkán fordul elő a fehérjékben, így a peptid bontó enzimek számára aspecifikusak. A baktériumok különböznek a PG aminosav szekvenciái és molekulaszervezete között (Ryan and Ray, 2004). A PG érzékelése az ecetmuslicában és az emlősökben a peptidoglükán felismerő fehérjék (*peptidoglycan recognition protein*, PGRP) közvetítésével történik (Girardin and Philpott, 2004). A *Drosophilában* a PGRP-k a legelső baktérium érzékelő egységek, amelyek megindítják a jelátviteli folyamatot, melynek végső lépéseként antimikrobiális peptidek képződnek. A Gram-negatív és Gram-pozitív PG közötti különbséget is érzékelik, és ennek megfelelően más-más jelátviteli útvonal működtetésével reagálnak (Lásd 2.1. fejezet). Emlősökben a PGRP-ken kívül a Nod1 és Nod2 fehérjék is közrejátszanak a PG felismerésében (Girardin and Philpott, 2004). Széleskörű kutatások folynak a PG által indukált válaszok tanulmányozására, de csak *Drosophilában* és emlősökben. Általános és állandó jelenlétéből kifolyólag ideális elicitor lehetne a növényi felismerő rendszer számára is, ennek ellenére mindösszesen két dolgozat számol be a PG növényekben történő vizsgálatáról (Wacek and Sequeira, 1973; Felix and Boller, 2003).

Felix és mtsai. (2003) dohány sejtszuszpenzióban a peptidoglükán elicitor aktivitását az indukált pH csökkenéssel igazolták. Azonban a teljes *M. lisodeicticus* sejtek jóval nagyobb elicitor aktivitást mutattak, mint a peptidoglükán készítmény, ezért a további kísérletek a baktériumból származó más elicitor felderítésére koncentráltak.

2.5.2. A baktériumsejt belsejéből izolált elicitor aktivitású molekulák

A hideg sokk fehérjék (*cold shock protein*, CSP) nevüket arról a megfigyelésről kapták, miszerint a baktériumok zömében ilyen, speciális fehérjék halmozódnak fel hirtelen bekövetkező, erős lehűlés (hideg sokk: -10 °C hőmérsékletváltozás) esetén. Ezek a fehérjék a baktériumokban általánosan megtalálható, konzervált szerkezetű fehérje csoporthoz tartoznak, melyek lehetnek állandó működésűek, vagy a hideg sokkon kívül egyéb stresszválaszok

jellemző velejárói is (Thieringer et al., 1998). Például a CspA-szerű fehérjék családja *E. coli*-ban nyolc tagból áll, de közülük csak három, a CspA, a CspB és a CspG fehérjék indukálódnak hideg sokk estén. Így a nevük ellenére, a CSP családba tartozó fehérjék között szép számmal találunk olyanokat, amelyeknek nincs közük a hideg sokk okozta stresszválaszhoz. A CSP-k a nukleinsavhoz kötötten fordulnak elő és RNS saperonként (konformációt fenntartó kísérő molekulaként), valamint a transzláció anti-terminátoraiként funkcionálnak (Bae et al., 2000). A növényekben is ismerünk hideg stresszhez kapcsolható fehérjéket, de ezek nem homológok a baktériumokban található CSP-vel (Gilmour et al., 1996). Mindemellett a baktériumokban található CSP fehérjék szekvenciájával és RNS kötő tulajdonságaival nagy hasonlóságot mutató fehérjék előfordulnak a növényi és állati sejtek nukleinsavához kapcsoltnak (Graumann and Marahiel, 1998). A különböző baktérium eredetű CSP-k szigorúan konzervált régiója egy kb. 15 aminosav hosszúságú szakasz, amely két párhuzamos és ellentétes (*antiparallel*) β -szállal képez hurkot és a fehérje felszínén formáz aromás és bázikus amino oldalláncot (Schröder et al., 1995). A bakteriális CSP családba tartozó fehérjéknek ez az általánosan konzervált régiója tartalmazza azt az RNP-1 ismétlődő szakaszt, KGFGFITP, amely a dohányban elicitor aktivitással rendelkezik (Felix and Boller, 2003). A *M. lisodeicticus* CSP-szerű fehérjéinek konzervált régiója alapján szintetizált különböző hosszúságú szintetikus peptideket megvizsgálva a 22 aminosav hosszúságú (csp22) peptid bizonyult a legaktívabb elicitornak dohányban. A CSP peptidek által kiváltott növényi reakciók: dohány sejtszuszpenzióban a tápközeg gyors lúgosodása, intakt dohány növényben aktív oxigén formák, valamint etilén felhalmozódása. A növényi védekezésre utaló válaszokat a peptid csak a *Solanaceae* családba tartozó fajokban indukált, *Arabidopsis*-ban és más keresztesekben a peptid inaktív volt (Felix and Boller, 2003).

A hidegsokk peptiden kívül felmerült további nem sejt felszíni elicitor meglétének lehetősége, mivel az *FLS2* génre mutáns növényekben a flagellin kezelés nem okozott indukált reakciókat, de a részlegesen tisztított *E. coli* sejt-homogenizátummal való kezelés megvédte a növényt a későbbi fertőzéstől. Ez azt sejtette, hogy a baktérium sejtben a flagellinen kívül más, elicitor aktivitással rendelkező molekulának is lennie kell. A baktérium kivonatból tisztított egyik lehetséges BR elicitor az EF-Tu elongációs faktor, amely nélkülözhetetlen a transzlációnál és az egyik legkonzerváltabb fehérje a baktériumsejtben. A legtöbb baktériumban ráadásul nagy mennyiségben található meg. Az elicitor aktivitással rendelkező, általában 18 aminosavnál hosszabb szintetikus peptidek (pld.: elf26) a keresztes növények széles körében okoztak rezisztenciát. Érdekes azonban, hogy míg az EF-Tu peptid a *Cruciferae* családban védekezést váltott ki, addig a *Solanaceae* család tagjaiban elicitor-aktivitást nem mutattak ki, éppen fordítva, mint a CSP peptid esetében (Kuntze et al., 2004).

Az EFR (EF-Tu Receptor) receptor felelős az elf peptidok felismeréséért. Az elf peptidre egyébként nem reagáló *Nicotiana benthamiana* növények *EFR* génnel transzformált egyedei azonban a védekezéshez kapcsolható reakciókat mutatták elf peptid kezelésre. A *EFR* génre mutáns *Arabidopsis*ok érzéketlenek az elf peptidre és ráadásul fokozott fogékonyságot mutattak *Agrobacterium tumefaciens* fertőzésre. Az elf, és feltehetően más PAMP-ok is tehát fontosak lehetnek e kórokozóval szembeni védelem kialakításában (Zipfel et al., 2006).

Mint ahogy azt bemutattuk az előző bekezdésekben, a baktériumok szerkezetében és működésében elengedhetetlen „molekuláris mintázatok”, melyek a növényi felismerési mechanizmus célmolekuláivá is váltak, nem minden esetben a sejtfelszínhez kötöttek. Mégis, a növényekben és az állatokban kialakultak olyan rendszerek, amelyek képesek ezeket a rejtett struktúrákat is felismerni. A PAMP-ok egyre bővülő köre egyre hangsúlyosabbá teszi a kérdést, hogyan válnak felismerhetővé a védelem „őrszemei”, a receptorok számára ezek a rejtett vagy beágyazott molekulák? Jelenleg ez(ek) a mechanizmus(ok) még nem teljesen feltárt(ak), de a gazda – növény vagy állat – lítikus enzimeit akár előtérbe is kerülhetnek az elicitorok „rejtekhelyükről” való előhozatalában (Zipfel and Felix, 2005).

2.6. Az indukált növényi védekezést gátló baktérium stratégiák

A növényi sejtközötti járatokban a patogén baktériumok kapcsolatba kerülnek a növényi sejtekkel. Az *A. tumefaciens* ezt a kapcsolatot cellulóz szálakkal is megerősíti (Gelvin, 2000). Ezután a baktérium a saját fehérjéit, ún. effektorokat juttat a növénybe, módosítva a gazdasejt működését. A Gram-negatív baktériumokban hat rendszert azonosítottak, melyek segítségével a belső és külső membránokon keresztül a fehérje és nukleinsav szekréció történik (Thanassi and Hultgren, 2000). A két legbonyolultabb, a III. típusú (*type three secretion system*, TTSS) (He et al., 2004), a növénykórokozók közül a *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* és *Pantoea* fajokban, a IV. típusú (T4SS) pedig az *Agrobacterium* fajokban (Christie, 2004) és a *Mesorhizobium loti* szimbióta baktériumban fordul elő (Hubber et al., 2004). A TTSS segítségével a sejtfalon és a plazmamembránon át patogenitással kapcsolatos fehérjéket (Alfano and Collmer, 1997), míg a IV. típusú rendszeren keresztül a gazdanövényben indukált tumorképzéshez szükséges fehérjéket és géneket juttat át a baktérium (Christie, 2004).

2.6.1. A TTSS és az effektorok

A TTSS-t a *hrp* gének kódolják, amelyek csoportokat (*cluster*) alkotva fordulnak elő a patogenitás szigeteken. A *hrp* gének a növényi sejtfalat átszűrő és sejtmembránt elérő pilus

szerkezeti elemeit alkotó fehérjéket, ezen elemek szintézisét vagy „összeszerelését” szabályozó fehérjéket, harpin (Hrp) fehérjéket, valamint effektor fehérjéket (ez utóbbiak közé tartoznak az avirulencia (Avr) fehérjék is) kódolnak (Galan and Collmer, 1999). A *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 törzs több mint 30 effektort injektál a növényi sejtbe. Ezek néhány funkciója: a TTSS által az apoplastba kiválasztott harpinok extracelluláris elicitorokként HR/SAR-t válthatnak ki a növénysejten kívülről; a növénysejtbe jutott Avr fehérjéket a rezisztens gazdanövény R fehérjéi felismerik és hiperszenzitív reakció alakul ki; a PAMP-ok felismerését követően a BR mechanizmus elkezdődik, de a kompatibilis kórokozó TTSS-e által kiválasztott effektor fehérjéi meggátolják a rezisztencia kialakulását; az Avr-R fehérje kölcsönhatás nyomán elkezdődő HR-t a kompatibilis baktérium által a gazdanövény sejtjeibe injektált effektorok akadályozzák meg; az effektorok a szignál útvonalak mentén megállítják a jelátvitelt; némely effektorok az antimikrobiális válaszokhoz (pl. PR-fehérjék) vezető útvonalat blokkolják (Yamir et al., 2004); a sejtben módosítják a gazdasejt transzkripcióját (Alfano and Collmer, 2004). Néhány Avr fehérje által indukált HR-t a *P. syringae* effektorok (AvrPphE_{Pto}, HopPtoN, HopPtoE) gátolták (Espinosa and Alfano, 2004). A TTSS-en keresztül juttatott fehérjék „kettős ügynökök”, mivel amelyik egyik növényben rezisztenciát indukál, az a másik növényben a rezisztencia kialakulását gátolhatja, így vesz részt a betegség-okozásban (Alfano and Collmer, 2004).

2.6.2. A IV típusú transzportrendszer (T4SS)

Az *Agrobacterium* által okozott betegség kialakulásához két alapvető folyamat szükséges: a tumorindukáló DNS-t növénysejtbe juttatni (transzformáció) és ennek segítségével módosítani a növénysejt anyagcseréjét. A növényi sérülések környékén keletkező fenolszármazékokat a VirA/VirG (*vir*=virulencia) szenzor-együttes érzékeli, ennek hatására az *Agrobacterium*ban beindul a transzformációt előkészítő *vir*-indukációs mechanizmus. A VirD1 és VirD2 fehérjék közreműködésével egyszálú DNS, ún. T-szál (T-DNS) szintetizálódik a tumorindukáló (Ti) plazmidról. A VirD2 fehérje a T-szálhoz kapcsolódva alkotja a T-komplexet, melyhez a növényi sejtben a külön egységként átjutó, VirE2 fehérje által alkotott burok kapcsolódik (Tzfira and Citovsky, 2005). A T-komplex a Vir (VirE2, VirE3, VirF) fehérjékkel együtt a IV. típusú transzport rendszeren jut át a növényi sejtbe (Lacroix et al., 2005). A T-DNS beépülésnek folyamata a növényi genomba már jelentős mértékben tisztázott (Tzfira and Citovsky, 2005). A T-DNS-en onkogének és opin gének vannak kódolva. Az onkogének megváltoztatják a növény hormon szintézisét- és érzékelését. Ezért az auxin és citokinin hormonok fokozott termelését nem érzékeli a növény, aminek következtében tumorok (golyvák) képződnek. A fertőzött sejtek opinokat kezdenek el

termelni, ezzel az *Agrobacterium* számára kedvező ökológiai környezetet alakítanak ki (Escobar and Dandekar, 2003).

A fertőzés főbb lépéseit az eddigi kutatások már feltárták. Azonban az a mechanizmus, amellyel az *Agrobacterium* tolerálja vagy elnyomja a növényi védekezés komponenseit, teljesen ismeretlen. Nem ismert például az *Agrobacterium* által indukált nem-gazda rezisztencia, de néhány faktor, mint a mikrobagátló anyagcseretermékek (Sahi et al., 1990) termelődése, a *vir* gén növényi kiváltóinak, a fenolszármazékoknak esetenkénti hiánya (Usami et al., 1987), a T-DNS gyenge beépülése (Narasimhulu et al., 1996) és az *Agrobacterium*-indukált PCD (Hansen, 2000) megjelenése a fertőzés kivédésére ad lehetőséget. Korai stádiumban van még az *Agrobacterium* által növényben kiváltott védekezési reakciók jellemzése. Dohány sejtszuspenzióban végzett vizsgálatok rávilágítottak, hogy az *Agrobacterium* a növényben időben elkülönülő válaszokat indukál. A T-DNS transzfer-deficiens mutánsok egy korai (maximuma 3.-6. órával az indukciót követően) és egy késői 30.-36. óránál kicsúcsosodó növényi génaktivációt indukáltak. Ezzel szemben a vad típussal való fertőzéskor a védekezésben részt vevő géneknek csak a korai indukcióját figyelték meg (Veena et al., 2003), vagyis a késői fázisban lévő génműködést elnyomta az *Agrobacterium*. Ez a megfigyelés azért érdekes, mert az *Agrobacterium*-ból izolált flagellinnek nem volt elicitor aktivitása (Felix et al., 1999), és más aktív elicitor sem izoláltak eddig. Igaz a növényi sejtfalhoz tapadásban hibás, cellulózt nem termelő mutánsok fokozott védekezésre utaló gén indukciót mutattak a vad típusához képest (Ditt et al., 2005). Továbbra is kérdés, mi az *Agrobacterium* stratégiája a növényi védekezés elnyomására, mivel a T4SS-en átjutó fehérjék között a TTSS rendszerben bemutatott szupresszor fehérjékhez hasonlókat nem azonosítottak. Meg kell jegyezni azonban, hogy a T-komplexszel a növénybe kerülő Vir fehérjék ilyen irányú vizsgálata még nem történt meg. Viszont fontos lehet, hogy a VirE2 fehérjét transzportálni képtelen *Agrobacterium* mutáns törzs csak elvétve tudott betegséget okozni (Lee et al., 2003).

2.7. Az agrobaktériumos golyvásodás jelentősége és az ellene való védekezés lehetőségei

Az *Agrobacterium tumefaciens* a növénykórokozók között egyedülállóan széles gazdanövénykörrel rendelkezik. A baktérium a nyitvatermők és a kétszikűek mintegy 60 %-án képes betegséget okozni (De Cleene and DeLey, 1976). Az egyszikű fajoknak csak elenyésző hányada fogékony a kórokozóra. Az *Agrobacterium*-fajok által okozott daganatos betegség komoly károkat okoz a gyümölcsfákon és a szőlőn. A kórokozó, kevés kivételtől eltekintve, az összes európai szőlőfajtát képes megfertőzni. Egyedül a Kövidinka fajta mutat

rezisztenciát (szabadföldön nem jelennek meg a tünetek) az *Agrobacterium* ellen. Ez a széles gazdanövénykör talán a növényi rezisztencia mechanizmusok elnyomását és/vagy kikerülését és/vagy elviselését feltételező, de eddig nem bizonyított folyamatoknak köszönhető. A tünetek a gyökéren (gyümölcsfák) és a fás törzsön (szőlő) egyaránt előfordulnak. A sejtburjánzás következtében az edénynyaláb rendszer elveszíti funkcióját, ami pl. szőlő esetében a tőke gyengüléséhez, súlyosabb esetben a tőke pusztulásához vezet. A fertőzés szisztemikusan elterjed a szőlőben (Lehoczky, 1968), így a betegséggel szemben nincs megfelelő kémiai eljárás. Mivel a fertőzés a fás részekben következik be, ezért a hatóanyag célszövetbe juttatása a szükséges koncentrációban igen nehéz, ami részben a kijuttatás optimális idejének megválasztásán múlik. A vegetációs időszak elején a fás részekben a fejletlen hancstranszport még nem biztosítja az egyenletes szétterjedést, az idős elhalt hancsrészeken keresztül pedig nem tud felszívódni a hatóanyag. A talajon keresztüli felszívódás hatásos lehet, ám ez jelentős többletköltséggel és környezetkárosítással jár. (Szegeci, 2005). Számos kísérlet volt *Agrobacterium*ra rezisztens fajták hagyományos- és molekuláris nemesítési módszerekkel történő előállítására. Az *Agrobacterium*ból származó *virE1* gén dohányba transzformálásával (Szegeci et al., 2001), valamint a T-DNS és az onkogének kifejeződésének géncsendesítéssel történő gátlásával (Escobar and Dandekar, 2003; Lee et al., 2003) golyvásodással szembeni rezisztenciát értek el. Azonban mindezen kutatások mellett a megelőzés, a fertőzésmentes szaporítóanyag telepítése játssza a főszerepet a kórokozó elleni védelemben. A védekezés kialakításának új irányvonala, felhasználva a növényi indukált védekezés komponenseit új stratégiákat állíthat fel az *Agrobacterium* elleni hatékony védelem létrehozására.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Növények

Dohány (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun nn) növényeket üvegházban neveltük. A 4-8 leveles fejlettségű növényeket klímakamrákba tettük 1 nappal a kísérlet kezdete előtt. A klímakamrában 20-25 °C, 50-60 %-os páratartalom és napi 16 óra 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ fényerősségű megvilágítás volt. A NahG növényeket NOVARTIS, Agricultural Biotechnology Research Institute-től kaptuk.

3.2. Kezelés baktériumokkal

A kísérletekben használt baktériumokat (4. táblázat) King's medium B (King et al., 1954) folyékony táptalajon, 25 °C-on szaporítottuk. Élő baktériumokkal való kezelésen kívül hővel elölt baktériumokat is használtunk (*P. tabaci*, *P. phaseolicola* esetében). Az elölés előtt a sejtsűrűséget 10^9 sejt/ml-re állítottuk be. A szaporodás kései logaritmikus fázisában lévő baktérium sejteket centrifugáltuk, a folyékony tápoldat leöntése után vízzel mostuk, majd 70 °C-os vízfürdőben 13 percig inkubáltuk. Az elölés után hígítással állítottunk be 5×10^8 sejt/ml denzitást. Az élő vagy elölt baktérium szuszpenziót az erek közötti levéllemez területekbe fecskendeztük, steril orvosi fecskendővel és 26-os méretű tűvel (Klement, 1990).

4. táblázat A kísérletek során használt baktérium törzsek és a dohánnyal alkotott kapcsolatuk * GSPB No Göttingeni Növénykórokozó Baktérium Törzsgyűjteményi száma

Törzs	Dohány-baktérium kapcsolat típusa	Dohányon okozott tünet	Jellemzők	Származás és hivatkozás
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 55	Szaprotrof	Tünetmentes	Vad típus	Huang et al., 1988
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 61 <i>hrpJ</i>	Inkompatibilis, nincs HR	Tünetmentes	<i>hrp</i> mutáns	Xiao et al., 1994
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coriandricola</i>	Nincs HR	Tünetmentes	Vad típus	GSPB* No 2784
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Nem növénykórokozó	Tünetmentes	Alkalmazása molekuláris klónozásban	Woodcock et al., 1989
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	Nincs HR	Tünetmentes	T-DNS nélküli mutáns	Hoekema et al. 1983
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tabaci</i> H10	Kompatibilis	Normoszenzitív nekrozis	Dohányvész okozója	NCAIM B.01601
<i>Micrococcus lisodeicticus</i>	Nem növénykórokozó	Tünetmentes	Gram-pozitív	Sigma-Aldrich M-3770
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Inkompatibilis	HR	Vad típus	Mansfield et al., 1994
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A281	Nincs HR	Tünetmentes	pTiBo542 C58 kromoszómális háttérben	Hood et al., 1986

3.3. Sejtközötti folyadék kinyerése

A sejtközötti folyadékban található fehérjék vizsgálata azért fontos, mivel a növénykórokozó baktériumok a sejtközötti járatokban szaporodnak, sosem jutnak be az élő növényi sejtbe, s csak a növényi sejtfallal lépnek közvetlen érintkezésbe. Így előfordulhatnak olyan fehérjék, amelyek a sejtfallban, vagy a sejtközötti térbe kijutva hatnak a baktériumokra. Módszerünk Klement (1965) kinyerési módszerén alapult, Ott és mtsai. (2006) módosításai alapján. A dohánylevélből a kezelt érkezőket kivágtuk és desztillált vízben a vágási felületeket a sejttermelékektől lemostuk. A mosott levélérkezőket előzőleg gáztalanított desztillált vízbe merítettük. Majd a leveleket vákuum alá helyezve a sejtközötti járatokból a levegő eltávozott. 1-2 perc után lassan megszüntettük a vákuumot, és így a levelek sejtközötti tere egyenletesen megtelt vízzel. A levelek felületéről szűrőpapírral leittattuk a vizet. Az azonos kezelésű levélérkezőkből 1-3 db-ot 30 ml-es centrifugacsövekbe helyeztük, a cső fala felé a levél színével. A levéldarabok a centrifugális erőnek köszönhetően nem mozdultak el sem függőleges, sem oldal irányban. 2-3 érkező centrifugálása esetén a levéldarabokat centrifugacső belső oldalához ragasztószalaggal is rögzítettük biztosabb tapadás érdekében. A centrifugacsöveket 6 x 30 ml-es szögrotorban, 1000 g viszonylagos nehézségi gyorsulás mellett 15 percig centrifugáltuk, 4 °C-on. A centrifugális erő hatására a sejtközötti járatokból a nyitott légzőnyílásokon keresztül eltávozó és a centrifugacső aljában összegyűlt, 75-200 µl sejtközötti folyadékot –70 °C-on tároltuk a felhasználásig.

3.4. A sejtközötti folyadék sűrítése membránszűrőkkel

A sejtközötti folyadék sűrítéséhez nagy mennyiségű kiindulási anyag szükséges, melyet a 3.3. fejezetben leírtaktól eltérően végeztünk. A kontroll (kezeletlen) és az injektált dohány levéllemezt mindkét felét a főér mentén levágtuk. A vágott felületet desztillált vízzel lemostuk. A levélfeleket előzőleg gáztalanított desztillált vízbe merítettük. Majd a leveleket vákuum alá helyezve a sejtközötti járatokból a levegő eltávozott. 1-2 perc után lassan megszüntettük a vákuumot, és így a levelek sejtközötti tere egyenletesen megtelt vízzel. A levelek felületéről szűrőpapírral leittattuk a vizet. Az azonos kezelésű levélfeleket 5-7 cm szélességű zacskó sávokra helyeztük. A sáv egyik végén 10 ml-es centrifugacső volt ragasztószalaggal rögzítve. A leveleket a centrifugacsőtől kiindulva, nem túl szoros hengerré felcsavartuk, majd ragasztószalaggal rögzítettük. A hengert 30 ml-es centrifugacsőbe helyeztük, melynek aljában a rögzítést biztosító, de a folyadékot átengedő szűrő található. A centrifugacsöveket kilendülő rotorban, 500 g viszonylagos nehézségi gyorsulás mellett 15

percig centrifugáltuk, 4 °C-on. A szűrő fönntartotta a levéllemez hengert, de a sejtközötti folyadékot átengedte. Az így nyert 2-3 ml sejtközötti folyadékot -70 °C-on tároltuk a sűrítésig. A sűrítés nitrogéngáz-nyomás alatt történt ultraszűréssel (*Amicon Stirred Ultrafiltration Cells*). Az ultraszűrő egységben a folyadékot egy beébitett mágneses keverőbot folyamatosan keveri és a nitogéngáz közvetlen nyomása jutattja át a NMWL (*Nominal Molecular Weight Limit*) 5000 és 30000 kDa regenerált cellulóz membránokon (Millipore). A víz és az oldott anyagok a membrán alatt távoznak el az egységből.

3.5. A sejtközötti folyadék fehérjéinek poliakrilamidgél-elektroforézise

A fehérjék szétválasztására magas pH-jú, nem-disszociáló (natív), megszakított Ornstein-Davis puffer rendszert (Ornstein and Davis, 1964) használtunk, melyben az elválasztó gél porozitása a futás irányába csökkent (poliakrilamid grádiense 10-20%). A gélek összetételét a 2. mellékletben részleteztük. A gyűjtőgél egy zsebébe 20 µl mintát tettünk, a töltőpufferral 1:6 arányban. A minták hasonló korú levelekből, a levélen belül hasonló szöveti megjelenésű helyekről származtak. Minden kezelést követően nem határoztuk meg a sejtközötti folyadékban lévő fehérjemennyiséget és nem sűrítettük vagy hígítottuk a mintákat egyforma fehérjetartalomra. Kísérleteink során a fő cél az volt, hogy megállapítsuk egy adott kezelés, milyen és mekkora fehérjeváltozást idéz elő a dohányban a pozitív kontrollhoz képest. Ha az eltérő kezelést kapott levelekből származó sejtközötti folyadékot egymással megegyező fehérjemennyiségre sűrítettük volna, akkor eltűntek volna a kezelésekre egymáshoz viszonyított különbségei. Így minden gélkép mutatta, hogy az indukciót követően időben hogyan alakult az EBR215/250, vagy más fehérjék mennyisége. A töltőpuffer összetétele: 10 % glicerol és 0.02 % brómfenolkék indikátor, 1 x gyűjtőpufferban. A minták gyűjtőgélből elválasztó gélbe vándorlásáig állandó 100 V, majd ezután állandó 150 V feszültséggel futtattuk, kb. 1.5 órán át 4 °C-on. Kisméretű 8 x 7.3 x 0.1 cm-es géleken történt az elválasztás. A géleket ezüstoffestéssel festettük meg (Heukeshofen and Dernik, 1985) (3. melléklet). A tömegspektrometriás analízisre küldött géleket módosított Coomassie-kék módszerrel festettük meg (Rosenfeld et al., 1992).

3.6. Tömegspektrometriás meghatározás

Gélben emésztés: A géleket 3 x 10 percig, 25 mM NH₄HCO₃/50 % acetonitril oldattal mostuk a sók és a Coomassie Brilliant Blue festék eltávolítása végett. A diszulfid-hidakat ditiotreitollal redukáltuk, majd a szabad szulfhidril csoportokat jódiacetamiddal alkiláltuk. Az

emésztést Promega oldallánc-védett tripszinnel végeztük 25 mM NH₄HCO₃ oldatban (pH 8) 37 °C-on 4 órán át. A triptikus peptideket 2 % hangyasav/50 % acetonitril oldattal extraháltuk, majd C18 Zip-tip-en (Millipore) sóalanítottuk.

Tömegspektrometriás analízis: A frakcionálatlan minták MS (*Mass Spectrometry*) analízisét Bruker Reflex III MALDI-TOF tömegspektrométeren végeztük. 2,5-dihidroxi-benzooesavat használtunk mátrixnak. Belső kalibrálásra tripszin autolízis termékek szolgáltak: m/z (tömeg/töltés) 842,51 és 2211.10. Néhány kiválasztott ionról 10-12 lépésben tandem, egymás után következő, MS-MS (PSD, *post source decay*) spektrumot vettünk fel, minden lépésnél 25 %-kal csökkentve a reflektoron feszültséget. A kapott peptidtömegekkel MS-Fit (keresés MS spektrumra (tömegtérkép spektrumra)), a PSD adatokkal MS-Tag (keresés MS/MS spektrumra (PSD-re)), a PSD adatokból *de novo* meghatározott szekvenciákkal pedig MS-*Pattern* (MS-mintázat) lekeresést végeztünk az NCBI adatbázisában (*National Center for Biotechnology Information*) a *Protein Prospector* (<http://prospector.ucsf.edu/>) programcsomag segítségével.

3.7. Enzimaktivitás mérése

3.7.1. Kitináz aktivitás

A kitináz aktivitás teszt során a fent leírt módon futtatott gélek felületére szorosan ráhelyeztünk 0.04 % glikol-kitint tartalmazó fedőgélt. Glikol-kitint a glikol-kitozán acetilálásával állítottunk elő (Trudel and Asselin, 1988). A folyamat során 5 g glikol-kitint 100 ml 10 %-os ecetsavban oldottunk fel. A viszkózus folyadékot éjszakán át inkubáltuk 22 °C-on. Az oldathoz folyamatos mágneses keverés mellett metanolt (450 ml), majd ecetsavanhidridet (7.5 ml) adtunk. A képződött gélt 30 perc állás után apróra daraboltuk, az esetleges ottmaradt folyadékot leöntöttük és metanollal homogenizáltuk. A homogenizátumot 4 °C-on centrifugáltuk 21000 g visznylagos nehézségi gyorsulás mellett. A gélállagú üledéket – másodszeri metanolos homogenizálás, majd centrifugálást követően – 500 ml 0,02 % nátrium-azidot tartalmazó desztillált vízzel homogenizáltuk. Az így kapott 1% (W/V) glikol-kitint 4 °C-on tároltuk. A futtatott és a glikol-kitin tartalmú gélek egymáson való elmozdulását kerülve 2 órán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk, megóvva a kiszáradástól. Az inkubációs idő letelte után a fedőgélt fluoreszcens festékkel (Fluorescent Brightener 28, Sigma) festettük meg. Majd UV fényvel megvilágítva, azon fehérjék, amelyek kitináz aktivitással rendelkeztek, nem fluoreszkáló foltokként voltak láthatók (Trudel and Asselin, 1989). A kiértékelés Alphainnotech TM-26 géldokumentációs rendszer által történt. A foltok nagysága, erőssége jelzi a kitináz aktivitás mértékét. A fedőgéleken a képkészítő szoftver

általi denzitométeres elemzéssel vettük fel az egyes foltok adatait. A vándorlási távolság, a folt legsötétebb régiójában felvett csúcs magassága és a görbe alatti terület jellemezte az egyes kitináz aktivitást mutató fehérjecsíkokat. A görbe alatti terület nem csak a szín intenzitására, de a folt nagyságára is utalt, ezért ez az érték alkalmas volt az egyes kezelések kvantitatív összehasonlítására. Az önkényes egységekben kapott értékek alátámasztották a szemmel is látható különbségeket.

3.7.2. Lizozim aktivitás

A sejtközütti folyadék izoelektromos pont szerinti elválasztását követően a kiválasztott frakciók lizozim aktivitását Selsted and Martinez (1980) módszere alapján mértük. A 200 µl reakció-elegy összetétele: 20 µg *M. lisodeicticus* baktérium, 20 µl pH 6.8 nátrium-foszfát puffer, 10 U lizozim (1 U= olyan mennyiségű lizozim enzim, ami 0.001 min L abszorbancia csökkenést okoz) valamint desztillált víz. Az optikai denzitást Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2S spektrofotométeren 450 nm hullámhosszon mértük. A különböző pH tartományú frakciók lizozim aktivitását különböző pH-értékű pufferek mellett is vizsgáltuk. Az 4.6. fejezetben az eredményeket azon a pH-n mutatjuk be, ahol a legaktívabb baktériumsejt bontást mértük.

3.8. Az EBR tüneti kimutatása

Mivel az EBR tünetmentes, ezért jelenlétét csak közvetett módszerrel lehet kimutatni. Ilyenkor EBR-t indukáló kezelésként hővel elölt, babpatogén *P. savastanoi* pv. *phaseolicolat* injektáltunk a dohánylevélbe. Az EBR-induktor bejuttatása után élő *P. s.* pv. *phaseolicolaval* felülfertőztük az előkezelt részt. Az élő babkórokozó inkompatibilis a dohányban, ezért HR-t okozott, melynek a levélszövet elhalása volt a látható jele. Amennyiben az előkezeléskor bejuttatott baktérium vagy más elicitor indukálta az EBR-t, akkor a HR nem jelent meg (Klement et al., 1999).

3.9. RNS kivonás és cDNS szintézis

A kezelt és kezeletlen dohány levéllemezekből 0.5-24 órával az injektálást követően 0.1 g mennyiséget kivágtunk és folyékony nitrogénben azonnal fagyasztottuk. A -70 °C -on tárolt levéldarabokból a teljes RNS frakció kivonása a Plant Total RNA Extraction Miniprep System-mel (Viogene) történt a gyártó által előírt módszer szerint. A kivonat RNS koncentrációját UV spektrofotométerrel, 260 nm hullámhossznál mértük.

A teljes RNS-ből 2,5 µg felhasználásával, Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) segítségével a gyártó szerint javasolt módon, oligo (dT) indító szekvencia használatával cDNS-t szintetizáltunk.

3.10. A kitináz gén mRNS szintjének vizsgálata valós idejű (Real-Time) PCR módszerrel

Kísérletünkben használt CHO3D9 génre tervezett indítószekvencia koncentrációja, bekötődési hőmérséklete, valamint az 5' és 3' indítószekvenciák bázissorendje: CHO3D9: 3 μ M, 52°C, 5' CAA CCA TTC GAG CCA 3', 5' TAA GCC TCA CAA CCG TG 3'. A 3.9. fejezet alapján előállított 10-szeresen hígított cDNS törzsoldatból 2,5 μ l-t használtunk 15 μ l reakcióelegy összeállításához. A polimeráz láncreakció a DNA Engine Opticon 2 (MJ Research) készülékben, iQ SYBR Green 2x Supermix (BioRad) használatával történt. A reakció 95 °C-on, 6 percig tartó denaturálással kezdődött. A felvitt reakcióelegyben egy ciklus során lezajló folyamatok: denaturáció 95 °C-on 30 mp-ig, bekötődés 52 °C-on 1 percig, szintézis 40 mp 72 °C-on, fluoreszcencia-érték leolvasása. A ciklus 40-szer ismétlődött.

A relatív génkifejeződés mértékét az Applied Biosystems ABI PRISM 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2 (1997) ajánlása szerint határoztuk meg. A $\Delta C(T)$ és $\Delta\Delta C(T)$ értékek kiszámítását az összehasonlító görbe-metszéspont (cycle threshold) módszer segítségével végeztük. A mért C(T) értékek minden esetben az aktinnal voltak normalizálva (aktin: belső kontrol, a dohányban mindig állandó szinten termelődik). A mérések legalább kétszer voltak ismételve. A nem kezelt (kontroll) dohánylevelekben mért értékek adták az 1, relatív értéket. A kezelt minták a kontroll értékével lettek összehasonlítva.

3.11. A fehérjék folyadék közegben történő szétválasztása izoelektromos töltésük szerint

Az elválasztást a Bio-Rad MicroRotor™ Liquid-Phase IEF Cell készülékkel végeztük. A készülék 3 ml folyadék fehérjéit választja szét izoelektromos töltésük szerint. A hígítatlan sejtközötti folyadék elválasztását a készülék használati utasítása szerint végeztük. A folyamat során a folyadékfázisban lévő fehérjéket pH 3-10 tartományon belül tíz frakcióba választja szét a készülék, melyek egyenként kb. 0.7 pH egységen belüli fehérjéket foglalnak magukba. A kiindulási 3 ml, sűrítetlen sejtközötti folyadékban lévő fehérjéket az egyes frakciók nem csak pH alapján elválasztva, de bekonzentráltan tartalmazzák.

3.12. Az agrobaktériumos golyvásodás elleni védekezés indukciója in vitro dohány növényekben

Nicotiana tabacum L cv. Samsun magjait 70 %-os etanol, 1 %-os hypo, majd sterilvizes lemosással fertőtlenítettük. Az így fertőtlenített magokat csapvizes agaron csíráztattuk. A csíranövényeket 1 % szacharóz tartalmú, hormonmentes MS táptalajon (5. melléklet) (Murashige and Skoog, 1962) neveltük tovább. Az *in vitro* dohánynövények leveleibe kontrollként steril vizet és 1 μM sterilre szűrt flagellin peptidet injektáltunk. Az előkezelés utáni indukciós idők 6, 24, és 48 órák voltak. Az indukciós idő elteltével az injektált levelekből 6-8 cm-es levélkorongokat vágunk. A levélkorongokat *A. tumefaciens* baktériummal fertőztük.

Az *A. tumefaciens* A281 törzset AB sókkal kiegészített glükóz-élesztő kivonaton (Lichtenstein and Draper, 1986) szaporítottuk. Az 1-2 napig tenyésztett sejtekből 10^9 sejt ml^{-1} ($\text{OD}_{600}=1.0$) szuszpenziót készítettünk. Ebből a törzstenyészetből adtuk az 50 ml folyékony tápoldatba helyezett levélkorongokhoz 500 μl -t. A nem injektált vagy steril vízzel injektált kontroll, illetve az flg22 peptiddel injektált levélkorongokat 15 percig rázattuk – az előbb leírt módon 5×10^7 sejt ml^{-1} sejtkoncentrációra beállított – folyékony MS tápoldatban. A fertőzött levélkorongokat 14 illetve 24 órán keresztül, sötétben kokultiváltattuk a baktériummal. A kokultiváció során az élő baktériumot együtt tenyésztjük a növényi sejtekkel, szövetekkel, s közben megtörténhet a T-DNS átjuttatása a baktériumsejtből a növényi sejtbe. A kokultivációs idő letelte után 15 percig, 50 μl ml^{-1} cefotaxim tartalmú folyékony MS tápoldatban mostuk, majd 3% szacharóz tartalmú MS táptalajra helyeztük a levélkorongokat. Az ily módon fertőzött növényanyagon 16 órás megvilágítás mellett ($80 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 23-28 °C hőmérsékleten, 2-3 hét alatt alakultak ki az agrobaktériumos fertőzésre jellemző tumor-tünetek. A tumorok számát valamint az elhalt levélrészek arányát 4 héttel a fertőzést követően jegyeztük fel.

3.13. Elicitorok

Az abiotikus elicitorok koncentrációja 0.4 M mannitol, 0.2 M konyhasó, 40 μM paraquat és 0.3 M hidrogén-peroxid, valamint 1 mM 1-amino-ciklopropán-karboxilsav, 0.6 mM szalicilsav és 100 μM metil-jazmonát volt. Ezeket a koncentrációkat irodalmi adatok segítségével és koncentrációsor felvételével állapítottuk meg. Minden esetben azt a legmagasabb koncentrációt tüntettük fel, melynél a legerősebb fehérjeválaszt mutattuk ki, és amely még nem okozott szöveti elváltozást, nekrozist a leveleken.

Az általános elicitorokat (ún. PAMP-ok), a *P. avenae* flg22 szekvenciája alapján szintetizált 22 aminosav hosszúságú peptidet, a *M. lisodeicticus*ból tisztított fehérje konzervált régiója alapján szintetizált csp22 peptidet és az *E. coli* szekvenciája alapján szintetizált elf26 peptidet Georg Felix-től (Zürich-Basel Plant Science Center, Botanisches Institut der Universität Basel, Svájc) kaptuk vizsgálatainkhoz. Több koncentrációt is vizsgáltunk, de nem tapasztaltunk különbséget a magasabb vagy alacsonyabb elicitor-töménység esetében, ezért a leíró publikációkban megállapított koncentrációjú elicitor oldatokat injektáltuk dohányba. A peptidoglikán kereskedelmi forgalomban kapható (Fluka, Kat. szám: 53243). Az LPS a Göttingeni Egyetem Növénypatológiai Intézetéből származik.

3.14. Az eredmények kiértékelése

A hibasávok az egyes ismétlésekben mért adatok (belső ill. független ismétlések) átlagos eltérését mutatják grafikusán. Az átlagos eltérés az adatok átlaguktól való átlagos abszolút eltérését számítja ki, amely így egy adathalmaz szóródásának a mérőszáma. Az átlagos eltérés egyenlete:

$$\frac{1}{n} \sum |x - \bar{x}|$$

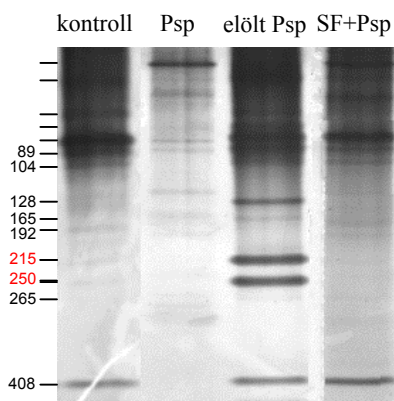
ahol n = ismétlések száma, x = adatpontok. Az adatsorok egymástól való eltérése szignifikánsnak tekinthető, ha a hibasávok nem érnek össze.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A dohány sejtközötti folyadékában biotikus stresszválaszhoz köthető fehérjék bemutatása

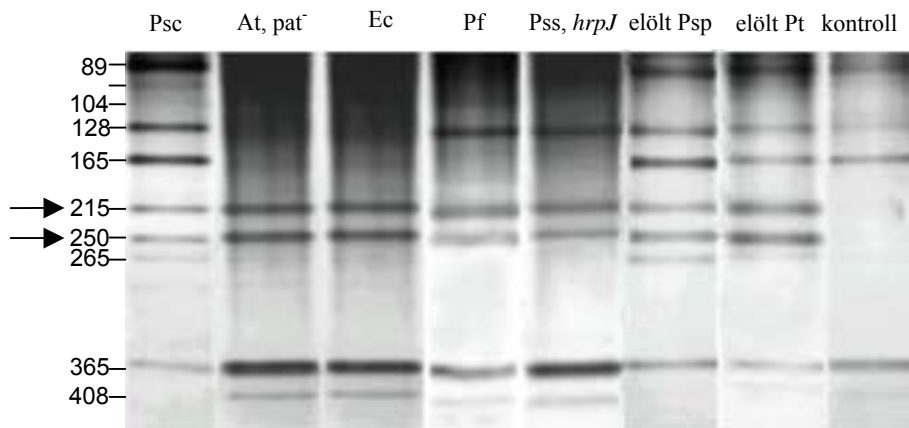
A dohány leveleinek sejtközötti terébe injektált elölt baktérium szuszpenzió rövid időn belül (3-6 óra) kiváltja a növényi választ, melynek közvetett jele a későbbi HR megelőzése (Klement, 2003). Ezzel összhangban a dohány sejtközötti folyadékának egy dimenziós poliakrilamidgél-elektroforézissel elválasztott fehérjemintázatában a 30 kDa alatti tartományban legalább két fehérje megjelenése volt összefüggésbe hozható az EBR-rel (Ott 2002). Kísérleteink elsődleges célja volt a fehérjék EBR-rel való korrelációjának további jellemzése és a fehérjék meghatározása. Az EBR és a fehérjék közötti korreláció meglétét baktériumos indukciót követő fehérjevizsgálattal alapoztuk meg.

Modellünkben az EBR kiváltója a hővel elölt *P. s. pv. phaseolicola* volt. Az élő *P. s. pv. phaseolicola* HR-t okoz és az inokulált szövet összeesése lehetetlenné teszi a sejtközötti folyadék kinyerését. Az előlésre használt hőmérséklet (70 °C, 12 perc) kíméletesen pusztítja el a baktériumokat úgy, hogy az EBR kiváltásában szerepet játszó elicitor molekulák nem, vagy kevésbé veszítik el aktivációs képességüket. A pirossal kiemelt fehérjék megjelenése a sejtközötti folyadékban egyértelműen a baktérium általi indukció eredménye (4. ábra). A két indukált fehérje sem a kezeletlen dohánylevélben, sem az inokuláláshoz használt baktérium szuszpenzióban nem volt kimutatható. A fehérjék növényi válaszhoz kapcsoltságát az is alátámasztotta, hogy a kezeletlen dohánylevél sejtközötti folyadékának összekeverése a hővel elölt baktérium szuszpenzióval nem eredményezte a fehérjék megjelenését, ami arra is utal, hogy nem fehérje bomlástermékekről van szó (4. ábra, Ott, 2002). A fehérjék aminosav-sorrendjének meghatározását csak abban az esetben láttuk indokoltnak, amennyiben e két fehérje indukciós sajátosságai és EBR-rel való kapcsolata bizonyított.



4. ábra. Dohány sejtközötti folyadékának poliakrilamidgél-elektroforézissel elválasztott és ezüsttel festett mintázata. Kontroll, kezetlen kontroll; Psp, *P. syringae* pv. *phaseolicola*; elölt Psp, *P. s.* pv. *phaseolicola* (hővel elölt); SF, sejtközötti folyadék; 89-408, a fehérjék jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján

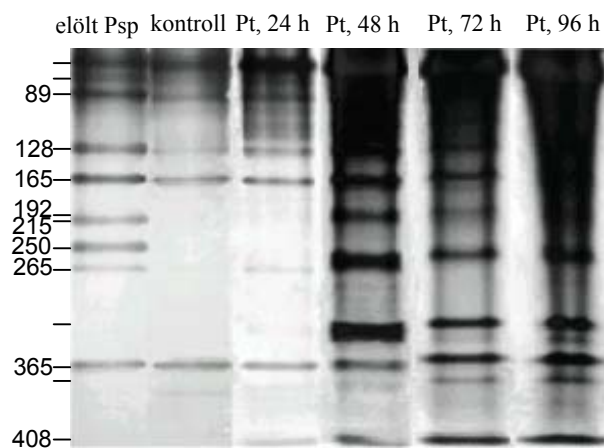
A hővel elölt *P. s.* pv. *phaseolicola* szuszpenzió és desztillált víz kontrollok mellett a dohány leveleibe injektáltunk növény- és nem növénykórokozó baktériumokat. A vizsgált növénykórokozók között szerepeltek a dohányjal inkompatibilis (növény-baktérium kapcsolat típusa: rezisztencia) és kompatibilis (fogékonyság) baktérium törzsek. A baktériumokkal injektált levélérközők egy részéből a fehérje-szintű válasz vizsgálatához sejtközötti folyadékot nyertünk, másik részén felülfertőzést végeztünk HR-t indukáló baktériummal. Az adott baktérium törzssel való előkezelést EBR induktorként értékeltük, amennyiben a kezelt területen végrehajtott felülfertőzést nem követett hiperszenzitív elhalás. Egy EBR induktor (pl. hővel elölt baktérium) dohány levélbe injektálását követően az összfehérje mennyiség növekszik a sejtközötti folyadékban (Ott, 2002). Ez az EBR-hez kapcsolható fehérjék esetében is megfigyelhető volt. Mivel növényenként változhat az EBR erőssége és kialakulásának ideje ezért a biztos kimutathatóságuk végett a sejtközötti folyadékot az EBR késői időpontjában (az EBR maximális intenzitásakor, 12-19 óra) nyertük. A gélképeken az elektroforetikus mintázatnak csak azt a részét mutatjuk, ahol az EBR során változás látható. A vizsgált fehérjéket egyaránt indukálták az élő, a dohányon nem virulens *P. s.* pv. *coriandricola*, a patogenitását vesztett *A. tumefaciens*, a nem növénykórokozó *E. coli*, a szaprotróf *P. fluorescens* és a *hrp* mutáns *P. syringae* pv. *syringae* baktériumok, valamint a kompatibilis, hővel elölt *P. tabaci* (5. ábra). Ugyanezen baktériumokkal kezelt másik levélrészeken mindegyik vizsgált baktérium indukált HR gátlást, tehát EBR-t.



5. ábra EBR indukáló baktérium törzsek EBR-hez kapcsolható két fehérje (→) indukciója 19 órával a kezelést követően, dohánylevél sejtközötti folyadékának elektroforetikus képe. Psc, *Pseudomonas coriandricola*; At, pat⁻, *Agrobacterium tumefaciens* (patogenitását veszített mutáns); Ec, *Escherichia coli*; Pf, *Pseudomonas fluorescens*; Pss, *hrpJ*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae hrpJ* mutánsa; elölt Psp, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (hővel elölt); elölt Pt, *Pseudomonas tabaci* (hővel elölt); kontroll, kezeletlen kontroll; 89-408, a fehérjék jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján

Az EBR hatékonysága gyorsaságában rejlik. Az EBR működését, ezen belül is HR gátlását már nagyon korán, 2-6 órán belül lehet detektálni (Ott, 2002). A 215 és 250 jelű fehérjék ezzel összecsengésben 30 °C-on már 2.5 órával, 20 °C-on már 6 órával a hővel elölt baktériummal való előkezelést követően megtalálhatóak voltak a sejtközötti folyadékban (Ott, 2002). Az EBR-indukáló kezelés tehát minőségi változást idézett elő a sejtközötti folyadék fehérjemintázatában.

Az EBR és az LBR számos tulajdonságban és fiziológiai hatásban tér el egymástól. Így felmerülhet a kérdés, hogy a baktériumokra esetlegesen ható fehérjék összetételében található-e további minőségi különbségek, melyek jellemzően csak az LBR időszak alatt mutathatók ki? Ott (2002) beszámol a 215 és 250 fehérjék fokozatos eliminálásáról a sejtközötti folyadékból. A fehérjék kimutathatási ideje nagyban függött a kísérletekben alkalmazott hőmérséklettől. 20 °C-on 1 héttel az indukció után is gyengén kimutathatóak voltak az EBR-hez kapcsolt fehérjék. Tehát a 215 és 250 fehérjék az LBR működésében is részt vesznek, ezáltal nem alkalmasak a rezisztencia két időszakának megkülönböztetésére. Egyes kisméretű fehérjék jellemzően csak az indukciót követő 2. naptól mutathatók ki a sejtközötti folyadékban. Ezeknek a kisméretű fehérjéknek az LBR-rel való lehetséges kapcsoltságát az 4.5.1 fejezetben, az LPS-el végzett kísérleteink kapcsán taglaljuk.



6. ábra A fogékony dohány sejtközötti folyadékának fehérjemintázata kompatibilis *Pseudomonas tabaci* kezelés után. előlt Psp, *P. s. pv. phaseolicola* (hővel előlt, pozitív kontroll); kontroll, kezeletlen (negatív) kontroll; Pt, *P. tabaci*; 24 h-96 h, a kezelést követően a sejtközötti folyadék kinyeréséig eltelt órák száma; 89-408, a fehérjék jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján

A fehérjék EBR-rel való kapcsolatát olyan baktériumos előkezelések is alátámasztották, amelyek esetében nem tapasztalható a növényi védekezés hatására gátlódó baktériumszaporodás, illetve *hrp* gén aktivitás. A hővel előlt *P. tabaci* baktérium egyaránt indukálja a fehérjéket és az EBR-t is. Azonban az élő, kompatibilis baktériumra nem hat az EBR, és/vagy eddig még nem teljesen ismert úton hatástalanítja a védekezési mechanizmust, hiszen sikeresen elszaporodik. A dohányban betegséget okozó, élő *P. tabaci* fertőzés esetén a két fehérje nem vagy csak nagyon kis mennyiségben mutatható ki a sejtközötti folyadékban (6. ábra). A betegség kialakulásának előrehaladtával más fehérjék mennyisége megnövekszik, viszont a 215 és 250 jelű fehérjék még 24 óra után sem jelentek meg. A kompatibilis *P. tabaci* fertőzés és az EBR-hez kapcsolható fehérjék vonatkozásában azonban megfigyeltünk bizonyos mennyiségi összefüggéseket. Ha nagyszámú, 10^9 kompatibilis baktérium sejtet injektáltunk a dohányba (nem mutatjuk), akkor a sejtközötti folyadékban gyengén megjelentek a kérdéses fehérjék.

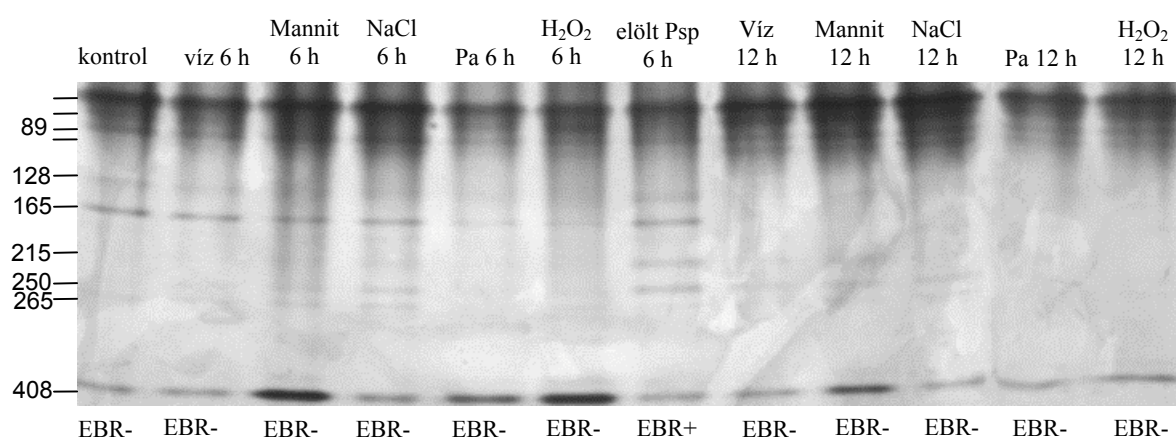
Megállapítható volt tehát, hogy mindegyik baktérium, amely EBR-t indukált, egyben indukálta a vizsgált fehérjéket is a dohánylevélben.

4.2. A fehérjék indukációs sajátosságai

4.2.1. A fehérjék indukciója abiotikus stresszhatások esetén

A növényi védekezéssel legtöbbször összefüggésbe hozott fehérjék a PR fehérjék (Stintzi et al., 1993). Indukciójuk azonban nem csak a kórokozók (vírusok, gombák, baktériumok),

vagyis a biotikus stressz sajátossága, hanem ozmotikus-, só- vagy oxidatív stresszhatások kivédésének, etilén, auxin, citokinin vagy szalicilsav kezelés jellemző velejárái (Van Loon, 1983). Két kérdés megválaszolása alapvető a fehérjék EBR-rel való kapcsolatának meghatározásához. Az első: Indukálódnak-e a fehérjék olyan kezelések esetén, amelyek jellemzően PR fehérjék termelődését eredményezik? A második: Az EBR 215 és 250 esetleg már régóta ismert PR-fehérje? A 215 és 250 fehérjék EBR-rel való korrelációjának megállapításáért baktérium-előkezeléseken kívül abiotikus stresszek – só, ozmotikus és oxidatív stressz – okozta fehérjevaltozásokat vizsgáltuk a dohány sejtközötti folyadékában.



7. ábra Indukált ozmotikus-, só- és oxidatív stressz alatt az EBR-hez kapcsolható fehérjék (215, 250) elmaradása 24 órával a dohányba injektálás után. kontroll, kezeletlen kontroll; víz, desztillált víz; Mannit, mannitol (0.4 M); NaCl, nátrium-klorid (0.2 M); Pa, paraquat (40 μ M); H₂O₂, hidrogén-peroxid (0.3 M); elölt Psp, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (hővel elölt); 6 h és 12 h, a kezelést követően a sejtközötti folyadék kinyeréséig eltelt órák száma; 89-408, a fehérjék jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján; EBR+/-, az EBR működése/nem működése a HR-gátlás teszt alapján

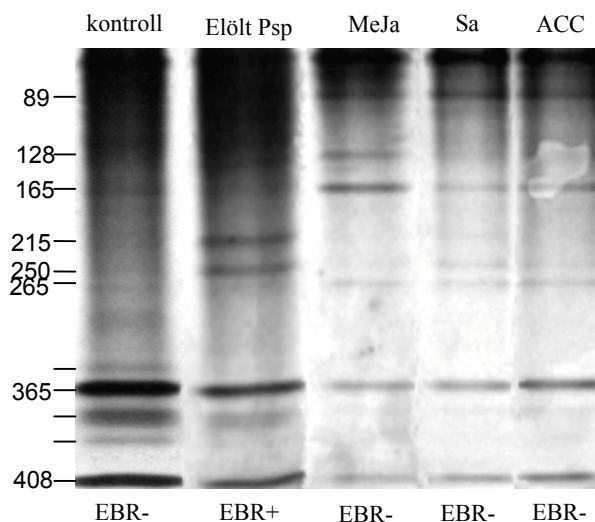
A dohány vízzel injektálása során a tűszúrás nyomán sérülések keletkeznek, de ezek sem többlet fehérje termelést, sem EBR-t nem indukáltak a dohányban (Varga et al., 2005 a). Meg kell jegyezni, hogy a számos vizsgálat közül néhányban megfigyeltük a 215 és 250 fehérjék nagyon gyenge indukcióját víz hatására (Ott et al., 2006). A dohányokban, a leveleikbe injektált oldatokkal, különböző stresszhatásokat idéztünk elő. Az injektálás után 6, 12, 24 órával megfigyeltük a fehérjék előfordulását a sejtközötti folyadékban. A 0.4 M-os mannitol oldat dohányba injektálásával ozmotikus-, 0.2 M-os konyhasóval só-, 40 μ M paraquat és 0.3 M hidrogén-peroxiddal pedig oxidatív stresszhatás fehérje indukcióját vizsgáltuk. NaCl és mannitol dohányba injektálását követően 6 órával kis mértékben kimutathatók voltak a fehérjék a sejtközötti folyadékban (7. ábra). Az abiotikus elicitorok által indukált fehérjék mennyisége kevesebb volt, mint a hővel elölt baktérium általi indukció esetében. A kezelt levélfelületeken hat óra múlva végzett felülfertőzésre megjelent a HR,

vagyis az EBR nem alakult ki e vegyületek dohányba injektálásával (nem mutatjuk). Ez a gyenge indukció nem erősödött a vizsgálati idő előrehaladtával, és 12 órával az indukciót követően a fehérjék az ezüstoffestés érzékenységének alsó határát közelítő mennyiségben voltak jelen a mintákban.

Mivel abiotikus stresszek nem indukálták a kérdéses fehérjéket, vagyis az eddig ismert PR-fehérjéktől eltérő indukciós tulajdonságúak, úgy feltehetően új, BR-specifikus fehérjék azonosítása történhet meg.

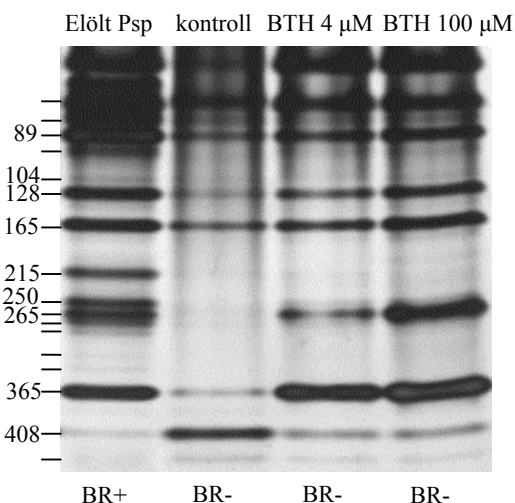
4.2.2. A fehérjék indukciója jelátviteli útvonalakban résztvevő kémiai anyagokkal

A növényben szisztémikusan ható rezisztencia-mechanizmusokban, mint amilyen a SAR és az ISR, fontos szerepet játszanak az ún. jelátviteli molekulák. Ilyenek a szalicilsav, a jazmonsav és az etilén (Ryals et al., 1994). Növénybe injektálásuk PR fehérjék termelődését eredményezi (Van Loon, 1983). 100 μ M metil-jazmonát vagy 1 mM 1-amino-ciklopropán-karboxilsav, az etilén prekursorának dohánylevelekbe injektálását követően azonban az új fehérjék nem voltak felfedezhetőek a sejtközötti folyadékban (8. ábra). A 0.6 mM szalicilsav kezelés esetén, a legérzékenyebb ezüstoffestés módszerrel, alig kimutatható kifejeződést kaptunk. A vizsgált kemikáliák nem indukálták a 215 és 250 jelű fehérjéket, és ezzel összhangban a HR-gátlás teszttel sem tudtuk kimutatni a védekezést (nem mutatjuk). A szalicilsavat felhalmozni nem képes NahG transzgenikus dohány növényekben hóvel előlt baktérium kezelést követően az EBR215/250 fehérjék a nem transzgenikus növényben is kimutatott szinten jelentek meg a sejtközötti folyadékban, és a HR-prevenció jelezte az EBR működését .



8. ábra Dohány sejtközötti folyadékának mintázata jelátviteli útvonalakban részt vevő kémiai anyagok injektálását követően húsz órával. kontroll, kezeletlen kontroll; elölt Psp, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (hővel elölt); MeJa, metil-jazmonát (100 μ M); Sa, szalicilsav (0.6 mM); ACC, 1-amino-ciklopropán-karboxilsav (1 mM); 89-408, a fehérjék jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján; EBR+/-, az EBR működése/nem működése a HR-gátlás teszt alapján

A növényi védekezést fokozó benzo-thiadiazolt (BTH) 1, 4, 20 és 100 μ M koncentrációban dohány levelekbe injektáltunk. A kérdés az volt, hogy a BTH által indukált védekezési mechanizmus ugyanaz-e, mint a hővel elölt baktériummal indukált BR. A fehérjék megjelenését a sejtközötti folyadékban a BTH hatástartama alatt vizsgáltuk. 4 nappal a dohánylevelekbe injektálást követően a kezelt levelek sejtközötti folyadékában nem voltak kimutathatóak az EBR-hez kapcsolt fehérjék (9. ábra). A BTH-val kezelt leveleken elhalás jelentkezett, az immunfokozó nem okozott HR-preventív hatást (nem mutatjuk).

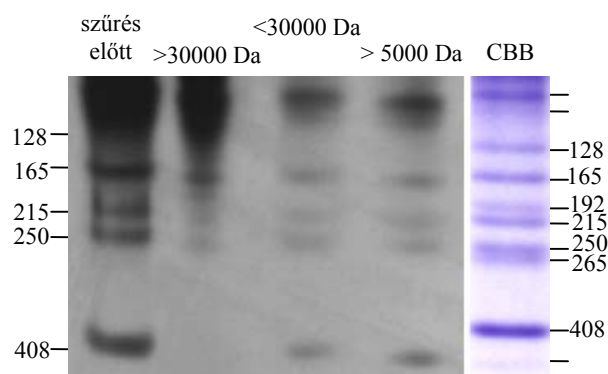


9. ábra Benzo-thiadiazollal kezelt dohány levél sejtközötti folyadékának fehérje-mintázata. Elölt Psp, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (hővel előlt), 3 nappal a dohányba injektálást követően; kontroll, kezeletlen kontroll; BTH, benzo thiadiazol, 4 nappal a dohányba injektálást követően, 89-408, a fehérjék jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján; BR +/-, az általános rezisztencia (BR) működése/nem működése a HR-gátlás teszt alapján

Kísérleteinkben tehát a jaszmonsav, szalicilsav és etilén előkezelések, melyeknek gyakori velejáráói a PR fehérjék, nem eredményezték a 215 és 250 jelű fehérjék megjelenését a dohány sejtközötti folyadékában valamint az EBR szempontjából a BTH is inaktív vegyület.

4.3. Az EBR-rel korreláló, sejtközötti folyadékban megjelenő fehérjék meghatározása

A fehérjék meghatározására tömegspektrometriás módszert alkalmaztunk. A tömegspektrometriás analízishez a fehérjéknek olyan mennyiségben kellett lenniük az egyes gélcsíkokban, hogy Coomassie-kék festéssel látható legyen. A festék érzékenysége 50-100 ng fehérje csíkonként. Mivel a növényekből kinyert sejtközötti folyadék összfehérje-tartalma, Bradford-reagenssel meghatározva (Bradford 1976), 150 µg/ml, a sűrítés elengedhetetlen volt. A regenerált cellulóz membránon sűrített sejtközötti folyadékban azonban kevesebb fehérjét tudtunk kimutatni, mint a kiindulási anyagban (10. ábra). A fehérjék visszanyeréséhez szükséges volt a membránhoz kötődött, nagymennyiségű fehérje pH 6.8 Tris-pufferral történő lemosása a szűrést követően. A pufferban oldott fehérjék koncentrációja 40-szeres volt a kiindulási sejtközötti folyadék fehérjemennyiségéhez képest. Az így sűrített fehérje oldatot nagyméretű (16 x 14 x 0.1 cm) gélen futtatva választottuk el, módosított Coomassie-kékkel festettük és a célzott fehérjecsíkokat a gélből kivágva a Szegedi Biológiai Központ Tömegspektrometriai Laboratóriumába küldtük meghatározás céljából.

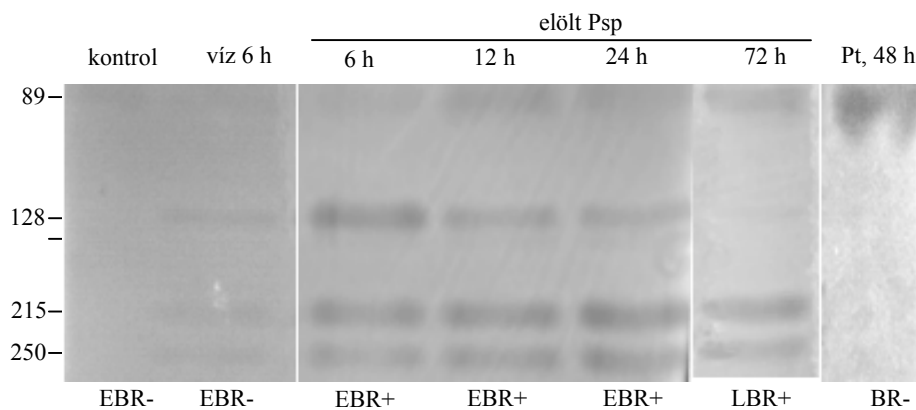


10. ábra A dohány sejtközötti folyadék sűrítésének lépései. szűrés előtt, hővel előlt baktériummal injektált dohány levél sejtközötti folyadéka; >30000 Da, NMWL 30 000 Da regenerált cellulóz membránon át nem jutó fehérjék mintázata; <30000 Da, NMWL 30 000 Da regenerált cellulóz membránon átszűrt sejtközötti folyadék fehérjetartalma; > 5000 Da, NMWL 30 000 Da regenerált cellulóz membránon átjutó, de az NMWL 5000 Da membránon fennmaradó fehérjék összessége; CBB, az NMWL 5000 Da szűrőn fennmaradt és onnan pH 6.8 Tris-pufferral lemosott fehérjék mintázata, Coomassie Brilliant Blue R250 festékkel festve; 128-408, a fehérjék jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján

A gélelektroforézissel elválasztott két sáv tripszines emésztményét frakcionálás nélkül vizsgáltuk MALDI-TOF tömegspektrometriával. Mindkét emésztményben kb. 20 peptidet detektáltunk, amelyek 80%-a a két mintában megegyezett, amiből arra következtettünk, hogy azonos, vagy igen hasonló fehérjékkal állunk szemben. A mért peptidtömegekből nem tudtuk fehérjét azonosítani, ezért PSD spektrumot (forrás utáni bomlás) vettünk fel a hat legintenzívebbnek mért peptidről: $MH^+ = 779.4; 1588.7; 1748.8; 1899.9; 2464.2$ és 2649.2 (protonált molekula ion). Az $MH^+ = 779.4$ és 1588.7 tömegű peptidek PSD spektrumának manuális szekvenálása a következő aminosav sorrendeket eredményezte: DAVI/LSFK és PDI/LVAR. (az Ile/Leu között nem tudunk különbséget tenni.) Ezek a szekvenciák MS-*Pattern* lekeresés alapján egy 26 kDa-os bab kitináz (NCBI# 10120702) [144-150] és [138-143] szakaszainak feleltek meg. Ezen kívül az $MH^+ = 1748.8$ tömegű peptid PSD spektruma MS-Tag lekeresés alapján egy rizs kitináz (NCBI# 7435372) triptikus peptidjére illet: GPLQISWNFNYGPAGK. Az aláhúzott aminosav szekvenciát a spektrumban detektált N- és C-terminális fragmens ionok egyértelműen alátámasztják. Mindent egybevéve megállapíthattuk, hogy egy ezidáig még le nem írt dohány kitinázt találtunk, melyek indukciós sajátosságai és időbeni lefutása jól korrelált az EBR-rel.

A MALDI-TOF vizsgálat eredményei szerint az EBR-hez kapcsolható fehérjék meghatározott aminosav-szekvenciái kitinázok konzervált régiójához hasonlítanak. A kitinázok természetes szubsztrátja a kitin. Glikol-kitozánból előállított glikol-kitin tartalmú poliakrilamid-gélben lehetőség van kitináz-aktivitás kimutatására (Trudel and Asselin 1989).

A 215 és 250 jelű fehérjék már 6 órával a hővel előlt baktériumos előkezelés után erős kitináz aktivitást mutattak. A kitináz-aktivitás teszt nem csak a kitinázok szelektív kimutatására volt alkalmas, hanem lehetőséget adott a fehérjék kvantitatív mérésére is. Az aktivitás növekedését jelző, nagyobb és sötétebb litékus folt a fehérjék mennyiségének növekedését jelzi (8. ábra). *P. tabaci* előkezelés után, melynél nem volt várható az új kitinázok megjelenése, a teszt is negatív eredményt mutatott (8. ábra).



11. ábra Dohány levél sejtközötti folyadékából kimutatott kitináz aktivitás. kontroll, kezeletlen kontroll; víz, desztillált víz; elölt Psp, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (hővel előlt); Pt, *P. tabaci*; 6 h-48 h, az injektálástól eltelt idő; 89-250, a kitinázok jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján; EBR+/-, LBR+ és BR-, a korai (EBR), a késői (LBR) általános rezisztencia (BR) működése/nem működése a HR-gátlás teszt alapján

A kitináz-aktivitás teszt elvégzését követően felfigyelhetünk két másik fehérjére (11. ábra). Ezek szintén olyan kezeléseket követően jelentek meg a sejtközötti folyadékban, melyek EBR-t indukálnak. Ha megvizsgáljuk az ezüst-nitráttal festett dohány sejtközötti folyadék fehérjemintázatát (Lásd 4. és 5. ábra) látható, hogy az általunk leggyakrabban használt nem denaturáló poliakrilamid-gélben ezek a kitinázok nem különíthetők el a kezeletlen dohánylevélben is jelenlévő egyazon helyre vándorló fehérjéktől. A 128-al jelölt helyen tehát több fehérje található, melyek közül (legalább) az egyik kitináz. Látható, hogy míg az EBR 215 és 250 kitinázok még 72 órával az injektálást követően is jól kimutathatóak, addig a 128-as fehérje már alig látható (11. ábra). Működése és jelenléte tehát csak az EBR-re, vagyis a korai időszakra tehető. Ez a kitináz feltételezhetően – Kauffmann et al. (1987) nevezéktana szerint – a PR-N (1,3- β -glükánáz) fehérjével egy helyre vándorol. 128-as fehérjét egy következő EBR-ben szerepet játszó komponensként jegyezhetjük fel. A tömegspektrometriás azonosítást azonban nehezíti, hogy a 128 helyen legalább két fehérje található és a kimutatás is csak a kitinázokat szelektíven mutató teszt alkalmazásával lehetséges.

A 215 és 250 jelű fehérjék tehát egymásra igen hasonlító kitinázok, melyeknek az eddig meghatározott aminosav sorrendjét a 12. ábrán mutatjuk be.

¹ MNFSSRKHFI	FLFALAIVVV	VVPRTILAQS	VADVVSNAFF	SGIADQAAST	⁵⁰
-----					⁵⁰
⁵¹ CEGK GFY TRA	RFLEALQSYF	NFGTIG STDD	SKRE IAAFFA	HVTHETGHMC	¹⁰⁰
-----					¹⁰⁰
---	GFYTR ---	---	GSTDD	SKR ---	---
¹⁰¹ FINEINGPSL	DYCDENNTEY	PCVSGKNIYYG	RGPIQLSWNF	NYGPAGK SIG	¹⁵⁰
-----					¹⁵⁰
---	---	---	-GPIQLSWNF	NYGPAGK SIG	---
¹⁵¹ FDGLNDPDI	ARDAVISFKT	ALWYWMNNCH	SLITSGQGFG	PTIRAINGQI	²⁰⁰
-----					²⁰⁰
FDGLNDPDI	ARDAVISFKT	ALWYWMNNCH	SLITSGQGFG	PTIRAINGQI	²⁰⁰
²⁰¹ ECDGGPQTVA	RRVEYYTEYC	QQLGVETGDN	LTC ²³³		

ECDGGPQTVA	RRVEYYTEYC	QQLGVETGDN	LTC		

* ²³⁴ HPK.LKRLNERITRDFNY.LLHGCEAYIYML.ELNKTPLYIILF.KEYTIILHSW					

12. ábra Az EBR215/250 fehérjék tömegspektrometriával meghatározott aminosav sorrendje. Fekete szín, az adatbázisban talált kitináz szekvenciája, a kiemelt részek az EBR215/250 fehérjével közös szekvenciareszletek; piros, a tömegspektrometriával meghatározott szekvencia.

A stopkodon (*-tól) előtti ismert részek egyben homológok egy másik kitinázzal (12. ábra). Ezt a kitinázt (DW000275) a dohány génjeinek szekvenálási programjában találtuk meg, de lehetséges funkciót nem társítottak a fehérjéhez. Az aminosavak számozása az adatbázisban talált kitináz alapján történt. Az ismeretlen kitináz teljes aminosavsorrendjében kötőjelekkel helyettesítettük azokat az aminosavakat, amelyek a tömegspektrometriai vizsgálat alapján nem azonosak az EBR215/250 fehérjében lévővel. Az EBR215/250 fehérjéből megszekvenált és itt bemutatott szekvenciák 100 %-ban megegyeztek az ismeretlen kitinázzal.

A teljes EBR-hez kapcsolható kitináz aminosav sorrendjét még nem sikerült meghatározni. Az EBR215/250 kitináz ismert szekvenciájának tömege 10 663.9 Da, izoelektromos pontja pH 4.82. A szekvenciában más fehérjékben is megtalálható konzervált domén található. Ez a 19-es családba tartozó kitinázokra jellemző glikozid-hidroláz domén.

4.4. Az EBR215/250 kitinázok az EBR molekuláris markerei

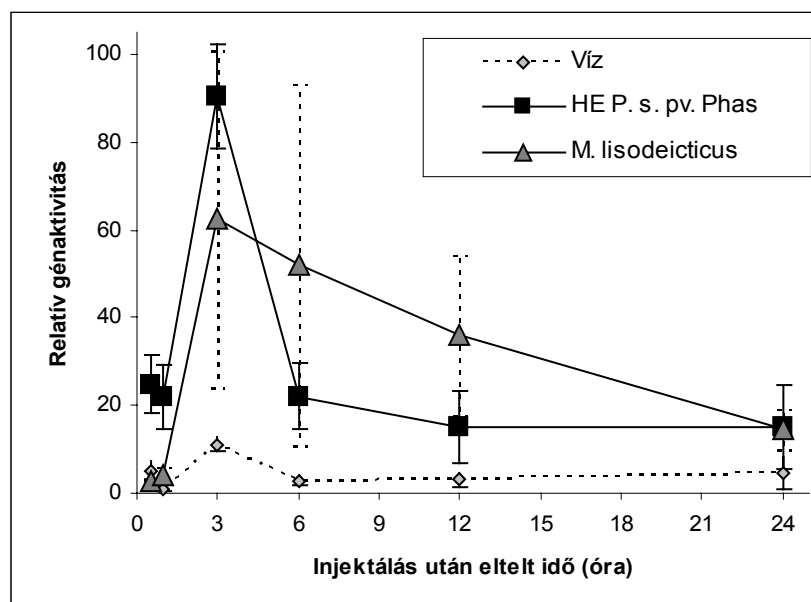
Az általunk vizsgált kezelések összességét és azok EBR-hez kapcsolt kitináz indukcióját foglalja össze az 5. táblázat. Szatmári Ágnes a kitinázokra jellemző konzervatív régiók alapján tervezett indító-szekvenciák (5' CAA CCA TTC GAG CCA 3'; 5' TAA GCC TCA CAA CCG TG 3') felhasználásával sikeresen klónozte az EBR215/250 fehérjék génjét (*chto3D9*, génbanki szám: AJ880384) (Ott et al., 2006). A tömegspektrometriás vizsgálat szerint a '215' és a '250' fehérjék az eddig meghatározott aminosav sorrendjükben

megegyeznek. Ha van különbség a két fehérjében az csak a karboxi terminális, eddig még ismeretlen régióban lehet. Nem vethető el, hogy két külön gén kódolja a '215' és '250' fehérjéket, de az is valószínűsíthető, hogy a génről átíródó fehérjék a translációt követő módosulásoknak köszönhetően különülnek el egymástól. A fehérjék teljes aminosav sorrendjének és génjének meghatározásáig megalapozottnak láttuk, hogy a *chto3D9* gént az EBR markerének, és az EBR215/250 fehérjék génjének tekintjük. A már említett indítószekvenciákkal megvizsgáltuk a kitináz génről átíródó mRNS termelődést és időbeli lefutását (13. ábra). Az EBR erősségének mérése relatív, csak a HR gátlás kialakulása és mértéke szolgáltat információt a rezisztencia működéséről. A valós idejű PCR és a kitináz-aktivitás teszt módszerekkel mért EBR215/250 aktivációból következtethetünk a vizsgált kezelés EBR-indukciójára.

Hővel előlt baktériumok nem mindig alkalmasak EBR indukálásra, például amikor a vizsgálat steril, *in vitro* növényekben történik. Az általunk használt hőkezelés ugyanis a baktériumokat nem pusztítja el teljes mértékben. A hőkezelés után baktérium szuszpenzióban, csekély százalékban ugyan, maradnak nem élettelen, csak inaktivált sejtek. Ezek a sejtek *in vitro* kultúrába kerülve, a számukra igen kedvező körülmények között, visszanyerik aktivitásukat, és elszaporodhatnak. Az EBR mérése lehetővé tette, hogy olyan elicitor molekulákat vizsgáljunk intakt növényben, amelyek önmagukban is kiváltják a rezisztenciára jellemző tulajdonságok mérhető részét, teljes baktériumsejtek használata nélkül.

5. táblázat A kitinázok és az EBR indukciója közötti összefüggés. + a fehérje/EBR kimutatható; - a fehérje/EBR nem kimutatható; +/- a fehérjék detektálása a kimutathatóság alsó határán volt; EBR 215*; EBR 250*: a fehérjék jelzése gélbeni vándorlási távolságuk alapján

Kezelések	Kitináz 215*	Kitináz 250*	EBR
<i>P. coriandricola</i>	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> (pat-)	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+
<i>P. fluorescens</i>	+	+	+
<i>P. syringae</i> 61 <i>hrpJ</i>	+	+	+
Hővel előlt <i>P. phaseolicola</i>	+	+	+
Hővel előlt <i>P. tabaci</i>	+	+	+
Élő <i>P. tabaci</i>	-	-	-
<i>M. lisodeicticus</i>	+	+	+
Mannitol 0,4 M	-	-	-
Konyhasó 0,2 M	+/-	+/-	-
Paraquat 40 µM	+/-	-	-
Hidrogén-peroxid 0,3 M	-	+/-	-
Jázmonsav 100 µM	-	-	-
ACC 1 mM	+/-	+/-	-
Szalicilsav	+/-	+/-	-



13. ábra *A chto3D9* gén relatív aktivitásának mértéke és időbeli lefutása az abszolút (kezeletlen) kontrolhoz viszonyítva. Víz, desztillált víz; HE P. s. pv. Phas, hővel előlt *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*; M. lisodeicticus, *Micrococcus lisodeicticus*. Hiba sávok: a középértékek átlagos eltérése, ahol n=4

Eredményeinket, melyek a vizsgált elicitorok által kiváltott reakciókról számolnak be, az egyes elicitorok baktériumsejtbeli helye alapján csoportosítva mutatjuk be.

4.5. Az EBR elicitorainak meghatározása

4.5.1. A baktériumsejt külső felszínéhez kapcsolható elicitor molekulák

Flagellin 15

Kísérleteinkben 2 μ M koncentrációjú flg15 peptidet injektáltunk intakt dohány növények leveleibe. Az injektálás után 6, 24, 48, 72 órával a kezelt levelek egy részén HR indukáló baktériummal felülfertőzést végeztünk, a többitől sejtközi folyadékot nyertünk. A sejtközi folyadék fehérje összetételében a peptid hatására bekövetkező változásokat natív, poliakrilamidgél-elektroforézis módszerrel követtük nyomon. A 215 és 250 kitinázok egyik vizsgált időpontban sem voltak kimutathatók a sejtközi folyadékból. A flg15 nem indukált HR gátlást egyik felülfertőzési időpontban sem. A 6. táblázat a kezelt levelek felülfertőzésekor megjelenő HR mértékét értékeli 0-5 számokkal, ahol a 0 teljes HR gátlást (BR-t), az 5 teljes elhalást jelöl.

6. táblázat Flagellin (flg15) és lipopoliszacharid (LPS) elicitorokkal előkezelt leveleken *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicolaval* indukált hiperszenzitív reakció (HR) megjelenésének mértéke. Jelölések: hpi, az injektálás után a felülfertőzésig eltelt idő; kontroll, kezeletlen kontroll; *P. s. pv. coriandricola*, *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola*; 0-5, a felülfertőzött területen megjelenő HR mértéke: 0- nincs HR, 1- a szövetek jellegében változás látható, de nincs jellemző HR elhalás, 2- nem a teljes felülfertőzött területen jelent meg a HR, 3- a HR megjelenik a teljes felülfertőzött területen, de nem teljes az elhalás, a szövetek zöld színűek maradnak, 4- a felülfertőzött területen zöld és elhalt foltok váltakozva, nagyobb arányban vannak az elhalt szövetrészek, 5- teljes HR

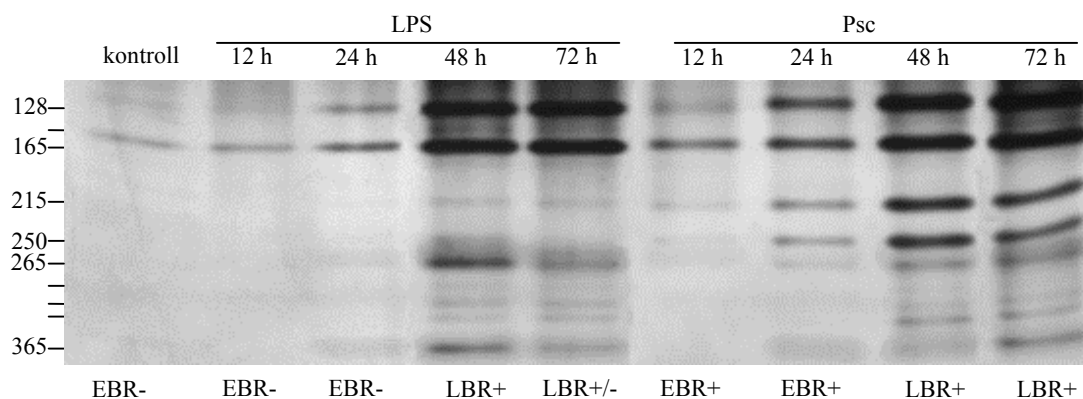
hpi (óra)	kontroll	flg15	LPS	flg15+LPS	<i>P. s. pv.</i> <i>coriandricola</i>
6	5	5	5	5	2
24	4	5	4	4	0
48	3	2	0	0	0
72	5	5	1	1	0

Az flg15 peptid nem okozott HR gátlást, vagyis BR-t dohányban a vizsgált időpontokban.

Lipopoliszacharid

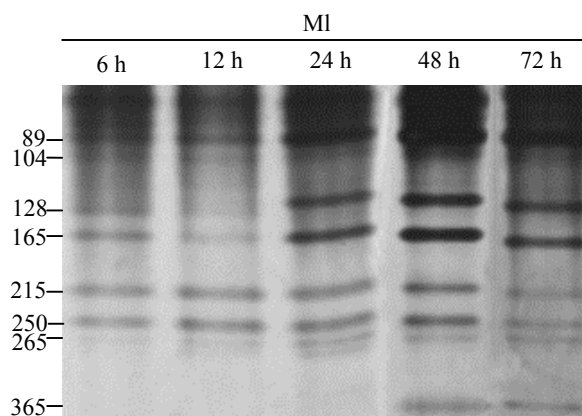
Kecskés (2000) *Xanthomonas* fajokból tisztított LPS HR gátló és LBR-induktív (korábbi elnevezés LIR) hatását vizsgálta dohányban. Az EBR-hez kapcsolható kitináz-markerekkel tisztázhatjuk az LPS szerepét az EBR kiváltásában. Az elicítort 100 µM koncentrációban injektáltuk dohány növényekbe. Az LPS által indukált növényi reakciókat az flg15 peptidet vizsgáló kísérlettel megegyező időpontokban figyeltük meg, tehát 6, 24, 48 és 72 órával a növénybe injektálást követően. Dohányban az LPS elicitor egy kései választ eredményezett. Az EBR működési ideje alatt, vagyis az injektálástól számított 24 órán belül nem tudtuk kimutatni a sejtközötti folyadékból a 215 és 250 jelű kitinázokat (14. ábra). Ezt megerősítik az injektált területen végzett HR indukáló, *P. s. pv. phaseolicolaval* végzett felülfertőzések (6. táblázat). A felülfertőzést 6 és 24 órával megelőző LPS kezelések nem eredményeztek HR gátló hatást a dohányban. Azonban a flagellintól eltérően (Lásd 4.5.1. alfejezet) a későbbi időpontokban (48-72 óra), amely időintervallum inkább az LBR működési ideje, már megfigyelhető volt az indukált HR gátlás (6. táblázat). Ezzel összecseng, hogy azokban az időpontokban, amelyekben már működött a védekezést jelző HR gátlás, a poliakrilamidgél-elektroforézissel elválasztott fehérjemintázatban megfigyelhetők voltak a védekezéshez kapcsolható fehérjék (14. ábra). A 48 óra vagy annál hosszabb idejű *P. s. pv. coriandricola*

előkezelés hatására a 250 jelű fehérje alatt megfigyelhető egy több, kisméretű fehérjéből álló sorozat (14. ábra). A kisméretű fehérjék LBR-ben játszott lehetséges – de ki is zárható – szerepére Ott (2002) is felhívta a figyelmet. A '265'-'365' közötti fehérjék *P. tabaci* kezelést követően is megjelentek. Ezt a sorozatot (265 és 365 közötti, számmal jelöletlen fehérjecsíkok) az LPS egymaga is indukálta, ami leginkább megkérdőjelezte az LBR-hez való kapcsoltságukat. E kérdés tisztázásához olyan baktérium által indukált fehérjeválaszt kellett megvizsgálni, amelyik nem rendelkezik LPS-el, tehát egy Gram-pozitív baktérium.



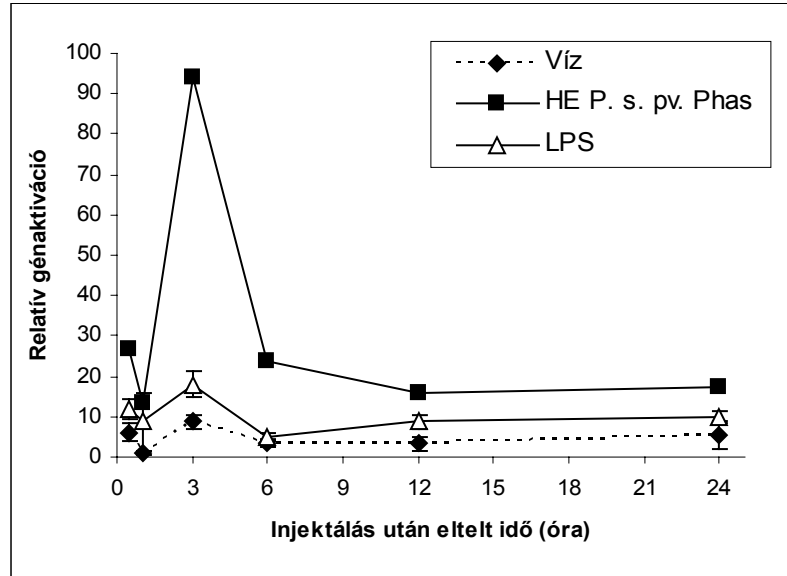
14. ábra A *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola* és sejtfalából tisztított lipopoliszacharid (LPS) által dohányban kiváltott fehérje-szintű válasz elektroforetikus képe. kontroll, kezeletlen kontroll; LPS, lipopoliszacharid (100 μ M); Psc, *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola*; 12 h-72 h, az injektálástól eltelt idő; 128-365, a fehérjék jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján; EBR+/- és LBR+/-, a korai (EBR) és a késői (LBR) általános rezisztencia működése/nem működése a HR-gátlás teszt alapján

A dohányba injektált *M. lisodeicticus* baktérium szuszpenzió hatásaként a korai (6 és 24 óra) és a késői (48 és 72 óra) felülfertőzések esetében egyaránt gátlódott a HR kialakulása. Tehát a BR-t Gram-pozitív baktériumok is indukálják. A kezelt levelekből nyert sejtközötti folyadékban megjelentek a rezisztenciára utaló kitinázok (15. ábra), de a kisméretű fehérjék (265-365) a vizsgált késői időpontokban (48 és 72 óra) – vagyis amikor már LBR-ről beszélhetünk– nem voltak megfigyelhetőek (15. ábra).



15. ábra A dohány sejtközötti folyadékának fehérjemintázata *Micrococcus lysodeicticus* kezelést követően. MI, *M. lysodeicticus*; 6 h-72 h, az injektálástól eltelt idő, 89-365, a fehérjék jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján

A *P. coriandricola*-ból tisztított 100 µg koncentrációjú LPS tehát nem indukált korai általános rezisztenciát dohányban. Mivel az EBR 215/250 fehérjék a késői időpontokban (48 h, 72 h) megfigyelhetők voltak, de az EBR időszak alatt nem, feltettük a kérdést, vajon egyáltalán nincs korai reakció erre az elicitorra? Mivel az LPS által növényben kiváltott reakciókat kiterjedt irodalom taglal (Meyer et al., 2001; Dow et al., 2000; Gerber et al., 2004; Zeidler et al., 2004; Keshavarzi et al., 2004; Silipo et al., 2005) feltételezzük, hogy a korai időszakban csak nagyon gyenge reakciót vált ki, amely fehérje szinten nem kimutatható. Az EBR-hez kapcsolható kitináz génre specifikus indítószekvenciák alkalmazásával valós idejű PCR-t végeztünk. A dohánylevelek LPS-el történő injektálását követően 30 perccel, 1, 3, 6, 12, és 24 órával össz-RNS-t izoláltunk. LPS indukcióra a kitináz génről átíródott mRNS mennyisége jóval alatta maradt a hővel előlt baktérium által indukált több, mint 90-szeres génaktiváció mértékénél (16. ábra). Míg a víz előkezelés hatására a kitináz gén indukciójának maximuma kb. 8,6-szeres volt, addig az LPS által indukált génaktiváció mindössze kb. 18-szoros volt.



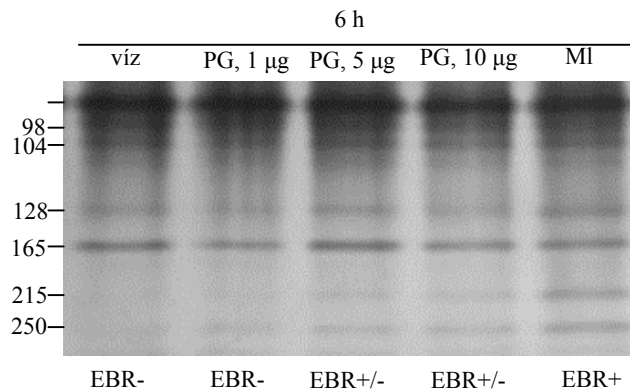
16. ábra A *chto3D9* gén relatív aktivitásának mértéke és időbeli lefutása lipopoliszacharid előkezelést követően az abszolút (kezeletlen) kontrolhoz viszonyítva. Víz, desztillált víz; HE P. s. pv. Phas, hővel előlt *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*; LPS, lipopoliszacharid. Hiba sávok: a középértékek átlagos eltérése, ahol n=4

A vizsgált LPS nem indukált EBR-t dohányban, azonban LBR-elicitor aktivitása nem zárható ki, ezért ennek tisztázásához további kísérleteket kell elvégeznünk.

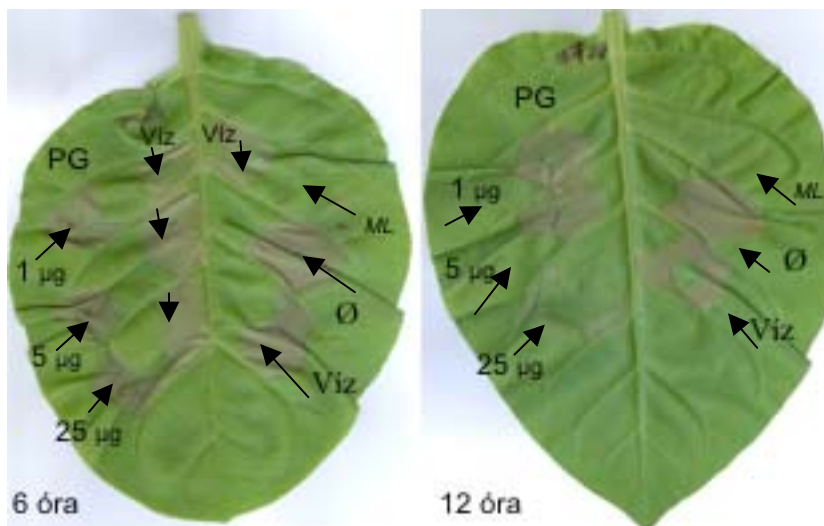
Peptidoglükán

Számos dolgozat taglalja a PG jelentőségét emlősökben és *Drosophilaban* (Lásd 2.1. fejezet). Mivel a Gram-pozitív *M. lisodeicticus* is indukálta az EBR-t és az EBR215/250 kitinázokat, fontosnak tartottuk, hogy ne maradjon ki az általunk növényekben tanulmányozott lehetséges BR elicitorok sorából.

A PG-t több koncentrációban injektáltuk dohány levelekbe: 1, 5, 10 és 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Az elicitor BR kiváltását a többi elicitorhoz hasonló módon vizsgáltuk. A legalacsonyabb, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációjú PG nem váltott ki a víz általánál nagyobb EBR-fehérjemarker aktivációt a dohányban. A vizsgált három magasabb koncentrációjú elicitor között 6 órával az injektálás után nem volt szignifikáns különbség a sejtközi folyadékban megjelenő kitinázok mennyiségében, azonban mindegyik erősebben indukálta az EBR-hez kapcsolható fehérjét, mint a víz, de gyengébben, mint a *M. lisodeicticus* (17. ábra). Ebben a vizsgálati időpontban nem volt detektálható PG indukálta HR-gátlás (18. ábra).

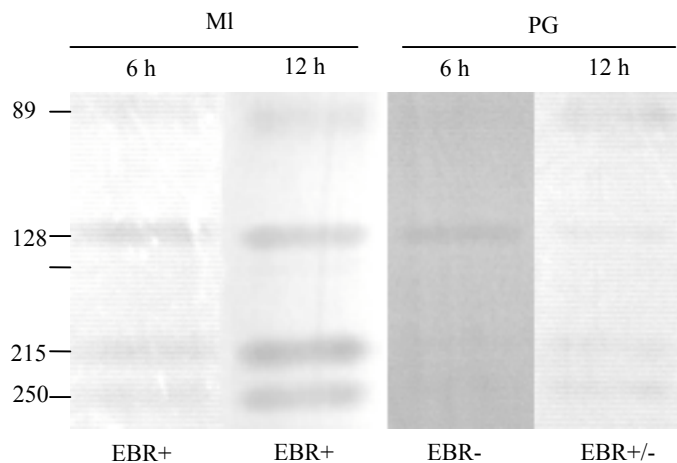


17. ábra Az EBR215/250 fehérjék kimutatása a dohány sejtközötti folyadékában 1, 5 és 10 µg peptidoglükán kezelést követően. 6 h, az injektálástól eltelt idő; víz, desztillált víz; PG, peptidoglükán; MI, *Micrococcus lisodeicticus*; 98-250, a fehérjék jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján; EBR+/-, az EBR működése a HR-gátlás teszt alapján



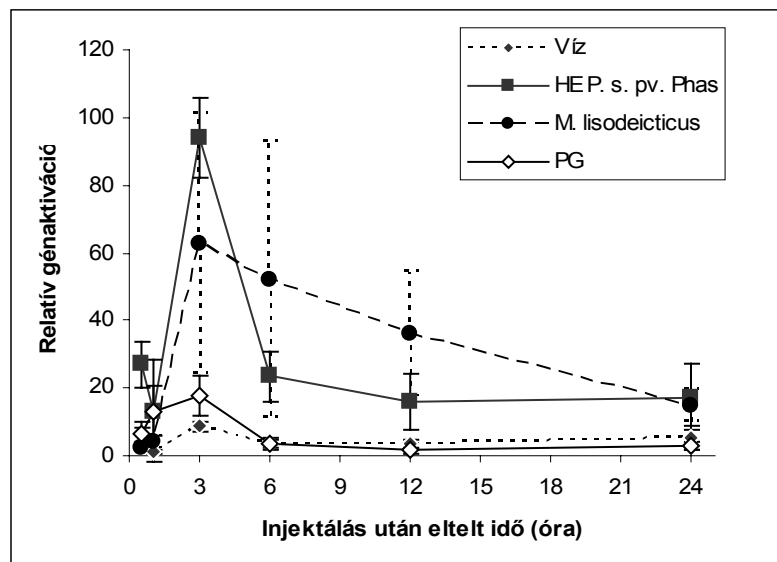
18. ábra Az EBR kimutatása a HR-gátlás tesztrel 1, 5 és 25 µg peptidoglükán (PG) előkezelést követően. 6-12 óra, az előkezelés és a *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* felülfertőzés között eltelt idő; Víz, desztillált vizes előkezelés; ML, *Micrococcus lisodeicticus*; Ø, a fertőzött terület nem volt előkezelve

12 órával az injektálás után a fehérjék mennyisége magasabb volt (19. ábra), ezzel párhuzamosan a HR-gátlás is jelentkezett (18. ábra). 24 illetve 48 órával a dohányba injektálást követően, már nem voltak kimutathatók sem a fehérjék, sem az EBR HR-gátló hatása (nem mutatjuk).



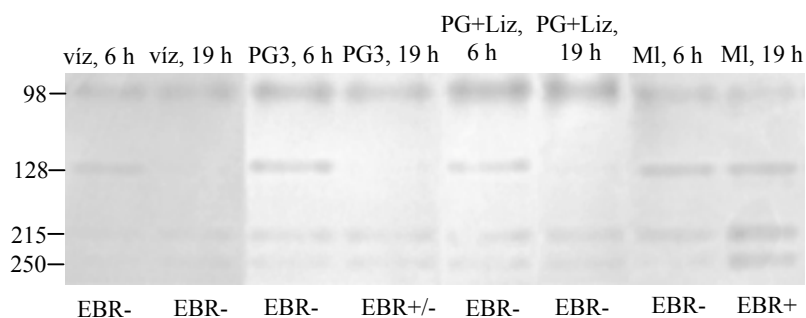
19. ábra *Micrococcus lysodeicticus* (MI) és a peptidoglükán (PG) elicitor által dohányban indukált kitináz fehérjék aktivitása. 6 h és 12 h, az injektálástól a sejtközötti folyadék kinyeréséig eltelt idő; 89-250, a kitinázok jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján; EBR+/-, az EBR működése/nem működése a HR-gátlás teszt alapján

A fehérjék nyomon követése a sejtközötti folyadékban nem adott meggyőző és egyértelmű választ a PG által intakt dohány növényben indukált reakcióról. A fehérjeindukció ismeretében nem volt meglepő a marker kitinázok gén-aktivációjának alacsony mértéke, ami az LPS-hez hasonlóan alig 18-szorosa volt a víz által indukáltnak (20. ábra).



20. ábra A *chot3D9* kitináz gén relatív aktivitásának mértéke és időbeli lefutása peptidoglükán (PG) előkezelést követően, az abszolút (kezeletlen) kontrolhoz viszonyítva. Víz, desztillált víz; HE P. s. pv. Phas, hővel előlt *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*; M. lysodeicticus, *Micrococcus lysodeicticus*. Hiba sávok: a középértékek átlagos eltérése, ahol n=4

A kísérletekben használt peptidoglükán (Fluka), mely kereskedelmi forgalomban is kapható, *M. lisodeicticus*ból tisztított sejtfalalkotó. Ez az elicitor készítmény széles körűen alkalmazott az állati és az ecetmuslica veleszületett immunitásának kutatásában. Egyes dolgozatok az elicitor által indukált reakciók intenzitásának növekedéséről számolnak be, amennyiben a peptidoglükán láncot tojásfehérje-lizozimmal rövidebb darabokra hasítják. A kísérleteinkben kapott gyenge EBR-indukció miatt ultrahangos szonikálással (9x10 perc), valamint lizozimos emésztéssel (4. melléklet) próbáltuk a peptidoglükán készítmény feltételezett hatását fokozni. Az EBR-hez kapcsolt 215 és 250 jelű kitinázok esetében egyik hasítási mód sem okozott fokozottabb indukciót, mint az emésztetlen készítmény (nem mutatjuk). A peptidoglükán oldathoz hozzáadott és azonnal a növénybe juttatott, valamint a 30 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a dohányba injektált elicitor oldatkombinációk által kiváltott EBR215/250 kitinázok aktivitása között nem volt jelentős különbség. Azonban a dohány sejtközötti folyadékában, a marker-kitinázok mellett, van még legalább három kitináz (Lásd 4.3 fejezet), melyek közül kettőnél új indukciós tulajdonságokat jegyezhetünk fel.



21. ábra Kitinázok aktivitása lizozimmal emésztett peptidoglükán (PG) oldattal injektált dohánylevél sejtközötti folyadékában. 6h és 19 h, az injektálástól eltelt idő; PG3, 50 U lizozimmal emésztett 10 µg PG; PG+Liz, 100 U lizozimmal 30 percig inkubált 10 µg PG; MI, *Micrococcus lisodeicticus*; 98-250, a kitinázok jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján; EBR +/-, az EBR működése/nem működése a HR-gátlás teszt alapján

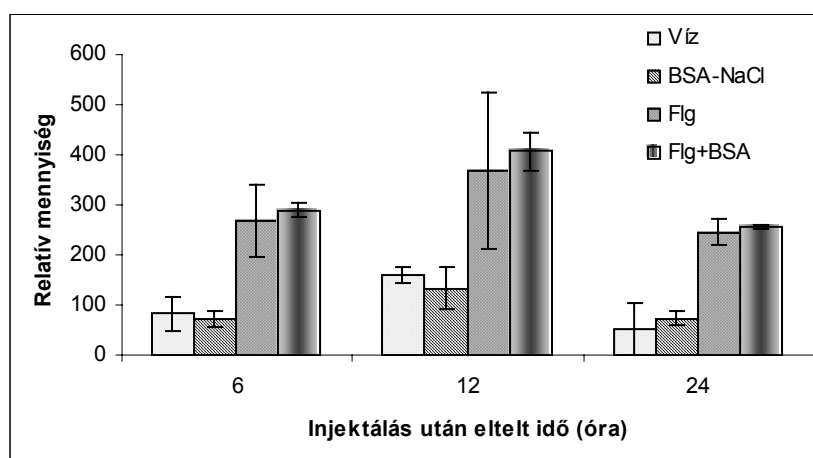
A 128 jelű kitináz a PR-N fehérjével együtt vándorol és a hővel elölt baktériummal való injektálást követően ez a kitináz fokozatosan eltűnik a sejtközötti folyadékból (Lásd 4.3. fejezet). A fehérje 6 órával a PG injektálást követően kimutatható, de 19 (24) órával a kezelést követően már nincs jelen a sejtközötti folyadékban (21. ábra). Ez az eredmény minden olyan esetben megismétlődött, amikor nem volt erős EBR vagy '215', '250' fehérje indukció.

A PG részleges HR-gátlást, valamint az EBR215/250 fehérjék gyenge kifejeződését indukálta. A legerősebb mérhető reakció egybeesett az EBR maximális intenzitású periódusába.

Flagellin 22

A flagellin fehérje amino-terminális végén található 22 aminosav hosszúságú peptid (flg22) bizonyult ezidáig az egyik leghatékonyabb baktérium eredetű elicitornak (Boller et al., 2004). A flg22 peptid növénybeni felismerésének első említésétől (Felix 1999) a peptidet felismerő, FLS2 receptorhoz való kötődéséig (Chinchilla et al., 2006), annyi új eredmény született, hogy elengedhetlenné vált bevonása az általunk felállított vizsgálati rendszerbe.

A peptid egy része kitapadhat a műanyag felületekhez, ezért 1 mg ml^{-1} marhaszérum albumin (BSA) és $0,1 \text{ M NaCl}$ oldattal elegyített 1 mM flg22 koncentrációjú törzsoldatot készítettünk. Ezt a törzsoldatot hígítottuk később a kívánt koncentrációra. A kontrollként vízzel injektált dohány levelekben esetenként előfordul alacsony kitináz indukció (Ott et al., 2006). A BSA – NaCl oldat nem váltott ki a víznél erősebb kitináz termelődést (22. ábra) és HR-gátlást sem indukált dohányban. Az oldat elhagyása ellenére is megbízhatóan és szignifikánsan mérhető volt a flagellin peptid általi indukció (22. ábra), ezért a későbbiekben nem alkalmaztuk. A kitapadás megakadályozása végett a Sigma-Aldrich Kft. által forgalmazott Low Bind Tube (Eppendorf) reakciócsöveket (a peptidek kitapadását csökkent mértékben mutatja) használtunk a hígításhoz és üveg fecskendőt az injektáláshoz.

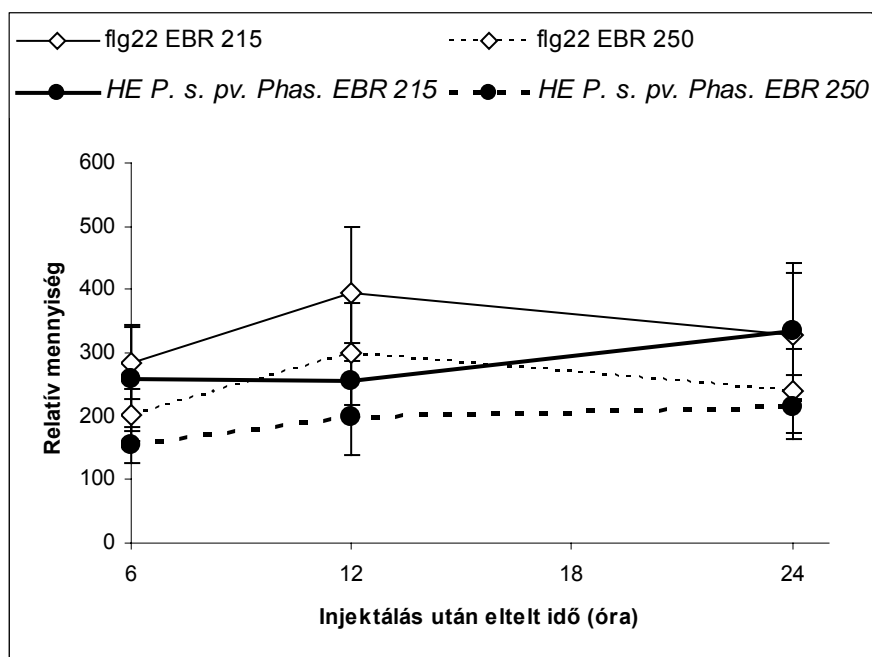


22. ábra Az EBR215 kitináz kifejeződésének mértéke a sejtközötti folyadékban flagellin (flg22 peptid) és az oldatbantartó kísérőanyagok hatására. Víz, desztillált víz; BSA-NaCl, 1 mg ml^{-1} marhaszérum albumin (BSA) $0,1 \text{ M NaCl}$ oldatban; Flg, $1 \text{ } \mu\text{M flg22}$; Flg+BSA, $1 \text{ } \mu\text{M flg22}$ a BSA-NaCl oldattal elegyítve. Hiba jelzések: a középértékek átlagos eltérése, ahol $n=3$

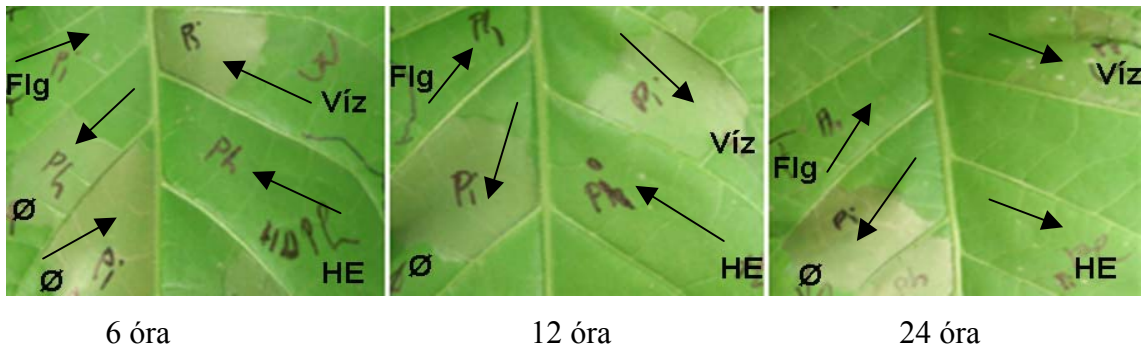
A kísérletek során a szerző (Felix et al., 1999) által vizsgált és javasolt $1 \text{ } \mu\text{M}$ -os elegyen kívül $10 \text{ } \mu\text{M}$ koncentrációjú flg22-t is vizsgáltunk Mivel az előkísérletekben nem volt szignifikáns különbség a két koncentráció által kiváltott növényi reakció között (nem mutatjuk), ezért a továbbiakban csak az $1 \text{ } \mu\text{M}$ -os peptid eleggyel kapott eredményeket

mutatjuk be. A dohányba injektálás után 6, 12, 24 órával vizsgáltuk a peptid által kiváltott reakciókat.

Az flg22-vel injektált levelekből nyert sejtközötti folyadékban kimutathatóak voltak az EBR-hez kapcsolt fehérjék. A legkorábbi, 6 és 24 órás sejtközötti folyadék mintában erősen, a pozitív kontrollként szolgáló, hővel előlt *P. s. pv. phaseolicola* által indukált reakcióhoz hasonló mértékben voltak jelen a kitinázok. Közvetetten a mennyiségre is utaló kitinázaktivitás-teszt eredményei azt mutatták, hogy az flg22 peptid 12 órával az injektálást követően erősebb reakciót váltott ki az intakt növényben, mint a hővel előlt baktérium szuszpenzió (23. ábra). Általánosan megállapítható volt, hogy a 250 jelű kitinázból kevesebb volt a sejtközötti folyadékban, mint a másik EBR-hez kapcsolt fehérjéből, de ezt nem csak a flg22 által indukált válasz esetében tapasztaltuk (nem mutatjuk). Az flg22 EBR elicitálása a HR gátlás-tesztel bizonyítható volt (Varga et al., 2005 a), és ezzel párhuzamosan jelentek meg az EBR215/250 kitinázok a sejtközötti folyadékban. A pozitív kontrollhoz hasonlóan 6, 12 és 24 órás vizsgálati időpontban védelemet idézett elő az flg22 peptid a későbbi HR okozó baktériummal szemben (24. ábra).

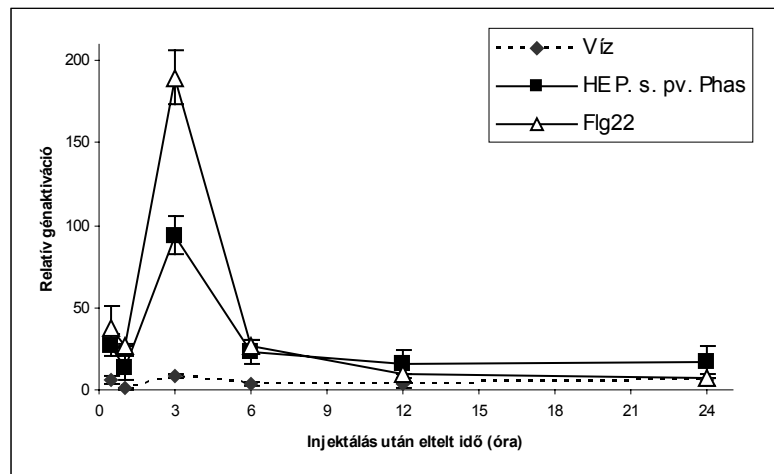


23. ábra Az EBR215/250 fehérjék aktivitásának időbeli lefutása a flagellinnel (flg22) kezelt dohány sejtközötti folyadékában egy EBR induktorhoz viszonyítva. HE *P. s. pv. Phas.*, hővel előlt *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (pozitív kontroll). Hiba sávok: a középértékek átlagos eltérése, ahol n=3



24. ábra A flagellin (flg22) peptid HR-kivédő hatása (EBR) *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Ph) és *Pseudomonas pisi* (Pi) baktériumokkal szemben. Flg, flg22 peptid; Ø, előkezelés nélküli levélrész; Víz, desztillált víz (negatív kontroll); HE, hővel előlt *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (pozitív kontroll)

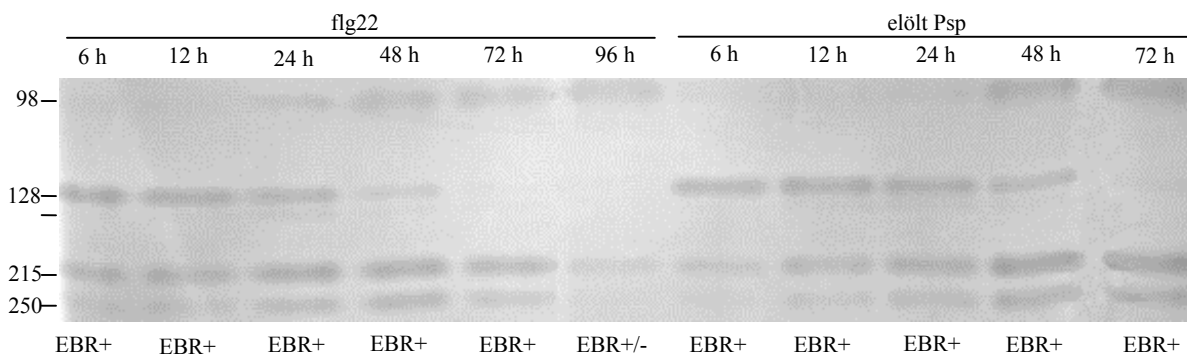
Az flg22 peptid tehát a vizsgált koncentrációjú (4×10^8 sejt ml^{-1}) hővel előlt baktérium szuszpenzió által kiváltott kitináz-aktivitásnál erősebb reakciót váltott ki dohányban. A különbség becslésére a marker kitinázok génjének aktivációját mértük meg az elicitor hatására (25. ábra). Az flg22 már 30 perccel az injektálást követően erősebben aktiválta a *cht3D9* gént, mint a pozitív kontroll. Az indukció a 3 óránál bekövetkező aktivációs-maximum esetében is különbséget mutat a peptid javára. A mennyiségi különbségek ellenére a hővel előlt baktérium és az elicitor által indukált génaktiváció lefutása igen hasonló volt.



25. ábra A *cht3D9* kitináz gén relatív aktivitásának időbeli lefutása flagellin előkezelést követően, az abszolút (kezeletlen) kontrollhoz viszonyítva. Víz, desztillált víz; HE P. s. pv. Phas, hővel előlt *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*; Flg22, 22 aminosav hosszúságú flagellin peptid ($1 \mu\text{M}$). Hiba sávok: a középértékek átlagos eltérése, ahol $n=2$

A PG-t tárgyaló részben már szó esett a 128-as jelű kitináz rövid működéséről a sejtközi folyadékban. Azonban az flg22 elicitor hatására a fehérje majdnem a hővel előlt

baktériummal megegyező, hosszú ideig volt kimutatható (26. ábra). Meg kell jegyezni, hogy a flagellin tízszeres chto3D9 génaktivációt indukált és a HR-gátlás teszttel is erős rezisztenciát tapasztaltunk. Vagyis, ha a vizsgált elicitor (teljes baktériumsejt vagy csak elicitor molekula) erős EBR-t indukál, a 128-as kitináz is hosszú ideig jelen van. Amennyiben az elicitor egy gyenge védekezési reakciót indukál, a kitináz is gyengén és rövid ideig mutatható ki a sejtközötti folyadékából (21. ábra).



26. ábra A dohány sejtközötti folyadékában az EBR során megjelenő kitinázok aktivitásának időbeli lefutása. flg22, 22 aminosav hosszúságú flagellin peptid; előlt Psp, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (hővel előlt); 6 h-96 h, az injektálástól eltelt idő; 98-250, a kitinázok jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján; EBR+/-, az EBR működése/nem működése a HR-gátlás teszt alapján

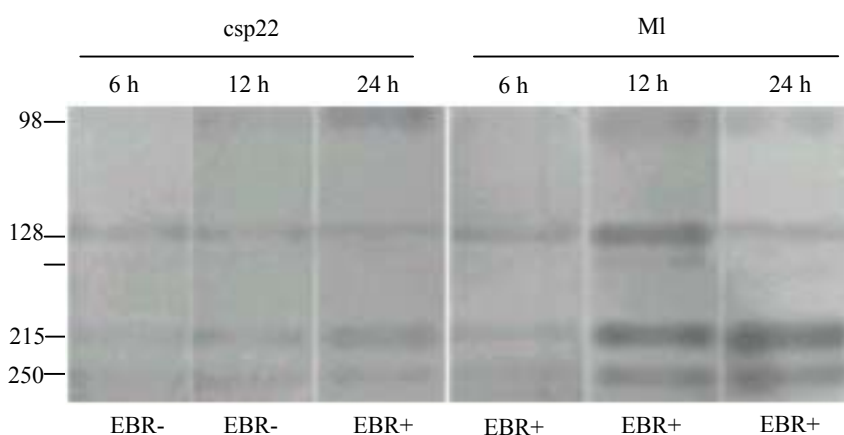
A különböző elicitorok vizsgálatával célunk egy olyan molekula meghatározása volt, mely önállóan, baktérium sejtek nélkül alkalmas a BR alatt lezajló védekezési reakciók indukálására. A génaktiváció lefolyása, a sejtközötti folyadék fehérje-összetétele és HR kialakulásának gátlása nagyon hasonlított a hővel előlt baktérium-szuszpenzió és a flg22 peptid általi indukció esetében. A vizsgálati rendszerben mért EBR jellemzők alapján az flg22 peptid alkalmas lehet a hővel előlt vagy *hrp* mutáns baktérium szuszpenzió helyettesítésére.

4.5.2. A baktériumsejt belsejében található elicitorok

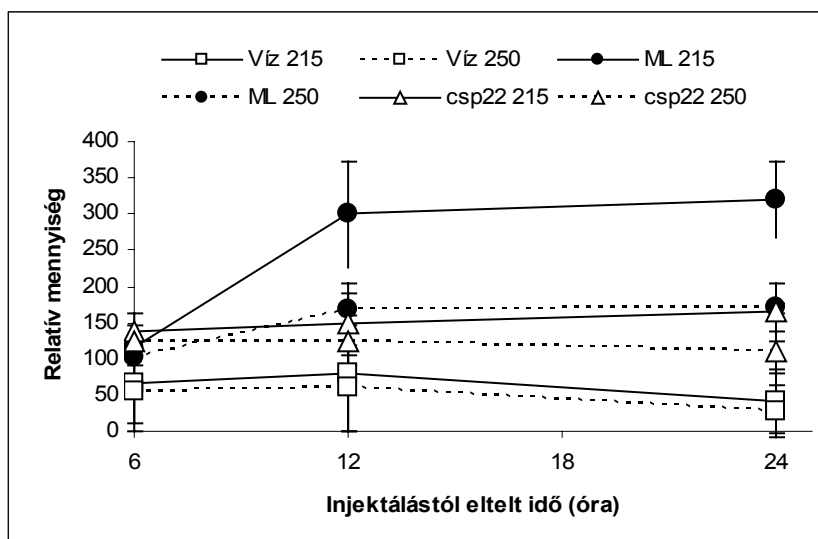
Hideg sokk peptid

A *csp22* peptid dohányba injektálva nem váltott ki HR-t. A peptidet több koncentrációban vizsgáltuk, de nem volt szignifikáns különbség az 1, 5 és 10 μM koncentrációjú elicitorok által kiváltott kitináz aktivitásban. A továbbiakban az 1 μM koncentrációjú elicitor oldattal végzett kísérletek eredményeit mutatjuk be. Az EBR-hez kapcsolható kitinázok indukciója megfigyelhető volt az elicitor hatására (27. ábra). A fehérjék mennyisége a sejtközötti folyadékban 6, 12 és 24 órával az injektálást követően közel azonos volt. A poliakrilamidgél-elektroforézissel kapott fehérjemintázat kitináz aktivitása alapján kis

mértékű mennyiségi, illetve aktivitásbeli növekedés volt tapasztalható 24 órával az indukciót követően (28. ábra). A *csp22* által indukált kitinázok mennyisége a sejtközötti folyadékban jóval kevesebb volt, mint ugyanezen fehérjék mennyisége *M. lisodeicticus*sal injektált levelek sejtközötti folyadékában (27. és 28. ábrák), de minden mintavételi időpontban magasabb volt mint a víz esetében (28. ábra). A *csp22*-vel előkezelt levélrészbe injektált élő *P. pisi* HR-t csak a korai (6-12 órás) vizsgálati időpontokban tudott okozni. 24 órával a peptid dohányba injektálását követően az elicitor által indukált EBR már megakadályozta ezt (nem mutatjuk). Szembetűnő a párhuzam a fehérjék mennyiségének növekedése és a HR gátló tulajdonság kialakulása között.



27. ábra Az EBR215/250 kitinázok aktivitásának időbeli lefutása hidegsokk-peptid (CSP) és *Micrococcus lisodeicticus* kezelést követően a dohány sejtközötti folyadékában. *csp22*, 22 aminosav hosszúságú CSP; MI, *M. lisodeicticus*; 6 h-24 h, az injektálástól eltelt idő; 98-250, a kitinázok jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján; EBR+/-, az EBR működése a HR-gátlás teszt alapján

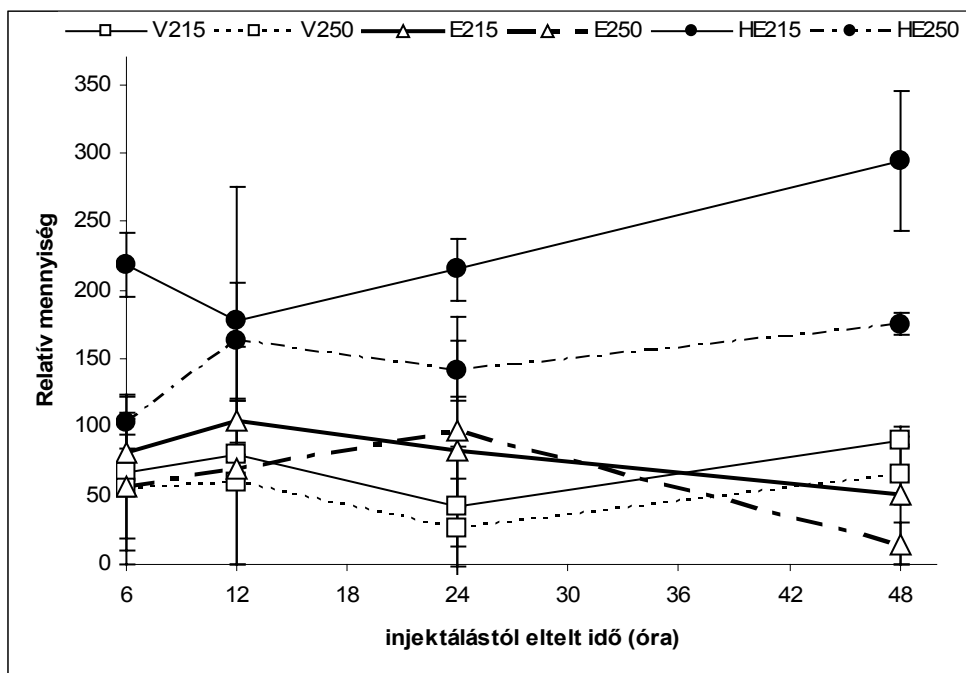


28. ábra Az EBR215/250 fehérjék mennyiségének időbeli lefutása a hidegsokk-peptiddel (csp22) kezelt dohány sejtközötti folyadékában a vízhez és egy EBR induktorhoz viszonyítva. ML, *Micrococcus lysodeicticus* (pozitív kontroll). Hiba sávok: a középértékek átlagos eltérése, ahol n=3

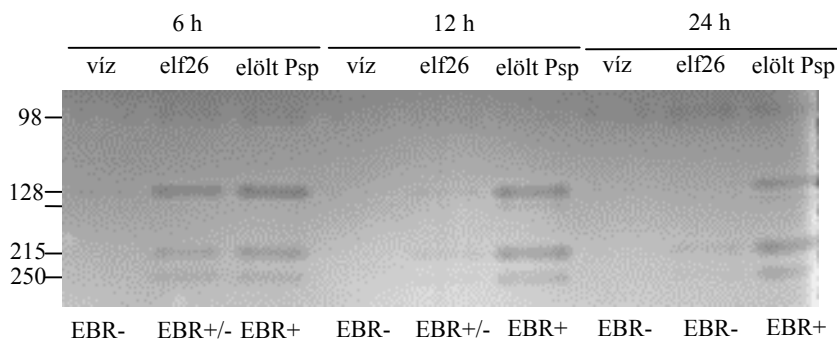
Az LPS általi indukcióhoz hasonlóan a csp22 peptidre adott válasz sem az indukciót követő 6. és 12. óra között maximalizálódott. A csp22-re viszonylag későn detektálható növényi reakció ellenére is bizonyított a felismerés.

EF-Tu transzkripció elongációs factor

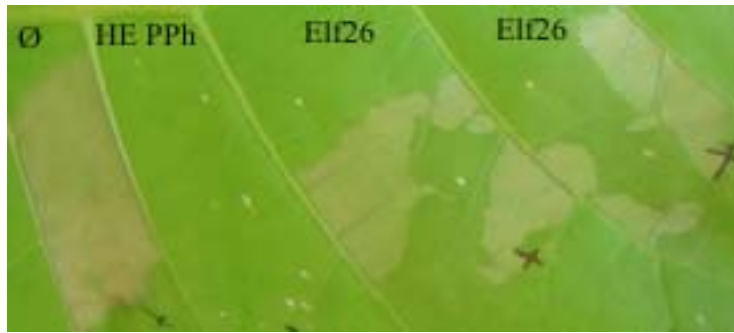
Az 1 μ M elf26-ra adott növényi válasz gyengébb volt, mint a pozitív kontrollra (hővel előlt baktérium), de szignifikánsan erősebb kitináz termelődést mutattunk ki a sejtközötti folyadékból a vízhez képest (29. ábra). A védekezéshez kapcsolható fehérjék jellemzően a korai időpontokban (6-24 h) voltak a legnagyobb mennyiségben jelen a sejtközötti folyadékban (30. ábra). A BR működését igazolta az elf26-al injektált levélrészekben a HR elmaradása *P. s. pv. phaseolicolaval* való felülfertőzést követően (31. ábra). Ez az EBR-re jellemző tulajdonság a felülfertőzött területnek csak egy részén, és csak 19 órával az indukciót követően volt detektálható. A fehérjék mennyisége 48 órával az injektálást követően erősen lecsökkent. A csökkenéssel egybecsengett a HR gátlás elmaradása ebben az időintervallumban.



29. ábra Az EBR215/250 fehérjék mennyiségének időbeli lefutása EF-Tu elicitorral kezelt dohány sejtközötti folyadékában a vízhez és egy EBR induktorhoz viszonyítva. V, desztillált víz; E, 26 aminosav hosszúságú EF-Tu peptid (1 μ M); HE, hővel előlt *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (pozitív kontroll). Hiba sávok: a középértékek átlagos eltérése, ahol n=2



30. ábra Az EBR215/250 kitinázok kimutatása a dohány sejtközötti folyadékából EF-Tu elicitor kezelést követően. víz, desztillált víz; elf26, 26 aminosav hosszúságú EF-Tu peptid (1 μ M); előlt Psp, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (hővel előlt); 6 h-24 h, az injektálástól eltelt idő; 98-250, a kitinázok jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján; EBR+/-, az EBR működése/nem működése a HR-gátlás teszt alapján



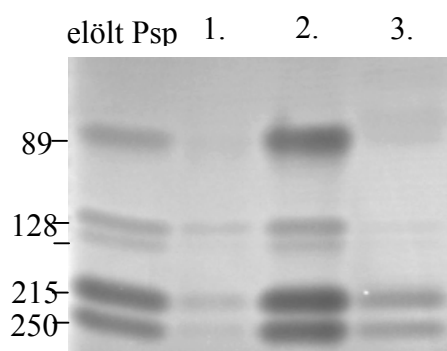
31. ábra Az EF-Tu elicitor részleges HR-kivédő hatása (EBR) 19 órával az indukciót követően *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* baktériumokkal szemben. Ø, előkezelés nélküli levélrész; HE PPh, hővel elölt *P. s. pv. phaseolicola*; Elf26, 26 aminosav hosszúságú EF-Tu peptid (1 µM)

Az elf26 peptid szignifikáns kitináz indukciót váltott ki a dohányban és a rezisztencia működését biztosan jelző, HR gátlást is kimutattuk. A HR-megelőzés gyengébb volt, mint az összehasonlításként szolgáló hővel elölt baktérium által indukált „vakcináltság”.

4.6. A kitinázok lizozim aktivitásának vizsgálata

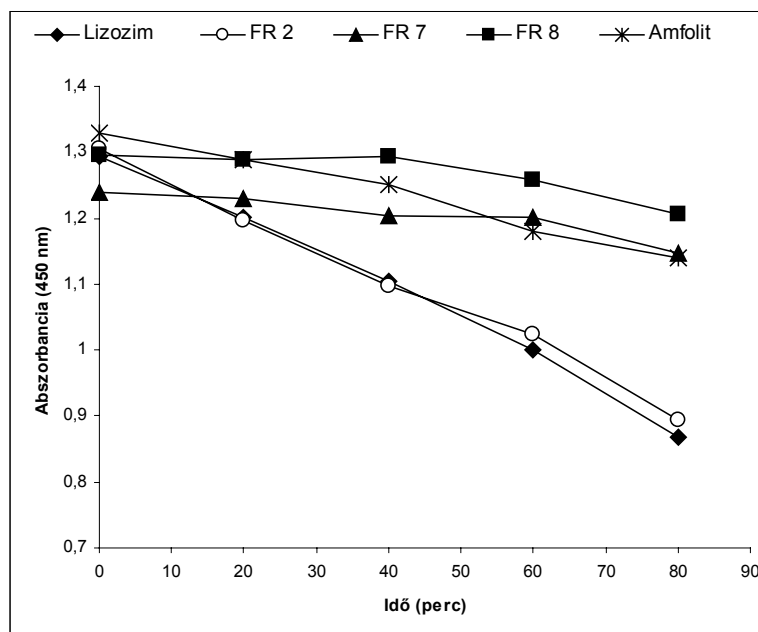
Az EBR215/250 fehérjék a korai általános rezisztencia kimutatására alkalmas markerek. EBR-hez való kapcsoltságuk és enzimaktivitásuk miatt érdekes és fontos kérdés, vajon van-e szerepük az EBR baktériumra gyakorolt gátló hatásában? Mivel az EBR215/250 fehérjék a sejtfalba/apoplastba továbbítódnak a transzlációt követően, ezért közvetlen a baktériumra gyakorolt hatásuk is feltételezhető. Az EBR215/250 fehérjék 1-2 %-át teszik ki a sejtközötti állományból kinyert folyadék teljes fehérjetartalmának (Ott, 2002), ezért koncentrálsuk és méginkább elkülönítjük a sejtközötti folyadék többi fehérjéjétől szükséges volt a baktériumokra gyakorolt hatásuk vizsgálatához. Több út is alkalmas lehet egy (vagy néhány) fehérje elkülönítésére: a fehérjék kromatográfiás elválasztása, majd az egyes fehérje frakciók leoldása az oszlopról sóoldattal vagy a fehérjék kicsapása (Scopes, 1982). Ezen eljárások során azonban, a fehérjék részben vagy teljesen elveszíthetik aktivitásukat. A végül is kiválasztott folyadékfázisban történő izoelektromos fókuszálás (IEF) módszer során a fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján választhatjuk szét, akár natív körülmények között is. Ebben a sejtközötti folyadékot nem kell elegyíteni semmilyen aktivitás gátló anyaggal, viszont hátrányként meg kell jegyezni, hogy az izoelektromos pontjukat elérve kicsapódhatnak a fehérjék. Az elválasztással párhuzamosan a fehérjék mennyisége az egyes frakciókban bekonztrálódik. A 3 ml sejtközötti folyadék összfehérje tartalma (Bradford reagenssel mérve) 450 µg volt. Az egyes frakciókban 250-300 µl folyadékot nyertünk vissza a

fókuszálást követően. A frakciók natív poliakrilamid-gélben való elválasztását követően kiderült, hogy az EBR215/250 fehérjék a 2. frakcióba jutottak, melynek pH-ja a 3.8-4.4 tartományba esik. Ide került a másik 2 kitináz ('89' és '128') is. A 3. frakcióba (pH 4.5-5.1) került a savas pH-jú fehérjék nagy része. Azonban ennek a frakciónak a kitináz aktivitása ('89', '128', '215' és '250') töredéke volt a 2. frakcióban lévő fehérjéknél tapasztaltnál, sőt a kiindulási (koncentrálatlan) sejtközötti folyadékénál is jóval alacsonyabb volt (32. ábra). E három savas frakción kívül a bázikus, pH 8-9.3 tartományban találtunk még két kitináz aktivitást mutató fehérjét (nem mutatjuk). Mivel a 2. frakció nagy mennyiségben tartalmazta az általunk vizsgálni kívánt fehérjéket, ezért a lizozim-aktivitás méréshez ezt a frakciót használtuk.



32. ábra. Az izoelektromos fókuszálással elválasztott, savas frakciók kitináz aktivitása dohány sejtközötti folyadékában az alábbi kezelések után: előlt Psp, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (hóvel előlt), kiindulási koncentrálatlan sejtközötti folyadék; 1., 1. frakció (pH 3-3.7); 2., 2. frakció (pH 3.8-4.4); 3., 3. frakció (pH 4.5-5.1); 89-250, a kitinázok jelölése gélbeni vándorlási távolságuk alapján

A lizozim aktivitás egyes ismert PR-kitinázok jellemző tulajdonsága (Stintzi ez al., 1993). A PR-3 családba tartozó fehérjék közül a chi 28 fehérjének bizonyított gyenge kitináz és lizozim aktivitása, míg a PR-P és Q csak kitináz aktivitást mutat. A PR-8, ún. kitináz/lizozim családból a savas lys 28a gyenge kitináz-, a bázikus lys b1 és lys b2 fehérjék pedig gyenge kitináz és erős lizozim aktivitású fehérjék (Stintzi ez al., 1993) (Lásd 3. táblázat). Az EBR215/250 fehérjék esetleges lizozim aktivitását a 2. frakció *M. lisodeicticus* sejteket bontó képessége alapján mértük.



33. ábra. A dohány-kitinázokat tartalmazó IEF frakciók lizozim aktivitása. Lizozim, tojásfehérje-lizozim (1 U/ μ l) (pozitív kontroll); FR 2, 2. frakció, EBR-t mutató dohány pH 3.8-4.4 tartományába eső kitinázok; FR 7, 7. frakció, pH 7.3-7.9 tartomány; FR 8, 8. frakció, pH 8-8.6; Amfolit, az izoelektromos fókuszáláshoz használt puffer (negatív kontroll)

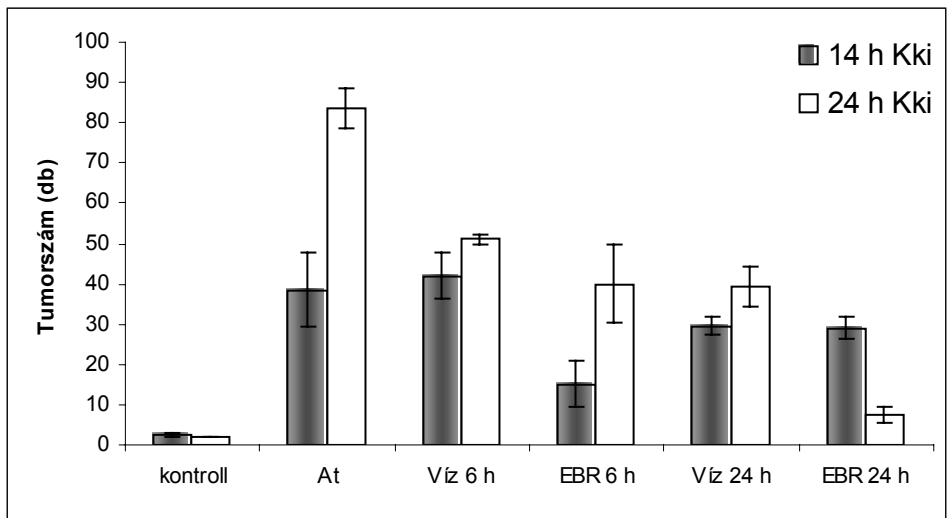
Az egyes frakciók lizozim aktivitását több különböző pH-értékű pufferben mértük. A 33. ábrán a legintenzívebb enzimaktivitást eredményező pH-értékeken mért adatokat hasonlítottuk össze. A 2. frakcióban lévő fehérjéknek a lizozim aktivitása megegyezett az 1 U/ μ l tojásfehérje-lizozim általi *M. lisodeicticus* bontással (33. ábra). A 7. frakcióban összesen egy fehérjét láttunk, melynek nem volt kitináz aktivitása, a 8. frakcióban pedig két bázikus, kitináz aktivitással rendelkező fehérjét mutattunk ki (nem mutatjuk). A *M. lisodeicticus* szuszpenzió bontása alapján megállapítható, hogy a 2. frakció, melybe a pH 3.8-4.4 tartományába eső kitinázok is tartoznak, a többi vizsgált frakciónál erősebb lizozim aktivitással rendelkezik.

4.7. Flagellinnel indukált növényi védekezési mechanizmus hatása az agrobaktériumos golyvásodásra

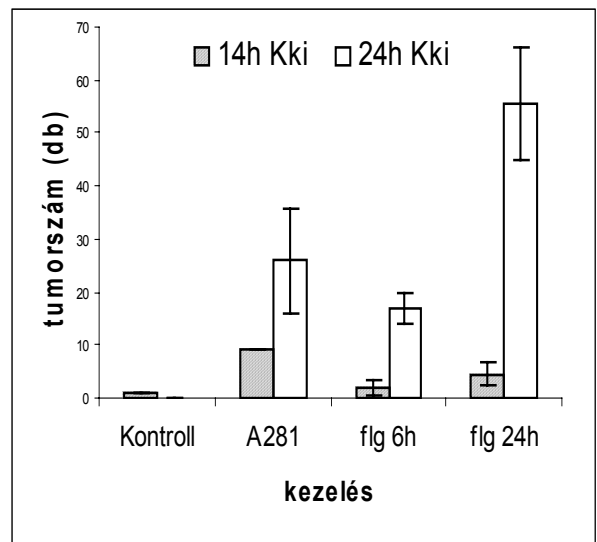
Agrobacteriumos kísérleteinkkel arra próbáltunk fényt deríteni, hogy a már kialakult BR ellenére is képes-e tumort indukálni a baktérium. Korábban már bebizonyosodott, hogy az flg22 önállóan indukálta az EBR-t és a hozzá kapcsolható molekuláris markereket. A tumorképződésre gyakorolt hatás vizsgálatára a flg22-vel előkezelt levélkorongokat *A. tumefaciens* A281 törzssel fertőztük. Kevés számú tumorszerű képződmény a fertőzésmentes levélkorongok főerein is képződött. Ez a kalluszképződés a korongok kivágását követően a levéldarabokban lévő növényi hormonnak tulajdonítható. Négy héttel a fertőzést követően

mind a kezeletlen vagy vízzel injektált, mind a flagellinnel injektált levélkorongokon tapasztaltunk tumorképződést. A kezeletlen levélkorongokon az *Agrobacterium* fertőzés hatására jelentős mértékű tumorképződést jegyeztünk fel (34. ábra). Több független ismétlésben 20-30 %-os különbségek voltak a képződött tumorok számában. Azonban tendenciózusan több tumor képződött a hosszabb idejű (24 órás) kokultivációt (együtttenyésztést) követően. A csak steril vízzel injektált levélkorongokon kevesebb tumor képződött, ami feltehetően nem a flagellin, hanem a víz előkezelést követően esetenként megfigyelhető gyenge EBR-reakció hatásaként tartható számon (Lásd 4.2.1. fejezet; Ott et al., 2006). A steril vizes előkezelés után megközelítőleg egyforma tumorszámot jegyeztünk fel a levélkorongokon, függetlenül az előkezelés időtartamától és a kokultivációs idő hosszúságától (34. ábra).

A flagellin által indukált hatást a vízzel injektált levéldarabokhoz viszonyítva lehet értékelni. Szembeötlő különbség a vízzel és a flg22-vel előkezelt dohány-levélkorongokon képződött tumorok számában két kombináció esetében figyelhető meg (6 h flg22-t követő 14 h kokultiváció és 24h flg22-t követő 24 h kokultiváció), melyek mindegyik kísérletben határozott különbségeket mutattak a kontrollokhöz képest. Szignifikánsan kevesebb tumor képződött azokon a levélkorongokon, amelyek 6 órával a flagellines előkezelést követően a rövidebb idejű (14 órás kokultiváció) *Agrobacterium* fertőzésnek voltak kitéve (34. ábra). Amennyiben ez a kapcsolat 24 órán keresztül tartott két ellentétes hatást tapasztaltunk: fokozott tumorképződést (35. ábra) vagy tumorgátlást (34. ábra).



34. ábra A flagellinnel kiváltott EBR hatása *Agrobacterium tumefaciens* (A281) fertőzésre *in vitro* dohány növényekben. kontroll, *Agrobacterium*-fertőzés nélküli levélkorongok; At, *A. tumefaciens*; Víz, desztillált vizes előkezelés; 6h, és 24h, az előkezelés hosszúsága; 14 h Kki és 24 h Kki, kokultivációs idő. Hiba sávok: a középértékek átlagos eltérése, ahol n=2



35. ábra Agrobaktériumos golyva tünetek kialakulása flagellinnel (flg) előkezelt dohány levélkorongokon. Kontroll, előkezelés és *Agrobacterium tumefaciens* fertőzés mentes levélkorongok; A281, *A. tumefaciens* A281 törzs; 6h és 24h, az előkezelés hosszúsága; 14 h Kki és 24 h Kki, kokultivációs idő. Hiba sávok: a középértékek átlagos eltérése, ahol n=2

A 6 órás flagellin kezelés tehát gátló hatással volt az agrobaktériumos fertőzésre. A 24 órás flagellin előkezelés ellentmondásos eredményeket mutatott, serkentőleg is hatott a fertőzésre. A korai védekezés a fertőzés hatékony gátlása miatt tarthat számít további kísérletekben való vizsgálatra.

4.8. Új tudományos eredmények

1. Kimutattuk, hogy a dohány sejtközötti folyadékából elkülönített EBR215/250 fehérjék a korai általános rezisztencia (EBR) működésével szoros és mennyiségileg is kifejezhető korrelációban állnak. EBR-kiváltó baktérium-előkezelések esetén a fehérjék rendre megjelennek. A kompatibilis *P. tabaci* nem tudja elkerülni általános elicitorainak növénybeni felismerését, de a rá káros hatás, ebben az esetben az EBR215/250 kitinázok kialakulását gátolja.
2. A fenti fehérjék nem vagy nagyon kis mennyiségben indukálódtak abiotikus tényezőkre, közelebbről ozmotikus-, só- és oxidatív stresszre. A fehérjék az eddig ismert PR-fehérjéktől abban is különböznek, hogy nem mutathatók ki a sejtközötti folyadékból szalicilsav, metil-jazmonát és etilén kezelések után. Az EBR-rel kapcsolatos fehérjék nem részei a Bion[®] által stimulált növényi védekezésnek.
3. A fenti fehérjék aminosavsorrendjük alapján korábban még nem azonosított, kitináz fehérjék (EBR215/250).
4. Az EBR215/250 kitinázok mint EBR-markerek és a HR-gátlás teszt segítségével kimutattuk, hogy a 15 aminosav hosszúságú flagellin peptid és a *P. coriandricolaból* tisztított lipopoliszacharid elicitorok nem váltanak ki EBR-t.
5. Intakt dohány növényben EBR-t (HR-gátlást) mutattunk ki peptidoglükán, a hideg sokk fehérjék konzervált régiójának 22 aminosav hosszúságú peptidje és az EF-Tu elongációs faktor konzervált régiójának 26 aminosav hosszúságú peptidje által. Mind a három elicitor gyengén indukálta az EBR-marker fehérjéket.
6. Az flg22 peptid indukálja az EBR215/250 fehérjéket, és a kiváltott védekezés preventív hatással volt a későbbi fertőzésre.
7. Az EBR215/250 kitinázok lizozim aktivitással rendelkeznek.
8. A 6 órás flg22 peptid kezelés által dohányban indukált védekezés gátló hatással volt az agrobaktériumos golyvásodás tüneteinek kialakulására, de a 24 órás előkezelés esetében ellentmondásos eredményeket kaptunk. Ennek háttere még nem tisztázott.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A dohánylevél fehérjeszintézisének hősokkal vagy cikloheximiddel történő blokkolása az EBR elmaradásával járt (Bozsó et al., 1999). Ezzel egybehangzóan a dohány sejtközötti folyadékában erőteljes fehérjeváltozások jelezték az aktív védekezést (Ott, 2002). Vizsgálatainkban elsősorban arra kerestük a választ mennyire köthető a fehérje indukció a baktériumok által kiváltott rezisztenciához, milyen sejten kívüli fehérjék jellemzik, lehet-e ezeknek szerepe az EBR mechanizmusában, milyen baktérium sejtalkotók válhatnak ki EBR-t és az ilyen módon kiváltott EBR alkalmas lehet-e különböző típusú betegségekkel szemben?

5.1. Az EBR215/250 a dohány specifikusan baktérium-fertőzésre kifejeződő fehérjéi

Az EBR215/250 fehérjéket egyaránt indukálták a nem növénykórokozó, a *hrp* és patogénitását vesztett mutáns, a szaprotróf baktériumok, valamint az elölt inkompatibilis és kompatibilis kórokozók. Azonban az élő, kompatibilis *P. tabaci* fertőzés esetén, a fehérjék kifejeződése gátlódott. Ez alól csak abban az esetben figyeltünk meg eltérést, ha kiugróan magas számú (10^9 ml⁻¹) baktériummal fertőztük a dohányt. Ez arra enged következtetni, hogy az irreálisan nagyszámú baktérium olyan mennyiségű általános elicítort hordoz, amely eleinte nem tudja elkerülni a növény felismerő mechanizmusát (Ott et al., 2006), és így az EBR gyenge kialakulása elkezdődik, a védekezéshez kapcsolható fehérjék megjelennek a sejtközötti folyadékban, viszont a kompatibilis baktérium egyben hatástalanítani is tudja e mechanizmust, s ezért az EBR baktériumra ható elemei nem fejeződnek ki, végül kialakul a betegség. Az EBR 215/250 fehérjéknek ezért feltehetően mérvadó hatásuk van a rezisztencia során, ha a kompatibilis baktérium az elnyomásukra törekszik. Jelentőségüket az is erősítette, hogy az indukciót – a baktérium felismerését – követően korán, kimutathatóak voltak. Mivel számos baktérium növény kapcsolatban leírtak PR-fehérje, PR-kitináz indukciót, sajátos tulajdonságaikra a konkrét PR-fehérje indukáló kezelések hívták fel a figyelmet.

Az EBR-hez kapcsolt fehérjék nem vagy csekély mértékben indukálódtak ozmotikus-, só- és oxidatív-stressz stimulusra. Előfordulásuk a sejtközötti folyadékban jellemzően biotikus, konkrétan baktériumos kezelés hatására volt megfigyelhető. (Bár a dolgozatban nem tértünk ki rá, de TMV-dohány kapcsolatban is vizsgáltuk a fehérjék megjelenését a sejtközötti folyadékban. Az EBR215/250 fehérjék nem voltak kimutathatóak vírus hatására. Gomba eredetű elicitorokat még nem próbáltunk.) A szalicilsav, etilén és jazmonsav szignálmolekulák dohányba injektálása sem váltotta ki az EBR215/250 fehérjék apoplasztban

való megjelenését, sem magát az EBR-t, így ez a mechanizmus feltehetően nem jár-e hormonok indukciójával és szalicilsav független úton alakul ki, és fejt ki hatását. A vizsgált anyagok HR-ben és a szisztémikus szerzett rezisztenciában (SAR) betöltött szerepére már korábban rávilágított Achuo és mtsai. (2002) *Oidium neolycopersici* és paradicsom, valamint dohány és *Bortrytis cinerea* kapcsolatában. A benzo-thiadiazol (BTH) számos növényben alkalmazott immunstimuláló szer, hatására indukált rezisztencia alakult ki, pl. napraforgó-peronoszpórával szemben (Bán et al., 2004). Azonban a BTH által indukált rezisztencia nem azonos az EBR-rel. Számos alapvető különbségre kell felhívni a figyelmet. Az egyik az, hogy a BTH szisztémikusan is hat, vagyis szalicilsav-függő védekezést indukál (Achuo et al., 2002), míg az EBR lokális hatású, és az előzőekben már bizonyítottuk, hogy a szalicilsav nem játszik szerepet sem az EBR, sem a védekezéshez kapcsolható fehérjék indukálásában. Másik különbség, hogy a BTH hatása 28 óra-1 hét között a legintenzívebb (Baysal et al., 2002), míg az EBR aktivitásának csúcsa 8-12 órával az indukciót követően állapítható meg. Végül, bár a BTH-ra kialakuló növényi válaszban kitináz fehérjéket is kimutattak (Burketova et al., 1999; Burketova et al., 2003), eddigi eredményeink szerint az EBR-hez kapcsolható fehérjék nem játszanak szerepet a BTH hatásmechanizmusában. A vizsgált fehérjék tehát eltértek a már ismert PR-fehérjéktől abban, hogy az őket kiváltó stimulusra igen gyorsan kifejeződtek, de az általában PR-fehérjéket indukáló kezelések esetén nem mutattak fokozott aktivitást. Mindezek a tulajdonságok (gyors és baktérium-specifikus indukció, szoros korreláció az EBR-rel) erősítették a nézetünket, hogy az EBR215/250 fehérjéket érdemes tovább jellemezni és ha lehet, meghatározni.

5.2. Az EBR215/250 újonnan leírt, eddig ismeretlen kitinázok

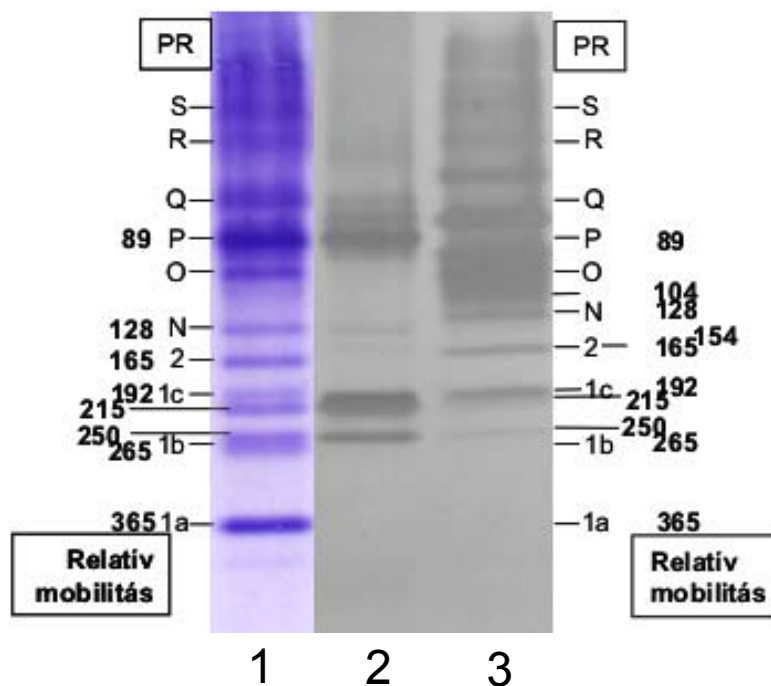
A tömegspektrometriai elemzés alapján a két fehérje nagyon hasonlít egymásra, feltehetően a poszt-transzlációs módosulások vagy az ún. alternatív *splicing*-nak (szabályozó mechanizmus, melynek révén a DNS transzkripciója során keletkezett RNS-ből a kódoló exon régiók különféle variációi alakulhatnak ki, így egy gén egynél több fehérjét, izoformát képes kódolni) köszönhetik az egymástól eltérő alak és/vagy molekulásúly különbséget. Az NCBI adatbázisban fellelhető fehérjék közül csak egy babból és egy rizsből izolált kitináz rövid aminosavszekvenciájára kaptunk homológiát. A MALDI-TOF vizsgálatainkkal párhuzamosan Szatmári különböző, konzervatív kitináz szekvenciák alapján tervezett indítószekvenciákkal három PCR-terméket kapott *hrcC* mutáns *P. syringae* pv. *syringae*vel előkezelt, tehát EBR-t mutató dohányból. Az egyik termék indukciós sajátosságai (időbeli lefutása) igen hasonlóak voltak a tömegspektrometriával meghatározott kitinázéhoz. A PCR-termék szekvenálásból

kapott eredményeket a tömegspektrometriai laboratórium eredményeit 100 %-ban alátámasztották, vagyis a PCR-rel felszaporított génszakasz az általunk poliakrilamid-gélből kivágott és tömegspektrometriával meghatározott fehérje génjének a része (Ott et al., 2006). A fehérjék enzimatis aktivitását géleken is ki tudtuk mutatni. Fontos kihangsúlyozni azt is, hogy extracelluláris, savas pH-jú és *M. lisodeicticus* sejteket bontó lizozim aktivitású PR-fehérjékről eddig még nem számoltak be. Sőt, a '215' és '250' kitinázokon kívül a teszt további három kitinázt mutatott ki. A kitinázok, a növényi PR-fehérjék családjában nagy „létszámú” csoportot képviselnek. A legtöbb PR-fehérjét vírusfertőzést követően HR-t mutató növényből izolálták. A dohány PR-fehérjékről beszámoló több tucat közleményt áttanulmányozva találtunk rá Trudel és mtsai. (1989) munkájában olyan kitinázokra, amelyek a TMV-vel fertőzött levelek sejtközi folyadékában és a HR-elhalásokat mutató levél homogenizátumában is kimutathatóak. Az EBR215/250 fehérjét inkompatibilis TMV-dohány kapcsolatban sem a sejtközi folyadékban, sem a szövethomogenizátumban nem találták meg. A közlemény másik érdekessége volt egy olyan kitináz, amelyik a sejtközi folyadékban nem, de a szövethomogenizátumban megjelent. Ez a kitináz a PR-N fehérjével egy vonalban vándorolt. Fontos megjegyezni, hogy ezt az eredményt hét nappal a TMV fertőzést követően kapták. A kitináz-aktivitás tesztek alapján, a közleményben leírt PR-N fehérje mellett vándorló kitináz azonos az előlt baktériummal történő kezelést követően (is) megjelenő '168'-al jelölt fehérjével. Abban az esetben a kitinázt a sejtközi folyadékból azért nem tudhatták kimutatni, mert eredményeink szerint a '168' kitináz rövid időn belül eltűnik a sejtközi folyadékból (baktérium indukciót követően). Ez azonban nem magyarázható a sejten belüli készlet kimerülésével. A '168' fehérje indukciós sajátosságainak vizsgálata még folyamatban van, így részleteiben nem térünk ki rá.

5.3. Az EBR215/250 bakteriolitikus hatású enzimek

Fontos kérdés, hogy az EBR215/250 fehérjék csak jelzik az EBR-t vagy annak aktív, antimikrobiális komponensei. A lizozim aktivitás egyes ismert PR-kitinázok jellemző tulajdonsága (Stintzi et al., 1993). A PR-3 családba tartozó fehérjék közül a chi 28 fehérjének bizonyított gyenge kitináz és lizozim aktivitása, míg a PR-P és Q csak kitináz aktivitást mutat. A PR-8, ún. kitináz/lizozim családból a savas lys 28a gyenge kitináz-, a bázikus lys b1 és lys b2 fehérjék pedig gyenge kitináz és erős lizozim aktivitású fehérjék (Stintzi et al., 1993) (Lásd 2.4.2. fejezet, 3. táblázat). Az általunk izoelektromos fókuszálással előállított 7. frakcióban összesen egy fehérjét láttunk, melynek nem volt kitináz aktivitása. A 8. frakcióban két bázikus, kitináz aktivitással rendelkező fehérjét mutattunk ki, amelyek feltételezhetően a

lys b1 és lys b2, melyek izoelektromos pontja pH 8.3 (Brunner et al., 1998). Annak ellenére, hogy a 8. frakcióban lévő fehérjék is feltételezett lizozim-aktivitású kitinázok, a 2. frakcióban erősebb *M. lisodeicticus* bontást mértünk (33. ábra).



36. ábra. Hövel előlt *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicolava* l kezelte dohánylevél sejtközötti folyadékában található fehérjék elválasztása izoelektromos pontjuk alapján és a PR-fehérjék nevezéktana (Kauffmann et al., 1987). 1., a dohány sejtközötti folyadékában található fehérjék Coomassie Brilliant Blue R250 festékekkel festve; 2., 2. frakció, pH 3.8-4.4; 3., 3. frakció, pH 4.5-5.1. A 2. és 3. frakció fehérjéit ezüsttel festettük.

A 2. frakcióban, a '89', '128', EBR215 és 250 fehérjéken kívül, több fehérjét mutattunk ki ezüstfestéssel (36. ábra). Vajon a frakció lizozim aktivitása az EBR215/250 kitinázok, vagy a többi közül egy (vagy több) fehérje jellemzője? A 2. és 3. frakció között több minőségi különbség is megfigyelhető. Az egyik a PR-Q fehérje, de kimutatott lizozim aktivitása nincs (Stintzi et al., 1993). A következő a PR-P, ami nem található meg a 3.-as frakcióban. Mivel ezen a környéken ez az egy markáns minőségi különbség található a 2. és 3. frakció között, a kitináz aktivitás gél alapján (32. ábra) a '89' kitináz a PR-P fehérje. Ez a kitináz nem rendelkezik lizozim aktivitással (Stintzi et al., 1993). Kicsivel lejjebb, a '128' helyen, korábban a PR-N fehérjét véltük felismerni (Lásd 4.3. fejezet). Az izoelektromos fókuszálást követően világosan látható volt, hogy a kitináz ('128'), mely gyenge EBR esetén már 12 órával az indukciót követően eltűnik a sejtközötti folyadékból, nem pontosan a PR-N fehérjével együtt vándorol, hanem attól kicsit lejjebb, a '154' fehérje vonalában. Ezt a fehérjét már Ott (2002) is kimutatta, de a fehérjék bizonytalanok ítélt mennyisége miatt az EBR-rel

való kapcsoltságát nem vizsgálta. Kísérleteiben a '154' fehérje kis mennyiségére magyarázatot adhat arra, hogy ez a fehérje nem denaturáló poliakrilamid gélben csak nagyon ritkán válik el a '128' fehérjétől. EBR-hez való kapcsoltsága a kitináz aktivitás gélekkel történő kimutatásnak köszönhetően bizonyosodott be. A '154' fehérje valószínűsíthetően a lys 28a (Lásd 3. táblázat), mely extracelluláris, pH 4.4, 28 kDa nagyságú fehérje, mely gyenge kitináz aktivitással rendelkezik, de *M. lisodeicticus* bontó aktivitással nem. A lizozimok másik szubsztrátjával, a 4-metil-umbelliferil-kitotriózzal (4-MUCT) (Tronsmo and Harman, 1993) szemben azonban erős enzimaktivitást mutatott, ezért a kitináz/lizozimok csoportjába tartozik (Stintzi et al., 1993). A dohány sejtközötti folyadékában, a pH 3.8-4.4 izoelektromos pontú tartományban kimutatott kitinázok közül, kizárásos alapon, az EBR215 és/vagy 250 fehérjének van tehát *M. lisodeicticus* sejtek bontásával kimutatható lizozim aktivitása. A bakteriolitikus hatás tényét nem csak a *M. lisodeicticus* sejtek bontására alapozott vizsgálat (Lásd 4.6. fejezet), de az EBR215/250 aminosav sorrendjében fellelhető 19. glikozid-hidroláz családba tartozó kitináz domén megléte is erősíti (Marchler-Bauer et al., 2005). Bár a valódi lizozimokkal a család tagjai semmilyen homológiát nem mutatnak, a fehérjék szerkezete alapján megállapították, hogy a 19. családba tartozó kitinázok a 46. családba tartozó kitozanázokkal egyetemben a T4-fágból és a libából azonosított lizozimokra hasonlítanak, és mindegyikük az ún. lizozim-szerű enzimek csoportjába tartozik. (Marchler-Bauer et al., 2005).

A lizozim aktivitás legalább két helyen lehet fontos a védekezésben. A lizozim-aktivitású enzimek a peptidoglükán bontásával roncsolhatják a baktériumsejtet, tehát elsődleges szerepük lehet (a többi, később megjelenő lizozim aktivitású fehérjével együtt) a baktériumra kifejtett direkt hatásban. Az EBR215/250 kitinázok rövid indukciós ideje alapján joggal feltételezhetjük, hogy az EBR-markereknek a rezisztencia kialakulásának nagyon korai szakaszában van jelentőségük. Alapul véve a flagellin indukcióra adott választ, a peptid akár egy elsődleges EBR215/250-kiváltó mechanizmus komponensének is tekinthető. A flagellin által indukált lizozim-aktivitású kitinázok a baktériumsejttel való kapcsolatba kerüléskor annak peptidoglükán láncait emésztve elicitorokat szabadíthatnak fel, melyek további antimikrobiális hatásokat, fehérjéket indukálhatnak. Pozitív visszacsatolás révén az eredeti kitináz mennyiségének növekedését is okozhatják. Ezzel összhangban van pl. az EBR215/250 fehérjék aktivitásának 12-24 órán keresztüli folyamatos növekedése. Az antimikrobiális hatás fokozásán kívül fontos lehet a kiszabadított elicitorok általi válaszban megjelenő számos, további PAMP felismerését lehetővé tevő receptor indukciója. Ezt *Arabidopsis*-ban már megismerhettük (Navarro et al., 2004). Talán az EBR215/250 fehérjék nagyon gyors megjelenése és lizozim aktivitása a kulcs a baktériumsejt belsejében lévő elicitorok

kiszabadításában? Ennek biztos megállapítása további vizsgálatokat igényel. Ezen EBR markereknek a fentiek szerint jó esélyük van az EBR funkciós egységeivé előrelépni.

5.4. Az EBR elicitorainak meghatározása

Az EBR215/250 kitinázok fontos, baktérium specifikus, indukciós sajátosságai (5. táblázat) alapján e fehérjék EBR-molekuláris markerként való alkalmazhatósága megalapozottá vált. Jelenlétük a sejtközötti folyadékban specifikusan csak az EBR – illetve később az LBR – működése alatt mutatható ki. Egyre több bakteriális elicitor (Felix et al., 1999; Dow et al., 2000; Felix and Boller, 2003; Kuntze et al., 2004) és receptor (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Zipfel et al., 2006) ismert, azonban az általunk közvetített válasz HR-gátlását, vagyis az EBR-t nem vizsgálták. Ezért célul tűztük ki e témakör szűken az EBR-re vonatkozó kérdéseinek a megválaszolását. Az elicitorok meghatározása több további szempontból fontos és érdekes feladat. A baktériumsejtek a növényi sejtközötti járatokban eltöltött idő előrehaladtával a kedvezőtlen, indukált és állandó növényi rezisztencia által okozott fiziológiai hatások következtében sérülnek, és egyre több baktérium sejtalkotó szabadul ki. Ezek a sejtalkotók újabb reakciókat válthatnak ki a növényben. A rezisztencia későbbi időszakában a baktériumsejt felszínén, és feltehetően a belsejében lévő elicitorok együttes, akár szinergisztikus indukciós hatása is érvényesülhet. Amikor hővel előlt baktérium szuszpenzióval indukáljuk az EBR-t, nem csak egy faktor felismerődésének hatását látjuk. Nem tudjuk, hogy a teljes EBR mechanizmus minden különálló elicitor hatására ugyanúgy kialakul, vagy a folyamat alatt leírt fiziológiai és molekuláris események az összes elicitor együttes hatásaként jönnek létre? E kérdés megválaszolása feltétlenül igényli az egyes elicitorok meghatározását. Az elicitorok meghatározása fontos lehet a steril, *in vitro* kultúrákban kivitelezendő kísérletekben, valamint gyakorlati növényvédelmi vonatkozásokban, ahol indukált rezisztenciát hívnak segítségül.

5.4.1. A lipopoliszacharid nem vált ki korai általános rezisztenciát

Az EBR-elicitorok meghatározására rendelkezésre álló (flg15, LPS) és újonnan leírt (flg22, csp22, elf26) elicitorok által kiváltott reakciókat vizsgáltuk az EBR215/250 markerek felhasználásával és párhuzamosan a HR-gátlás teszttel. Az flg15 mindkét rendszerben abszolút inaktív volt. A *P. coriandricolaból* tisztított LPS két, jól megfigyelhető reakciót is kiváltott. Az EBR működési ideje alatt, 24 órával az indukciót követően bezárólag, nem

indukálta sem a marker kitinázokat, sem HR-gátlást. A kitináz gén átíródása sem mutatott magasabb értéket a víz által indukáltnál.

Az LBR alatt, ami egy nappal az indukciót követően kezd működni, 48 és 72 órával az injektálást követően vizsgált sejtközötti folyadékban gyengén tudtuk kimutatni a kitinázokat és HR-gátlás is csak ebben az időszakban, átmenetileg alakult ki. Ezek alapján az LPS inkább a késői válasz kialakításáért lehet az egyik felelős. Azonban az LPS-el injektált dohánylevélben olyan fehérjék is megjelentek a sejtközötti folyadékban ('265' és '365' közötti régióban), amelyeket korábban csak teljes baktériumsejtek általi fertőzésnél figyelhettünk meg, függetlenül annak dohánynyal alkotott patogenitási viszonyaitól. Az LPS LBR és a kisméretű fehérjék indukálásában játszott szerepének (Lásd 4.5.1 fejezet) tisztázására a *M. lisodeicticus*, LPS-el nem rendelkező Gram-pozitív baktérium általi fehérjeválasz megvizsgálása hozott további eredményeket. A *M. lisodeicticus* minden vizsgált időpontban (6, 12, 24, 48, 72 órával az injektálást követően) kiváltotta a HR-gátlást és az EBR markereket. Mivel mind a Gram-pozitív és a Gram-negatív baktériumok, mind az utóbbi csoport sejtfalának LPS alkotóeleme indukáltak HR-gátlás és a kisméretű fehérjék megjelenése csak a Gram-negatívokkal és a rájuk specifikus elicitorral végzett kezelések esetében volt megfigyelhető, ezért az LPS és az általa is kiváltott kérdéses fehérje-sorozat nem hozható össze szoros összefüggésbe az LBR-rel. Annál is inkább, mivel a '265'-'365' közötti csíksorozat nem mutatható ki a gélek Coomassie-kék festését követően, ami az ezüstfestéstől eltérően csak a fehérjéket festi meg. A kis méretű csíkok megjelenése LPS-t tartalmazó induktorral arra utalhat, hogy ezek inkább az LPS molekula bomlástermékei, mint a késői rezisztencia velejárói. Ezt az állítást igazolták a BTH-val valamint az flg22 peptiddel végzett kísérleteink is (Lásd 4.2.3 és 4.5.1 fejezetek).

5.4.2. A peptidoglükán gyengén indukálja a korai általános rezisztenciát

A peptidoglükán a *Drosophilában* és az emlősökben igen aktív elicitor (Zipfel and Felix, 2005). Sejtszuszpenzióban (Felix and Boller, 2003) és intakt dohányban végzett kísérletekben (4.5.1. fejezet) azonban gyenge elicitor-aktivitást találunk. A pozitív kontrollként a dohányba injektált *M. lisodeicticus* jóval erősebben indukálta a kitinázokat. De az elicitor-kezelést követő marker-kitinázok időbeni megjelenése nagyon hasonlított az EBR perzisztenciájához. Az elicitor lizozimos emésztése következtében a peptidoglükán lánc kisebb egységekre darabolódik. Egyes esetekben ezek a peptidoglükán frakciók aktívabbnak bizonyultak (Kanost et al., 2005). A *M. lisodeicticus* peptidoglükán lizozimmel való inkubációja sem fokozta az elicitor aktivitását (21. ábra) jelentős mértékben. A tény, hogy a teljes baktériumsejtek, melyek sem LPS-sel sem flagellinnel nem rendelkeznek (Felix and Boller, 2003), és a

tisztított peptidoglükán sem egész, sem darabolt formájában még csak meg sem közelíti az egész sejtek általi indukció mértékét azt sejteti, hogy a peptidoglükán mellett a *M. lisodeicticus*-ban kell lennie egy másik, aktívabb PAMP-nak. Erre azonban még nincs utalás. A peptidoglükán tehát nem indukált a pozitív kontrollokhoz hasonló mértékű EBR-t egyik kimutatási rendszerben sem. E sejtfalalkotó hatására kialakult gyors kitináz génaktiváció és a fehérje megjelenésének, a pozitív kontrollhoz hasonló, 12 órás maximuma magában rejti annak lehetőségét, hogy bár önmagában nem vált ki robosztus reakciót a növényben, de megjelenése a sejtközötti térben egyfajta figyelmeztetés a növény számára, és ha gyengén is, de elindíthatja a védekezési folyamatok sorát. E feltételezés alapja a gomba-növény kapcsolatból már ismert folyamat: növényi szövetbe jutó gombák a védekezés következtében roncsolódnak és a sejtfalukból leszakadó oligo-kitin és oligo-glükán egységek újabb elicitorokat szolgáltatnak a növényi védekezés jelfogói számára (Fritig et al., 1998). Ezt a hipotézist erősíti a flagellin hatására a receptor kináz gének nagyszámú indukciója (Navarro et al., 2004).

5.4.3. Az elf26 peptid dohányban gyenge, de értékelhető reakciót vált ki

A hidegsokk peptiden kívül felmerült további sejten belüli elicitor jelenléte az *fls2* mutánsok baktérium homogenizátumra adott reakciójából kiindulva. Az izolált elf peptidek indukálták a védekezéshez köthető reakciókat *Arabidopsis*-ban és más keresztes növényben, valamint a védekezéshez kapcsolható *SIRK/FRK1* (Robatzek and Somssich, 2002) géneket. A legaktívabb elf26 peptid etilén felhalmozódást nem indukált az dohány, citrom, paradicsom és egyéb nem keresztes növények leveleiben. Georg Felixtől (Zürich-Basel Plant Science Center, Botanisches Institut der Universität Basel, Svájc), a CSP-t és más növényben működő elicitorokat leíró csoport kutatójától kapott peptid vizsgálata a mi rendszerünkben új eredményekkel gyarapította a peptiddel kapcsolatos ismereteket. Annak ellenére, hogy a dohányban nem mutattak ki etilén termelődést és más védekezési választ az elf peptid hatására, az általunk használt BR-vizsgálati rendszerben (kitináz aktivitás és HR-gátlás teszttel) sikerült kimutatni indukált növényi rezisztenciát egy nem keresztes növény családjában. Az etilén „többszerepes” résztvevője a védekezési rendszereknek. Egyes esetekben a védekezés komponenseinek induktoraként írták le (Mauch and Staehelin, 1989; Botha et al., 1998), máskor szisztemikus védekezés jelátvivőjeként és más védekezési folyamatok regulátoraként szerepel (Ecker and Davis, 1987), de számos esetben a rezisztencia működését igazolták jelenlétével (Felix et al., 1999; Felix and Boller, 2003; Kuntze et al., 2004). Ez arra enged következtetni, hogy a BR, ezen belül az EBR nem etilén-függő útvonalak által fejtik ki

hatását. Ezt csak erősíti, hogy az etilén-prekursor kezelés, nem indukálta az EBR215/250 kitinázokat és a HR-gátlást (Lásd 4.2.2 fejezet). CSP kezelést követően a *Solanaceae* család tagjai fokozott etilén bioszintézist mutattak, míg e családba nem tartozó fajok esetében, mint pl. az *Arabidopsis*, ezt a védekezési reakciót nem mutatták ki (Felix and Boller, 2003). Az elf peptid hatására, ezzel ellentétesen, a *Solanaceae* család nem mutatott etilén termelődést, de az *Arabidopsis* és más keresztesek igen (Kuntze et al., 2004). Vagyis az etilén bioszintézis nem mindegyik növényfajban működik a védekezésben részt vevő szereplőként. Mivel dohányban, az igen érzékeny sejtszuszpenzió pH-változás és etilén felhalmozódás mérésén alapuló módszerekkel, nem mutattak ki indukált választ (Kunze et al., 2004), kísérletünkben kimutatott alacsony értékek is egyértelműen a dohányban való felismerést jelentik.

Mint látható, számos baktérium faktor ismert már, melyek a növényi általános rezisztencia felismerő-mechanizmusát aktiválhatják. A növénybe jutó kórokozó és nem kórokozó mikroorganizmusok sokfélesége – legyen szó baktériumokról, gombákról vagy vírusokról – szükségszerűen maga után vonja, hogy a növények számos, és feltehetően egyre több, sejtidegen mikroorganizmus-komponenst képesek felismerni. Munkánk eredményei azt sugallják, hogy különbséget kell tenni az egyes elicitorok között olyan értelemben, hogy némely elicitorok felismerése a védekezésre ösztökéli a növényt, mások pedig inkább egy gyengébb, iniciáló jelet jelentenek a szervezet számára.

5.4.4. A vizsgált elicitorok közül a csp22 és a flg22 peptid indukálta a legerősebb korai BR-t

A BR tünetmentes reakció, így az elicitor kezelésre adott válasz, aktív oxigénformák felhalmozódása, a tápközeg lúgosodása stb. (Lásd 2.5. fejezet) a BR lehetséges elemeiként tarthatók számon. Az indukált reakciók csak közvetetten utalnak a rezisztencia kialakulására. Ezért a PAMP-ok vizsgálata a mi fiziológiai- és fehérje-szintű változásokon alapuló rendszerünkben fontos eredményekkel gyarapította a peptidekkel kapcsolatos ismereteket. A CSP, az LPS-hez hasonlóan, egy időben későbbi reakciót váltott ki a dohányban. Azzal a különbséggel, hogy a csp22 peptid már 6 és 12 órával az injektálást követően nagyon gyengén indukálta az EBR215/250 kitinázokat. A peptiddel végzett kísérletek egyértelműen alátámasztották az EBR215/250 fehérjék mennyisége és az EBR hatékony HR-gátlása közötti korrelációt. A legkorábbi, 6 órás felülfertőzés háttérében a negatív kontrollal megegyező mértékű kitináz-aktivitás nem eredményezett HR-gátlást. Érdekes, hogy a *M. lisodeicticussal* injektált levelekben a 6 órás vizsgálati időpontban kevesebb fehérje volt, mint a csp22-indukált maximum (amelynél már HR-gátlás volt), mégis a teljes baktériumsejt-kezelés már

ekkor megvédte a szövetet a későbbi fertőzéstől (27. ábra). Ennek lehetséges oka az, hogy az EBR egy széles spektrumú válasz, melynek a kitinázok csak egy részét képviselik. Ezt támasztják alá a *Medicago*ban megfigyelt nagyszámú génaktivitás-változások az EBR-során (Bozsó et al., 2005 b). Továbbá a teljes *M. lisodeicticus* sejtekben egyszerre meglévő peptidoglükán, CSP és egyéb eddig ismeretlen elicitorok az általuk beindított jelátviteli útvonalak egymás melletti, párhuzamos működése feltehetően más és/vagy erősebb indukciós hatásúak. Az elicitorok általi szinergisztikus, vagyis több elicitor együttes bejuttatásával egymás hatásának fokozását Zipfel és mtsai. (2006) vizsgálták. A flg22 és az elf peptidet együttesen juttatták az *Arabidopsis*ba. A két elicitor együttes alkalinizációs hatása nem haladta meg az elicitorok által külön-külön mért értékeket. A MAP kináz kaszkád elemei, az MPK3 és MPK6, mindkét elicitor esetében aktiválódtak, az elf26 egyedüli hatását meghaladták, de a flagellinnél nem volt magasabb a kombinációjuk általi indukció, vagyis nem mutatták ki a kinázok szinergisztikus aktivitás-növekedését. Meg kell jegyezni, hogy minőségi változás ugyanaz volt a két elicitorra reagáló növényben, de a flagellinre a kinázok hamarabb aktiválódtak és később csengett le működésük. Mi határozza meg, hogy egy adott elicitorra mikor alakul ki a növényi válasz? A baktériumsejtek növénybe jutásakor szükség van bizonyos időre, amíg a sejt roncsolódásának vagy más hatásoknak következtében a sejt belsejében lévő elicitorok kiszabadulnak, és így a növényi felismerő rendszer számára immár aktív elicitorrá válnak. Azonban kísérleti körülmények között, amikor szintetikus elicitort injektálunk a növénybe, már nem lehet szükség időre a baktériumsejtből való kijutáshoz, az egyes elicitorokra adott válasz mégis más-más időpontban detektálható. A kérdés feltehető lett volna már az LPS lipo-oligoszacharid, központi és A-lipid részei által kiváltott reakciók időbeni elkülönítésekor (Silipo et al., 2005). Azonban e fontos és igen összetett kérdés magvázolására nem vállalkoztak a szerzők. Ennek magyarázata az egyes elicitorokat felismerő receptorok meghatározása és a teljes jelátviteli útvonalak megismerése után történhet meg.

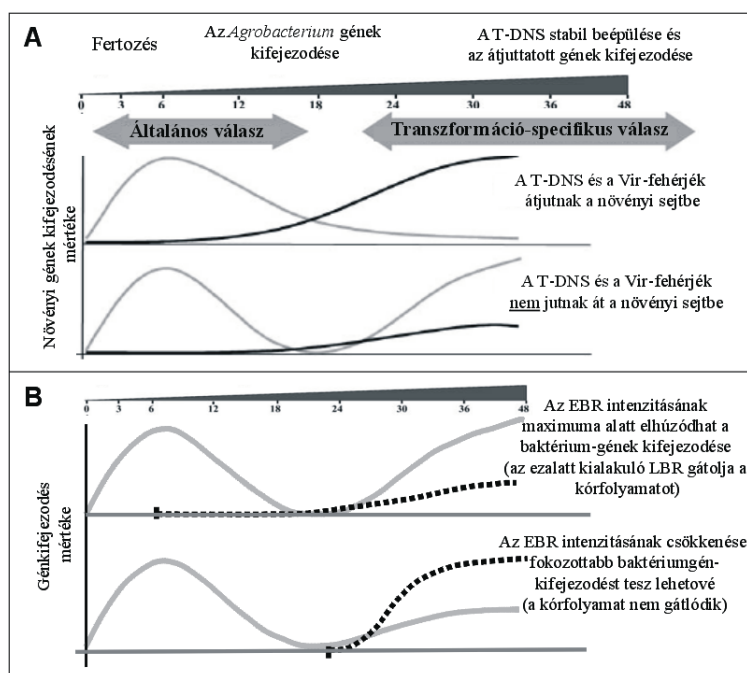
Mint azt bemutattuk (Lásd 4.5.1. fejezet), az flg15 peptid nem váltotta ki dohányban az általunk vizsgált BR markereket, sem HR gátlást. A dohányban jóval aktívabb flg22 peptid (Felix et al., 1999) azonban, mind a molekuláris, mind a fiziológiai EBR-markereket kiváltotta. Flagellin általi HR-prevenzióról először számolhattunk be (Varga et al., 2005 b). A peptid a teljes baktériumsejtek által indukálthoz hasonló, vagy azt meghaladó védettséggel ruházta fel az előkezelt szöveteket. Az EBR-markereket igen hosszú ideig ki lehetett mutatni a sejtközötti folyadékából (26. ábra). Tehát egyetlen elicitorral tudtuk indukálni a korai és a késői választ is. Az LPS-el kapcsolatban megvitatott kis méretű csíksorozat nem jelent meg flg22 injektálást követően, ami megerősíti a feltételezésünket, hogy ez a sorozat ('265' és

'365' közötti régióban) az LPS molekulából származik. A flagellinnel kapcsolatban további vizsgálendő téma maradt az általa indukált védekezés hatása a kompatibilis baktériumra. Az 1 μ M flagellin peptid kétszer olyan génaktivációt váltott ki, mint a hővel előlt baktérium. A flagellin általi indukció valós mértékét úgy lehetne igazán megállapítani, ha ismernénk adott sejt-koncentrációjú baktérium szuszpenzióval mennyi flagellint juttatunk be a növényi sejt-közötti térbe. Így a kísérletekben kapott elicitor aktivitást ennek tükrében kell értékelni.

5.5. Az *flg22* elicitor által kiváltott reakció hatása *Agrobacterium tumefaciens* fertőzésre

Az *Agrobacterium tumefaciens* a növénykórokozók között egyedülállóan széles gazdakör fertőzésére képes. Talán az elicitorok is szerepet játszanak ebben, hiszen a *A. tumefaciens* *flg22* peptidje *Arabidopsis*-ban, paradicsomban és még néhány *Solanaceae* családba tartozó növényben nem vált ki védekezési reakciót (Felix et al., 1999). Ez a baktérium is hordoz a növény által „azonosított” elicitorokat, azonban az általuk indukált általános védekezésben feltehetően olyan faktorok működnek, melyet elvisel és/vagy kikerül a kórokozó. Bár a dolgozatban nem részleteztük, több élő, virulens és T-DNS nélküli mutáns *Agrobacterium* törzs indukálta az EBR215/250 kitinázokat, ami bizonyítja, hogy a flagellin mellett más elicitor is hordoznak. Az is bizonyított, hogy az *Agrobacterium* gátolja a növényi védekezés egyes elemeit, de ennek módja eddig ismeretlen (Veena et al., 2003). Kísérleteinkkel arra próbáltunk fényt deríteni, hogy vajon a BR hatásos-e ezzel a sajátos baktérium kórokozóval szemben? Zipfel és mtsaival (2006) párhuzamosan mi is beszámoltunk a PAMP kezelés *Agrobacterium*-fertőzést gátló hatásáról (Varga et al., 2006). Mivel steril desztillált víz hatására is tapasztaltunk bizonyos fokú tumor-tünet gátlást, ezért felmerülhet, hogy a csökkent tumorképződés nem a bejuttatott peptid által kiváltott reakció, hanem a levél szöveteiben lévő folyadék baktériumsejt tapadását gátló hatásának következménye. A sérült szövet sejtjeihez való tapadás az *Agrobacterium* fertőzési folyamatában kulcsfontosságú lépés, és az ún. tapadás-képtelen mutáns baktériumok nem okoznak tumor tüneteket (Matthysse, 1987). Azonban a flagellin által kiváltott reakció a víz hatását meghaladóan gátolta a tumor-tünetek kialakulását. A kezeletlen levelekhez képest is extrém magas tumorképződés magyarázatát a védekezési folyamat két csúcú lefolyása adhatja. A nem patogén *Agrobacterium* által indukált védekezési reakció egy korai, 18.-24. óra után lecsengő, és egy késői, maximuma 30.-36. óránál mérhető, válaszból áll (Veena, et al., 2003; 37. ábra A). A patogén *Agrobacterium* fertőzése folyamán viszont csak az első periódusra jellemző válaszok indukálódnak, a későbbiek feltehetően elnyomja a kórokozó. Ebben a modellben a fertőzés és a növényi védekező mechanizmus indukciója egyszerre

kezdődik. A kórokozási folyamat időigénye a baktérium növényi sejthez való kapcsolódásából, a növényi környezethez való alkalmazkodásából, valamint, a baktérium általános elicitorai által indukált korai védekezés tolerálásából és „kiheveréséből” tevődik össze. A betegség kialakításához szükséges faktorok, a T-DNS átviteli mechanizmus kiépítése a baktérium növénybe jutását követően 6-12 óra környékén mérhető leghamarabb (Veena et al., 2003). Mivel az *Agrobacterium* általános elicitoraira nem vagy másképp reagál a növény (Felix et al., 1999), ezért lassulhat a felismerés. A korai védekezés gyengülésével párhuzamosan a baktérium génjei egyre erősebben működnek. Nem patogén *Agrobacterium* általi indukció esetében 18-24 óra után cseng le (feltehetően) az EBR és alakul ki az LBR. Legalábbis az idő paraméterek e két rezisztencia működési idejére illeszthetőek rá. A patogén *Agrobacterium* törzs a T-DNS, az átvitelhez szükséges fehérjék (pl. Vir), vagy eddig ismeretlen fehérjék átjuttatásával képes elnyomni a növényi védekezést is (Veena et al., 2003), így az LBR már nem tud működni. A flagellin kevesebb, mint hat óra alatt működésbe hozza a védekezést. Kísérleteinkben a baktérium a már működő EBR hatásait kellett, hogy tolerálja, ezért a kórfolyamathoz szükséges gének aktivációja elhúzódhat, és így lehetőség van az LBR kialakulására. A 24 órás előkezelés esetén a patogén *A. tumefaciens* időeltolódással, a flagellin által indukált EBR hanyatlásakor (24 óra) kerül kapcsolatba a dohány levélkorongokkal (37. ábra B). A lecsengő növényi védekezés mellett ekkor nincs szükség tolerálásra, és így egyből a kapcsolódás és támadás következhet a fertőzési folyamat lépései közül. Kihasznlva a gyengült állapotot, a T-DNS átvitel sokkal gyorsabb és hatékonyabb lehet. A T-DNS-el együtt átjuttatott, növényi védekezést blokkoló faktorok (akár erősebb) működése következtében fertőzést nem gátolja semmilyen növényi védekezés és a kritikusan gyenge védelmű növényi szövetben a kokultiváció ideje alatt az *Agrobacterium* fokozottabb tumor képződést vihet véghez (35. ábra; Varga et al., 2006). (Ez akár magyarázata lehet egy erős, szennyező, nem-kívánt fertőződésnek is.) Az *Agrobacterium* fertőzés során feltételezett növényi és baktérium génműködést Veena és mtsai. (2003) eredményeire vetítve szemléltetjük (37. ábra). A hipotézis tényezőinek részletesebb vizsgálatával fejthetjük meg a golyvásodás betegség kialakulásának kulcskérdéseit.



37. ábra A növényi gének aktivitása agrobaktériumos fertőzés során (A) Veena és mtsai. (2003) munkája (magyarra fordítva) és a flagellin előkezelést követően kimutatott tumorgátlás és fokozott tumorképződés feltételezett genetikai háttere saját eredményeink alapján (B). Fekete vonal, a kórfolyamathoz szükséges (pl. sejtosztódáshoz és -növekedéshez kapcsolható) növényi gének kifejeződése; szürke vonal, a védekezéshez kapcsolható növényi gének kifejeződése; szaggatott vonal, a tumorgátlás alapján feltételezett *Agrobacterium* gének aktivitása

Az EBR215/250 kitinázok az EBR kimutatására alkalmas megbízható és kvantifikálható módszert alapoztak meg. Az „újdonsült” EBR-markereket felhasználva a jelenleg ismert legtöbb PAMP EBR indukcióját vizsgáltuk meg. A vizsgáltak közül a flagellin 22 aminosav hosszúságú, konzervált peptidje volt a legaktívabb elicitor. A sikeres modellkísérletek távlatilag fontos gyakorlati jelentőséggel bírnak. Ilyen megközelítésben a flagellin, vagy akár más a növényi általános védekezést hatékonyan stimuláló elicitor, potenciális „növényvédő szer” is lehet a közeljövőben. A legnagyobb problémát az elicitor kijuttatása, vagy ebben az értelmezésben inkább bejuttatása jelenti. Az EBR215/250 kitinázok további vizsgálatát (pl. géncsendesítés hatása az EBR-re) követően a génműködés javításával (gyorsításával, fokozásával), a baktériumok ellen hatékony védettséggel rendelkező, genetikailag módosított fajták előállítására lehet perspektivikus. Mivel a génmódosítás következtében a növény saját fehérjéjének módosított működése adná a rezisztencia alapkövét, kevesebb környezetvédelemmel kapcsolatos aggálynak adna tápot.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az általános rezisztencia (BR) a baktériumok általános elicitorait felismerve a növény sejtközötti járataiban megállítja a nem-patogén és nem növény-kórokozó mikroorganizmusok szaporodását, és közreműködik a kompatibilis baktériumok megfékezésében. A BR hatás egyik legkorábban tettenérhető funkcionális következményeként az inkompatibilis baktérium sem tud hiperszenzitív reakciót okozni (korai BR, EBR). Mindmáig tisztázatlan, hogy a BR által védett növényi szövetben mik is azok a tényezők, melyek közvetlenül a baktérium sejtire hatnak.

A dohány EBR során olyan fehérjéket mutattunk ki, melyek nagyon gyorsan (3-6 óra alatt) jelentek meg a baktérium fertőzés színhelyén, a levelek sejtközötti folyadékában és a baktérium sejtekhez vagy azok komponenseihez kapcsolható kifejeződést mutattak. Az EBR215/250 fehérjék sajátossága, hogy sem abiotikus (ozmotikus, só, oxidatív) stresszek, sem a növényi védekezéssel korreláló, ismert patogenezishez kapcsolt (PR) fehérjék kémiai induktorai (szalicilsav, etilén, jazmonsav) nem váltották ki megjelenésüket. Az EBR és a kapcsolt fehérjék tehát szalicilsav-független úton jönnek létre, amit a NahG – szalicilsav hiányos – növényekben kimutatásunk is igazolt. Aminosav szekvenciájuk alapján az EBR215/250 fehérjék eddig nem azonosított kitinázok. Ezek a kitinázok lizozim aktivitással is bírtak. A kitináz aktivitás és génindukció, valamint az EBR intenzitás mérésével baktériumból azonosított általános elicitorok hatását vizsgáltuk. A baktériumok állandó sejtalkotói: a flg15, flg22, csp22 és elf26 konzervált peptidek, valamint a lipopoliszacharid és peptidoglükán (PG) közül a flg22 peptid bizonyult a legaktívabb EBR elicitornak. Az flg22-n kívül a csp22, az elf26 és a PG által indukált HR-gátlást és EBR-specifikus fehérje-kifejeződést először írtuk le. *In vitro* dohány növényekben az flg22 által indukált EBR csökkentette az *Agrobacterium tumefaciens* által okozott golyvásodás tüneteit.

Az EBR215/250 kitinázok lizozim és egyéb aktivitásuk révén többféle szerepet tölthetnek be a BR hatásmechanizmusában. A baktérium sejttel való találkozást követően a PG réteg bontásával és ezáltal a sejtek belsejében lokalizált elicitorok kiszabadításával további elicitorokat szolgáltathatnak a növényi felismerő receptorok számára. A flagellin és más általános elicitorok által indukált EBR215/250 kitinázok közvetlenül részt vehetnek az EBR baktérium-gátló mechanizmusában. E fehérjék további vizsgálata alapot adhat pl. az agrobaktériumos golyvásodás betegséggel szembeni hatékony gyakorlati védekezés kialakítására.

SUMMARY

Basal resistance (BR), triggered by general elicitors of bacteria, inhibits growth of non-pathogenic and non-plant pathogenic microorganisms in the intercellular spaces of plants and has a role in restricting of compatible bacteria. As one of the earliest functional consequences of BR, incompatible bacteria become unable to cause the hypersensitive reaction (early BR, EBR). We still do not know what factors of the BR-protected tissue affect bacteria directly .

During EBR of tobacco, we detected tobacco proteins with rapid (3-6 h) appearance in the intercellular washing fluid and with induction by bacterial cells or bacterial cell components. The EBR related proteins were neither induced by abiotic (osmotic, salt and oxidative) stresses, nor chemical inductors of known pathogenesis-related proteins (salicylic acid, ethylene or jasmonic acid). Expression of EBR and the related proteins (EBR215/250) was independent from salicylic acid because it did not fail in NahG plants known not to accumulate this signal compound. EBR215/250 are novel chitinases showing significant level of lysozyme activity. Chitinase activity and gene expression measurement along with EBR detection were used to examine activity of known general bacterial elicitors including flg15, flg22, csp22, elf26 peptides, lipopolisaccharide, and peptidoglycan (PG). The most active of them was flg22 peptide and in addition we demonstrated, the first time, EBR-elicitor activity of csp22, elf26 and PG. flg22 treatment of *in vitro* tobacco plants is accompanied with reduced tumor formation after *Agrobacterium tumefaciens* infection.

By means of lysozyme and other activities, EBR215/250 chitinases may play multiple roles in the machinery of BR. They may release further elicitors from 'hidden' locations. The chitinases may also have a direct effect on invading bacteria. Further experiments with EBR-related chitinases may ground effective and practicable measures against plant-pathogenic bacteria such as *Agrobacterium tumefaciens*.

7. MELLÉKLETEK

7.1. Irodalmi hivatkozások

- Abad, L. R., D'Urzo, M. P., Liu, D., Narasimhan, M. L., Reuveni, M., Zhu, J. K., Niu, X., Singh, N. K., Hasegawa, P. M. and Bressan, R. A. (1996) Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci.*, 118: 11-23.
- Abo-Elyousr, K., Yegen, O and Zeller, W. (2006) Investigations on induced resistance against fire blight (*Erwinia amylovora*) with different bioagents. Xth International Workshop on Fireblight, ISHS Acta Hort., 704.
- Achuo, A. E., Audenaert, K. Meziane, H. and Hofte, M. (2002) The SA-dependent defense pathway is active against different pathogens in tomato and tobacco. *Meded. Rijksuniv. Gent. Fak. Landbouwk. Toegep. Biol. Wet.*, 67: 149-157.
- Aderem, A. and Ulevitch, R. J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406: 782-787.
- Alfano, J. R. and Collmer, A. (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.*, 179: 5655-5662.
- Alfano, J. R. and Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42: 385-414.
- Anderson, A. J. (1984) Differences between lipopolysaccharide compositions of plant pathogenic and saprophytic *Pseudomonas* species. *Appl. Environm. Microbiol.*, 48: 31-35
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L. and Gomez-Gomez, L. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415: 977-983.
- Bae, W., Xia, B., Inouye, M., and Severinov, K. (2000) *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7784-7789.
- Bajsal, O., Laux, P. and Zeller, W. (2002) Systemic acquired resistance (SAR)-effect of BTH against fire blight. IXth International Workshop on Fire Blight, ISHS Acta Hort., 590.
- Bán R., Virányi F., Kőrösi K. és Nagy S. (2004) Indukált rezisztencia a napraforgó-peronoszspórával szemben. *Növényvédelem*, 40: 545-550.
- Bell, E. A. and Charlwood, B. V. (1980) Secondary plant products. Springer Verlag, Berlin.
- Bernasconi, P., Locher, R., Pilet, P. E., Jollés, J. and Jollés, P. (1987) Purification and N-terminal amino-acid sequence of a basic lysozyme from *Parthenocissus quinquefolia* cultured *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 915: 254-260.
- Bernier, I., Van Leemputten, E., Horisberger, M., Bush, D. A. and Jollés, P. (1971) The turnip lysozyme. *FEBS Lett.*, 14: 100-104.
- Besenyei, E., Ott, P. G., Bozsó, Z., Czalleng, A., Szatmári, Á., Varga, G. J. and Klement, Z. (2005) Low temperature delay and inhibition of a plant defence mechanism: early basal resistance in tobacco. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 40: 323-332.
- Bol, J. F., Linthorst, H. J. M. and Cornelissen, B. J. C. (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 113-138.

- Boller, T. (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 189-214.
- Boller, T. and Kende, H. (1979) Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cell. *Plant Physiol.*, 63: 1123-1132.
- Boller, T., Chinchilla, D., Felix, G., Kunze, G., Robatzek, S. and Zipfel, C. (2004) PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) and innate immunity in plants. International Joint Workshop on PR-proteins and Induced Resistance (pp. 58), Elsinor, Denmark May 5-9.
- Boller, T., Gehri, A., Mauch, F and Vögeli, U. (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta*, 157: 22-31.
- Botha, A. M., Nagel, M. A. C., Van der Westhuizen, A. J. and Botha, F. C. (1998): Russian wheat aphid infestation, exogenous ethylene, mechanical wounding, and chitinase isoenzymes. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 39: 99-106.
- Bowles, D. J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.*, 59: 873-907.
- Bozsó, Z., Ott, P. G., Szatmári, Á., Czalleng, A., Varga, G. J., Besenyei, E., Sárdi, É., Bányai, É. and Klement, Z. (2005 a) Early detection of bacterium induced basal resistance in tobacco leaves with diamino-benzidine (DAB) and dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). *J. Phytopathol.*, 153: 596-607.
- Bozsó Z., Szatmári Á., Kondorosi É., Kondorosi Á. és Klement Z. (2005 b) Genomszintű transzkripciósváltozások baktérium fertőzést követően kialakuló általános növényi védekezési reakció során *Medicago truncatula* növényben. 51. Növényvédelmi Tudományos Napok (pp. 39), Budapest, Február 22-23.
- Bozsó, Z., Besenyei, E., Ott, P. G., Czalleng, A. and Klement, Z. (2002) Cloning and characterization of peroxidases associated with generalized defense reactions of plants against bacterial pathogens. *Acta Biologica Szegediensis*, 46: 139-141.
- Bozsó, Z., Ott, P. G., Kecskés, M. L. and 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. *Phys. Mol. Plant Pathol.*, 55: 215-223.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brogliè, K. Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J. and Brogliè, R. (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, 254: 1194-1197.
- Brunner, F., Stintzi, A., Fritig, B and Legrand, M. (1998) Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant J.*, 14: 225-234.
- Burgyán, J. and Klement, Z. (1979): Early induced selective inhibition of incompatible bacteria in tobacco plants. *Phytopathol. Med.*, 18: 153-161.
- Burketova, L., Sindelarova, M. and Sindelarov, L. (1999) Benzothiadiazol as an inducer of β -1,3-glucanase and chitinase isozymes in sugar beet. *Biol. Plant.*, 42: 423-430.
- Burketova, L., Stillerov, K. and Feltlova, M. (2003) Immunohistological localization of chitinase and beta-1,3-glucanase in rhizomania-diseased and benzothiadiazole treated sugar beet roots. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 63: 47-54.
- Chinchilla, D., Bauer, Zs., Regenass, M., Boller, T. and Felix, G. (2006) The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, 18: 465-476.

- Christ, U. and Mössinger, E. (1989) Pathogenesis-related proteins of tomato: I. Induction by *Phytophthora infestans* and other biotic and abiotic inducers and correlation with resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 35: 53-65.
- Christie, P. J. (2004) Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 1664: 219-234.
- Cohn, J., Sessa, G. and Martin, G. B. (2001) Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.*, 13: 55-62.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U. and Vad, K. (1993) Plant chitinases. *Plant J.*, 3: 31-40.
- Czelleng A. (2005) Növénykórokozó *Pseudomonas*ok virulencia/patogenitás génjeinek izolálása és jellemzése. Doktori értekezés. Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.
- Davis, J. M., Wu, H., Cooke, J. E. K., Reed, J. M., Luce, K. S. and Michler, C. H. (2002): Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15: 380–387.
- De Cleene, M. and De Ley, J. (1976) The host range of crown gall. *Bot. Rev.* 442: 389-466.
- De Tapia, M., Bergman, P., Awade, A. and Burkard, G. (1986) Analysis of acid extractable bean leaf proteins induced by mercuric chloride treatment and alfalfa mosaic virus infection. Partial purification and characterisation. *Plant Sci.*, 45: 167-177.
- Didierjean, L., Frenedo, P., Nasser, W., Marivet, J., Genot, G., Margis-Pinheiro, M., Passelegue, E., Amegninou, D., Martin, C. and Burkard, G. (1993) Plant genes induced by chemicals and pollutants. In: *Mechanisms of Plant Defense Responses* (Fritig, B., Legrand, M. eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 276-285.
- Ditt, R. F., Nester, E. and Comai, L. (2005) The plant cell defense and *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 247: 207-213.
- Donnelly, M. A. and Steiner, T. S. (2002) Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *J. Biol. Chem.*, 277: 40456-40461.
- Dow, M., Newman, M. A. and von Roepenack, E. (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 38: 241-261.
- Dumas, E., Gianinazzi, S. and Cornu, A. (1987) Genetic aspects of polyacrylic-acid-induced resistance to tobacco mosaic virus and tobacco necrosis virus in *Nicotiana* plants. *Plant Pathol.*, 36: 544-550.
- Ecker, J. R. and Davis, R. W. (1987) Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5202-5206.
- Ernst, D., Schraudner, M., Langebartels, C. and Sandermann, Jr., H. (1992) Ozone induced changes of mRNA levels of β -1,3-glucanase, chitinase and 'pathogenesis-related' proteins 1b in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.*, 20: 673-682.
- Escobar, M. A. and Dandekar, A. M. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci.* 8: 380-6.
- Espinosa, A. and Alfano, J. R. (2004) Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell. Microbiol.*, 6: 1027-1040.
- Eyal, Y., Sagee, O. and Fluhr, R. (1992) Dark-induced accumulation of a basic pathogenesis-related (PR-1) transcript and a light requirement for its induction by ethylene. *Plant Mol. Biol.*, 19:589-599.

- Felix, G. and Boller, T. (2003) Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.* 278: 6201-6208.
- Felix, G. and Meins, Jr. F. (1986) Developmental end hormonal regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. *Planta*, 167: 206-211.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. and Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.*, 18: 265-276.
- Flor, H. H. (1955): Host-parasite interactions in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685.
- Fraser, R. S. S. (1981) Evidence for the occurrence of the 'Pathogenesis-Related' proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering. *Physiol. Plant Pathol.*, 19: 69-76.
- Fritig, B., Heitz, T. and Legrand, M. (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.*, 10: 16-22.
- Galan, J. E. and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284: 1322-1328.
- Gelvin, S. B. (2000) Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 223-256.
- Gerber, I. B., Zeidler, D., Durner, J. and Dubery, I. A. (2004) Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Planta*, 218: 647-657.
- Gilmour, S. J., Lin, C., and Thomashow, M. F. (1996) Purification and properties of *Arabidopsis thaliana* COR (cold-regulated) gene polypeptides COR15am and COR6.6 expressed in *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* 111: 293-299.
- Girardin, S. E. and Philpott, D. J. (2004) Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *Eur. J. Immunol.*, 34: 1777-1782.
- Godiard, L., Ragueh, F., Froissard, G., Leguay, J. J., Grosset, J., Chertier, Y., Meyer, Y. and Marco, Y. (1990) Analysis of the synthesis of several pathogenesis-related proteins in tobacco leaves infiltrated with water and with compatible and incompatible isolates of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3: 207-213.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell.*, 5:1003-1011.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G. and Boller, T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 18: 277-284.
- Gopaplan, S. Bauer, D. W., Alfano, J. R. Loniello, A. O., He, S. Y. and Collmer, A. (1996) Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence proteins *AvrB* in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (*hrp*) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. *Plant Cell*, 1095-1105.
- Graumann, P. L., and Marahiel, M. A. (1998) A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem. Sci.* 23: 286-290.
- Green, T. R. and Ryan, C. A. (1972) Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175: 776-777.

- Grosset, J., Meyer, Y., Chartier, Y., Kauffmann, S., Legrand, M. and Fritig, B. (1990) Tobacco mesophyll protoplasts synthesize 1,3- β -glucanase, chitinase, and 'osmotins' during *in vitro* culture. *Plant Physiol.*, 92: 520-527.
- Hamel, F. and Bellemare, G. (1995) Characterisation of a class I chitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1263: 212-220.
- Hammerschmidt, R. (1999) Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 285-306.
- Hansen, G. (2000) Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13: 649-657.
- 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.
- He, S. Y., Nomura, K. and Whittam, T. S. (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta*, 1664: 181-206.
- Herget, T., Schell, J. and Schreier, P. H. (1990) Elicitor-specific induction of one member of the chitinase gene family in *Arachis hypogaea*. *Mol. Gen. Genet.*, 224: 469–76.
- Heukeshoven, J. and Dernik, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6: 103-112.
- Hevesi, M., Mehari, F. F. and 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 Phytopathol.*, 16: 355-364.
- Hodson, A., Smith, R. W. and Hignet, R. C. (1996) Outer membrane and rough lipopolysaccharide preparations of mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *mosprunorum* C28 prevent hypersensitive necrosis and cause silvering *in planta*. *Phys. Mol. Plant Pathol.*, 48: 11-20.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykas, P. J. J. and Schilperoort, R. A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- region and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* TI-plasmid. *Nature*, 303: 179-180.
- Hon, C. W., Griffith, M., Mlynarz, A., Kwok, Y. C. and Yang, D. S. C. (1995) Antifreeze proteins in Winter Rye are similar to Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiol.*, 109: 879–889.
- Hong, J. K. and 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: 433-448.
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. and Chilton, M. D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A2281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168: 1291-1301.
- Hornok, L. and Király, Z. (1984) Changes in the antigen composition of the upper leaves of cucumber plants after inducing systemic acquired-resistance by inoculation with *Colletotrichum lagenarium*. *Phys. Plant Pathol.*, 25: 171-179.
- Hou, W. C., Chen, Y. C. and Lin, Y. H. (1998) Chitinase activity of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam var. Tainong 57). *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 39: 93–97.
- Huang, H. C., Schuurink, R., Denny, T. P., Atkinson, M. M., Baker, C. J., Yucel, I., Hutchenson, S. W. and 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. *J. Bact.* 170: 4748-4756.

- Hubber, A., Vergunst, A. C., Sullivan, J. T., Hooykaas, P. J. and Ronson, C. W. (2004) Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol. Microbiol.*, 54: 561-574.
- Hughes, R. K. and Dickerson, A. G. (1991) Modulation of elicitor-induced chitinase and β -1,3-glucanase activity by hormones in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol.*, 32: 853-861.
- Imler, J. L. and Hoffmann, J. A. (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell. Biol.*, 11: 304-311.
- Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J. M. and Henrissat, B. (1996) Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Lett.*, 382: 186-188.
- Jakobek, J. L. and Lindgren, P. B. (1993) Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive reaction. *Plant Cell*, 5: 49-56.
- Jakobek, J. L., Smith, J. A. and Lindgren, P. B. (1993) Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, 5: 57-63.
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H. S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S. and Tang, X. (2004) Identification of *Pseudomonas syringae* type III secreted effectors that suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J.*, 37: 554-565.
- Jollés, P. and Lollés, J. (1984) What's new on lysozyme research? *Mol. Cell. Biochem.*, 63: 165-189.
- Jones, J. D. G., Dean, C., Gidoni, D., Gilbert, D., Bonde-Nutter, D., Lee, R., Bedbrook, J. and Dunsmuir, P. (1988) Expression of bacterial chitinase protein in tobacco leaves using two photosynthetic gene promoters. *Mol. Gen. Genet.*, 212: 536-542.
- Jung, J. L., Fritig, B. and Hahne, G. (1993) Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Pathogenesis-Related proteins. *Plant Physiol.*, 101: 873-880.
- Kálmán D. és Gáborjányi R. (1998) A szalicilsav és a BTH hatása a dohánynövények dohány mozaik vírussal szembeni fertőzés-fogékonyságára és betegség-ellenállóságára. *Növényvédelem*, 34: 593-599.
- Kanost, M. R., Dai, W. and Dunn, P. E. (2005) Peptidoglycan fragments elicit antibacterial protein synthesis in larvae of *Manduca sexta*. *Arc. Insect Biochem. Physiol.*, 8: 147-164.
- Kasprzewska, A. (2003) Plant chitinases-regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 8: 809-824.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B. (1987) Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J.*, 11: 3209-3212.
- Kecskés M. L. (2000) Három *Xanthomonas* baktériumtörzs lipopoliszacharid összetétele és szerepe a növényi indukált rezisztenciában. Doktori értekezés, Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar.
- Kecskés, M. L., Ahohuendo, B., Müller, P., Schröder, I., Rudolph, K., Bozsó, Z., Ott, P. G. and Klement, Z. (1999) Some details about the involvement of lipopolysaccharides in resistance induction against phytopathogenic bacteria. (19. Arbeitskreis für Phytobacteriologie, Jena, Germany) *Phytomedizin, Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft*, 29: 43-44.
- Keefe, D., Hinz, U. and Meins, F. (1990) The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of the β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Planta*, 182: 43-51.
- Keshavarzi, M., Soyly, S., Brown, I., Bonas, U., Nicole, M., Rossiter, J. and Mansfield, J. (2004) Basal defenses induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 17: 805-815.
- Khush, R. S. and Lemaitre, B. (2000) Genes that fight infection – what the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends Genet.*, 16:442-449.

- King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Bacteriol.* 170: 4748-4756.
- King, G. J., Hussey, C. E. and Turner, V. A. (1986) A protein induced by NaCl in suspension cultures of *Nicotiana tabacum* accumulates in whole plant roots. *Plant Mol. Biol.*, 7: 441-449.
- Klement, Z. (1965) Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluids merit as substrate for phyto-bacterial pathogens. *Phytopathology* 55: 1033-1034.
- Klement, Z. (1990) Inoculation of plant tissues. In: Klement, Z., Rudolph, L., Sands, D. C. *Methods in phyto-bacteriology*. Budapest, Akadémiai Kiadó 96-121.
- Klement, Z., Bozsó, Z., Kecskés, M. L., Besenyey, E., Czalleng, A., and Ott, P. G. (2003) Local early induced resistance of plants as the first line of defence against bacteria. *Pest. Manag. Sci.*, 59: 465-474
- Klement, Z., Bozsó, Z., Ott, P. G. and Rudolph, K. (1997) The mechanism of symptomless reaction of plants induced by pathogenic pseudomonads. In: Rudolph, K., Burr, T. J., Mansfield, J. W., Stead, D., Vivian, A. and von Kietzell, J. eds. *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 127-133.
- Klement, Z., Bozsó, Z., Ott, P. G., Kecskés, M. L. and Rudolph, K. (1999) Symptomless resistant response instead of the hypersensitive reaction in tobacco after infiltration of heterologous pathovars of *Pseudomonas Syringae*. *J. Phytopathol.* 12: 479-489.
- Klement, Z., Farkas, G., and Lovrekovich, L. (1964) Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54: 474-477.
- Kuntze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T. and Felix, G. (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, 16: 3496-3507.
- Lacroix, B., Vaidya, M., Tzfira, T. and Citovsky, V. (2005) The VirE3 protein of *Agrobacterium* mimics a host cell function required for plant genetic transformation. *EMBO J.*, 24: 428-437.
- Lam, E., Kato, N. and Lawton, M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411: 848-853.
- Lamb, C. and Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in the plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 251-275.
- Lee, H., Humann, J. L., Pitrak, J. S., Cuperus, J. T., Parks, D. T., Whistler, C. A., Mok, M. C. and Ream, W. L. (2003) Translation start sequences affect the efficiency of silencing of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA oncogenes. *Plant Physiol.*, 133: 966-977.
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. and Fritig, B. (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 6750-6754.
- Lehoczky, J. (1968) Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine, after natural infection. *Phytopath. Zeitschr.*, 63: 239-246.
- Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J. H., Caroff, M., Lee, W. J., Mengin-Lecreulx, D. and Lemaitre, B. (2003) The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific paptidoglycan recognition. *Nat. Immunol.*, 4: 478-484.

- Leung, D. W. M. (1992) Involvement of plant chitinase in sexual reproduction of higher plants. *Phytochemistry*, 31: 1899-1900.
- Li, X., Lin, H., Zhang, W., Zou, Y., Zhang, J., Tang, X. and Zhou, J. M. (2005) Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 12990-12995.
- Lichtenstein, C. and Draper, J. (1986) Genetic engineering of plants. In: *DNA Cloning: A Practical Approach*. Vol II., pp.: 67-119, ed.: D.M. Glover, IRL Press. Oxford.
- Lindgren, P. B. (1997) The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 35: 129-152.
- Linthorst, H. J. M. (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 10: 123-150.
- Linthorst, H. J. M., Van Loon, L. C., Van Rossum, C. M. A., Mayer, A., Bol, J. F., Van Roekel, J. S.C., Meulenhoff, E. J. S. and Cornelissen, B. J. C. (1990) Analysis of acidic and basic chitinases from tobacco and petunia and their constitutive expression in transgenic tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3: 252-258.
- Loebenstein, G. and Lovrekovich, L. (1966) Interference with tobacco mosaic virus local lesion formation in tobacco by injecting het-killed cells of *Pseudomonas syringae*. *Virology* 30: 587-591.
- Lovrekovich, L. and Farkas, G. L. (1965) Induced protection against wildfire disease in tobacco leaves treated with heat-killed bacteria. *Nature*, 205: 823-824.
- Lummerzheim, M., Oliveira, D., Miguens, F. C., Louzada, E., Roby, D., Montagu, Van M. and Timmerman, B. (1993) Identification of compatible and incompatible interactions between *Arabidopsis thaliana* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and characterization of the hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6: 532-544.
- Majeau, N., Trudel, J. and Asselin, A. (1990) Diversity of cucumber chitinase isoforms and characterization of one seed basic chitinase with lysozyme activity. *Plant Sci.*, 68: 9-16.
- Malamy, J., Hennig, J. and Klessig, D. F. (1992) Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *Plant Cell.*, 4: 359-366.
- Mansfield, J., Jenner, C., Hockenhull, R., Bennett, M. A. and Stewart, R. (1994) Characterization of *avrPphE*, a gene for cultivar-specific avirulence from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* which is physically linked to *hrpY*, a new *hrp* gene identified in the halo-blight bacterium. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 7:726-739.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Cherukuri, P. F., DeWeese-Scott, C., Geer, L. Y., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Shoemaker, B. A., Simonyan, V., Song, J. S., Thiessen, P. A., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D. and Bryant, S. H. (2005). CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res.*, 33: D192-196.
- Matthysse, A. G. (1987) Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, 169: 313-323.
- Mauch, F. and Staehelin, L. A. (1989) Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and [beta]-1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell*, 1: 447-457.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. (1988) Antifungal hydrolases in pes tissue. II. inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.*, 88: 936-942.

- Mauch, F., Meehl, J. B. and Staehelin, L. A. (1992) Ethylene induced chitinase and β -1,3-glucanase accumulate specifically in the lower epidermis and along vascular strands of bean leaves. *Planta*, 186: 367-375.
- Mazzucchi, U. and Pupillo, P. (1976) Prevention of confluent hypersensitive necroses in tobacco leaves by a bacterial protein-lipopolysaccharide complex. *Physiol. Plant Pathol.*, 9: 101-112.
- Medzhitov, R. and Janeway, C. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91: 295-298.
- Meier, B. M., Shaw, N. and Slusarenko, A. J. (1993) Spatial and temporal accumulation of defence gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria induced hypersensitive cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6: 453-466.
- Memelink, J., Linthorst, H. J. M., Schilperoort, R. A. and Hoge, J. H. C. (1990) Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns. *Plant Mol. Biol.*, 14: 119-126.
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gauden, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. and Inverardi, B. (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, 250: 1004-1006.
- Meyer, A., Pühler, A. and Niehaus, K. (2001) The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 213: 214-222.
- Meyerowitz, E. M. (2002) Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science*, 295: 1482-1485.
- Minardi, P. (1995) Altered expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in tobacco leaves pretreated with bacterial protein lipopolysaccharides. *J. Phytopathol.*, 143: 199-205.
- Miyake, K. (2004) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol.*, 12: 186-192.
- Montesano, M., Braader, G. and Palve, E. T. (2005) Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.*, 4: 73-79.
- Murashige, T. and Scoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- Mysore, K. S. and Ryu, C. M. (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.*, 9: 97-104.
- Narasimhulu, S. B., Deng, X. B., Sarria, R. and Gelvin, S. B. (1996) Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA genes in tobacco and maize. *Plant Cell*, 8: 873-886.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T and Jones, J. D. G. (2004) The transcriptional innate immun response to *flg22*. Interplay and overlap with *avr* gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.*, 135: 1113-1128.
- Nelson, D. E., Raghothama, K. G., Singh, N. K., Hasegawa, P. M. and Bressan, R. A. (1992) Analysis of structure and transcriptional activation of an osmotin gene. *Plant Mol. Biol.*, 19: 577-588.
- Neuhaus, J. M., Ahl-Goy, P. Hinz, U., Flores, S. and Meins, F. (1991) High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Mol. Biol.*, 16: 141-151.
- Newman, M. A., Daniels, M. J. and Dow, J. W. (1995) Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defense-related gene expression in *Brassica campestris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8: 778-780.

- Newman, M. A., Daniels, M. J. and Dow, J. W. (1997) The activity of lipidA and core components of bacterial lipopolysaccharides in the prevention of the hypersensitive response in pepper. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 10: 926-928.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. and Mössinger, E. (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterisation of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 108: 17-27.
- Nurnberger, T. and Brunner, F. (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 1-7.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L., (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.*, 198: 249-266.
- Oh, H. S. and Collmer, A. (2005) Basal resistance against bacteria in *Nicotiana benthamiana* leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple *Pseudomonas syringae* type III secretion system effector proteins. *Plant J.*, 44: 348-359.
- Ornstein, L. and Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. New York Acad. Sci.* 121: 32-49.
- Ott P. G. (2002) A korai indukált rezisztencia (EIR) és a hiperszenzitív reakció (HR) növényben lezajló folyamatainak és kölcsönhatásainak jellemzése. Doktori értekezés, Szent István Egyetem Kertészettudományi Kar.
- Ott, P. G., Szabó, L., Klement, Z. and Balázs, E. (1998) Submicroscopical evidence of bacterially induced resistance in tobacco leaves. *Acta. Phytopathol. Acad. Sci. Hung.*, 32. 265-280.
- Ott, P. G., Varga, G. J., Szatmári, Á., Bozsó, Z., Klement, É., Medzihradzsky, K. F., Besenyi, E., Czalleng, A. and 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. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 19: 161-172.
- Robatzek, S. and Somssich, I. E. (2002) Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes. Dev.*, 16: 1139-1149.
- Roberts, W. K. and Selitrennikoff, C. P. (1988) Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 169-176.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. and Ferrara P. (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 203: 173-179.
- Rosenthal, R. S. and Dziarski, R. (1994) Isolation of peptidoglycan and soluble peptidoglycan fragments. *Methods Enzymol.*, 235: 253-285.
- Ryals, J., Uknes, S. and Ward, E. (1994) Systemic acquired resistance. *Plant Physiol.*, 104: 1109-1112.
- Ryan, K. J. and Ray, C. G. (editors) (2004) *Sherris medical Microbiology*, 4th ed., McGraw Hill.
- Sahi, S. V., Chilton, M. D. and Chilton, W. S. (1990) Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87: 3879-3883.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C. and Manners, J. M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 11655-11660.

- Schröder, K., Graumann, P., Schnuchel, A., Holak, T. A., and Marahiel, M. A. (1995) Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Mol. Microbiol.*, 16: 699-708.
- Scopes, R. K. (1982) Protein purification. Principles and practice. (Springer advanced texts in chemistry; Cantor C. R.) Springer-Verlag, New York.
- Selsted, M. E. and Martinez, R. J. (1980) A simple and ultrasensitive enzymatic assay for the quantitative determination of lysozyme in the picogram range. *Anal. Biochem.*, 109: 67-70.
- Sequeira, L. (1983): Mechanism of induced resistance in plants, fungi, viruses, bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37: 51-79.
- Sequeira, L. and Hill, L. M. (1974) Induced resistance in tobacco leaves: the growth of *Pseudomonas solanacearum* in protected tissues. *Physiol. Plant. Pathol.*, 4: 447-445.
- Sequeira, L., Aist, S. and Ainslie, V. (1972) Prevention of the hypersensitive reaction in tobacco by proteinaceous constituent of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 62: 536-542.
- Shimizu, R., Taguchi, F., Marutani, M., Mukaihara, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2003) The DeltafliD mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, which secretes flagellin monomers, induces a strong hypersensitive reaction (HR) in non-host tomato cells. *Mol. Gen. Genom.*, 269: 21-30.
- Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, M. J., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman, M. A. and Parrilli, M. (2005) The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *J. Biol. Chem.* 280: 33660-33668.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. and Fritig, B. (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75: 687-706.
- Suo, Y. and Leung, D. W. M. (2001) Induction of resistance to *Diplacarpion rosae* and *Agrobacterium tumefaciens* by acibenzolar-S-methyl (BTH) in rose. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, 108: 382-391.
- Szatmári Á. és Klement Z. (2003) Hasonlóságok és különbségek a növény- és állatvilág immunmechanizmusában. *Növénytermelés*, 52: 703-712.
- Szatmári, Á., Ott, P. G., Varga, G. J., Besenyi, E., Czalleng, A., Klement, Z. and Bozsó, Z. (2006) Characterisation of basal resistance (BR) by expression patterns of newly isolated representative genes in tobacco. *Plant Cell Rep.*, 25: 728-740.
- Szegedi E. (2005) A szőlő *Agrobacterium*-os betegsége: patogén-specifikus plazmidok jellemzése és genetikai módszerek alkalmazása a golyvásodás megelőzésére Doktori értekezés, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest.
- Szegedi, E., Obeschall, A., Bottka, S., Oláh, R. and Tinland, B. (2001) Transformation of tobacco plants with *virE1* gene derived from *Agrobacterium tumefaciens* pTiA6 and its effect on crown gall tumor formation. *IJHS*, 7: 54-57.
- Taguchi, F., Shimizu, R., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2003) Post-translational modification of flagellin determines the specificity of HR induction. *Plant Cell Physiol.*, 44: 342-349.
- Terras, F. R. G., Schoofs, H., De Bolle, M. F. C., Van Leuven, F., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. and Broekaert, W. F. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 15301-15309.

- Thanassi, D. G., and Hultgren, S. J. (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12:420-430.
- Thieringer, H. A., Jones, P. G., and Inouye, M. (1998) Cold shock and adaptation. *Bioassays*, 20: 49–57.
- Thomson, S. V., Brisset, M. N., Chartier, R and Paulin, J. P. (1999) Induced resistance in apple and pear seedlings to fire blight by Bion® and correlation with some defense-related enzymes. *Acta Hort.*, 489.
- Thordal-Christensen, H. (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 351–357.
- Traw, M. B., Kim, J., Enright, S., Cipollini, D. F. and Bergelson, J. (2003) Negative cross-talk between salicylate- and jasmonate-mediated pathways in the Wassilewskija ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Ecol.*, 12: 1125-1135.
- Tronsmo, A. and Harman, G. (1993) Detection and quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Anal. Biochem.*, 208: 74-79.
- Trudel, J. and Asselin, A. (1989) Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178: 362-366.
- Trudel, J., Audy, P. and Asselin, A. (1989) Electrophoretic forms of chitinase activity in Xanthi-nc tobacco, healthy and infected with tobacco mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2: 315-324.
- Tzfira, T. and Citovsky, V. (2005) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr. Opin. Plant Biotech.*, 17: 1-8.
- Underhill, D. M. and Ozinsky, A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.*, 14:103-110.
- Usami, S., Morikawa, S., Takebe, I. and Machida, Y. (1987) Absence in monocotyledonous plants of the diffusible plant factors inducing T-DNA circularization and *vir* gene expression in *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.*, 209: 221-226.
- Van Loon, L. C. (1983) The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. *Neth. J. Plant Pathol.*, 89: 265-273.
- Van Loon, L. C. (1985) Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.*, 4: 111-116.
- Van Loon, L. C. and Kammen, A. (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var 'Samsun' and 'samsun NN'. Changes in protein constitution after infection with TMV. *Virology*, 40: 199-211.
- Varga G. J., Ott P. G. és Klement Z. (2005 a) A baktériumok árulkodó jelei: Mi alapján ismerik fel a növények a baktériumokat? 51. Növényvédelmi Tudományos Napok (pp. 38) Budapest, Február 22-23.
- Varga G. J., Ott P. G., Klement É., Medzihradzsky K. F. és Klement Z. (2005 b) A korai általános rezisztenciával kapcsolatos új kitinázok dohányban. *Növényvédelem*, 7: 287-296.
- Varga, G. J., Szegedi, E., Ott, P. G. and Szabó, E. (2006) Early basal resistance inhibits tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*. *Cer. Res. Commun.*, 34: 97-100.
- Veena, H. J., Doerge, R. W. and Gelvin, S. B. (2003) Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *Plant J.* 35: 219-236.
- Venisse, J. S., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J. P and Brisset, M. N. (2002) Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15(12):1204-1212.

- Voisey, C. R. and Slusarenko, A. J. (1989) Chitinase mRNA and enzyme activity in *Phaseolus vulgaris* (L) increase more rapidly in response to avirulent than to virulent cells of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 35:403-412.
- Wacek, T. J. and Sequeira, L. (1973) The peptidoglycan of *Pseudomonas solanacearum*: Chemical composition and biological activity in relation to the hypersensitive reaction in tobacco. *Physiol. Plant Pathol.*, 3: 363-369.
- Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Collmer, A. and Beer, S. V. (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257: 85-88.
- White, R. F. (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 99: 410-412.
- White, R. F. and Antoniwi, J. F. (1991) Virus-induced resistance responses in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 9: 443-455.
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F. Jr, Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., Bovee, D. Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M. J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z. Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S. V., Tomb, J. F., Gordon, M. P., Olson, M. V., Nester, E. W. (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294: 2317-2323.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. and Graham, M. W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl. Acids. Res.*, 17: 3469-3478.
- Xiao, Y., Hue, S., Yi, J., Lu, Y. and Hutchenson, S. W. (1994) Identification of putative alternate sigma factor and characterization of multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrp* and *hrmA* genes. *J. Bacteriol.*, 176: 1025-1036.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T. M. A., Kleier, D. A. and Raskin, I. (1991) Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell*, 3: 809-818.
- Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P. and Durner, J. (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 101:15811-15816.
- Zipfel, C. and Felix, G. (2005) Plants and animals: different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8: 353-360.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T. and Felix, G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125: 749-760.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G. and Boller, T. (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception- *Nature*, 428: 764-767.

7.2. A kísérletek során használt poliakrilamidgél összetétele

Az elektroforézis során használt pufferek összetétele

	Elválasztógél puffer 8x, pH 8.8	Gyűjtőgél puffer 12x, pH 6.8 (sósavval beállított)	Futtató puffer 10x, pH 8.3
Tris HCl, g	3.54	-	-
Tris Base, g	3.34	9	15
Glicin, g	-	-	72
Vízzel kiegészített végső térfogat (ml)	33.3	50	500

A 10-20% akrilamid grádiensű elválasztó gél és a gyűjtő gél összetétele

	Elválasztó gél		Gyűjtő gél
	10%	20%	4%
Poliakrilamid koncentráció	10%	20%	4%
Akrilamid-biszakrilamid (30:0.8) (ml)	0.8	1.6	0.26
Puffer (ml)	0.3	0.3	0.16
Glicerol (ml)	-	0.5	-
Víz (ml)	1.3	-	1.5
Végső térfogat (ml)	2.4	2.4	1.9
Polimerizáció katalizátora	10%-APS (μl)	15	6
	DMAPN (μl)	7.5	2.5
	TEMED (μl)	-	-
			4

7.3. Az akrilamidgéllek festése ezüst-nitráttal

Fixálás (időtartam: 2 óra): 31.25 ml etanol (95%), 10 ml jégecetsav, desztillált vízzel 100 ml végső térfogatra beállítva;

Inkubálás (2 óra): 31.25 ml etanol (95%), 4 g nátrium-acetát, 2 ml glutár-aldehid, 0.31 g nátrium-tioszulfát, desztillált vízzel 100 ml végső térfogatra beállítva;

Mosás (2 x 10 perc): 2 x 100 ml desztillált víz;

Festés (45 perc): 0.1 g ezüst-nitrát, 28.5 µl formaldehid (35%), desztillált vízzel 100 ml végső térfogatra beállítva;

Előhívás (3-10 perc): 2.5 g nátrium-karbonát, 28.5 µl formaldehid (35%), desztillált vízzel 100 ml végső térfogatra beállítva;

Leállítás (15 perc): 1.86 g EDTA desztillált vízzel 100 ml végső térfogatra beállítva;

Mosás (3 x 10 perc): 3 x 100 ml desztillált víz.

7.4. Peptidoglükán elicitor-kombinációk

- 1) $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ PG + 50 U lizozim
- 2) $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ PG + 100 U lizozim
- 3) $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ PG + 50 U lizozim
- 4) $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ PG + 100 U lizozim

A négy kombináció mindegyikét azonnal, valamint 30 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően injektáltuk a dohányba.

7.5. Az agrobaktériumos-fertőzés kísérletekben használt MS-táptalaj

Moorashige and Scoog (1962)

Makroelem (mg/l):

NH₄NO₃ 1650
KNO₃ 1900
CaCl₂ x 2H₂O 440
Mg SO₄ x 7H₂O 370
KH₂PO₄ 170

Fe- EDTA (mg/l):

Na₂ EDTA 37.3
FeSO₄ x 7H₂O 27.8

Mikroelem (mg/l):

KI 0.83
H₃BO₃ 6.2
MnSO₄ x 4H₂O 22.3
ZnSO₄ x 4H₂O 8.6
Na₂MoO₄ x 2H₂O 0.25
CuSO₄ x 5H₂O 0.025
CoCl₂ x 6H₂O 0.025

Vitaminok (mg/l):

Nikotinsav 0.4
Piridoxin 0.4
Thiamin 0.4
Folsav 0.002
Biotin 0.002
Ca-pantotenát 0.4
PABA 0.2
Laktoflavin 0.2

Glicin/inozit (mg/l):

Mezo-inozit 400
Glicin 8 mg

Agar: 6 g/l

A kokultiváció 1%, a regeneráció 3 % szacharóz és 200 mg/l cefotaxim tartalmú táptalajon történt.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Puskás Erzsébetnek, az agrobaktériumos kísérletekben nyújtott technikai segítségért, a SzBK Tömegspektrometriai Laboratóriumának a tömegspektrometriás vizsgálatokért, Georg Felixnek (Zürich-Basel Plant Science Center, Botanisches Institut der Universität Basel, Svájc) a kísérletekben használt elicitorokért.

Ezen kívül legnagyobb köszönet jár témavezetőimnek, Klement Zoltánnak és Ott Péternek, akik elméleti útmutatásaikkal, gyakorlati tanácsaikkal, emberi értékeikkel segítettek hozzá eredményeim eléréséhez, és az NKI Bakteriológia Csoportnak, kollégáimnak és egyben barátaimnak, amiért sokszor szívesen segítettek a kísérletek sikeres kivitelezésében.

Köszönöm a Növényvédelmi Kutatóintézet és a Kecskeméti Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet vezetőségének a lehetőséget és az anyagi támogatást, Szegedi Ernőnek a lelkes irányítást, valamint mindkét intézet munkatársainak, akik mindnyájan hozzájárultak ahhoz, hogy munkámat kellemes légkörben végezhettem.

Végül, de nem utolsó sorban, vőlegényemnek és családomnak szeretném megköszönni, hogy munkámat türelmükkel és biztatásukkal lendítették előre.