



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**A BAKTÉRIUMOK ÁLTAL INDUKÁLT ÁLTALÁNOS
REZISZTENCIÁVAL KAPCSOLATBA HOZHATÓ NÖVÉNYI
GÉNEK AZONOSÍTÁSA ÉS KIFEJEZŐDÉSÜK VIZSGÁLATA**

Doktori értekezés tézisei

Készítette: Szatmári Ágnes

MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

Budapest

2008

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi

tudományága: Növényvédelem és Kórélettan

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

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

Dr. Bozsó Zoltán
Tudományos főmunkatárs
MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az általános rezisztencia (basal resistance – BR) a növény eszköze arra, hogy megakadályozza idegen mikroorganizmusok elszaporodását saját szervezetében. Erre azért van szüksége, mert a növény kórokozók jelenléte nélkül is folyamatos, aktív védekezésre kényszerül a környezetében található nem-kórokozó és opportunista kórokozó mikrobák ellen. A BR-t indukálhatják patogénitásukat vesztett mutáns és hővel előlt kórokozó baktériumok, valamint szaprotrófok, sőt egyes baktérium-alkotórészek (microbe associated molecular patterns, MAMP-ok) is. A BR folyamata egy korai (early basal resistance, EBR), és egy késői (late basal resistance, LBR) fázisra különül el, melyek közül az EBR sötétben is kialakul, de az LBR létrejöttéhez fény szükséges. A BR detektálását megkönnyíti, hogy BR-t indukáló baktériumot injektálva a levélbe tünetmentes lokális rezisztencia idézhető elő. Ez védi a növényt a hiperszenzitív reakció (HR) kialakulásától inkompatibilis baktériummal történő felülfertőzéskor, valamint a betegségtől, amennyiben kompatibilis kórokozó baktériummal fertőzik felül.

Modellnövényünk, a dohány, hagyományosan fontos szerepet tölt be a növényi rezisztenciakutatásban, ez fokozottan érvényes a baktériumos kölcsönhatásokra. Ezt a szerepét máig megőrizte, bár sok vizsgálat könnyebben elvégezhető *Arabidopsis*-on, mivel annak már teljes genomja ismert. Érdemes azonban más modellnövényen, például dohányon is vizsgálni a BR-t, mivel ezt általános rezisztenciaként, vagyis minden

növényben meglévő rendszerként tartjuk számon. A különböző növényekben lezajló BR mutat azonosságokat és különbségeket is, melyek megtalálása segíthet a folyamat lényegi megértésében. Az azonosított gének feladatának meghatározását a későbbiekben megkönnyítheti, hogy a dohányon számos jól kidolgozott géncsendesítési, valamint túltermelési technika áll rendelkezésre. Ezenfelül a dohányra vonatkozó eredmények a *Solanaceae* család más haszonnövény tagjainak szempontjából is fontosak lehetnek.

A gének kifejeződésének BR alatt bekövetkező változásait transzkriptomikai módszerekkel vizsgálva következtethetünk a növénysejtben lezajló folyamatokra. Irodalmi adatok szerint a növények energiáikat a felépítő anyagcsere-folyamatoktól a másodlagos, védekező anyagcsere-folyamatokhoz csoportosítják át. Az aromás aminosavak szintézisében részt vevő enzimek aktivitása megemelkedik, ami összecseng a fenilpropanoid útvonal enzimeinek aktivációjával. Ez elvezethet a feltételezhetően mikrobagátló hatású papillák képződéséhez, melyek kialakulása a baktérium és a növénysejt érintkezésénél figyelhető meg.

Az általános rezisztencia gyakorlati, növénytermesztési felhasználási lehetőségeinek keresése érdekében fontos, hogy az alap kutatás eszközeivel minél többet megtudjunk az általános rezisztencia folyamatáról. Dolgozattal is ehhez szeretnék hozzájárulni, az általános rezisztencia génátírási szintű változásainak vizsgálatával.

Célkitűzések

- Az általános védekezés során aktiválódó növényi gének azonosításához a 3'RACE valamint a szubtrakciós hibridizáció módszereket kívánjuk használni. Ezek során létrejön egy klóngyűjtemény, valamint azon géneknek az adatbázis-szerű könyvtára is, melyek közül később egyes jelöltek biológiai jelentőségét is vizsgálni lehet.
- Az aktiválódó gének lehetséges feladatára ismert génekhez való hasonlóságuk alapján kívánunk következtetni. A gének funkció szerinti csoportosításával arra keressük a választ, mely géncsoportok, illetve az ezeknek megfelelő fehérjék, enzimek tekinthetők fontos jelöltnek a BR kialakulásának irányítása és mikrobaellenes hatása szempontjából.
- A BR lefutását szorosan követő aktiválódási mintázattal rendelkező géneket megkeresve és markerként használva vizsgálni kívánjuk, vajon a BR mennyire tekinthető általános hatású rezisztenciának. Ez a dohánynövényvel különböző kölcsönhatásban lévő baktériumokkal történt kezelés után a markergének aktivációjának mérésével lehetséges. A markergének segítségével azt is célunk kideríteni, vajon az ismert növényi védekező- és stressz-folyamatokban résztvevő jelátviteli molekulák szerepet játszanak-e a BR-ben.
- Az azonosított BR-hez köthető gének, géncsoportok, illetve a nekik megfelelő fehérjék közül néhánynak a BR-ben betöltött szerepét is vizsgálni kívánjuk. Az enzimek gátlásával vagy rekombináns túltermelésével megváltoztatható a kívánt enzimek működési szintje. Ennek a BR-re kifejtett hatása többek között HR-gátlási teszttel, valamint a kompatibilis baktérium szaporodási sebességének mérésével lehetséges.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növények, baktériumok, kezelések

2–2,5 hónapos dohánynövények (*Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*) leveleinek injektálását fecskendővel végeztük. A *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, és *Sinorhizobium* törzseket 28°C-on, King B táptalajon tenyésztettük. Inokuláláshoz egyéjszakás tenyészeteket használtunk, BR előidézéséhez a baktériumokat 10^8 CFU/ml, baktériumszaporodás méréséhez 10^5 CFU/ml koncentrációra állítottuk be. Utóbbinál levélkorong homogenizátumokból hígítási sort készítettünk, melyeket kiszélesztettünk King B táptalajra. A kolónia-képző sejtek (CFU) számát levélterületre vonatkoztattuk. A BR detektálását HR-gátlási teszttel végeztük. A különböző módon előkezelt levélérközöket félóránként felülfertőztük *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (10^8 CFU/ml) baktérium-szuspenzióval. A vizsgálatok során a következő jelátviteli- és gátlómolekulákat használtuk: Metil-jázmonsav (MeJa, 200 μ M), szalicilsav (SA, 400 μ M), spermin (SPM, 100 μ M), 1-amino-ciklopropán-1-karbonsav (ACC, 1 mM) az etilén prekurzora, piperonilsav (PIP, 1 mM, Sigma-Aldrich).

BR-specifikus cDNS könyvtár készítése

A *Pseudomonas syringae* pv. *syringae hrcC* (10^8 CFU/ml) baktérium-szuspenzióval kezelt és a kontroll dohánylevelekből 3, 6 és 48 órával a kezelés után mintát vettük. A korai mintákat összekevertük. RNS-t

vontunk ki, majd duplaszálú cDNS-t készítettünk. Ezután a Clontech Protocol # PT1117-1 alapján szubtraktív hibridizációt végeztünk. A kapott géndarabokat klónoztuk, és univerzális M13 primerpárral PCR-rel felszaporítottuk. A termékek további feldolgozása és cDNS-chipre vitele a Szegedi Biológiai Központ Funkcionális Genomikai Laborjában történt. A szekvenálendő klónok kiválasztásához chip hibridizációt végeztünk, amihez a leveleket a *P. syringae hrcC* baktériummal kezeltük. A kontroll leveleket vízzel injektáltuk. A hibridizáláshoz a mintákat fluoreszcensen jelöltük. A detektálást konfokális fluoreszcens lézer szkennelrel végeztük. A kapott képfájlokat a GenePix Pro6.0 (Axon Instruments Inc.) programmal elemeztük. Az adatok normalizálása után az arányértékek 2-es alapú logaritmusát kiszámítva, az ismétléseket felhasználva egymintás t-próbát végeztünk. Azokat a klónokat, amelyek logaritmusértékeinek átlaga 95%-os valószínűséggel nagyobb volt 1-nél, (ez kétszeres emelkedésnek felel meg) aktiválódónak tekintettük, és meghatároztattuk a bázissorrendjüket. A szekvenálást az MWG-Biotech Ag. (Ebersberg, Németország) végezte. A Seqman programmal eltávolítottuk a vektor illetve az adapter maradványokat, majd összeillesztettük az azonos géneket képviselő géndarabokat (kontigok). A gének azonosítását a BLAST programmal végeztük. Az aktivációkat újabb hibridizációkkal, és valós idejű PCR-rel ellenőriztük.

A gének expressziós szintjének vizsgálata valós idejű PCR-rel

Össz-RNS-t vontunk ki folyékony nitrogénben eldörzsölt növényi mintából. A tisztítás során a mintákat DN-ázzal kezeltük, cDNS-t írtunk

oligo(dT) primer felhasználásával. A PCR reakciókat Opticon 2 DNA Engine (MJ Research) készüléken futtattuk minden primernél azonos paraméterekkel. Minden mintánál két technikai ismétlés értékeit átlagoltuk.

Kitináz cDNS klónozása 3'RACE módszerrel

Az EBR-hez kapcsolódó gének klónozásához a dohányleveleket a *P. syringae* pv. *syringae* *hrcC* mutáns baktérium 10^8 CFU/ml szuszpenziójával kezeltük. Egy evolúciósan megőrzött (HNFNYG aminosav-sorrendű) kitináz-részletre degenerált PCR primert terveztünk. Ennek bázissorrendje a következő volt: CHTO, 5' CAC AAC T(A/T)(C/T) AAC TA(C/T) GG(A/G) C 3'. Az agaróz-gélben megjelent PCR-termékeket klónoztuk.

A BR-specifikus kitináz előállítását átmeneti génkifejeztetéssel

A gént a PVX vírus-vektorba építettük be. A klónozáskor a PCR reakcióval restriktions hasítóhelyeket és hisztidin-jelet (HIS-tag) is elhelyeztünk. Felhasznált primerek: RE_Ntchitinase_5 5'-CCATC GATTC GAAGG AGATA GAACC ATGAA TTTCT CTTC AAG-3'; RE_Ntchitinase_3 5'-CCGTC GACTC Agtgg tgatg gtgat ggtgG CAGGT GAGAT TATCC CCAG-3'. A beépített gént tartalmazó vírusgenomot transzkripcióval kópiát írtunk át RNS formába. A vírus RNS-sel fogékony *Nicotiana benthamiana* növényeket fertőztünk. A fertőzés után 9-12 nappal vett mintákat -70 °C-on tároltuk. A tricin-SDS PAGE után a fehérjét Western blotolal, hisztidin-jelet felismerő ellenanyaggal detektáltuk.

EREDMÉNYEK

Emelkedett kifejeződési szintű gének keresése és ellenőrzése

Kísérleteinkben a BR alatt aktiválódó géneket kerestük, ehhez a dohánylevelek egyik felét BR-t kiváltó, de HR-t nem okozó *Pseudomonas syringae* pv. *syringae hrcC* mutánsának 10^8 CFU/ml sűrűségű szuszpenziójával oltottuk be, másik felét nem kezeltük, majd a kivont RNS feldolgozásával szubtraktív hibridizációt végeztünk. Így olyan cDNS populációt állítottunk elő, amely dúsítva tartalmazza azokat a géndarabokat, melyeknek expressziója a baktériumok hatására megnövekedett. A korai, 3–6 órás mintából kb. 430, a késői, 48 órás mintából kb. 460 klónt izoláltunk. A gének aktivációjának ellenőrzéséhez a belőlük készült PCR-termékekből cDNS chipeket nyomtattunk, melyekhez *P. syringae hrcC*-vel kezelt és vizes kontroll levelekből származó, fluoreszcensen jelölt cDNS mintákat hibridizáltunk. Kiválasztottuk azokat a klónokat, amelyek a számításaink szerint elérték a kétszeres aktivációs küszöböt, ez alapján 461 klónt jelöltünk ki a szekvenáláshoz. A kapott géndarabokból (mivel egy gént több cDNS klón is képviselt) 176 különálló génszakaszt (kontigot) állítottunk össze, melyek aktivációját ismételten ellenőriztük. A további, egyes géncsoportokon végzett kísérleteinknél az átíródási szint emelkedését valósídejű PCR-rel is megmértük. A valósídejű PCR és a chip hibridizáció egymást megerősítő eredményeket adott, de a valósídejű PCR érzékenyebbnek bizonyult.

Az aktiválódó gének lehetséges szerepük szerinti csoportjai

A kontigokat az ismert génekhez való hasonlóságuk alapján megállapított lehetséges szerepük szerint a következő csoportokba soroltuk: sejtfelépítés (2 db), jelátvitel (20 db), sejtvédelem (7 db), sejtfal (11 db), fenilpropanoid (9 db), terpenoid (4 db), védekezés (16 db), hősokk fehérje (9 db), fehérje anyagcsere (13 db), szállító folyamatok (12 db), anyagcsere-energia (21 db), fotoszintézis (2 db), egyéb (7 db), ismeretlen (11 db), azonosítatlan (32 db). A vártanak megfelelően nagy arányban szerepelnek jelátviteli gének. Jelentős a sejtfallerősítő gének aránya, főleg, ha együtt tekintjük a fenilpropanoid szintézis génekkel, melyek szintén sejtfallerősítő folyamatokban vehetnek részt. Említésre méltó a védekezésben szerepet játszó gének nagy aránya és a fotoszintézisgének elenyésző hányada. Valószínűleg sok fontos gént rejt az ismeretlen funkciójú és az azonosítatlan gének csoportja. A géncsoportok közül fontosnak tartottuk a jelátvitelben részt vevő gének további vizsgálatát, mivel ezek közvetlenül szabályozhatják a rezisztencia folyamatokat. Az aktiválódó gének a jelátvitel folyamatának minden lépését képviselték, a jel érzékelésétől (receptorok) a jel továbbításon (kinázok) át a jelre adott válasz irányításáig (transzkripciós faktorok). Az e csoportba sorolt 16 kontigról valósidejű PCR-rel megállapítottuk, hogy a BR kiváltása után 6 vagy 48 órával 11 aktiválódott szignifikánsan, több mint kétszeresen.

A BR mikróbagátló hatása az egyik lehetséges magyarázat szerint a baktérium tapadási helyén megfigyelhető sejtfalvastagodáson és papillaképződésen alapul. Adataink szerint a lignines lerakódásért felelős fenilpropanoid útvonal szinte minden eleme, valamint a sejtfalszilárdító

glikoprotein-alapú hálózatot képező glicin-gazdag és extenzin fehérjék is megjelentek a BR alatt a dohánylevélben. Két fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) izoenzim, a fahéjsav-4-hidroziláz (C4H), koenzim-A ligáz (4CL), ortometil-transzferázok (OMT), és ferulasav-5-hidroziláz (F5H), valamint a ligninképző peroxidázok (POX) három izoenzimjének génaktivációját is kimutattuk. Az aktiválódott enzimek alapján feltételezzük, hogy a dohány BR-nél a fenilpropanoid útvonal főleg a lignines lerakódás képzésében vesz részt, mivel a szalicilsav és az anticianinok képzése felé vezető elágazás enzimeinek génei nem aktiválódtak. A fenilpropanoid útvonal megzavarásának BR-re gyakorolt hatását a piperonilsav (PIP) segítségével vizsgáltuk, amely a fahéjsav-4-hidroziláznak (C4H), a fenilpropanoid útvonal egy kulcsenzimének hatékony, szelektív inhibitora. A HR-gátlási teszttel kapott adatok szerint a *P. syringiae hrcC* baktérium által kiváltott BR mértékét az egyidőben alkalmazott PIP kezelés csökkenti.

A BR tulajdonságainak feltérképezése reprezentatív gének segítségével

A továbbiakban hat reprezentatív gén átíródását vizsgáltuk részletesebben valósídejű PCR-rel. Közülük kettő, a fahéjsav-4-hidroziláz (C4H) és az ortometil transzferáz (OMT) a fenilpropanoid útvonal része, míg másik kettő, a glicingazdag fehérje (GRP) és extenzin a sejtfalat erősítő fehérje-hálózatot alkotják. A sejtvédelemmel kapcsolatos gének közül a glutation-S-transzferázt (GST) és az epoxid-hidrolázt (EH) vizsgáltuk. Idősorban követve a gének expressziós szintjét egy általános sémát figyelhettünk meg. 1–6 órával a fertőzés után a gének már

aktiválódtak, ez 3–12 órával a fertőzés után érte el csúcsát, majd 24–48 órára a transzkripciós szintek visszaestek. Ez a mintázat egyezést mutat a BR során megfigyelhető HR-gátló hatással. A vizsgált géneket ezért a BR jó molekuláris markerének tartjuk. Különböző típusú növény–baktérium kapcsolatokban 6 órával a baktériumok bejuttatása után a BR-indukáló *P. syringae hrcC* mutáns baktérium közel hasonló génaktivációt okozott, mint a HR-t okozó vad típusú törzs (*P. syringae* pv. *syringae* 61), a kanamicinnel inaktivált kompatibilis kórokozó (*P. syringae* pv. *tabaci*), vagy a szaprofita *P. fluorescens* illetve az *E. coli*. Ezeknél azonban kisebb mértékű aktivációt tapasztaltunk három esetben, a virulens kompatibilis patogén *P. tabacival*, az *A. tumefaciens*-szel, valamint a *S. melilotival* való inokuláláskor. Ebből arra következtettünk, hogy ezek a baktériumok képesek aktívan gátolni, vagy passzívan elkerülni a BR-t. Négyféle, a védekezési reakciókban jól ismert szignálmolekula felhasználásával igyekeztünk kideríteni, mely jelátviteli útvonalak szerepelhetnek a BR kialakításában. A metil-jázmonsav (MeJa), az etilén prekurzora, az aminociklopropán-karboxilsav (ACC) és a spermin (SPM) hatására az általunk vizsgált gének nem mutattak szignifikáns átíródásiszint-változást 6 órával a kezelések után. A SA-nál azonban, az epoxid-hidroláz és a GST esetében szignifikáns expressziószint-növekedést mértünk. Ezért ellenőriztük, hogy a SA képes-e a BR-hez hasonlóan HR-gátlást okozni. A SA-val kezelt területen gátlódott a HR, de kevésbé, mint a tipikus BR során. Transzgenikus NahG növényeket használva, amelyekben egy beépített enzim a SA-t egy hatástalan terméké alakítja át, a *P. syringae* pv. *syringae hrcC*-vel való fertőzés ugyanúgy szignifikáns génexpresszió-növekedést

okozott a növényekben 6 óra múlva, mint a kontrollokban. Ez alátámasztotta csoportunk korábbi eredményeit, miszerint a BR megléte NahG növényekben HR-gátlási teszttel kimutatható.

BR-specifikus kitináz gén azonosítása és jellemzése dohányban

A BR-specifikus gének azonosítását a szubtrakciós hibridizáció mellett 3'RACE módszerrel is végeztük. A kitinázok konzervatív részére tervezett primer segítségével azonosítottunk egy dohány kitinázt, melyet 3D9 kóddal jelöltünk. Az új, eddig ismeretlen szekvenciával rendelkező gén mRNS szintje a baktériumos kezelés után már 1 óra múlva megemelkedett, és az aktiváció még 12 óra múlva is kimutatható volt. Munkatársaink a BR-indukált dohánylevél sejtközötti folyadékát vizsgálva két, kifejezetten BR-specifikus szintnövekedést mutató fehérjét azonosítottak, az EBR215 és EBR250 jelűeket. Ezek tömegspektrometriás vizsgálata kimutatta, hogy az EBR215 és EBR250 N-terminális peptid szekvenciái megegyeznek a 3D9 kitináz génnel. A 3D9 cDNS-nek megfelelő gént, illetve egyes részeit három változatban klónoztuk, valamint két változatban leltük fel az NCBI adatbázisában. A közel azonos szekvenciák illesztéséből kitűnik, hogy a kisebb különbségek mellett a kitin-kötő domén megléte, illetve hiánya alapján két csoportra lehetett osztani ezeket. Mindkét formát cDNS formában is megtaláltuk. Számítógépes elemzéssel nem találtunk RNS-szerkesztési helyet a szekvenciában a kitin-kötő domén környékén, ezért valószínűsítjük, hogy a két formát eltérő gének kódolják. A növénybeli kifejeztetés céljából

klónoztuk a teljes kitináz-kódoló régiót, melynek végére hisztidin-taget helyeztünk el. A kitináz átmeneti expresszióját PVX vírus-vektorral végeztük *N. benthamiana* növényekben. A termelt fehérjét Western-blottal mutattuk ki anti-hisztidin ellenanyaggal. A kitináz és a GFP-t kifejező kontroll növények között *in vivo* nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kompatibilis kórokozó *P. syringae* pv. *tabaci* baktériumok szaporodási képességében.

Új tudományos eredmények

1. Szubtraktív hibridizáció módszerrel azonosítottunk 176, a BR során nagy valószínűséggel aktiválódó gént. Ezeknek a géneknek az aktivációját valósídejű PCR-rel és chip-hibridizációval is ellenőriztük, melyek közül a valósídejű PCR módszer adott megbízhatóbb adatokat. A szubtraktált könyvtárból véletlenszerűen kiválasztott gének több, mint 70%-ánál igazoltuk utóbbi módszerrel a BR alatti transzkripció növekedését.
2. Transzkripció aktivációjuk alapján azonosítottuk a BR jelátviteli útvonalainak egyes lehetséges elemeit, nagyrészüknél aktiválódását valósídejű PCR-rel igazoltuk. Az aktivált jelátviteli gének típusa alapján megerősítettük a MAPK útvonalak jelentőségét, mellette valószínűsítettük a kevésbé vizsgált Ca²⁺-függő útvonalak szintén fontos voltát.
3. Az aktivált gének funkcióik szerinti csoportokba sorolásával megállapítottuk, hogy a sejtfalerősítés és papillaképzés fontos szerepet játszhat a BR kialakulásában. Bizonyítottuk a fenilpropanoid útvonal

ligninképzés felé vezető elemeinek aktivációját. A fenilpropanoid útvonal sebesség-meghatározó enzimét, a fahéjsav-4-hidroxilázt gátolva, számottevő csökkenést tapasztaltunk a BR hatékonyságában, amit HR-gátlási teszttel mutattunk ki.

4. Korai, és késői aktivitású BR-markergéneket azonosítottunk, melyek jól hasznosíthatók a BR egyes szakaszainak elkülönítésére.
5. Kimutattuk, hogy a HR-t okozó inkompatibilis baktériumok, valamint az *E. coli* baktérium a csak BR-t kiváltó, kórokozóképességüket veszített mutáns baktériumokhoz hasonló mértékben aktiválták a BR-markergéneket. Ugyanakkor a kompatibilis *P. syringae* pv. *tabaci* baktérium, valamint a nem patogén, de növényekkel kapcsolatban lévő *Agrobacterium* és *Sinorhizobium* törzsek a BR-markergéneket csak kisebb mértékben aktiválták, ami a BR gátlásával, vagy elkerülésével lehet kapcsolatban.
6. A növényi védekezési folyamatokban fontos szerepet játszó jelátviteli molekulák, a jázmonsav, etilén és spermin nem aktiválják a BR alatt indukálódó géneket. A szalicilsav részben BR-szerű HR-gátlást idézett elő, de a szalicilsavat nem felhalmozó NahG dohánynövényekben a vad típusú növényekhez hasonló mértékű volt a markergének aktivációja. Ez arra utal, hogy a szalicilsav a HR-gátlást a BR-től eltérő útvonalon éri el, azaz a BR kialakulása a szalicilsavtól független. Adataink alapján a BR kialakulásában a fent említett jelátviteli molekuáktól független jelátviteli út játszhat szerepet.
7. Az addig ismeretlen BR-specifikus dohány kitináz gént 3'Race és szubtrakciós hibridizáció módszerrel is azonosítottuk. Átmeneti

túltermeltetése *N. benthamiana* növényben aktív kitináz enzimet eredményezett. Az enzim *in vivo* baktérium gátló hatását azonban nem tudtuk kimutatni, vagyis a túltermelő növények nem voltak ellenállóbbak a kompatibilis baktériummal szemben, mint a kontroll növények.

8. Bizonyítottuk, hogy a BR-specifikus kitináz gén kitinkötő szakaszt nélkülöző rövid formája az irodalmi feltételezésekkel ellentétben nem poszttranszlációs módosítás eredménye, mivel a hosszú és a rövid forma is jelen volt már az mRNS szinten is.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az általunk készített cDNS könyvtár több mint 900 klónt tartalmaz, ebből kb. 180 különálló gént azonosítottunk. A valósidejű PCR-rel végzett tesztek szerint ezek kb. 70%-a aktiválódik a BR alatt. Eszerint legalább 130, BR során aktiválódó dohány gént azonosítottunk. Kutatásunk egyik célja jelátviteli gének azonosítása volt, mert ezek működésének befolyásolásával többet meg lehetne tudni a BR szabályozásáról. Azonosítottuk a MAPK-foszforilációs jelátviteli útvonal néhány elemét, transzkripciós faktorokat, melyeken keresztül a BR génátírásra kifejtett hatása érvényesül, valamint egy MAP kináz foszfatázt, amely felelős lehet a jelátviteli útvonal finomhangolásáért. Ezen kívül három kalcium-kötő hellyel rendelkező fehérje aktiválódott 6 és 48 órában is, melyek mind a sejten belüli jelátvitel folyamatának szereplői lehetnek. A kalcium-függő jelátvitellel kapcsolatos gének BR-ben betöltött szerepét érdemes a későbbiekben jobban megvizsgálni, mert jelentőségük a fentiek alapján valószínű, miközben a foszforilációs kaszkádokhoz viszonyítva viszonylag kevesen tanulmányozták őket. Az azonosított gének funkcionális vizsgálata talán lehetővé teszi majd a jelátviteli hálózatok bonyolult rendszeréről alkotott, egyelőre még sok feltételezésen alapuló elképzeléseink tisztázását. Erre ad lehetőséget a géncsendesített, illetve a túltermelő mutánsok fenotípusos vizsgálata, valamint egyes esetekben az enzimaktivitások, vagy más fehérjékkel kialakuló kölcsönhatások elemzése.

Az azonosított aktivált gének között sok volt a sejtfalerősítéssel kapcsolatos gén, melyek a BR hatásmechanizmusában fontosnak tartott papillaképződésben vehetnek részt. A növényi sejtfalnak a védekezési folyamatok során tapasztalt megváltozása a nemcsak baktériumos, hanem gombás fertőzések esetében is ismert folyamat. A lehetséges magyarázatok szerint a papillák és sejtfallerakódások gátolhatják a mikrobák víz- és tápanyagellátását, illetve megakadályozhatják az effektor molekulák bejuttatását a növényi sejtbe. Az általunk azonosított, BR-hez köthető gének között a ligninképződéshez vezető fenilpropanoid útvonalban megtalálható enzimek jelentős része jelen volt. A piperonilsav, amely hatékony inhibitora a fahéjsav-4-hidroxiláznak (C₄H), a fenilpropanoid útvonal korai elemének, eredményesen csökkentette a BR hatékonyságát. Kísérleteink arra utaltak, hogy a dohánynövényben a flavonoidok, illetve a szalicilsav-felhalmozódás nem játszanak kimutatható szerepet a BR-ben, a ligninképződésért felelős enzimek viszont aktívak. Ezért feltételezzük, hogy a BR baktériumgátló képessége kapcsolatban lehet a ligninképződéssel.

A BR általános tulajdonságaira egyes kiválasztott gének transzkripciós változásainak részletesebb, valósidejű PCR-es vizsgálatából következtettünk. Az idősor-vizsgálatok szerint a BR eseményei egy jól meghatározott sorrendben zajlanak le. A különböző növény–baktérium kapcsolatokban adott növényi választ vizsgálva, jelentős génaktivációt kaptunk a *P. syringae* csak BR-t indukáló és HR-t indukáló törzse esetében is. Ezek az eredmények, és irodalmi adatok is arra utalnak, hogy a BR és a HR folyamata jelentős átfedést mutat. Megállapíthattuk, hogy a növényi

BR-t a baktériumok széles köre képes kiváltani. A baktériumok a BR elkerülésére két lehetséges stratégiát használnak, egyrészt effektoraik segítségével gátolhatják a BR kialakulását, másrészt mintegy elmaszkírozhatják, elrejtetik azokat a molekulamintázataikat (MAMP-jaikat), amelyeket a növény felismerhetne. Jelátviteli molekulák hatását vizsgálva a MeJa, ACC és SPM nem okozott értékelhető transzkripciószint-változást a BR aktiválta génekben a vizes kontrollhoz képest. A szalicilsavval végzett kísérletek eredményei arra utaltak, hogy a BR folyamatai és a szalicilsavhoz kötött folyamatok kezdetben elkülönülnek, de lehet átfedés a későbbi következményekben. Valószínűnek tartjuk, hogy a fenti jelátviteli molekuláktól független jelátviteli útvonal játszik fontos szerepet a BR korai eseményeiben.

Célzottan kerestünk BR alatt aktiválódó kitináz(oka)t, mivel a BR folyamán többféle lehetséges szerepük is elképzelhető az irodalmi adatok alapján. A lizozimaktivitású kitinázok a baktériumok sejtfalát bonthatják, így antibakteriális hatással rendelkezhetnek. Ezenkívül képesek lehetnek endogén növényi elicitorok, vagy ismeretlen jelátviteli molekulák felszabadítására is. Az általunk izolált BR-indukált, CHO3D9 jelű új kitináz BR-specifikus aktivációja mind transzkripció-, mind fehérjeszinten bizonyítást nyert. Az eredmények további kérdéseket vetettek fel, melyek közül az egyik legfontosabb: hogyan segíti elő a CHO3D9 kitináz a BR folyamatát? Vajon antimikrobiális hatással rendelkezik, vagy inkább szignál-szerepe van? Felmerülhet, hogy a kitináz esetleges oligoszaharid típusú jelátviteli molekulákra gyakorolt hatásának is szerepe lehet. A kérdések megválaszolásához rekombinánsan termeltettük a kitinázt

tranzien PVX vírus-expressziós rendszerben. *In vivo* nem sikerült kimutatni a tranziensen termelt kitináz esetleges baktérium-szaporodást gátló hatását. A megfelelő mennyiség előállítás és tisztítása *in vitro* aktivitástereszteléshez későbbi feladat. Megállapítottuk, hogy a BR-specifikus kitináz két formában létezik, melyek közül a rövidebből hiányzik a kitinkötő domén. Az irodalomban rendelkezésre álló genomi szekvenciában ez megtalálható. Korábbi feltevések szerint a genomban található teljes kitináz poszttranszlációs módosítások révén veszíti el a kitinkötő domént. Mi azonban cDNS-ként kimutattuk a hosszú, és a rövid formát is, tehát a két forma már mRNS szinten eltér, és mivel RNS-szerkesztési helyet nem találtunk, talán a másik formának megfelelő genomi szekvencia is létezik. Szintén későbbi feladat lesz, hogy a hosszú és a rövid kitináz forma működését és BR-re gyakorolt hatását összehasonlítsuk.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Folyóirat cikkek:

1. Szatmári Á., Ott P. G., Varga G. J., Besenyei E., Czalleng A., Klement Z., Bozsó Z. (2006): Characterisation of basal resistance (BR) by expression patterns of newly isolated representative genes in tobacco. *Plant Cell Reports*, 25: 728-740. (IF 1,457)
2. Szatmári Á., Klement, Z. (2003): Hasonlóságok és különbözőségek a növény- és állatvilág immunmechanizmusában. *Növénytermelés*, 52: 703-712. (IF 0,27)
3. Klement Z., Szatmári Á. (2004): A növényi és állati immunrendszerek összehasonlító értékelése a növényi baktériumos betegségek tükrében. *Magyar Tudomány*, 10: 1119-1129.
4. Bozsó Z., Ott P. G., Szatmári Á., Czalleng A., Varga G. J., Besenyei E., Sárdi É., Bányai É, Klement Z. (2005): Early detection of bacterium induced basal resistance in tobacco leaves with diamino-benzidine (DAB) and dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). *Journal of Phytopathology*, 153: 596-608. (IF 0,575)
5. Ott P. G., Varga G. J., Szatmári Á., Bozsó Z., Klement É., Medzihradzky K. F., Besenyei E., Czalleng A., Klement Z. (2006): Novel extracellular chitinases rapidly and specifically induced by general bacterial elicitors and suppressed by virulent bacteria as a marker of early basal resistance in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 161-172. (IF: 3,5)
6. Czalleng A, Bozsó Z, Ott P. G., Besenyei E., Varga G. J., Szatmári Á., Király L., Klement Z. (2006): Identification of virulence-associated genes of *Pseudomonas viridiflava* activated during infection by use of a novel IVET promoter probing plasmid. *Current Microbiology*, 52: 282-286. (IF 1,075)

7. Besenyei E., Ott P. G., Bozsó Z., Czalleng A., Szatmári Á., Varga G. J., Klement Z. (2005): Low temperature delay and inhibition of a plant defence mechanism: early basal resistance in tobacco. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 40: 323-332.
8. Czalleng A., Bozsó Z., Ott P. G., Besenyei E., Varga G. J., Szatmári Á., Hafez Y. M., Klement Z. (2004): Isolation of in planta-induced genes of *Pseudomonas viridiflava*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 39: 361-375.
9. Ott P. G., Varga G. J., Szatmári Á., Bozsó Z., Besenyei E., Czalleng A., Szabó E. (2006): Basal resistance of plants against bacteria: from discovery to molecular characterisation. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 41: 37-46.

Előadások:

10. Szatmári Á., Bozsó Z., Besenyei E., Varga G. J., Ott P. G., Czalleng A., Szabó E., Puskás L., Klement Z. (2006): Az általános növényi védekezési reakció során aktiválódó nagyszámú gén azonosítása dohánylevélből. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február 23-24.
11. Szatmári Á., Bozsó Z., Besenyei E., Varga G. J., Ott P. G., Czalleng A., Klement Z. (2004): Az általános, nem-specifikus növényi védekezési reakció korai fázisában (EIR) aktiválódó gének azonosítása. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február 24-25.
12. Bozsó Z., Szatmári Á., Kondorosi É., Kondorosi Á., Klement Z. (2004): Baktériumok ellen indukálódó, általános nem-specifikus növényi védekezési reakcióban résztvevő gének azonosítása és transzkripciójuk jellemzése. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 9. Munkaértekezlete, Sopron, május 10-13.

Poszterek:

13. Szatmári Á., Besenyei E., Czelleng A., Ott P. G., Szabó E., Varga G. J., Puskás L., Kondorosi É., Klement Z., Bozsó Z., (2006): Contribution of the phenylpropanoid pathway is necessary for full-scale development of bacterial-induced basal resistance. Non-specific and specific innate and acquired plant resistance symposium, Budapest, aug. 31. - szept. 3.
14. Szatmári Á., Bozsó Z., Besenyei E., Czelleng A., Ott P. G., Varga G. J., 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. FESPB 2004 Congress, Krakko, Lengyelország, aug. 22-26.
15. Szatmári Á., Bozsó Z., Besenyei E., Czelleng A., Klement Z. (2003): Isolation of genes related to the general, non-specific defense reaction of plants from tobacco and *Arabidopsis*. 11th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Oroszország, Szentpétervár, július 18-26.
16. Szatmári Á., Bozsó Z., Besenyei E., Czelleng A., Varga G. J., Ott P. G. és Klement Z. (2003): A növények általános, nem-specifikus védekezési reakciójával (Lokális Indukált Rezisztencia) kapcsolatos gének izolálása dohányból és *Arabidopsis*ból. V. Magyar genetikai kongresszus, Siófok, április 13-15.
17. Ott P. G., Varga G., Szatmári Á., Bozsó Z., Klement É., Medzichradzky K. F., Klement Z. (2003): Characterization of apoplastic proteins associated with the early induced resistance (EIR). 11th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Oroszország, Szentpétervár, július 18-26.