

Az őszi búza vonalak zászlóslevelében lévő antioxidáns és detoxifikáló rendszerek vizsgálata Fuzárium fertőzés alatt

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Podmaniczki Anna

Témavezető: Dr. Gallé Ágnes
Egyetemi adjunktus



Biológus Msc II.
Növénybiológiai Tanszék
SZTE TTIK
2015

Tartalom

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	5
1.1 A búza kalászfuzáriózis jelentősége	5
1.2 A búza eredete és jellemzése	6
1.3 Fusarium genusz általános jellemzése	6
1.4 Stressz fogalma, általános adaptációs szindróma	7
1.5 Gombafertőzés és az általa indukált védekező mechanizmusok	7
1.6 Reaktív oxigén fajták (ROS)	8
1.7 Reaktív oxigén fajták túltermelődése elleni védelem nem enzimatis és enzimatis módjai	9
1.7.1 Aszkorbát	9
1.7.2 Glutation	10
1.7.3 Szuperoxid dizmutáz (SOD 1.15.1.1)	10
1.7.4 Kataláz (CAT, 1.11.1.6)	10
1.7.5 Glutation reduktáz (GR 1.6.4.2)	11
1.7.6 Glutation transzferáz (GST 2.5.1.18)	11
1.7.7 Gvajakol peroxidáz (ClassII peroxidase, GPOX 1.11.1.7)	12
1.8 Fuzárium fertőzés hatása a búza méregtelenítésére, antioxidáns védekezésére	12
2. Célkitűzések	14
3. Anyagok és módszerek	15
3.1. A növénynevelés és a kísérletek előkészítése	15
3.2 Nem enzimatis antioxidánsok vizsgálata	17
3.2.1 Összes aszkorbát és a redukált aszkorbát tartalom meghatározása	17
3.2.2 Összes glutation és oxidált glutation tartalom meghatározása	17
3.3 Enzimatis aktivitás meghatározása	17
3.3.1 Szuperoxid-dizmutáz (SOD)	17
3.3.2 Kataláz (CAT)	18
3.3.3 Glutation reduktáz (GR)	18
3.3.4 Glutation transzferáz	18
3.3.5 Gvajakol peroxidáz (POD)	18
3.3.6 RNS izolálás	18
3.3.7 DNáz kezelés és cDNS írás	19
3.3.8 qRT- PCR	20
3.3.9. Statisztikai kiértékelés	21

4. Eredmények és értékelésük.....	22
4.1 <i>Fuzárium</i> fertőzés hatása az aszkorbát és glutation tartalomra	22
4.2 Fertőzés hatása az enzimatis rendszerekre	26
4.3 Fertőzés hatására bekövetkező génexpressziós változások	31
5. Összefoglalás	34
6. Felhasznált irodalom.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
7. Köszönetnyilvánítás	Hiba! A könyvjelző nem létezik.

Rövidítések jegyzéke

Asc	aszorbát
Avr	avirulencia gének
CAT	kataláz
CDNB	1-klór-2,4-dinitrobenzol
DHA	dehidroaszorbát
DHAR	dehidroaszorbát reduktáz
DTNB	-5'5-ditio-bisz (2-nitro-benzoészav)
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraecészav
ETI	effektor indukált immunitás
GAS	általános adaptációs szindróma
GPOX	gvajakol peroxidáz
GR	glutation reduktáz
GSH	redukált glutation
GSSG	oxidált glutation
GST	glutation transzferáz
HR	hiperszenzitív reakció
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PR	pathogenesis-related
PRR	pattern recognition receptors
PTI	PAMP-triggered immunity
qRT-PCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
TCA	triklórecészav

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1 A búza kalászfuzáriózis jelentősége

Napjainkban világ termőterületeinek közel felén gabonaféléket termelnek, melyek közül kiemelendő gazdasági jelentőséggel bír a rizs, búza, kukorica, árpa. Közülük az utóbbi három növénycsoport igen érzékeny a *Fusarium* gombákkal szemben. A gomba által okozott betegség, a kalászfuzáriózis gyakran előforduló betegsége a gabonaféléknek, hazánkban is az egyik legsúlyosabb problémája ezen növényeknek, mely mennyiségi és minőségi kárt is okozhat.

Maguk a kórokozók egy igen diverz gombacsoport tagjai, a *Fusarium* az egyik legfajgazdagabb és legjelentősebb genus. Pontos rendszerezésük nem egyszerű feladat köszönhetően a nagymértékű morfológiai és fiziológiai változékonyságuknak, valamint heterogenitásuknak. Mindenütt megtalálhatóak, így a gabonaszemekben, a száron, a talajban, a gyomokon, de a legnagyobb fertőzőforrást (inokulumot) a termőföldön maradó fertőzött növényi maradványok jelentik. A kórokozók által termelt toxinok kimutathatóak mind a szálas takarmányban, az almozásra használt szalmában, valamint a raktárban elhelyezett gabonákban is (Parry és mtsai, 1995).

A fuzáriózis napjainkban igen elterjedt betegség, ám országos felbukkanásáról már az 1970-es évektől kezdve rendelkezésre állnak felmérések. Az utóbbi évtizedekben több évben is előfordult nagyobb kárt eredményező járvány (1970, 1975, 1999, 2010), szinte mind tavaszi vagy korai nyári esőzésekkel voltak összefüggésben. De nem csak a csapadék jelenléte lehet fontos környezeti tényező. A meleg hőmérséklet és a magas páratartalom együttes jelenléte szinte tökéletes körülményeket biztosíthat a gombák szaporodásához. 25 °C feletti időjárás a *Fusarium graminearum* megjelenésének kedvez, de a kissé hűvösebb idő esetén az alacsonyabb hőoptimumú fajok, mint például a *Fusarium culmorum* is, előfordulhatnak.

A *Fusarium* fajok által termelt másodlagos anyagcseretermékek a mikotoxinok, melyek állatokra és emberre nézve egyaránt veszélyesek. A gabonafélék esetén komoly mennyiségi és minőségi károkat okozhatnak hozamcsökkenés révén, valamint azáltal, hogy szennyezett termény emberi és állati fogyasztásra is alkalmatlanná válik. A mikotoxinok számos állati betegséget okozhatnak, esetenként vissza is utasítják a szennyezett takarmányt. Káros hatásukat emberekre is több esetben kimutatták.

1.2 A búza eredete és jellemzése

A gabonafélék emberi táplálkozásban betöltött jelentős szerepe vitathatatlan. Emellett az egyéb felhasználási lehetőségei is igen széleskörűek, így például legtöbb ország a gabonatermésének egy részét takarmányozásra, illetve - napjainkban egyre nagyobb mértékben - bioetanol előállítására fordítja.

Rendszertanilag a pelyvások rendjébe, a pázsitfűvek családjába, és a búza nemzetségébe tartozik.

A ma termesztett búza (*Triticum aestivum* L.) hosszú évezredekken át alakult ki a nemzetség fajaiból. A *Triticum* nemzetségbe számos faj tartozik, melyek kromoszómaszám alapján csoportosíthatóak, közöttük megkülönböztetünk diploidokat, allotetraploidokat és allohexaploidokat. A allo- előtag arra utal, hogy az egyed két vagy több különböző fajból származó genomot tartalmaz. A diploid növények 14 kromoszómával rendelkeznek, s többségük vad faj. Egy termesztett fajt sorolnak ide, az úgynevezett alakort, más néven egynemű búzát (*Triticum monococcum*). Az allotetraploidok 18 kromoszómával rendelkező fajok, ide tartozik fontos alfajként a durum búza és a tönke (más néven kétszemű búza). Az allohexaploidok közé tartozó növényeknek 42 kromoszómájuk van, a közönséges búza (vagy kenyérbúza, *Triticum aestivum*) is ebbe kategóriába tartozik.

Európában a búza nemesítési tevékenység kezdete az 1700-as évekre tehető, Magyarországon pedig az 1860-as évektől kezdve folyik búzanemesítői munka.

1.3 Fusarium genusz általános jellemzése

A mai *Fusarium* nemzetséget először Link (1809) írta le, akkor még *Fusisporium*ként. Az elnevezés az idetartozó fajok legjellegzetesebb tulajdonságára, az orsó alakú (fusiform) konídiumokra utal. A *F. graminearum* és *F. culmorum*, melyek a kalászfuzáriózis kialakításban legnagyobb mértékben részt vesznek, rendszertanilag az *Ascomycota* törzs, *Ascomycetes* osztály, *Hypocreales* rend, *Nectriaceae* család, *Fusarium* nemzetségébe tartozik, míg a *Fusarium graminearum* teleomorf alakja – a *Gibberella* nemzetségbe sorolandó. A genusba tartozó fajok rendszertana a legvitatottabb, ennek oka a formagazdagság, a fajon belül mutatott változékonyság, de a megjelenésüket a különböző környezeti hatások is befolyásolják. Jelenleg több százra tehető a leírt fajok száma, filogenetikai értelmezés alapján (Summerell és mtsai, 2010).

A leggyakrabban kalászosokon előforduló fajok közé tartoznak *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*. Azonban a fajok jelenléte, dominanciája nem egyforma a világon: Észak-Amerikában, Közép-Európában, Ausztráliában *F. graminearum*, míg Északnyugat-Európában a *F. culmorum* jellemző (Parry et. al. 1995). Magyarországon többször is vizsgálták a fajok megoszlását, míg a domináns faj tekintetében eltérnek egymástól, addig abban mind megegyeznek, hogy a *F. graminearum*, *F. culmorum* jelenléte mindenesetben jelentős.

1.4 Stressz fogalma, általános adaptációs szindróma

A növények helyhez kötött életformájuk miatt szoros kapcsolatban állnak a közvetlen környezetükkel, nagymértékben függnek annak állapotától. Az onnan érkező hatások befolyásolják életciklusukat, terméshozamukat. Ha a környezeti tényezők bizonyos értékei meghaladják, vagy éppen nem érik el az adott fajra jellemző optimális értékeket, akkor a növény stresszhelyzetbe kerül.

A stressz fogalmát először biológiai és biokémiai rendszerekre Selye János fogalmazta meg:

„az élő szervezetek valamennyi adaptációs reakciójának a stressz a foglalat, azaz a stressz egy fajlagos tünetcsoportban megnyilvánuló állapot, amely magában foglal minden nem-fajlagosan előidézett elváltozást egy biológiai rendszeren belül” (Selye, 1956). Az ő nevéhez fűződik az úgynevezett általános adaptációs szindróma (General Adaptation Syndrom GAS) bevezetése is, mely szerint a gyakran előforduló stresszhatásokra egy tipikus tünetcsoport jegyei jelennek meg az élőlényeken, függetlenül attól, hogy mi is a stresszor. A stressz fogalma és az általános adaptációs szindróma kialakulása növények esetén is általánosítható:

A stresszor megjelenése után nem sokkal egy destabilizáció alakul ki (vészreakció), mely akut károsodásban merülhet ki, illetve normalizálódás következhet be. Ez utóbbi esetben ezt egy fokozott ellenállási szakasz követi. Ha a stresszor jelenléte nem szűnik meg, akkor ez az ellenállás ismét csökkenni fog (kimerülési fázis), és akut károsodás, növény pusztulása lép fel (Szigeti, 1988).

Stresszor bármely faktor lehet, mely a stresszt kiváltja az adott fajban. Megkülönböztetünk biotikus és abiotikus, illetve antropogén stresszorokat. A különböző stresszoroknak megfelelően a növényi védekező mechanizmusok is eltérőek lesznek. Azonban ezen mechanizmusok elemeit 2 főbb csoportba tudjuk sorolni: szintoxikus és katatoxikus. A szintoxikus elemekhez olyan anyagok tartoznak, melyek alkalmassá teszik a növényt arra, hogy együtt tudjon élni az adott stresszorral (pl. hormonok, ozmoregulátorok, hősokk fehérjék, poliaminok). A katatoxikus elemek közé tartozók eltávolítják magát a stresszort a növényből, vagy legalábbis semlegesebb formává alakítják, melyet aztán képesek lesznek a sejteken kívülre transzportálni, vagy a vakuolumba juttatni (pl. enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok, méregtelenítő enzimek).

1.5 Gombafertőzés és az általa indukált védekező mechanizmusok

Mezőgazdasági növényeinknél, így a búzánál is komoly problémát okoznak a patogén gombák, melyek elpusztítják a növényt, vagy nagymértékben lecsökkentik a terméshozamot, illetve annak minőségét is erősen befolyásolják. Ezért fontos a sikeres nemesítés szempontjából az általuk indukált védekezési mechanizmusok alaposabb ismerete. A gombák, életmódjuk alapján lehetnek biotrófok, nekrotrófok és hemibiotrófok. A károkozások szempontjából e két utóbbi csoportba tartozók érdemelnek fokozott figyelmet. Az általunk vizsgált *Fusarium* fajok hemibiotróf életmódot folytatnak. Ezeknél a gombáknál megfigyelhető egy háromlépcsős életciklus: az első szakaszban a gomba biotróf viselkedésű

és tünetmentesen növekszik az élő sejtben. A második szakaszban nektrótrófként viselkedik, és növényi szövetek elhalása kíséri. A harmadik szakaszban a gomba befejezi a teljes életciklusát (Brunner és mtsai, 2013).

A növényeknek két fő stratégiája van arra, hogy felismerje a patogén kórokozókat: az egyik stratégia a PAMP elnevezést viseli, itt a gombák kitinje elicitoroként funkcionál, melyek specifikus receptorokhoz (PRR) kötődnek, ezáltal aktiválják a PTI (PAMP-triggered immunity) immunválaszt.

Másik típusa a védelemnek az ETI (effektor indukált immunitás – effector triggered immunity). Ebben az esetben az úgynevezett avirulencia gének (Avr) termékeit ismerik fel az rezisztencia gének által kódolt fehérjék (Dodds és Rathjen, 2010).

Az első esetben (PTI immunválasz esetén) aktiválódik a MAP-kináz kaszkád, mely különböző növényi hormonok által közvetített jelátviteli folyamatokkal együttesen védekezési gének transzkripcióját indítja el, ezek a gének proteáz gátlók szintézisét, szabad oxigén gyökök felhalmozódását irányíthatják.

ETI immunválaszt sokszor kíséri HR (hiperszenzitív reakció), ahol a gazdasejtek sejthalálával lokalizálják egy pontban a fertőzést (Jones és Dangl, 2006), valamint Szisztematikus Szerzett Rezisztencia (SAR- Systemic Acquired Resistance, León és Montesano, 2013). A szisztémikusan szerzett rezisztenciának nevezett védekezési reakció a szalicilsavnak és az általa serkentett antioxidánsoknak köszönhetően gátat szab a patogén szaporodásának a nem fertőzött szövetekben is. A HR és a SAR esetében is megjelenő oxidatív robbanás együtt jár a reaktív oxigén fajták (ROS) termelésével, mely majdnem mindenütt megjelenő válaszreakció növényekben patogén támadás esetén, és kulcsfontosságú szerepe van mind a PTI és ETI immunválaszban (Torres és mtsai, 2006). A ROS termeléshez társuló védekező válaszok között megtaláljuk a kórokozók közvetlen módon történő elölése, a gazdanövény sejthalálának indukálása (HR), és hozzájárul a sejtfal megerősítéséhez (Bolwell és Daudi, 2009).

1.6 Reaktív oxigén fajták (ROS)

Reaktív oxigénformák a növényben stressz mentes állapotban is keletkeznek, bizonyos formái többek között jelátviteli utak elemei lehetnek. Több sejtalkotóban is megjelennek a különböző élettani folyamatok során, így például a kloroplasztisban a fotoszintézis során, mitokondriumban az elektrontranszport folyamata alatt, sejtfalban peroxidázok hatására, endoplazmatikus retikulumban itt a NADPH-függő elektrontranszport alatt, apoplasztban sejtfalkapcsolt enzimek működése miatt, peroxisómában glikolsav oxidációhoz kapcsolódóan. De szabályozott úton termelődhetnek is a sejtmembrán külső felén a NADPH oxidázok által. A NADPH oxidáz által termelt ROS szerepet játszik a jelátviteli folyamatokban, növények egyedfejlődésében, sejthalálban, sztómazáródásban.

Azonban ha a ROS átlépi az élettani feladatok ellátásához szükséges mennyiséget és többlet mennyiségben jelenik meg, jelentős károkat okozhat nem csak a növényi, hanem a patogén organizmus sejtjeiben is.

Ezt használják fel a növények, amikor az őket megtámadó kórokozók ellen rövid idő alatt nagy mennyiségben megnövelik a reaktív oxigén fajták koncentrációját, HR esetén. A reaktív oxigén származékok változatos funkciókkal rendelkeznek a patogén fertőzésre adott válaszreakciókban: nagy mennyiségben halmozódnak fel a fertőzés melletti sejtekben és a

nekrózisok indukálása révén a közvetlen védelmet biztosítják a kórokozókkal szemben, illetve a távolabbi szövetekben, kisebb mennyiségben felszabaduló ROS különböző jelátviteli útvonalakat aktiválhat.

Ezen funkciók révén a ROS jelentős szerepet játszhat a kórokozó-növény kapcsolat korai interakciójában. Ha a megemelkedett ROS termelődés később, a fertőzés előrehaladottabb állapotában jelentkezik, és nincs kellően összehangolva kioltás, akár meg is könnyíthetik a betegséget okozó gomba terjedését (Waśkiewicz és mtsai, 2014).

1.7 Reaktív oxigén fajták túlermelődése elleni védelem nem enzimatis és enzimatis módjai

Nem enzimatis és enzimatis antioxidánsok szerepe, hogy megvédjék a sejteket az oxidatív károsodástól azáltal, hogy kioltják a reaktív oxigén származékokat. Amellett, hogy részt vesznek a védelmi és méregtelenítő rendszerben, például az aszkorbát képes közvetlenül reakcióba lépni számos szabadgyökkel és más oxidáló ágenssel, illetve a membránhoz kötött antioxidánsokat képes regenerálni (pl.: α -tokoferolt). A glutation szintén képes közvetlen szabadgyök semlegesítésre, valamint a GST szubsztrája, ezáltal a méregtelenítésben is szerepet kap. Az enzimatis antioxidánsok (SOD, CAT, GR, GPOX, POD, DHAR) különböző reakciók során eliminálják a sejtekre káros szabadgyököket és reaktív oxigén származékokat, vagy konjugátum képzéssel kevésbé káros, és könnyebben szállítható formává alakítják azokat. Optimális környezeti feltételek mellett eme többkomponensű védelmi rendszer elég, hogy megvédje a sejteket. Ha stresszhatás éri a növényeket gyakran lép fel oxidatív stressz az elsődleges stresszor jelenlétének következményeképp, mely többlet ROS megjelenésével jár. Ez történik részben tervezett módon patogéntámadás esetén is, a stresszhatásban köszönhetően előfordulhat azonban, hogy az antioxidáns kapacitás csökken, mely vezethet a gyengébb védekezőképességhez is.

1.7.1 Aszkorbát

Az aszkorbát leggyakoribb, kismolekula súlyú, nem enzimatis antioxidáns, mely kulcsszerepet játszik az oxidatív stressz elleni védelemben. Kimutatták, hogy fontos szerepet játszik számos fiziológiás folyamatban, így például a növekedésben, differenciálódásban és anyagcserében.

A legtöbb növényi sejt típusban kimutatható a jelenléte, különösen nagy mennyiségben fordul elő a fotoszintézisben szerepet játszó szövetekben. A sejtben belül a legnagyobb része (több, mint 90%) citoplazmában lokalizált, azonban milimólos koncentrációban az apoplastba is transzportálódik, ahol ez képezi az elsődleges védelmi vonalat a káros oxidáns anyagokkal szemben.

Normális körülmények között az aszkorbát redukált állapotban található meg a kloroplastban, ahol a violaxantin de-epoxidáz kofaktoraként működik.

Szükség esetén közvetlenül képes reakcióba lépni a szuperoxid gyökánionnal, hidrogén-peroxiddal, illetve képes regenerálni az α -tokoferolt. Ezenkívül fontos szerepe van az aszkorbát-glutation ciklusban is, ahol az aszkorbát peroxidáz segítségével a hidrogén-peroxidot vízzé alakítja. De más szabadgyökkel és oxidáló ágenssel is képes reakcióba lépni, eközben monodehidroaszkorbinsavvá vagy dehidroaszkorbinsavvá oxidálódik.

Fontos marker a növények stressz hatásokkal szembeni védekezésének vizsgálatakor, mennyiségének változása, illetve a redukált-oxidált formák arányának megváltozása a stressz hatás mértékét mutatja (Zechmann 2011).

1.7.2 Glutation

Nagy jelentőségű, nem enzimatis tripeptid a glutation, mely a sejten belüli ROS által indukált oxidatív károsodás ellen véd. Minden sejt-kompartimentben előfordul, így megtalálható a citoszolban, kloroplasztisban, endoplazmatikus retikulumban, mitokondriumban, vakuolumban. Szintézisét a γ -glutamilcisztein szintetáz és glutation szintetáz végzi, s mind kloroplasztikus, mind a nem-kloroplasztikus kompartimentekben is lejátszódó folyamatról beszélünk.

Redukált és oxidált állapota közti egyensúly központi komponense a sejtek redox állapotának fenntartásában (Noctor és Foyer, 1998). Ezenkívül fontos szerepet játszik különböző biológiai folyamatokban, mint például a növekedésben, kéntranszport szabályozásban, szignál transzdukcióban, metabolitok konjugációjában, enzim regulációban, és génexpresszióban szabályozásában.

Antioxidánsként működik, képes reakcióba lépni a szuperoxid gyök-anionnal, hidroxil gyökkel és a hidrogén-peroxiddal, ezért közvetlen gyökfogóként működhet. Megvédi a makromolekulákat azáltal, hogy képes konjugátumokat képezni. Részt vesz az aszkorbát-glutation ciklusban, ahol képes redukálni a dehidroaszkorbátot aszkorbáttá.

1.7.3 Szuperoxid dizmutáz (SOD 1.15.1.1)

A szuperoxid egy olyan metalloenzim család tagja, mely katalizálja a szuperoxid gyök-anion oxidációját, melynek eredményeképpen oxigén és hidrogén-peroxid keletkezik. Előfordul minden olyan sejtben, mely oxigénnel érintkezik.

Három osztálya fordul elő a növényekben a bennük megtalálható fémkofaktorok alapján: réz-cink szuperoxid dizmutáz (Cu/Zn-SOD), mangán szuperoxid dizmutáz (Mn-SOD) és vas szuperoxid dizmutáz (Fe-SOD). Míg a mangán szuperoxid dizmutáz mitokondrium lokalizált, addig a vas szuperoxid dizmutáz kloroplasztisban található meg. A réz-cink szuperoxid dizmutáznak három izoformája van, melyek eltérő lokalizációt mutatnak: citoplazmában, mitokondriumban, kloroplasztisban, és peroxisómában is kimutathatóak. Cu/Zn-SOD cian-szenzitív, és dimer állapotban működőképes, míg a másik kettő dimer vagy tetramer formában fordulnak elő, és cianra nem mutatnak érzékenységet.

Aktivitásáról már leírták, hogy környezeti stressz hatásokra növekszik, illetve a növekedés mértéke korrelál a növény különböző stresszhatásokra mutatott toleranciájával (Sharma és mtsai, 2012).

1.7.4 Kataláz (CAT, 1.11.1.6)

Az antioxidáns enzimek közül az elsőnek felfedezett és jellemzett enzim. Hem tartalmú, tetramer enzim, mely a hidrogén-peroxidot vízzé és oxigénné alakítja, s mindeközben nem igényel redukáló szubsztrátot a működéséhez, ellentétben más hidrogén-peroxidot degradáló enzimekkel.

Három fő osztályba lehet beosztani: az I. osztályba tartozó katalázok a fotoszintézist végző sejtekben fordulnak elő, és fény által reguláltak. A II. osztályba tartozó katalázok a vaszkuláris szövetekben fordul elő nagy mennyiségben, míg a III. osztályba tartozóak a magban és fiatal hajtásokban találhatók meg (Sharma és mtsai, 2012).

A stressz tartamától, intenzitásától és típusától függően fokozhatja vagy csökkentheti a kataláz aktivitását.

1.7.5 Glutation reduktáz (GR 1.6.4.2)

Egy flavoprotein oxidoreduktáz, mely megtalálható a prokariótákban és eukariótákban egyaránt. Fontos szerepe van a védekezésben a reaktív oxigén fajtákkal szemben: az aszkorbát-glutation ciklusban az oxidált glutation redukcióját végzi NADPH jelenlétében (Gill és Tuteja, 2010).

Nagy mennyiségben kloroplasztisz lokalizált, de kis mennyiségben előfordul a citoszolban és mitokondriumban is.

A glutationnal együtt döntő szerepet játszik a növényekben a tolerancia kialakításában stressz alatt.

1.7.6 Glutation transzferáz (GST 2.5.1.18)

Egy nagy és diverz enzimes család tagja, főbb funkciójuk közé tartozik a mérgező anyagok detoxifikálása glutationnal, de ezenkívül szerepet játszanak a hormon háztartásban, tirozin metabolizmusban, apoptózis regulációjában és a biotikus illetve abiotikus stresszekre adott növényi válaszok kialakításában (Gill és Tuteja, 2010).

Szekvenciamotívumok alapján csoportosították őket: négy nagy csoportot különböztetünk meg (tau, phi, zéta és theta) illetve négy kisebb csoportot (dehidroaszkorbát reduktáz, lambda, tetraklórhidrokinon dehalogenáz és mikroszómális, 1.1. táblázat)

A specifikusan növényekben előforduló, nagy variabilitást mutató phi és tau GSTk sok különböző xenobiotikum GSH konjugációját képesek elvégezni. A különböző stresszhatások kivédésében betöltött szerepüket széles körben vizsgálták, és sok esetben találtak összefüggést az aktivitás és/vagy génexpresszió mértéke és a stressztolerancia között (Cummins és mtsai, 1999).

A két legnagyobb és diverzebb csoport a phi és tau csoport, továbbá ennek a két csoportnak a tagjai mutatják a legmagasabb glutation konjugáló aktivitást. A búza phi csoportú GSTk herbicid indukálhatóságát Cummins és mtsai. (2003) vizsgálták meg. Hat fehérje katalitikus aktivitását határozták meg. Közülük három (*TaGSTF2*, *TaGSTF3* és *TaGSTF6*) magas GPOX aktivitással rendelkezik. *TaGSTF1*, *TaGSTF6* amellet, hogy magas konjugáló aktivitással rendelkeztek a CDNB szubsztráttal szemben.

A tau csoportú GSTk jelentős szerepet játszanak az oxidatív stressz elleni védekezésben is, hiszen az oxidatív stressz során termelődő másodlagos metabolitokkal szemben is mutatnak konjugáló aktivitást (Roxas és mtsai. 1997; Kilili és mtsai, 2004). Négy tau csoportba tartozó búza GSTt azonosítottak Thom és mtsai (2002), akik meghatározták ezek szubsztrátspecifitását is. Kiemelkedően magas CDNB bontó aktivitással rendelkezik a *TaGSTU2* fehérje. A *TaGSTU1* enzim egy stresszmetabolit analóggal (krotonaldehiddel) szemben mutat a tau csoport többi tagjához viszonyítva kiemelkedő konjugáló aktivitást, ami utal az oxidatív stressz elleni védekezésben betöltött szerepére.

1.1. táblázat: glutation transzferáz izoenzimcsalád csoportjainak elnevezése és jelölésük

GST csoportok	Gének jelölése
phi	GSTF
tau	GSTU
zéta	GSTZ
théta	GSTT
dehidroaszorbát reduktáz	GSTDHAR
lambda	GSTL
tetraklórhidrokinon dehalogenáz	GSTTCHQD
mikroszómális	GSTM

1.7.7 Gvajakol peroxidáz (ClassII peroxidase, GPOX 1.11.1.7)

Egy hem tartalmú protein család, mely széles körben előfordul az élővilágban, így az állatok, növények és mikrobák körében is. Négy konzervált diszulfid hidat tartalmaznak, és két Ca^{2+} iont. Sok izoenzyme fordul elő, ezek megtalálhatóak a vakuolumban, a sejt falban és a citoszolban. Sok folyamatban játszik szerepet, így például IAA degradációban, lignifikációban, etilén bioszintézisben, és a biotikus/abiotikus stressz elleni védekezésben (Gill és Tuteja, 2010).

Hatékony kioltóként működik reaktív oxigén köztesformák és peroxi gyökök esetén. Működése során előnyben részesíti az aromás elektrondonorokat, mint a gvajakolt vagy a pyrogallolt.

Szerepük van fuzárium fertőzésre adott válaszreakciókban is. Búza esetében a *Fusarium* fajok közül a legjelentősebben *F. graminearum*, *F. culmorum* és *F. oxysporum* emelte meg a növényi sejtek POD aktivitását (Gherbawy és mtsai, 2012).

1.8 Fuzárium fertőzés hatása a búza méregtelenítésére, antioxidáns védekezésére

A *Fusarium* fajokkal szembeni ellenállás kialakítása a búzában egyike az elsődleges feladatoknak, amiket a nemesítőknek meg kell oldaniuk. Ehhez azonban szükséges a háttérben lejátszódó molekuláris mechanizmusok ismerete, ami még napjainkban is sok hiányosságot tartalmaz.

A gombafertőzés különböző védekező mechanizmusokat indukál, de nem csak működésüket érdemes kutatni, hanem azt is figyelemmel kell követni, mely gének azok, melyek aktiválódnak egy-egy ilyen fertőzés során, illetve mik azok, amiket a növény elcsendesít a jobb védekezés érdekében.

Számos analízis eredményeit publikálták az elmúlt 10 évben, melyek a fuzárium fertőzés hatására megjelenő géneket, fehérjéket hivatottak azonosítani.

Közös vonásként lehet említeni többek között az antioxidáns védekezés és méregtelenítés elemeit. Zhou és mtsai 2005-ben mutatták ki a fuzárium indukálhatóságát SOD, CAT és DHAR enzimeknek és a méregtelenítő enzimek közül a GSTket emelték ki. A

növényi GST génekről korábban is kimutatták, hogy patogének által kiváltott fertőzések indukálják a regulációjukat (Dudler és mtsai, 1991). Így például *TaGSTA1*, *TaGSTF5* és *TaGSTF6* is nagyobb mennyiségben került átírásra, *F. graminearum* fertőzés alatt (Dudler és mtsai, 1991).

Ravensdale és mtsai 2014-ben megjelent publikációjukban a *F.graminearummal* kapcsolatos védekezési reakciók indukálhatóságát vizsgálták. A széles körű microarray kísérlet eredményeként egy újabb csoportját azonosították a búza védelmi génjeinek, melyek a fuzárium fertőzés hatására megemelkedett mRNS szintet mutatnak. Itt is szerepeltek a GST gének, III-as osztályú peroxidáz gének kíséretében.

2. Célkitűzések

Munkánk során azt tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk, milyen mechanizmusok játszódnak le a rezisztens és szenzitív búza vonalak zászlóslévélben *Fusarium* fertőzés alatt.

Kutatásaink során a következő kérdésekre kerestük a válaszokat:

1. Rezisztens és szenzitív búza vonalak esetén hogyan reagálnak a nem enzimatisz antioxidáns védekezési mechanizmusok a patogén fertőzésre?
2. Mely enzimatisz antioxidáns és méregtelenítő folyamatok erősödnek, illetve gyengülnek a fertőzés alatt?
3. Jelennek-e meg fehérje szinten változások a méregtelenítésben? És génexpresszió szintjén mely változások követhetőek nyomon?
4. Mely elemek teszik lehetővé a szisztematisz szerzett rezisztencia, illetve a fertőzés kialakulásával szembeni rezisztencia megjelenését?

3. Anyagok és módszerek

3.1. A növénynevelés és a kísérletek előkészítése

Kísérleteink során 4 különböző búza vonalat használtuk fel. 3 vonal egy keresztezés beltényesztett populációiból származott, melyeket a szegedi Gabonakutató Nonprofit KHT bocsátott a rendelkezésünkre. A két szülő, melyeket felhasználtak a keresztezéshez stressz rezisztens, széles körben termesztett fajták voltak: GK Mini Manó, mely szárrozsdával szembeni ellenállónak bizonyult és a Nobeoka Bozu, mely a leghatékonyabb fuzárium rezisztenciával rendelkező búzavonalak egyike pedigréjében megtalálhatóak a Wangshubai/Sumai3/Yangangfanzhou szülők. Ezen kívül egy fajta szerepelt még a vizsgálat vonalak mellett az extrém fuzárium ellenálló Sumai3.

A növényeket a szegedi Gabonakutató KHT munkatársai vetették és nevelték 3 egymást követő évben a tenyészkertben. A növényanyagokat ősszel (október közepe) vetették el a Gabonakutató tenyészkertjében (Szeged, Kecskés telep). 4 különböző vonalat vetettek el, mindegyiket külön, 1,5 m hosszúságú parcellákba.

A 4 vonal 4 különböző parcellában került vetésre, és két különböző kezelésben részesültek. Virágzás után a növényanyagot *Fusarium graminearum* és *Fusarium culmorum* izolátummal fertőzték, illetve mindenhol volt egy kontroll csoport.

A fertőzés a virágzást követően került sorra, de még a tejes érést megelőzően. A fertőző anyag előállítására 5-7 nap volt szükség, majd a gombaszuszpenziót a felhasználásig 4°C-on tárolták.

A fertőzés során az egyenletes fedettség érdekében kézi permetezővel juttattak 15-20 ml szuszpenziót 15-25 kalászból álló csokorra (3.1. kép). A növényeket *F. graminearum*, illetve *F. culmorum* izolátumokkal fertőzték. Az inokulációt követően a fertőző kalászcsoportokat polietilén zacskóval fedték le 48 órára (3.2. kép).



3.1. kép: Fuzárium szuszpenzióval történő fertőzés menete



3.2. kép: Az inokulációt követően a mintavétel a tejes (más néven zöld érés) fázisban történt, zászlóslevélből és kalászból.

3.1. Táblázat: A búza vonalak parcellaszámai és egységes elnevezésük

2. év	3. év (a)	3. év(b)	
474	2147	2017	Rezisztens 1
483	2148	2018	Szenzitív 1
488	2149	2019	Szenzitív 2
561 (Sumai3)	2151 (Sumai3)	2021 (Sumai3)	Rezisztens 2 (Sumai3)

A beltenyésztett vonalakat a parcellaszámok alapján azonosították a Gabonakutató KHT tenéyszkertjében. A különböző évek során a vonalak egymástól eltérő számokkal lettek jelölve (mivel más-más parcellákra kerültek), melyeket a könnyebb követhetőség érdekében átneveztük és egységesen Rezisztens1, Szenzitív1, Rezisztens2 és Szenzitív2 néven lesznek említve (3.1.Táblázat). A vonalak betegség ellenállóságáról előzetes GKI KHT tenéyszkertekben végzett kísérletek alapján kaptunk információkat. A mintavételt a zászloslevelekből végeztük kb. 11 nappal az antézis után és 8-9 nappal az inokuláció után.

3.2 Nem enzimatiszus antiozidánsok vizsgálata

3.2.1 Összes aszkorbát és a redukált aszkorbát tartalom meghatározása

A minta feltárásához 200 mg növényi anyagot dörzsöltünk el előhűtött dörzsmozsárban 1 ml 5%-os TCA-val (triklórecetsav). Ezután a homogenizátumot eppendorff csőbe gyűjtöttük, majd lecentrifugáltuk (4 °C-on, 6000 rpm, 20 perc). A felülúszót használtuk tovább a meghatározáshoz.

Redukált aszkorbát méréséhez 100 µl 75 mM-os foszfát puffert és 100 µl mintát pipettáztunk egy félkémcsőbe, majd ehhez 200 µl tisztított vizet adtunk. 500 µl 10%-os TCA-t mértünk bele. Ezek után 400 µl 43%-os foszforsavat, 400 µl 4%-os bipiridilt adtunk a reakcióhoz, majd keverés közben 200 µl 3%-os vas-kloridot adtunk hozzá. A csöveket ezt követően 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk, majd spektrofotométer segítségével 525 nm-en megmértük az OD-t.

Összes aszkorbát meghatározása során a 100 µl 75 mM-os foszfát pufferhez és 100 µl mintához 100 µl DTT-t (ditiotreitol) adunk és inkubáljuk 10 percig szobahőmérsékleten. Majd 100 µl 0,5%-os N-etil-malemidet adunk hozzá, és inkubáljuk 30 másodpercig, ezzel állítjuk le a DTT által katalizált reakciót. A reakcióelegy elkészítése ezek után megegyezik a redukált aszkorbátnál leírtakkal.

A méréshez tartozó standardot redukált aszkorbátból készítettük.

3.2.2 Összes glutation és oxidált glutation tartalom meghatározása

A növényi minták kezelése az aszkorbát meghatározásnál leírtak alapján történt. Az összes glutation méréséhez a felülúszóból 20 µl-t mértünk ki, ehhez 525 µl 0,1 M-os Na-foszfát puffert (pH 7,5) adtunk. Ezt követően 250 µl 1 mM-os DTNB-t, 200 µl 1 mM-os NAPH-t és 14,6 µl glutation reduktázt mértünk a küvettába. 30 másodperccel később 412 nm-en meghatároztuk az OD-t.

Oxidált glutation esetén a felülúszóból 100 µl-t vettünk ki, ehhez 2 µl 2-vinilpiridil-t adtunk. Ezt keverés követte, majd 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten a mintákat. Az inkubáció letelte után 25 µl-t kivettünk a reakcióelegyből, és az összes glutation mérésénél leírtaknak megfelelően folytattuk a minták vizsgálatát.

3.3 Enzimatiszus aktivitás meghatározása

3.3.1 Szuperoxid-dizmutáz (SOD)

A növényi mintákat jégen 1 ml extrakciós puffer (50 mM-os foszfát puffer) hozzáadása és mintánként 10 mg PVPP jelenléte mellett eldörzsöltük. Ezt követően 20 percen keresztül

centrifugáltuk (4 °C-on, 12000 g). A felülúszóból 50 µl-t, mint enzimkivonatot pipettáztunk át a küvetákba, majd hozzáadtunk 50 µl nitroblue tetrazóliumot (NBT), és 50 µl riboflavint. 15 perc inkubáció után 560 nm-en megmértük spektrofotométer segítségével a keletkezett formazin extinkcióját.

Az enzim aktivitását az NBT riboflavin jelenlétében történő fotokémiai redukciójának gátlása alapján határoztuk meg (Dhindsa és mtsai, 1981). Ebben az esetben egy enzimegység (unit) azt az enzimmennyiséget jelenti, amely a fény jelenlétében az NBT 50%-nak gátlására képes.

3.3.2 Kataláz (CAT)

A növényi mintákat a SOD-nál leírtak alapján kezeltük, majd az enzimkivonatból 100 µl-t, 50 mM-os foszfátpufferben, H₂O₂ hozzáadásával egy 3 ml-es végtérfogatú reakcióelegyben vizsgáltuk. Spektrofotométerrel 240 nm-en határoztuk meg pontosan a H₂O₂ bomlását az 1. és a 2. perc között mért extinkcióváltozásból.

3.3.3 Glutation reduktáz (GR)

A reakcióelegy a SOD-nál leírtak szerint kezelt 100 µl hajtás fehérjekivonatot, 50 µl 2 mM-os NADPH-t, 50 µl 20 mM-os GSSG-t (glutation-diszulfid) tartalmazott, 550 µl 200 mM-os foszfát pufferben (pH 7), 0,75 ml végtérfogatban. A reakció 250 µl 250 mM-os DNTB hozzáadásával indul, melyet a GR enzim által katalizált reakcióban keletkezett GSH redukál. Fél perc után kezdtük el az extinkcióváltozást mérni 412 nm-en az 1,6-dik perc végéig. Egy enzimmennyiség az az enzimmennyiség, mely 1 perc alatt 1 µmol GSSG redukcióját katalizálja (Smith és mtsai, 1988, Csiszár és mtsai, 2004).

3.3.4 Glutation transzferáz

A SOD-nál leírtak alapján előkészített fagyasztás nélküli enzimkivonatból 100 µl-t felhasználva készítettük el a reakcióelegyet. Az enzimen kívül 800 µl 100 mM-os foszfát puffert (pH 6,5), 50 µl 20 mM-os CDNB-t és 50 µl 20 mM-os GSH-t adtunk hozzá a reakcióelegyhez. A mérést 1,5 perc után kezdtük meg 340 nm-en, és 1,6 percen keresztül tartott.

3.3.5 Gvajakol peroxidáz (POD)

A mintákat a SOD-nál leírtak alapján kezeltük, az enzimaktivitás méréséhez. 25 µl fehérjekivonatot, 1%-os gvajakolt, 50 mM-os foszfát puffert (pH 7), 1 mM-os EDTA-t tartalmazó reakcióelegyünkhöz 1%-os H₂O₂-t adtunk, ezzel katalizálva a reakciót. Az enzim aktivitását 470 nm-en mért, 1 perc alatt bekövetkező növekedés alapján határoztuk meg. Enzimegységnek az 1 µmol tetraguaiakol képződését 1 perc alatt katalizáló enzimmennyiséget vettük (Upadhaya és mtsai, 1985).

3.3.6 RNS izolálás

A növényekből származó összes RNS preparálásra körülbelül 100 mg száraz növényi anyagot folyékony nitrogénnel és kvarc homokkal dörzscsészében homogenizáltuk. Ezután 1 ml TRI-reagenst (1,82 M guanidium izotiocianát, 11,36 mM nátrium-citrát, 200 mM kálium-acetát pH 4, 0,73 mM N-lauril-szarkozin, 44 mM β-merkaptoetanol, 45,45% fenol)

adtunk hozzá, majd 65 °C-on 3 percig inkubáltuk a mintákat. Inkubálás után 200 µl kloroformot tettünk hozzá és 3 perces centrifugálás után szobahőmérsékleten állni hagytuk. Majd újabb 15 perces centrifugálás (4 °C-on, 12000 g) következett. A felső vizes fázist 375 µl kloroform:izoamilalkohol (24:1) elegyet tartalmazó eppendorfba pipettáztuk át. Ismét centrifugálás (15 perc, 4 °C, 12000 g) következett, majd a felülúszót 500 µl izopropanolhoz adtuk és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

A felülúszót lepipettáztuk és a csapadékra 500 µl 70%-os etanolt tettünk, és ismét centrifugába (15 perc, 4 °C, 12000g) tettük a mintákat.

Az alkohol eltávolítását követően 30 µl DEP-es vízben feloldottuk az RNS-t (Chomczynski és Sacchi, 1987), mennyiségét 260 nm-en mért optikai denzitás pontos meghatározásával, spektrofotométer segítségével határoztuk meg. Az RNS mennyiségét és tisztaságát az OD₂₆₀/OD₂₈₀ és az OD₂₆₀/OD₂₃₀ arányok alapján számítottuk, illetve 1%-os agaróz gélben, elektroforézissel ellenőriztük.

3.3.7 DNáz kezelés és cDNS írás

Az össz növényi RNS preparálást Chomczynski és Sacchi (1987) szerint végeztük. 100 mg kiindulási anyagot dörzscsészében folyékony nitrogén és kvarchomok felhasználásával homogenizáltuk és hideg állapotban, ribonukleáz mentes környezet biztosításával, 1 ml feltárási pufferbe helyeztük. A feltárási puffer guanidinium izotiocianátot (1,822 M), nátrium-citrátot (11,36 mM), kálium-acetátot (200 mM, pH 4.0), *N-lauril-szarkozint* (0,7341 mM), β-merkaptóetanolt (44 mM), vízzel telített fenolt (45,45 %) tartalmazott. Az elegyet 65 °C-on 3 percig inkubáltuk, ezt követően legalább három percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Majd 5:1 (V:V) kloroform hozzáadása után 4 °C-ra előhűtött centrifugában 15 percig centrifugáltuk (10 000 x rpm, 10 845 g). A minták felülúszó részét átpipettáztuk egy-egy 750 µl kloroform: izopropil-alkoholt (24:1) tartalmazó Eppendorf csőbe. Újabb centrifugálás (15 perc 10 000 x rpm, 10 845 g) után a minták felülúszó részéhez egy újabb Eppendorf csőben 500 µl izopropanolt adtunk. Majd szobahőmérsékleten inkubáltuk legfeljebb 10 percig. Centrifugálás után, és az RNS csapadékot 70 %-os etanollal mostuk. A mosást követően 25 µl dietil-pirokarbonát (DEP) kezelt steril desztillált vízben feloldottuk az összRNS-t. Az RNS mennyiségét a 260 nm-en mért optikai denzitás meghatározásával, spektrofotométeren ellenőriztük (U-3310 Spectrophotometer, Hitachi, Tokio, Japán). A minták tisztaságára és minőségére az OD₂₆₀/OD₂₈₀ és az OD₂₆₀/OD₂₃₀ arányból következtettünk, illetve elektroforézissel (1%-os agaróz gélben) ellenőriztük az esetleges degradációt.

Az RNS minták genomi DNS szennyezettségétől való megtisztításához DNáz kezelést végeztünk. 12 µl RNS minta DNáz emésztését 40 µl végtérfogóban 4 µl 10x-es puffer és 4 U DNáz enzim (Fermentas) illetve 100 U Ribonukleáz inhibitor hozzáadásával oldottuk meg. Az elegyet 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd 65 °C-on inaktívtuk a Fermentas cég használati útmutatója szerint. Az elegyből a fehérjét 150-150 µl fenol, kloroform hozzáadásával elimináltuk, 15 perc 10 000 x rpm (10 845 g) centrifugálást követően egy újabb kloroformos tisztítási lépés után (1:1, v:v) a genomi DNS szennyeződéstől megtisztított össz RNS-t 109,09 mM-os Na-acetát és 96% etanol elegyével precipitáltuk. Az így nyert RNS

csapadékot 20 µl steril, DEP-kezelt desztillált vízbe visszaoldottuk, majd tisztaságát és mennyiségét a fent ismertetett módon ellenőriztük.

A tisztított RNS mintából összesen 1 µg-ot reverz transzkripcióval cDNS-sé alakítottunk random hexamer primerek (Biotium) segítségével. A reakciót 20 µl végtérfogóban végeztük, a gyártó (Fermentas, Burlington, Canada) utasításait követve. Első lépésben 5 percig 70 °C-ra hevítettük a templátot (2 µg), és a random hexamert (50 ng), majd 4 µl tömény reakciópuffer, 10 mM 4 dNTP mix (1 mM végkoncentráció) és 20 U ribonukleáz inhibitor hozzáadása után az elegyet 25 °C-on, 5 percig inkubáltuk. Ezután a reakcióhoz 200 unit reverz transzkriptáz enzimet adtunk, mellyel egy óráig inkubáltuk az elegyet 37 °C-on. A reakciót 10 perces 70 °C-os hevítéssel állítottuk le, amit ribonukleáz kezelés követett: 50 U ribonukleáz A hozzáadásával 37 °C-on 20 percig.

3.3.8 qRT-PCR

A vizsgált gének kifejeződését kvalitatív RT PCR technikával követtük nyomon. A kiválasztott génre az a Primer 3 szoftver (<http://frodo.wi.mit.edu/>) segítségével terveztük, a primereket táblázatban foglaltuk össze (3.2. táblázat). A szintetizált cDNS eket 1: 20 arányban hígítottuk nukleáz mentes vízzel. A reakcióelegy 20 µl végtérfogat volt, amiben az egyes oligonukleotidokat 150 µM végkoncentrációban voltak jelen, valamint 9 µl a hígított cDNSből és 10 µl a 2x SYBR Green PCR Master Mixből (Applied Biosystems, Foster City, California). Minden reakció esetében legalább három párhuzamos mérést végeztünk. A kvantitatív PCR-t MJ research PCR készülékkel és BioRad (Hercules, California) Real Time PCR Detektorral végeztük. A reakció 10 perces 90 °C-os hevítéssel kezdődött, majd 41 ciklus következett az alábbi paraméterekkel: 95 °C-on 15 másodperc és 60 °C-on 1 perc. A SYBRGreen festék fluoreszcencia intenzitását a ciklusok során minden amplifikációs lépés után detektáltuk Opticon Monitor szoftver segítségével (BioRad, Hercules, California). A PCR lefutását követően a termék specifikusságát olvadási görbe detektálásával ellenőriztük: 55 °C-tól 90 °C-ig (0,2 °C 0,2 s⁻¹). Az adatok analíziséhez a 2- $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztuk (Livak és Schmittegen, 2001). A kontroll értékei a transzkript szint relatív egységei. A referencia gének EF 1 és egy ismeretlen funkcióval rendelkező fehérjét kódoló gén (NP 1) voltak, amelyek konstitutív expressziót mutattak búza zászlóslevélben szemfeltöltődés alatt (Jukanti és mtsai. 2008). 2- $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztuk.

3.2. Táblázat: A kvantitatív RT-PCR-hez felhasznált oligonukleotidok

Acc. No	Név	Szekvencia (5'-3')
EF_1 (AK334915) F	EF	aacttcacctcccagggtcat
EF_1 (AK334915) R		gtcaccagctcaggcaaactt
NP_1 (AK335868) F	NP	ccaagacgaagcagaacaga
NP_1 (AK335868) R		acacatccaacgcaagagagaa
AJ414698 F	GSTU1B	cggagggaaggaacaaataa
AJ414698 R		cactgactgaccaaccaac
AJ414699 F	GSTU1C	ggtagttgttggtttggtagtgtga
AJ414699 R		gcaggtggcaacacttgaca
AJ414700 F	GSTU2	ccgtgctcgcttggat
AJ414700 R		ggcctgagctctgtgtgtt
X56004 F	GSTA2	ttcagtgcatcatcattcc
X56004 R		ccttcacctgggggtactca
AY064481 F	GST19E50	agcagcaaccaagggaataat
AY064481 R		cgccacgttcgtcgacatg
AF002211 F	GSTZ	atgagagccttgaggtggtt
AF002211 R		cacacatctcccaatggac
AJ441055 F	GSTF6	caagaagccgtgatttgcta
AJ441055 R		gcgacaccaacaagaaaaga
AY857756 F	Prx2	cggctcggttctgctg
AY857756 R		gcgtctggttcggcttc

3.3.9. Statisztikai kiértékelés

A kísérleteket minimum két biológiai ismételtsben végeztük el, legalább 3-3 párhuzamos méréssel. A dolgozatban bemutatott adatok egy reprezentatív kísérlet adataiból számított átlag értékek a hozzá tartozó szórással (standard deviancia, $\pm$ SD). Amennyiben az SD értékek kisebbek, mint az adatot jelző jelölés, az ábrákon nincsenek feltüntetve.

A kontrolltól való szignifikáns különbségeket Student-féle *t*-teszttel állapítottuk meg $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**) vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken.

4. Eredmények és értékelésük

Kísérleteinkhez 4 búza vonalat használtunk fel (2 vonal rezisztens, 2 vonal szenzitív), melyeket virágzás után fertőztünk *Furásium graminearum* illetve *F. culmorum* izolátumokkal. A mintavétel zászlóslevelekből történt, a teljes érést követően.

A fertőzés szemmel látható tüneteket produkált a kalászon a két szenzitív és ez egyik rezisztens vonalnál (ezek a búzavonalak származtak a GK Mini ManóxNobeokabozu keresztezéséből), míg Sumai3 vonal (Rezisztens2) teljes rezisztenciával rendelkezett, ezen a vonalon nem volt látható a fertőzés.

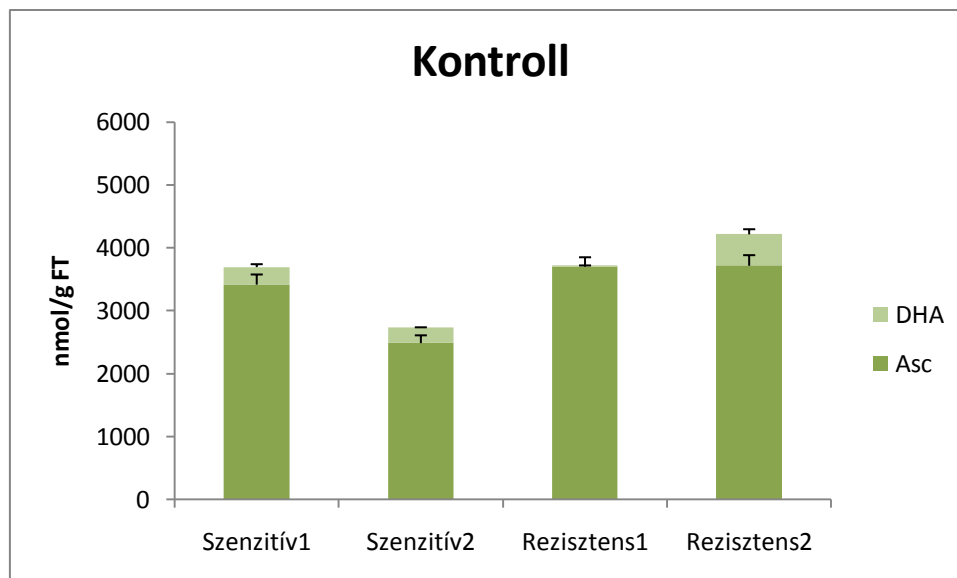
A kísérletek során egyaránt vizsgáltuk a zászlós levélen a nem enzimátikus (aszkorbát, glutation tartalom) és az enzimátikus antioxidáns rendszereket (SOD, CAT, GR, GST, GPOX), illetve a fertőzés hatására bekövetkező változásokat a génexpresszió szintjén is GST gének és egy peroxidáz gén esetében.

4.1 *Fuzárium* fertőzés hatása az aszkorbát és glutation tartalomra

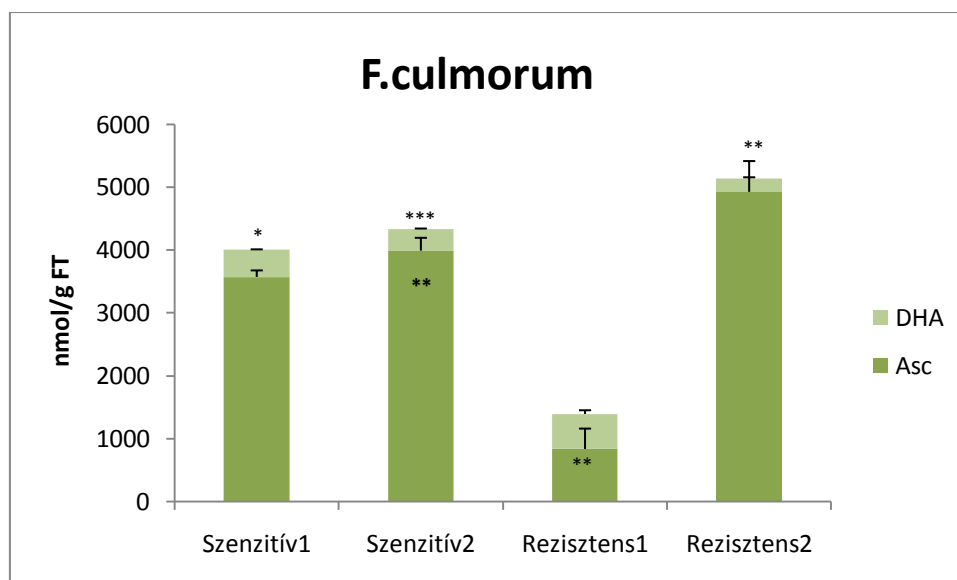
Az aszkorbát és glutation a nem enzimátikus antioxidánsok közül kiemelkedő szerepet játszanak mind biotikus, mind abiotikus stresszhatások esetén. Oxidált és redukált formájuk, illetve ezek arányának változása fontos információforrás a növényt érő stresszhatás mértékét illetően, valamint a védekező képesség markere.

A kontroll növények esetében a Rezisztens2 (Sumai3) vonalnál látható a legmagasabb összes aszkorbát tartalom, és a legmagasabb oxidált aszkorbát tartalom, míg a legkevesebb a Szenzitív2 vonalnál figyelhető meg (4.1. ábra). A kezelést követően az esetek többségében a redukált aszkorbát mennyisége szignifikáns emelkedést mutatott, főleg a Rezisztens2-nél, a dehidroaszkorbát mennyisége egyértelműen nőtt a Szenzitív1 vonalnál mind a két *Fusarium* faj fertőzését követően, míg a Szenzitív1-nél csak a *F. culmorum* indukált növekedést, a *F. graminearum* nem (4.2. ábra és 4.3. ábra).

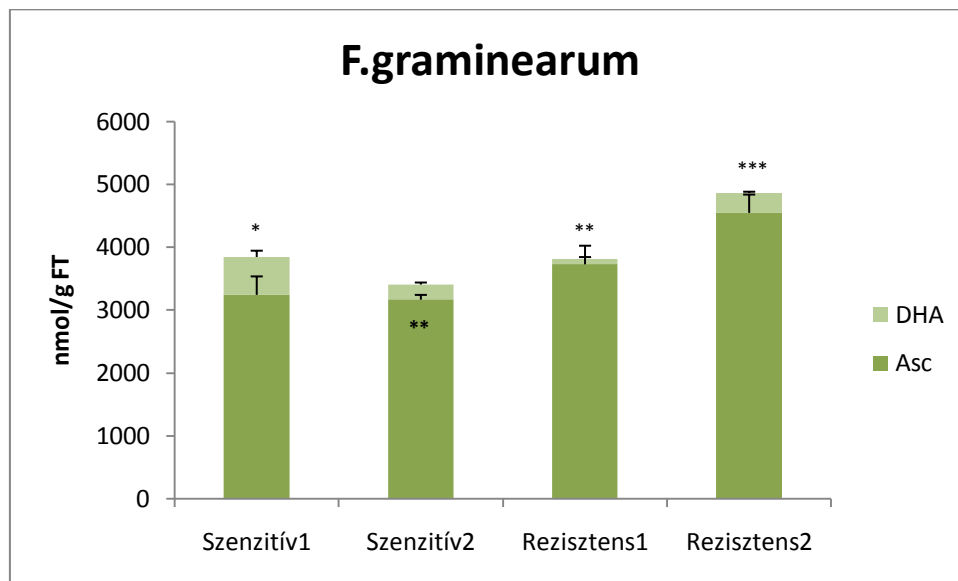
Az aszkorbát a reaktív oxigén fajták termelődése esetén védelmi funkciót lát el a növényben. Ahol megnövekedett a dehidroaszkorbát tartalom (Szenzitív1, Szenzitív2), ott a reaktív oxigén fajták vélhetőleg nagyobb mennyiségben termelődtek, ezért több aszkorbát alakult át. A Sumai3 (Rezisztens2) egy, a fertőzés kialakulásával szemben is rezisztenciát mutató nemesített vonal, mely a patogén fertőzésnek képes ellenállni. Feltehetően a fejlett védekező mechanizmusának része a kontroll esetben is magasabb aszkorbát tartalom és annak indukálhatósága elicitor jelenlétében.



4.1. ábra: Kontroll búza növények (GK Mini ManóxNobeokabozu beltenyésztett vonalak: Szenzitív1,2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek aszkorbát tartalma. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$). A *-gal jelölt változás a dehidroaszkorbát értékekre vonatkozik, míg a *-gal jelölt változások az aszkorbát értékekre vonatkoznak.



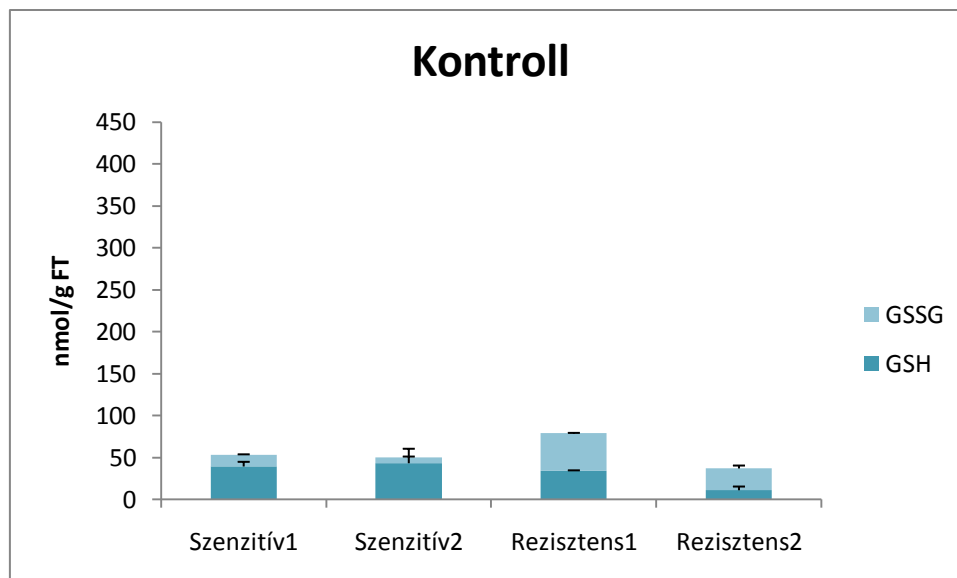
4.2. ábra: *Fusarium culmorum* búza növények (GK Mini ManóxNobeokabozu beltenyésztett vonalak: Szenzitív1,2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek aszkorbát tartalma. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$). A *-gal jelölt változás a dehidroaszkorbát értékekre vonatkozik, míg a *-gal jelölt változások az aszkorbát értékekre vonatkoznak.



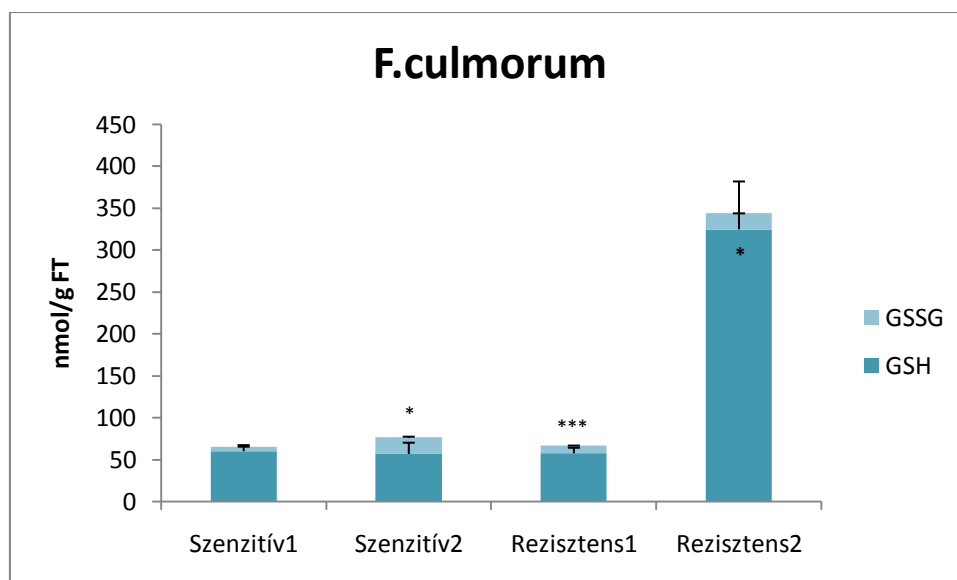
4.3. ábra: *Fusarium graminearum* fertőzött búza növények (GK Mini ManóxNobeokabozu beltenyésztett vonalak: Szenzitív1,2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek aszkorbát tartalma. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$). A *-gal jelölt változás a dehidroaszkorbát értékekre vonatkozik, míg a *-gal jelölt változások az aszkorbát értékekre vonatkoznak.

A glutation tartalom a kontroll növényeknél alacsony szintet mutatott, az oxidált glutation a két rezisztens vonal esetén mutatott magasabb értéket (4.4. ábra).

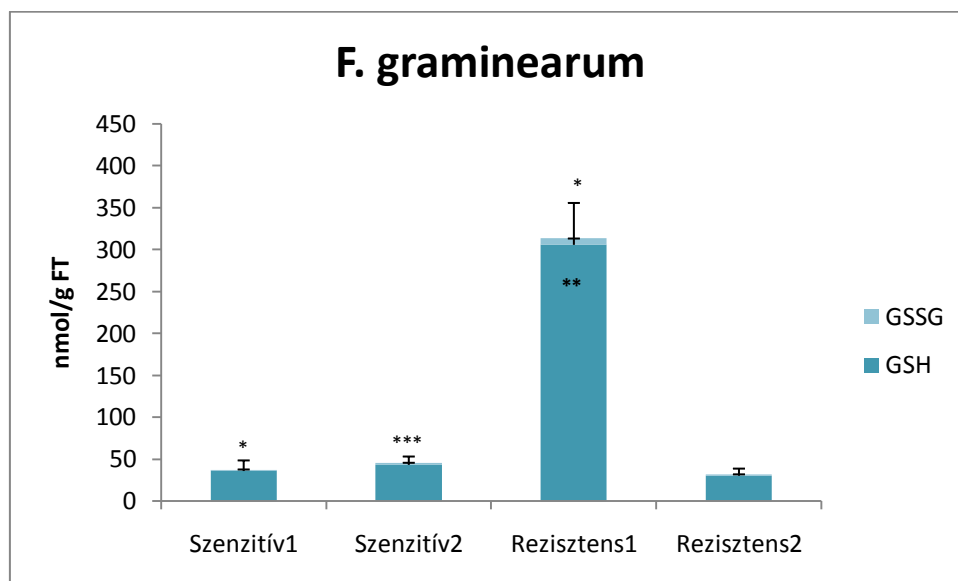
A *F. culmorum* fertőzés a Szenzitív1, Szenzitív2 és Rezisztens2 vonal esetén emelte meg szignifikánsan a glutation tartalmat, és minden növény esetén csökkentette az oxidált glutation szintet (4.5. ábra). *F. graminearum* fertőzés alatt a Rezisztens1 mutatott kiugró értékeket, illetve a többi minta esetén az oxidált glutation is növekedést mutatott (4.6. ábra). Valamint látható, ahol a glutation nagyobb mennyiségben található meg, ott az dehidroaszkorbát tartalom kisebb, a redukált aszkorbáthoz képest.



4.4. ábra: Kontroll búza növények (GK Mini ManóxNobeokabozu beltenyésztett vonalak: Szenzitív1,2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek glutation tartalma. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$). A *-gal jelölt változás az oxidált glutation értékekre vonatkozik, míg a *-gal jelölt változások a redukált glutation értékekre vonatkoznak.



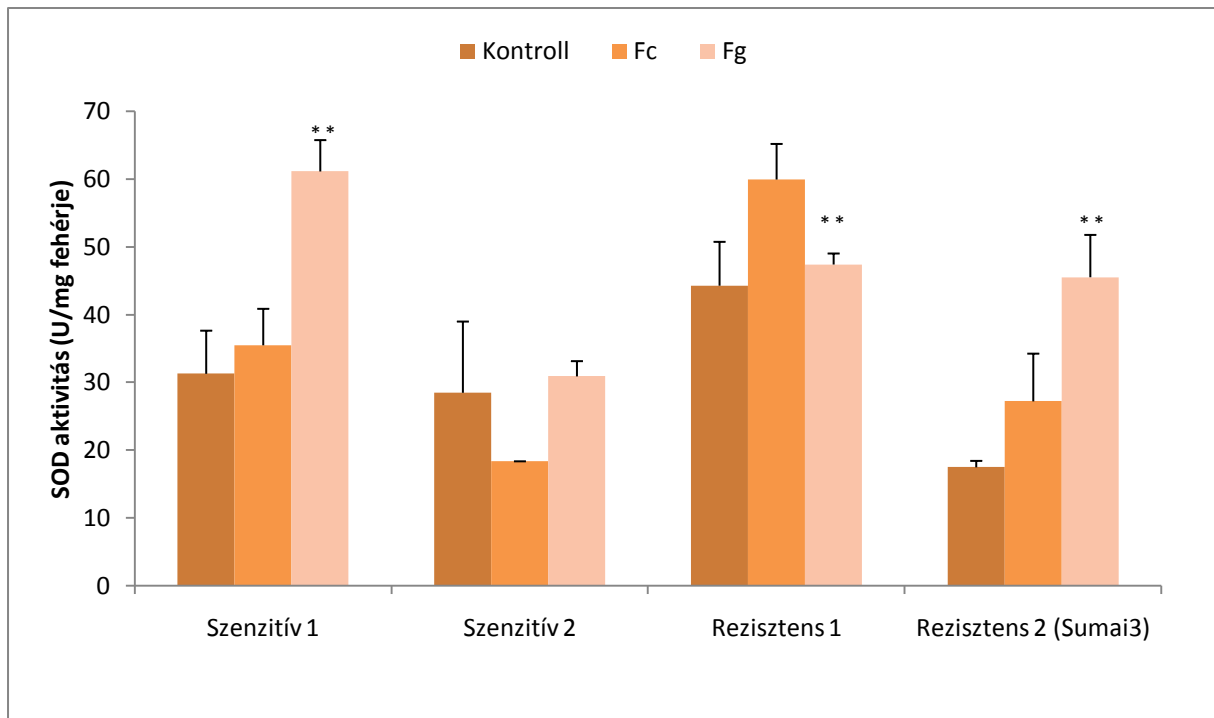
4.5. ábra: *Fusarium culmorum* búza növények (GK Mini ManóxNobeokabozu beltenyésztett vonalak: Szenzitív1,2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek glutation tartalma. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$). A *-gal jelölt változás az oxidált glutation értékekre vonatkozik, míg a *-gal jelölt változások a redukált glutation értékekre vonatkoznak.



4.6. ábra: *Fusarium graminearum* fertőzött búza növények (GK Mini Manóxnobeokabozu beltenyésztett vonalak: Szenzitív1,2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek glutation tartalma. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik (n=3). A *-gal jelölt változás az oxidált glutation értékekre vonatkozik, míg a *-gal jelölt változások a redukált glutation értékekre vonatkoznak.

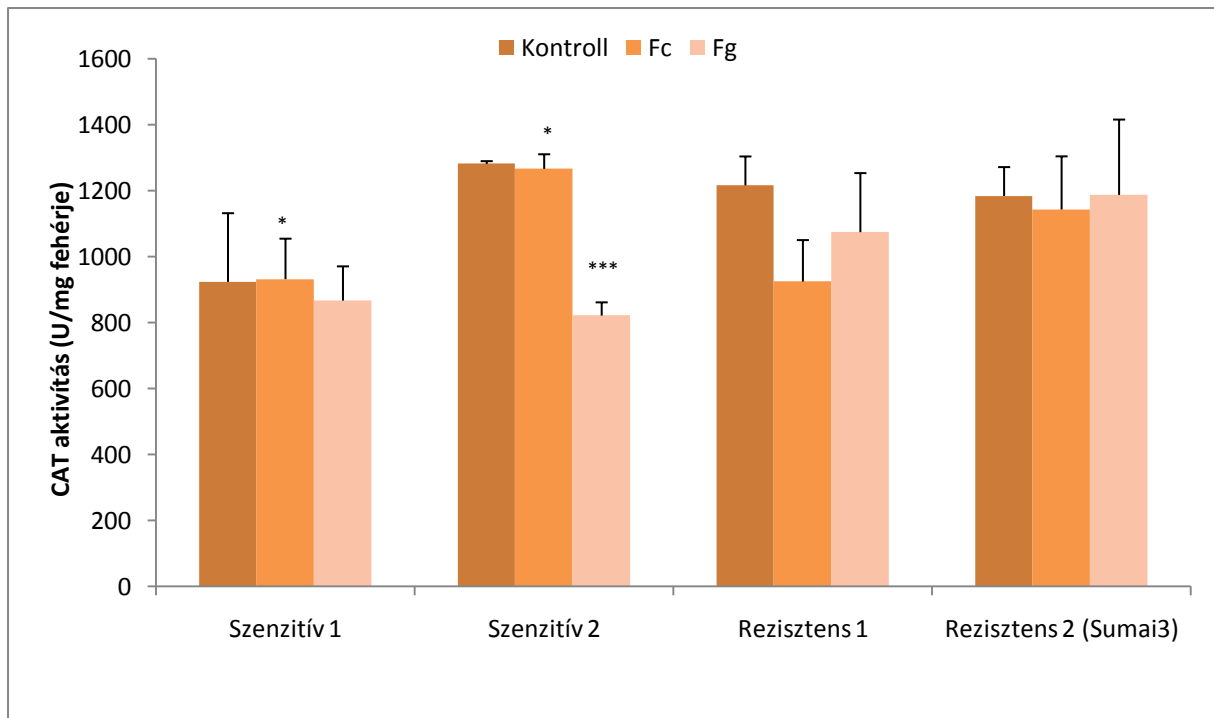
4.2 Fertőzés hatása az enzimatisz rendszerekre

Szuperoxid-dizmutáz enzim a kontroll növények esetén Rezisztens1-nél mutatta a legnagyobb aktivitást, míg a legkisebbet a Rezisztens2-nél. A fertőzéseket követően a *F. culmorum* hatására működése a Rezisztens1-nél nőtt szignifikánsan, míg *F. graminearum* esetén a Szenzitív1-nél láthatunk kiugró aktivitást (4.7. ábra). A szuperoxid-dizmutáz az egyike azon kulcsenzimeknek, melyek H_2O_2 termelésében játszanak szerepet. Több kutatócsoport is kimutatta, hogy működése megnövekszik búzában *Fusarium* fertőzés hatására, ezzel előidézve a H_2O_2 mennyiségében bekövetkező robbanásszerű növekedést, melynek számos hatása van a patogén fertőzések esetén (Zhou és mtsai, 2005, Zhang és mtsai, 2013).



4.7. ábra: Kontroll, *Fusarium culmorum* és *Fusarium graminearum* fertőzött búza növények (GK Mini ManóxNobeokabozu beltenyésztett vonalak: Szenzitív1,2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek SOD aktivitása. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

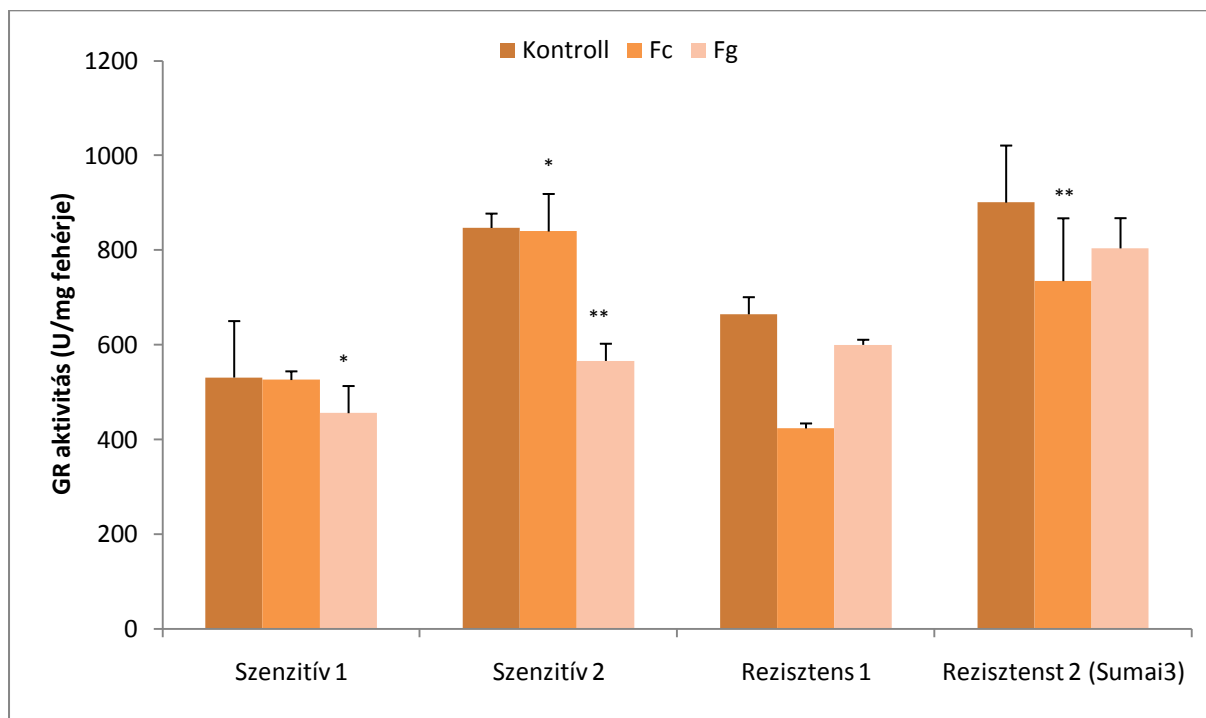
Kataláz aktivitása a kontroll növények esetén a Szenzitív1 vonalnál mutatta a legalacsonyabb értékeket. A másik szenzitív vonal esetében csökkenést tapasztaltunk *F.graminearum* fertőzés hatására (4.8. ábra).



4.8. ábra: Kontroll, *Fusarium culmorum* és *Fusarium graminearum* fertőzött búza növények (GK Mini ManóxNobeokabozu beltenyésztett vonalak: Szenzitív1,2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek CAT aktivitása. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik (n=3).

Glutation-reduktáz a kontrollok esetében a Szenzitív2 és Rezisztens2 esetén mutatott kiugró aktivitást. A kezelések után minden esetben csökkent az enzim működése, *F. culmorum* Rezisztens1 esetén, míg *F. graminearum* Szenzitív2-nél okozott nagyobb csökkenést.

Az enzim oxidált glutation redukcióját végzi el NADPH koenzimmel, ezzel emelve a redukált glutation tartalmát, ezáltal fontos enzime az aszkorbát-glutation ciklusnak (4.9. ábra).

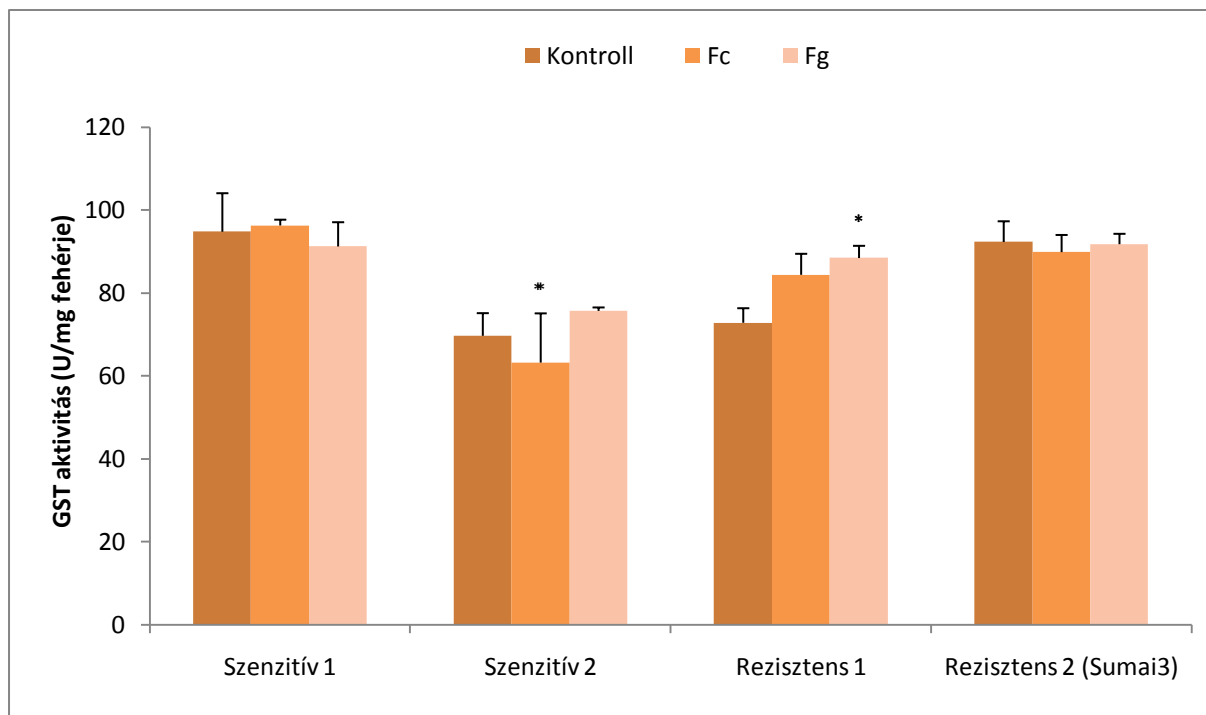


4.9. ábra: Kontroll, *Fusarium culmorum* és *Fusarium graminearum* fertőzött búza növények (GK Mini ManóxNobeokabozu beltenyésztett vonalak: Szenzitív1,2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek GR aktivitása. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

A GST enzim sokrétű funkcióval bír az élővilágban, melyek lehetnek enzimátikusak és nem enzimátikusak. Enzimátikus például a detoxifikáló képessége, mely során a glutation-S-transzferáz képes konjugátumok képzésére a növény számára toxikus anyagok esetén, melyhez glutationt használ fel. A gomba által termelt mikotoxinok aktiválhatják a működését.

A CDNB szubsztráttal mérhető glutation-S-transzferáz aktivitás fuzárium fertőzés után megemelkedett a Rezisztens1 vonalban (4.10. ábra). Irodalmi adatok igazolják, hogy GST aktivitás nőtt a búzakalászban *Fusarium* inokuláció után, s az enzim működése akár 1,5 nagyobb is lehetett a rezisztenciát mutató Sumai3-ban, mint más vonalban (Mohammadi és mtsai, 2000).

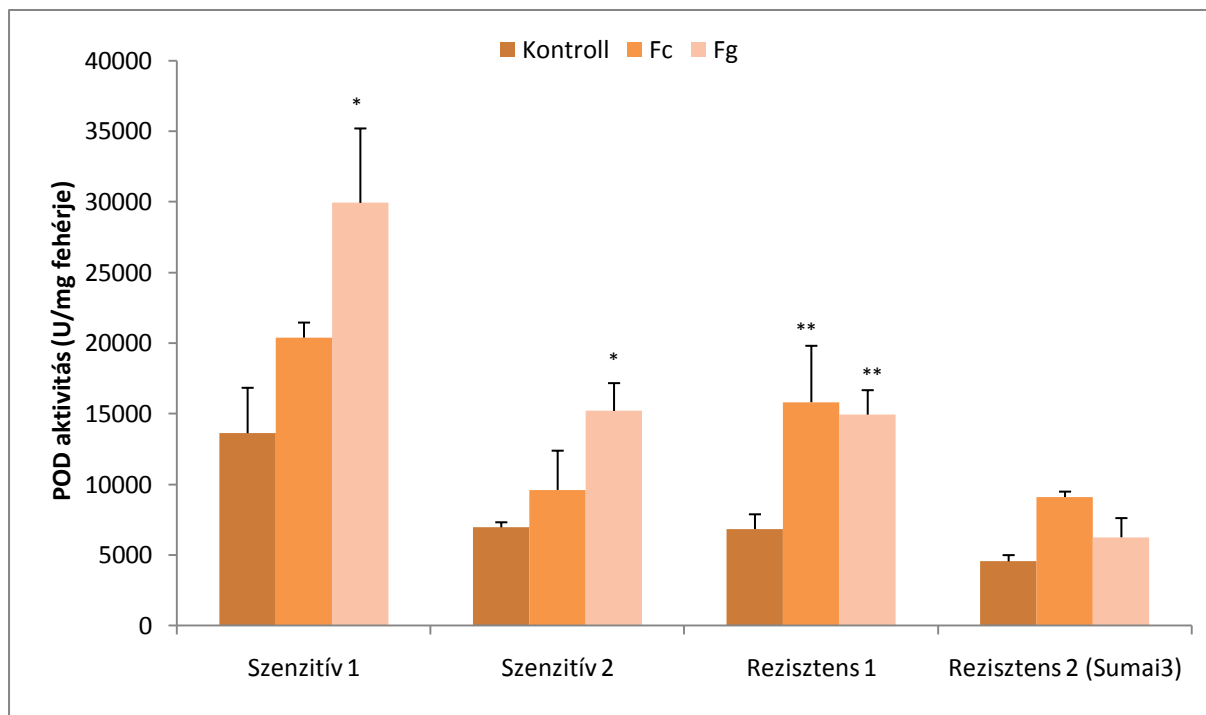
A látható fertőzéssel rendelkező és rezisztens vonal esetében a méregtelenítés indukciója részét képezheti a szisztematikus szerzett rezisztenciának, mely elicitor jelenlétben jöhet létre a hiperszenzitív reakció kíséretjeként. Az aktivitás állandósága a teljes rezisztenciával rendelkező vonalnál és a két szenzitív vonalnál a méregtelenítés szükségtelenségére illetve annak csökkent hatékonyságára utal.



4.10. ábra: Kontroll, *Fusarium culmorum* és *Fusarium graminearum* fertőzött búza növények (GK Mini ManóxNobeokabozu beltenyésztett vonalak: Szenzitív1,2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek GST aktivitása. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), $0,01$ (**) vagy $0,001$ (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

Gvajakol-peroxidáz kontroll körülmények között Szenzitív1-nél mutatta a legmagasabb értékeket. Fertőzés után megemelkedett az aktivitás értéke minden vonalban. A teljes rezisztenciával rendelkező, láthatóan nem fertőződött Sumai3 vonal esetében volt a legalacsonyabb a változás az inokuláció hatására (4.11. ábra).

Legmagasabb értékeket azon növényeknél mutattuk ki, melyek nagyobb érzékenységet mutattak a fertőzés iránt. Ez lehet annak az oka, hogy a bennük nagyobb hatékonysággal működő peroxidáz a védekezésként termelt H_2O_2 -ot semlegesítette, míg a rezisztenciát mutató vonalakban jóval kisebb hatékonysági fokkal működött.



4.11. ábra: Kontroll, *Fusarium culmorum* és *Fusarium graminearum* fertőzött búza növények (GK Mini ManóxNobeokabozu beltenyésztett vonalak: Szenzitiv1,2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek POD aktivitása. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), $0,01$ (**) vagy $0,001$ (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

4.3 Fertőzés hatására bekövetkező génexpressziós változások

Fuzárium fertőzés hatására a GST enzimes család aktivitás és expressziós szintű indukciója ismert, azonban kevésbé kutatott terület, hogy a zászlóslevélben az izoenzimes család mely tagjai köthetők a tolerancia, rezisztencia kialakításához.

A kísérletek során 7 gén expressziós változását vizsgáltuk: *TaGSTU1B*, *TaGSTU1C*, *TaGSTU2*, *TaGSTA2*, *TaGST19E50*, *TaGSTZ*, *TaGSTF6*, *TaPrx2*. Ezen gének a phi-, tau-, és zéta-csoportokba tartoznak.

A *TaGSTU1B*, *TaGSTU1C* a tau csoportba, a *TaGSTZ* a zéta csoportba, a *TaGST19E50* pedig a phi csoportba tartozik. A vizsgálatainkhoz két phi csoportú szekvenciát választottunk: az előzőeken megemlített *TaGST19E50* mellett a *TaGSTF6* gént. A *TaGSTF6* szubsztrát specifikitását Cummins és mtsai. (2003) határozták meg, amely magas konjugatív aktivitást mutatott oxidatív stressz metabolit analógokkal szemben. Az expressziós vizsgálatokba bevontuk a *TaGSTZ* gént és a *TaGSTA2*-t, amely nagy szekvencia hasonlóságot mutatott egy patogén indukált GST génhez (Dudler és mtsai, 1991)

Tau-csoporton belül a kontroll növényeknél a Szenzitiv2-nél a *TaGSTU1B* expressziója a legmagasabb, míg a többi vonalnál viszonylag alacsony értékek tapasztalhatók. Kezelés hatására legtöbb esetben mind *F. culmorum*, mind *F. graminearum* esetén a

génexpresszió növekedése mutatható ki. A legkisebb mértékű változás a Reziszten2 vonalnál tapasztalható, míg a legnagyobb Rezisztens1-nél látható (4.3. ábra).

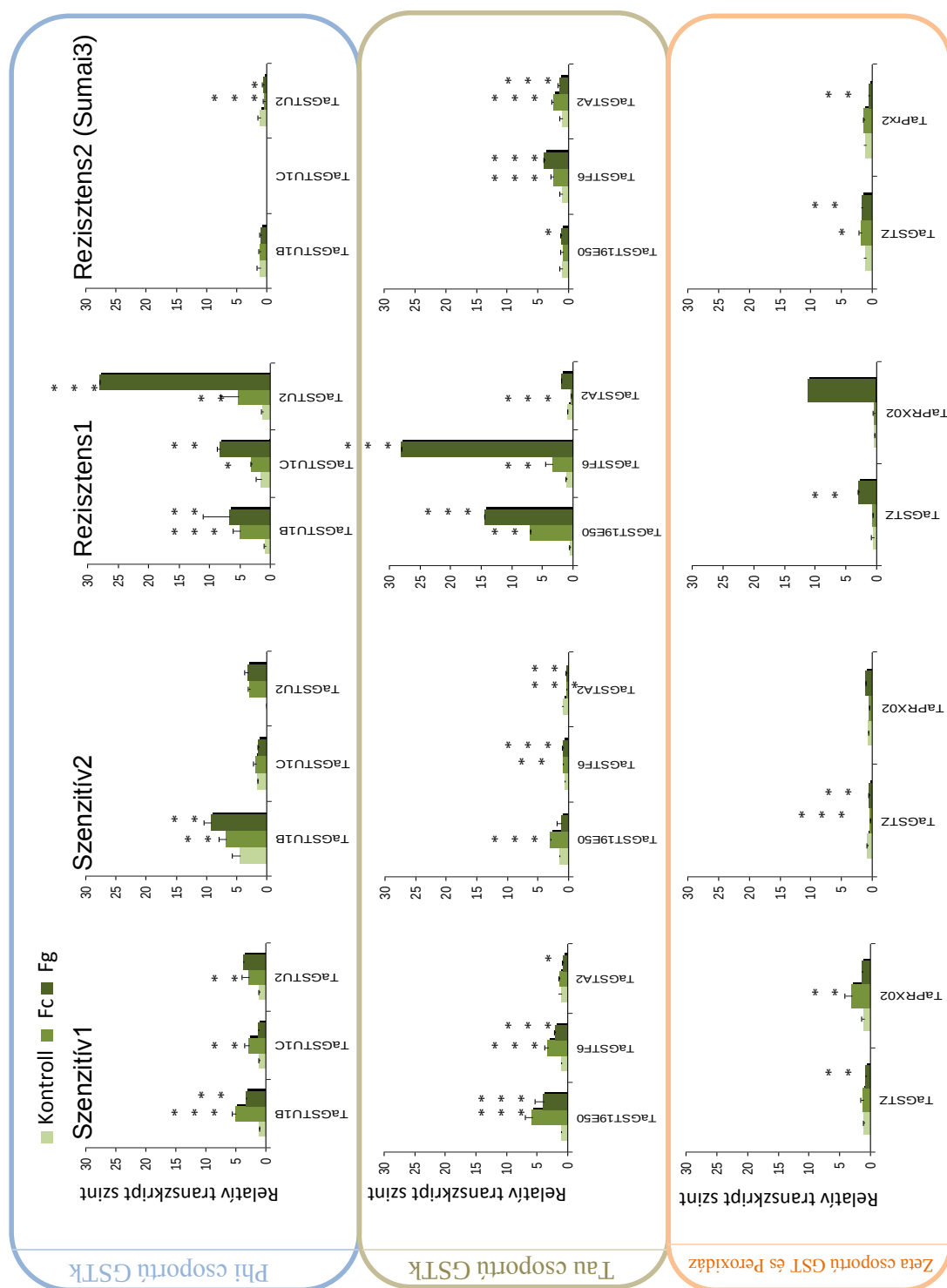
A Phi-csoportba tartozó GST-k expressziója minden esetben nőtt a patogén fertőzést követően, itt is leginkább a Rezisztens1 vonalnál tapasztalható nagymértékű növekedés az expresszió esetén, míg a legkisebb a Szenzitív2 vonalnál a *TaGSTF6* és a *TaGSTA2* géneknél tapasztalható (4.3. ábra)

Zéta csoportnál alacsony transzkripciószint figyelhető meg minden vonalnál, mely fertőzés hatására is csak minimális eltérést mutatott. Peroxidáz expressziója fertőzés hatására megemelkedett, főleg Rezisztens1-nél (4.3. ábra).

Ezek az értékek az össz GST aktivitáshoz hasonlóan alakultak különösen a jelentős CDNB konjugáló aktivitással rendelkező izoformák esetében. Kiemelik a tau és phi csoportú GSTk jelentőségét a szisztematikus szerzett rezisztenciában, mely Rezisztens1-es vonalnál láthatóan sikeresen aktiválódott.

A patogén támadás elleni védekezésben szerepet játszó Prx2 (Liu és mtsai, 2005) hasonlóan a GSTkhez *F. graminearum* inokulációt követően jelentősen megemelkedik a Rezisztens1 vonalban.

A hiperszenzitív reakciótól távolabbi szövetek védekezési reakcióiban (illetve a szisztematikus szerzett rezisztenciában) a vizsgált gének közül eredményeink alapján a *TaGSTU1B*, *TaGSTU1C*, *TaGSTU2*, *TaGST19E50*, *TaGSTF6* GST géneknek és a *TaPrx2* peroxidáz génnek van jelentős szerepe, melyek hatékony és nagyfokú indukciója a rezisztencia jelentős komponensének bizonyult a vizsgált hozam alapján rezisztensnek minősülő vonalban.



4.12. ábra: Kontroll, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* fertőzött búza növények (GK Mini ManóNobeokabozó) beltenyésztett vonalak: Szentivér1, 2 és Rezisztens1 és Sumai3: Rezisztens2) zászlós leveleinek a GST és PRX transzkript szint változása. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik (n=3). A transzkript szint relatív egysége a Szentivér1 vonal kontroll mintájában mért érték (=1).

5. Összefoglalás

A kalászfuzáriózis napjainkban is komoly problémákat okoz, ezért fontos szerepet kap a vele szemben ellenállóságot mutató kultúrnövényeink nemesítése, a bennük megtalálható védekező mechanizmusok pontosabb megismerése és erősítése, mint például a szisztematikus szerzett rezisztencia kialakítása, fenntartása, illetve a fertőzés bekövetkeztével szembeni rezisztencia kialakítása. Noha számos tanulmány foglalkozik a búzakaralásban illetve gyökérben bekövetkező enzimatis és nem enzimatis változásokkal a fertőzés létrejötte után, a zászlslevélben lezajló folyamatok kevésbé ismertek, annak ellenére, hogy kiemelkedő szerepet játszik a szemfeltöltődés során, így a termés minőségét is meghatározza az állapota. Kísérleteink céljából tűztük ki a zászls levelekben lezajló folyamatok vizsgálatát, a szisztematikus szerzett rezisztencia bizonyos, méregtelenítéssel kapcsolatos elemeinek azonosítását.

Kísérleteinkhez 4 búza vonalat használtunk fel (2 vonal rezisztens, 2 vonal szenzitiv), melyeket virágzás után fertőztünk *Furásium graminearum* illetve *F. culmorum* izolátumokkal. A mintavétel zászlslevelekből történt, a teljes érést követően. A kísérletek során egyaránt vizsgáltuk a nem enzimatis (aszkorbát, glutation tartalom) és az enzimatis antioxidáns rendszereket (SOD, CAT, GR, GST, GPOX), illetve a fertőzés hatására bekövetkező változásokat a génexpresszió szintjén is GST gének és egy peroxidáz gén esetében.

A redukált aszorbát tartalom az inokulációt követően nőtt a különböző érzékenységet mutató vonalakban, legnagyobb mértékben a Sumai3-ban, míg a szenzitiv növényekben jóval kisebb mértékű az eltérés a kontrollokhoz képest. A két szenzitiv vonal között látható különbség a fertőzések hatására.

Glutation mennyisége szignifikáns növekedést mutatott a patogén megjelenése után, főként a redukált formája, míg az oxidált glutation mennyisége inkább csökkent. Az antioxidáns enzimműködésben is változások tapasztalhatóak patogén fertőzés hatására:

Szuperoxid-dizmutáz aktivitása nőtt a kontroll növényekéhez képest, amely jól korrelál az eddigi irodalmi adatokkal, több publikáció SOD aktivitás emelkedésről számol be a különféle növényfajokban biotikus stressz hatására (Zhou és mtsai, 2005, Zhang és mtsai, 2013). A fertőzéseket követően a *F. culmorum* hatására működése a Rezisztens1-nél nőtt jelentősen, míg *F. graminearum* esetén a Szenzitiv1-nél láthatunk kiugró aktivitást.

Kataláz aktivitása a legtöbb esetben csökkenést mutatott a patogén hatására, ez magyarázható a többi kioltó mechanizmus nagyobb fokú aktivizálásával.

A glutation-S-transzferáz aktivitás fuzárium fertőzés után megemelkedett a Rezisztens1 vonalban. Irodalmi adatok igazolják, hogy GST aktivitás nőtt a búzakaralásban *Fusárium* inokuláció után, s az enzim működése akár 1,5 nagyobb is lehetett a rezisztenciát mutató Sumai3-ban, mint más vonalban (Mohammadi és mtsai, 2000).

Gvajakol peroxidáz aktivitása a fertőzés után *F. culmorum*-nál a legnagyobb növekedést Rezisztens1-nél mutatta, míg *F. graminearum*-nál Szenzitiv1-nél láthatunk kimagasló értékeket. Az enzim feladata alapesetben szintén a hidrogén-peroxid eliminálása.

Az össz. GST aktivitáshoz hasonlóan alakultak a génexpressziós adatok, melyek kiemelik a tau és phi csoportú GSTk jelentőségét a patogén elleni védekezésben, mely Rezisztens1-es vonalnál nagyobb mértékben aktiválódott, mint a két szenzitiv vonalnál.

A patogén támadás elleni védekezésben szerepet játszó *TaPrx2* (Liu és mtsai, 2005) hasonlóan a GSTkhez *F. graminearum* inokulációt követően jelentősen megemelkedik a Rezisztens1 vonalban.

A szisztematikus szerzett rezisztenciában a vizsgált gének közül eredményeink alapján a *TaGSTU1B*, *TaGSTU1C*, *TaGSTU2*, *TaGST19E50*, *TaGSTF6* GST géneknek és a *TaPrx2* peroxidáz génnek van jelentős szerepe, melyek hatékony és nagyfokú indukciója a rezisztencia jelentős komponensének bizonyult a vizsgált hozam alapján rezisztensnek minősülő vonalban.

Az eredményeket összefoglalva elmondható, hogy a patogén indukálta fertőzésekkel szembeni védekezés egyik kulcspontja a reaktív oxigén fajták mennyiségének növelése, ezáltal a hiperszenzitív reakció kialakítása, mely a szisztematikus szerzett rezisztencia kialakulásához vezet. Fontos szerepet töltenek be még a rezisztencia kialakításában a glutation-S-transzferázok is, melyek fertőzés alatti expressziója ugrásszerű növekedést mutatott a fertőződött, de hozam alapján rezisztens vonalban.