



SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

Doktori értekezés tézisei

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

**témavezetők:** Dr. Klement Zoltán†  
Kutató Professzor (MTA rendes tagja)  
MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

Dr. Ott Péter  
Tudományos főmunkatárs  
MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az indukált védekezések közül azt, amelyik – a preformált védekezéssel vállvetve – a növény sejtközötti járataiban megállítja a nem növény- és nem-patogén mikroorganizmusok általi fertőzést, és közreműködik az inkompatibilis illetve kompatibilis baktériumok megfékezésében (Ott et al., 2006) általános (*basal*) rezisztenciának (BR) nevezzük. Indukciójában nem kórokozó-specifikus elicitoroknak (pl. avirulencia fehérjék), hanem a baktériumokban általánosan jelen lévő, nélkülözhetetlen sejtalkotó elemeknek, molekuláknak felismerésén alapszik (Gomez-Gomez and Boller, 2002). Ilyen általános molekuláris mintázatok (PAMP) a baktérium sejt felszínén található flagellin (flg), a lipopoliszacharid (LPS) és a peptidoglükán (PG), vagy a baktérium sejt belsejében a hidegsokk fehérjék (CSP) vagy az ún. transzlációs elongációs faktor (EF-Tu) (Zipfel and Felix, 2005). A korai általános rezisztencia (*early basal resistance*, EBR) a növények indukált, lokális védekezési mechanizmusa, mely gyors kialakulásának köszönhetően (3-6 óra) a védekezés első vonalaként gátolja meg a baktériumok elszaporodását (Klement et al., 2003). Az EBR tünetmentes, még sejt-szinten sem jár a hiperszenzitív reakcióra (HR) jellemző sejtelhalással vagy más szubmikroszkópos tünettől (Ott et al., 1998). EBR-t minden baktérium indukál, ami általános elicitorokkal rendelkezik, ezek pl. legkülönbözőbb mutáns baktériumok is pl. melyek nem-működő *hrp* (*HR and pathogenicity*) rendszerrel rendelkeznek. 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 képesek mind a BR, mind a HR hatástalanítására, vagy az aktív védekezési komponensek tolerálására (Espinosa and Alfano, 2004; Ott et al., 2006). 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 programozott sejtelhalást, és így a HR elhalás elmarad. Az EBR-t ezáltal, az inkompatibilis fertőzésre gyakorolt gátló tulajdonságát felhasználva lehet kimutatni. E hatáson kívül az EBR működését számos fiziológiai és molekuláris változás jelzi. Az aktiválódott gének nyomonkövetésével mutatta be Szatmári és mtsai. (2006) az EBR összetettségét. Ezek között kell megemlíteni a sejtfallerősítésben, az aktív oxigén formák semlegesítésében és a kórokozókra ható antimikrobiális anyagok (pl. patogenezishez kapcsolt fehérjék) előállításában részt vevő géneket. Az intenzív kutatás ellenére még tisztázatlan, hogy a BR által védett növényi szövetben mik is azok a tényezők, melyek közvetlenül a baktérium sejtre hatnak. Ott (2002) doktori téziseiben rávilágított az EBR alatt a dohány sejt közötti folyadékában bekövetkező fehérje-változásokra. 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 lehetséges 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.

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

Üvegházban nevelt 4-8 leveles fejlettségű dohány (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun nn) növényeket használtunk a kísérletekhez. A NahG növényeket NOVARTIS, Agricultural Biotechnology Research Institute-től kaptuk. A kísérletekben használt baktériumokat King's medium B (King et al., 1954) folyékony táptalajon szaporítottuk. Élő baktériumokkal való kezelésen kívül hővel elölt baktériumokat is használtunk (*P. tabaci*, *P. s.*

pv. *phaseolicola* esetében). Az élő vagy elölt baktérium szuszpenziót ( $5 \times 10^8$  sejt/ml) az erek közötti levéllemez területekbe fecskendeztük (Klement, 1990). A sejtközötti folyadék kinyerése Klement (1965) módszerén alapult, Ott és mtsai. (2006) módosításai alapján. A sejtközötti folyadékban lévő fehérjék elválasztására magas pH-jú, nem-disszociáló (natív), megszakított Ornstein-Davis puffer rendszert (Ornstein and Davis, 1964) használtunk. A géleket ezüsthévízzel festettük meg (Heukeshofen and Dernik, 1985). A kiválasztott fehérjék meghatározása a Szegedi Biológiai Kutatóintézet Tömegspektrometriai Laboratóriumában történt. Az elválasztott fehérjék kitináz enzimaktivitását gélben vizsgáltuk (Trudel and Asselin, 1989). A fluoreszcens festékkel (Fluorescent Brightener 28, Sigma) festett 0.04 % glikol-kitin tartalmú fedőgéleket UV fényvel megvilágítva, azon fehérjék, amelyek kitináz aktivitással rendelkeztek, nem fluoreszkáló foltokként voltak láthatók. A sejtközötti folyadék izoelektromos pont szerinti elválasztását követően a kiválasztott frakciók lizozim aktivitását Selsted és Martinez (1980) módszere alapján mértük. EBR-t indukáló kezelésként hővel elölt, babpatogén *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*-t injektáltunk a dohánylevélbe. Az EBR-induktor bejuttatása után élő *P. s.* pv. *phaseolicola*-val 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). A kísérletek során használt elicitorok: a *P. avenae* flg22 szekvenciája alapján szintetizált 22 aminosav hosszúságú peptid, a *Micrococcus lisodeicticus*-ból tisztított fehérje konzervált régiója alapján szintetizált csp22 peptid és az *Escherichia coli* szekvenciája alapján

szintetizált elf26 peptid Georg Felix-től (Zürich-Basel Plant Science Center, Botanisches Institut der Universität Basel, Svájc) származnak. A peptidoglükán kereskedelmi forgalomban kapható (Fluka). Az LPS-t a Göttingeni Egyetem Növénypatológiai Intézetétől kaptuk. Az EBR alatti *cho3D9* gén aktivitását valós idejű (Real Time) PCR módszerrel vizsgáltuk. Az indítószekvencia bázissorrendje: 5' CAA CCA TTC GAG CCA 3', 5' TAA GCC TCA CAA CCG TG 3'.

## EREDMÉNYEK

### ***A dohány sejtközötti folyadékában biotikus stressz alatt megjelenő fehérjék korrelációja az EBR-rel***

A dohányba injektált hővel előlt *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* szuszpenzió 3-6 órával az injektálást követően indukálja a tünetmentes EBR-t. A HR-preventív hatással párhuzamosan az EBR-t mutató levélből nyert sejtközötti folyadékban, a 30 kDa alatti régióban, legalább két új fehérje megjelenését figyeltük meg. Ezek a fehérjék (EBR215/250, Ott, 2002) minden olyan baktériumfertőzést követően kimutathatóak voltak, ami EBR-t indukál: élő, nem növény-kórokozó *Escherichia coli*, Gram-pozitív *Micrococcus lisodeicticus*, szaprotróf *P. fluorescens*, T-DNS nélküli (betegség okozásra képtelen) *Agrobacterium tumefaciens*, *hrp* mutáns *P. syringae* pv. *syringae hrpJ* vagy a dohányban a dohányvész betegséget okozó (kompatibilis) hővel előlt *P. tabaci*. Kompatibilis baktériumfertőzés ellen az EBR nem olyan hatékony, mint pl. a szaprotróf baktériumok esetében. Nem tudja meggátolni a betegség kialakulását, de csökkenti a baktérium szaporodásának intenzitását (Ott et al., 2006). A kompatibilis

baktérium elnyomja az EBR-t és ezzel összecsengve az EBR215/250 fehérjék sem mutathatók ki a sejtközötti folyadékból. *P. tabaci* fertőzést követően csak abban az esetben volt a fehérjék gyenge megjelenése jellemző, amikor irreálisan magas ( $10^9$  sejt/ml) baktérium koncentrációt juttattunk a növénybe.

A dohányokban, a levelekbe injektált 0.4 M-os mannitol oldat ozmotikus-, 0.2 M-os konyhasó-, 40  $\mu$ M paraquat és 0.3 M hidrogénperoxid pedig oxidatív stresszhatást idézett elő és sok PR-fehérje ismert kiváltó tényezője. NaCl és mannitol hatására az injektálást követően 6 órával kis mértékben kimutathatók voltak a fehérjék a sejtközötti folyadékban. Az oxidatív stressz során egyik vizsgálati időpontban sem (6, 12, 24 órával az injektálást követően) valamint az ozmotikus és só stressz későbbi mintavételi időpontjaiban (12 és 24 óra) sem fejeződtek ki az EBR215/250 fehérjék. Néhány, a növényi védekezés jelátvitelében közreműködő molekula, mint a szalicilsav, az etilén vagy a jazmonsav számos PR-fehérje felhalmozódását váltja ki (Van Loon, 1983). 100  $\mu$ M metil-jazmonát vagy 1 mM 1-amino-ciklopropán-karboxilsav, az etilén prekursorának dohánylevelekbe juttatását követően az új fehérjék nem voltak felfedezhetőek a sejtközötti folyadékban. A 0.6 mM szalicilsav kezelés esetén, a legérzékenyebb ezüstoffestés módszerrel, alig kimutatható kifejeződést kaptunk. A vizsgált vegyületek nem indukálták a 215 és 250 jelű fehérjéket, és ezzel összhangban a HR-gátlás teszttel sem tudtuk kimutatni a védekezést. A szalicilsavat felhalmozni nem képes NahG genetikailag módosított dohány növényekben hővel elölt baktérium kezelést követően az EBR215/250 fehérjék a nem transzformáns növényben is kimutatott szinten jelentek meg a sejtközötti folyadékban, és



a HR-prevenció jelezte az EBR működését. A benzo-thiadiazol (BTH, Bion<sup>®</sup>) immunstimulátor hatására kialakuló növényi válaszból kitináz fehérjéket is kimutattak (Burketova et al., 1999), de eddigi eredményeink szerint az EBR-hez kapcsolható fehérjék nem vesznek részt BTH hatásmechanizmusában.

### **Az EBR215/250 fehérjék meghatározása és molekuláris markerként való alkalmazásuk megállapítása**

A tömegspektrometriai vizsgálat eredményei szerint az EBR-hez kapcsolható fehérjék meghatározott aminosav-szekvenciái kitinázok konzervált régiójához hasonlítanak, a '215' és '250' jelű fehérjék egymáshoz igen hasonlóak és ezidáig még le nem írt dohány kitinázok. 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 lúteszt a fehérjék mennyiségének növekedését is jelzi. *P. tabaci* előkezelés után, melynél nem volt várható az új kitinázok megjelenése, a teszt is negatív eredményt mutatott. A kitináz teljes 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 glikozid-hidroláz domén a 19-es családba tartozó kitinázokra jellemző. Ez a jellemző egység a lizozim-szerű fehérjékben található meg. Izoelektromos fókuszálást követően az EBR215/250 fehérjék a pH 3.8-4.4 izoelektromos pontú tartományba kerültek. Ez a frakció bontotta a *M. lisodeicticus* sejteket, vagyis a kitináz

aktivitás mellett lizozim aktivitást is mértünk. A pH 3.8-4.4 tartomány lizozim aktivitása a tojásfehérje lizozim által okozott lítikus aktivitás mértékéhez hasonló volt. Az EBR215/250 kitinázok enzim-aktivitásának és génaktivációjának (*chto3D9*, génbanki szám: AJ880384, Ott et al., 2006) nyomkövetésével is következtettünk a vizsgált kezelés EBR indukciójára, ami szoros génátírási szabályozást sejtet. 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.

### ***Ismert általános elicitor molekulák EBR indukciója***

Egyre több bakteriális elicitor (Felix et al., 1999; Dow et al., 2000; Felix and Boller, 2003; Kuntze et al., 2004) ismert, melyek növényekben védekezésre utaló válaszokat váltanak ki. Ilyen válaszok sejtuszuspenzióban a tápközeg lúgosodása, reaktív oxigén formák felhalmozódása, intakt növényekben etilén felhalmozódás, a védekezéssel korreláló növekedés csökkenés, illetve PR-fehérjék génjének aktivációja (Felix et al., 1999; Gomez-Gomez et al., 1999). A baktériumok mozgásában szerepet játszó flagellum (ostor) építő egysége a flagellin fehérje konzervált régiójának 15 aminosav hosszúságú peptidje (flg15) sem az EBR fehérje-markereit, sem HR-gátlást nem indukált egyik vizsgált időpontban sem (6, 24, 48, 72 órával az injektálást követően). A *P. s. pv. coriandricolaból* tisztított LPS hatására 6 és 24 óra elteltével nem jelentek meg, de később, 48 és 72 órával az infiltrálást követően már kimutathatóak voltak a fehérjék a sejtközötti folyadékából. A Gram-pozitív *M.*

*lisodeicticus*ból tisztított PG gyengén indukálta az EBR215/250 fehérjéket, és részleges HR-gátlást is detektáltunk 12 órával az indukciót követően. A flagellin fehérje 22 aminosav hosszúságú peptidje (flg22) mind a kitináz gén és -fehérje indukcióját, mind a HR-gátlást ki váltotta dohányban. A génaktivitás maximumát három órával a növénybe injektálást követően mértük. A génaktivitás és a kitináz aktivitás is azt mutatta, hogy az  $5 \times 10^8$  sejt/ml baktériumnál erősebb reakciót váltott ki 1  $\mu$ M flg22.

A baktérium sejt belsejében lokalizált általános elicitor a hidegsokk fehérjék (CSP) konzervált régiójának 22 aminosav hosszú peptidje (csp22). Ez az elicitor a *Solanaceae* családba tartozó növényekben váltott ki védekezéshez kapcsolható reakciókat (Felix and Boller, 2003). A csp22 6 és 12 órát követően gyenge EBR215/250 kitináz aktivitást indukált, de 24 óras előkezelést követően a kitinázokat és a HR-gátlást is detektáltuk. A baktériumokban nagy mennyiségben található meg és a különböző baktérium törzsek között is nagy konzerváltságot mutató transzlációs faktor (EF-Tu) 26 aminosav hosszúságú peptidjére (elf26) a *Cruciferae* családban mutattak ki védekezést (Kuntze et al., 2004). Az indukált reakciók, alkalinizáció, oxidatív robbanás, etilén felhalmozódás, dohányban nem alakultak ki. Az elf26 peptid 6, 12 és 24 óras előkezelések esetén is kiváltotta az EBR215/250 fehérjéket, és 19 órával az indukciót követően HR-gátlást is kimutattunk.

### ***Flagellinnel indukált növényi védekezés felhasználása az agrobaktériumos golyvásodás ellen***

Az agrobaktériumos golyvásodás ellen nincs hatékony védekezési eljárás a megelőzésen kívül. Mivel az flg22 az általunk mért EBR faktorokat (kitináz

gén és -fehérje indukció, HR-gátlás) a hővel előlt baktérium szuszpenzióhoz hasonló vagy annál erősebb mértékben aktiválta, ezért megvizsgáltuk, hogy a kiváltott reakciók hatásosak lehetnek-e a kórokozóval szemben. Az flg22 peptidet *in vitro* dohány növényekbe injektáltuk. Az előkezelt leveleket 6 és 24 órával később *A. tumefaciens* baktérium szuszpenzióba mártottuk. A levéldarabokról 14 illetve 24 óra elteltével antibiotikummal elpusztítottuk a kórokozó sejtjeit. Ennyi idő alatt a baktériumnak van elég ideje a tumorképzéshez szükséges gének átjuttatására. Amennyiben a 6 órás flagellin előkezelést követően 14 óra után lemostuk a baktériumokat, a tumorképződés alacsonyabb mértékű volt, mint az előkezelés nélküli levéldarabokon. Ha 24 óráig tartó előkezelést azonos idejű fertőzés követett a tumorszám-csökkenés nem volt szignifikáns. Előfordult, hogy az előkezeletlen levelekhez képest is magasabb tumorszámot vagy baktérium-szaporodást jegyeztünk fel.

### **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 kórokozó baktérium, *P. tabaci*, indukálja, de ugyanakkor el is nyomja a fehérjéket.
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 kezelése után. Az EBR-rel kapcsolatos fehérjék nem részei a Bion<sup>®</sup> 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-hátlást) 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 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.

## 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?

A kompatibilis *P. tabacin* kívül minden vizsgált baktérium indukálta az EBR 215/250 fehérjéket, ezért feltehetően mérvadó hatásuk van a rezisztencia során, ha a kompatibilis baktérium az elnyomásukra törekszik. Az EBR-rel való korrelációjukat az is erősítette, hogy az indukciót – a baktérium felismerését – követően korán, kimutathatóak voltak. Sajátos indukciós tulajdonságaikra az ismert PR-fehérjéket kiváltó kezelések hívták fel a figyelmet. Előfordulásuk a sejtközötti folyadékban jellemzően biotikus, konkrétan baktériumos kezelés hatására volt megfigyelhető. 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, amit a NahG növényekbeni kifejeződésük is igazolt. A fehérjék EBR-rel való kapcsolatát támasztja alá, hogy szisztemikusan is

ható BTH által stimulált védekezés során az EBR215/250 fehérjét nem mutattuk ki.

Fontos kérdés, hogy az EBR215/250 fehérjéknek milyen szerepe képzelhető el az EBR gépezetében. A növény baktérium-fertőzésre adott válaszában feltehetően azoknak az enzimeknek van direkt hatásuk, amelyek lizozim aktivitással rendelkeznek. A lizozim aktivitású fehérjék a baktérium peptidoglükán rétegét bontják, károsítják. A pH 3.8-4.4 izoelektromos pont tartományban az EBR215/250-en kívül már ismert enzimaktivitású PR-fehérjék találhatóak. Ezek a fehérjék nem rendelkeznek *M. lisodeicticus* bontó, lizozim aktivitással. Tehát az említett pH tartomány lizozim aktivitása egyértelműen az EBR215/250 kitinázok enzimatis aktivitásának tulajdonítható. A lizozim aktivitás legalább két ponton is fontos lehet a védekezésben. Direkt hatásként a peptidoglükán bontásával a baktériumsejt roncsolásában, valamint a baktériumsejtek belsejében lokalizált elicitorok kiszabadításában.

Amikor hővel előlt baktérium szuszpenzióval indukáljuk az EBR-t, nem csak egy faktor felismerődésének hatását látjuk. Vajon 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. A steril, *in vitro* kultúrákban kivitelezendő kísérletekben, ahol indukált rezisztenciát alkalmaznánk egy gyakorlati jelentőségű kórokozóval szemben szintén fontos az önálló elicitor meghatározása. Az LPS által kiváltott késői reakcióból arra következtethetünk, hogy szerepe inkább a 24-48 órával az indukciót követően kialakuló késői általános rezisztencia indukációjában van. A

peptidoglükán sem indukált a pozitív kontrollokhoz hasonló mértékű EBR-t egyik kimutatási rendszerben sem (EBR215/250, HR-gátlás). E sejtfalalkotó hatására kialakult gyors kitináz génaktiváció és a fehérje megjelenésének, a pozitív kontroll esetében megfigyelt, 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. Az flg22 peptid mind a molekuláris, mind a fiziológiai EBR-markereket kiváltotta. Flagellin általi HR-prevenzióról először számolhattunk be. A csp22 peptid hatására az EBR215/250 fehérjék igaz gyengén, de már 6 órával az injektálást követően megjelentek a sejtközötti folyadékban. A kitinázok aktivitása folyamatosan erősödött, és 24 órával az injektálást követően olyan mértékben voltak kimutathatóak, amely már HR-gátlással párosult. Ebből arra következtethetünk, hogy a kitinázok mennyisége és a HR-gátlás között pozitív korreláció áll fenn. A 6 óra utáni gyenge kitináz aktivitás mellett elmaradó HR-gátlás lehetséges oka az, hogy az EBR egy széles spektrumú válasz, melynek a kitinázok csak egy részét képviselik. Mivel az elf26 peptid csak keresztes növényekben indukált védekezéshez köthető reakciót (Kuntze et al., 2004), a dohányban kimutatott EBR215/250 kitinázok és a HR-gátlás által először mutattuk ki az indukált növényi választ egy nem keresztes növény család fájában.

A vizsgált elicitorok közül a legaktívabbnak az flg22 bizonyult. Az általa indukált növényi válasz – a korai hatást figyelembe véve feltehetően az EBR – csökkentette a tumorok számát dohány levélkorongokon. A későbbi nem egyértelmű reakció hátterének kiderítése a közeljövő



feladatainak egyike. Nézetünket, miszerint „létjogosultsága” van az EBR felhasználásának gyakorlati növényvédelmi célokra alátámasztják, hogy csoportunkon kívül is bizonyították PAMP-közvetítette növényi védekezés gátló hatását *A. tumefaciens* fertőzésre (Zipfel et al., 2006).

Az EBR és a hatásmechanizmusában feltehetően aktív szerepet játszó EBR215/250 kitinázok további vizsgálatát (pl. géncsendesítés hatása az EBR-re) követően a génműködés javításával (gyorsításával, fokozásával), a kompatibilis baktériumok ellen is 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.

### IRODALOMJEGYZÉK

- 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.
- 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  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isozymes in sugar beet. Biol. Plant., 42: 423-430.

- 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.
- Espinosa, A. and Alfano, J. R. (2004) Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell. Microbiol.*, 6: 1027-1040.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.*, 7: 251-256.
- 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.
- 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., 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.
- Heukeshofen, J. and Dernik, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrilamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6: 103-112.
- King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Bacteriol.* 170: 4748-4756.
- Klement, Z. (1965) Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluids merit as substrate for phytobacterial pathogens. *Phytopathology* 55: 1033-1034.

- Klement, Z. (1990) Inoculation of plant tissues. In: Klement, Z., Rudolph, L., Sands, D. C. Methods in phytobacteriology. Budapest, Akadémiai Kiadó 96-121.
- Klement, Z., Bozsó, Z., Kecskés, M. L., Besenyei, 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., 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.
- 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.
- 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., Medzihradzky, K. F., Besenyei, 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.
- 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.
- 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.
- Trudel, J. and Asselin, A. (1989) Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178: 362-366.
- Van Loon, L. C. (1983) The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. *Neth. J. Plant Pathol.*, 89: 265-273.
- 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.

## PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### **Tudományos cikkek**

1. Czalleng, A., Bozsó, Z., Ott, P. G., Besenyei, E., **Varga, G. J.**, Szatmári, Á., Haféz, Y. M. and Klement, Z. (2004) Isolation of *in planta*-induced genes of *Pseudomonas viridiflava*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 39: 361-375.
2. **Varga G. J.**, Ott P. G., Klement É., Medzihradzky K. F. és Klement Z. (2005) A korai általános rezisztenciával kapcsolatos új kitinázok dohányban. *Növényvédelem*, 7: 287-296.
3. Bozsó, Z., Ott, P. G., Szatmári, Á., Czalleng, A., **Varga, G. J.**, Besenyei, E., Sárdi, É., Bányai, É. and Klement, Z. (2005) Early detection of bacterium induced basal resistance in tobacco leaves with diamino-benzidine (DAB) and dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). *Journal of Phytopathology*, 153: 596-607. If: 0,575.
4. Czalleng, A., Bozsó, Z., Ott, P. G., Besenyei, E., **Varga, G. J.**, Szatmári, Á., Király, L. and Klement, Z. (2005) Identification of virulence-associated genes of *Pseudomonas viridiflava* activated during infection by use of a novel IVET promoter probing plasmid. *Current Microbiology*, 52: 282-286. If: 1,15.
5. 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.
6. Ott, P. G., **Varga, G. J.**, Szatmári, Á., Bozsó, Z., Klement, É., Medzihradzky, 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. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 19: 161-172. If: 3,580.

7. Szatmári, Á., Ott, P. G., **Varga, G. J.**, Besenyi, E., Czelleng, A., Klement, Z. and Bozsó, Z. (2006) Characterisation of basal resistance (BR) by expression patterns of newly isolated representative genes in tobacco. *Plant Cell Reports*, 25: 728-740. If: 1,457.
8. **Varga, G. J.**, Szegedi, E., Ott, P. G. and Szabó, E. (2006) Early basal resistance inhibits tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*. *Cereal Research Communication*, 34: 97-100. If: 0,157
9. Szabó, E., Klement, É., Medzihradzky, K. F., **Varga, G. J.**, Besenyi, E., Ott, P. G. (2006) Changes of apoplast protein composition during early basal resistance (EBR) in tobacco. *Cereal Research Communication*, 34: 677-680. If: 0,157.
10. Ott, P. G., **Varga, G. J.**, Szatmári, Á., Bozsó, Z., Besenyi, E., Czelleng, A. and Szabó, E. (2006) Basal resistance of plants: from discovery to molecular characterisation. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 41: 37-46.
11. **Varga, G. J.** et al. előkészületben (2006) Induction of early basal resistance (EBR) in tobacco plants with general bacterial elicitors (PAMPs).

#### **Konferencia absztraktok**

12. Ott, P. G., **Varga, G. J.**, Szatmári, Á., Bozsó, Z., Klement, É., Medzihradzky, K. F and Klement, Z. (2003) Characterisation of apoplastic proteins associated with the early induced resistance (EIR). 11<sup>th</sup> International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (pp.130) St.-Petersburg, Russia July 18-26.
13. **Varga, G. J.**, Ott, P. G., Besenyi, E., Bozsó, Z., Czelleng, A., Szatmári, Á., and Klement, Z. (2004) Novel Bacterially Induced Chitinases in tobacco with expression features different from most part of other known chitinases. International Joint Workshop on PR-proteins and Induced Resistance (pp. 96) Elsinor, Denmark May 5-9.

14. Szatmári, Á., Bozsó, Z., Besenyei, E., **Varga, G. J.**, Ott, P. G., Czalleng, A. and Klement, Z. (2004) Cloning and analysis of genes related to the early form of general defence response of plants against bacteria by subtractive hybridisation and quantitative PCR. The 14<sup>th</sup> FESPB Congress (pp.265) Cracow, Poland August 23-27.
15. Besenyei, E., Ott, P. G., Bozsó, Z., Szatmári, Á., **Varga, G. J.**, Czalleng, A. and Klement, Z. (2004) Inhibition of plant defence responses by low temperatures. 7<sup>th</sup> Conference of the European Foundation for Plant Pathology and British Society for Plant Pathology Presidential Meeting (pp. 31) University of Aberdeen, UK September 5-10.

### ***Ismeretterjesztő cikkek***

16. **Varga G. J.** (2005) Növényvédelem – önerőből. Élet és Tudomány, 32: 1001-1003. OTKA-Élet és Tudomány Kutatásismertető Cikkpályázat 2004, III. díj.

### ***Előadások***

17. **Varga G. J.**, Ott P. G., Besenyei E., Bozsó Z., Czalleng A., Szatmári Á., Klement É., Medzihradzky K. F. and Klement Z. (2004) Korai indukált rezisztenciához kapcsolható új kitinázok dohányban. 50. Növényvédelmi Tudományos Napok (pp. 105) Budapest Február 24-25.
18. **Varga G. J.**, Ott P.G. és Klement Z. (2005) A baktériumok árulkodó jelei: Mi alapján ismerik fel a növények a baktériumokat? 51. Növényvédelmi Tudományos Napok (pp. 38) Budapest, Február 22-23.