

A utóbbi évtizedben Magyarország körtetermése folyamatosan csökkent. Ennek egyik oka, hogy a körte az ökológiai körülményekre az egyik legérzékenyebben reagáló gyümölcsfajunk, 2001 és 2002-ben pl. 80-100% közötti virágfagykárt regisztráltak az ország különböző pontjain. Az almatermésű növényeknél ezen kívül a legkomolyabb problémát mégis az *Erwinia amylovora* okozta tűzelhalás betegség jelenti, melyre a körtefajták nagy része fogékony. Kutatási munkánkban az abiotikus stresszhatások közül a fagy hatásával, illetőleg a biotikus stresszhatások közül az *Erwinia amylovora* baktérium okozta fertőzés utáni biokémiai változásokkal foglalkoztunk. Kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a körtefajokban, fajtákban (fajhibridekben) kimutathatók-e olyan rezisztencia faktorok, melyek kompenzálják a biotikus és abiotikus stressz hatásait. Olyan összefüggéseket kerestünk, amelyek a későbbiekben felhasználhatók lehetnek a legmegfelelőbb fajta kiválasztásában a gazdasági károk csökkentése érdekében.

Az **abiotikus stressz** követésére 2002-2006 között különböző európai- (*Pyrus communis* L. – 'Packham's Triumph', 'Bosc kobak'), japán körtefajták (*P. pyrifolia* Nakai - 'Hosui', 'Nijisseiki'), valamint a 'Packham's Triumph' x 'Nijisseiki' (NP kóddal), illetve 'Packham's Triumph' x 'Hosui' (HP kód) hibridek és a 'Kieffer' (*P. pyrifolia* és *P. communis* fajokból származó) fajta fagyűrését vizsgáltuk. Kísérleteinkhez az irodalmi adatok alapján eltérő fagyűréssel rendelkező fajtákat választottunk. A Packham's Triumph és a Kieffer fajtát jó fagyűrőként tartják számon, a Bosc kobak pedig az irodalmi adatok szerint fagyérzékeny. Tisztázni szeretnénk volna a fajták, valamint az eltérő genotípusok fagyűrését és a fagy hatására lejátszódó biokémiai folyamatokat. Ehhez követtük a fajták termőrügyeinek fejlődését a nyugalmi időszakban, vizuális elemzéssel meghatároztuk a fagy hatására bekövetkező termőrügyek károsodását és elfagyását, valamint eltérő mértékű mesterséges hidegkezelést követően mértük a termővessző különböző részeiben (rügy, rügy alatti szövetekben) a peroxidáz (POD), polifenol-oxidáz (PPO) aktivitás változásokat, az összfenol tartalmat és a különböző szénhidrátfrakciók mennyiségét.

A növényanyagokat a BCE KeTK Kísérleti Üzeméből (Szigetcsép) gyűjtöttük be. 2003-ban 2 alkalommal értékeltük a hidegstressz következményeit; a mélynyugalomban február 10-én, valamint kényszernyugalmi időszakban március 10-én. A következő években sűrítettük a mintavételek időpontját; 2004-ben 5 alkalommal (január 12., február 3., 10., 17. és március 16.), és 2005-ben 3 alkalommal (február 10., március 3. és 16.) követtük nyomon a fajtákban a hidegkezelés hatását. A mélynyugalomban begyűjtött gallyakat 24 órán keresztül klímakamrában fokozatos hűtés mellett -25° (2003-ban), -28° és -30 °C-os (2004-2005) -, míg a kényszernyugalomban gyűjtött mintákat -15°, -18° (2003), illetve -18°, -20 °C-os (2004-2005) fagyhatásnak tettük ki. A hidegkezelések előtt és után a termőrügyeket hosszirányban felvágtuk, és Göndörné módszere alapján értékeltük. A rügy, és a rügyalap ép szövete, illetve barnulása alapján tudtunk következtetni az esetleges károsodásra. Mértük a termőrügyek, a dárdák termőrügy alatti szöveteinek és a termőgallyak peroxidáz enzim aktivitását (POD) spektrofotometriás módszerrel, H₂O₂ szubsztrát és ortodianidizin kromogén reagens jelenlétében ($\epsilon = 11.3$), $\lambda = 460$ nm-en. A polifenol-oxidáz (PPO) enzimaktivitás változásait katekol segítségével $\lambda = 420$ nm-en határoztuk meg spektrofotometriás úton. Az eredményeket U/mg-ra számoltuk ki. Az összfenol tartalmat spektrofotometriás úton $\lambda = 720$ nm-en Folin-Ciocalteu reagenssel határoztuk meg, eredményeinket mg/g friss tömegrre kaptuk meg. Ezzel párhuzamosan mértük a főbb szénhidrátfrakciók stresszhatásra bekövetkező változását OPLC (overpressure liquid chromatography) módszerrel. Eredményeinket mg/g-ban fejeztük ki.

A fajták termőrügyeinek fejlődését mikroszkóppal vizsgáltuk, a termők hosszának mérésével és a pollenkialakulás (mikrosporogenezis) ütemének megfigyelésével. A mélynyugalmi és a kényszernyugalmi stádium jól elkülönült egymástól. A mélynyugalom befejeződését először a termők növekedése jelzi, majd ezt követi a portokokban lévő

arhesporiális szövet differenciálódása, és a pollenszemek fokozatos kialakulása. A fajták eltérő időpontban léptek ki a mélynyugalomból, és ezután a termők hosszának folyamatos növekedését regisztráltuk. A termők mérete fajtánként eltérő volt, ami a genetikailag öröklött tulajdonságukkal magyarázható. Vizsgálati eredményeink szerint a körtefák termőrügyeinél a mélynyugalomból a kényszernyugalomba való átmenet nagyon lassú, vontatott, és a genotípusok fejlődési üteme között jelentős különbségek vannak. A vizsgált évjáratokban a virágrügyfejlődés üteme, az eltérő időjárási viszonyok miatt kissé eltérő volt, de a fajták nyugalmi állapotának megszűnése hasonló sorrendben következett be. Általánosságban elmondható, hogy a japán körtefajták korábban léptek ki a mélynyugalomból, mint az európai körtefajták. 2004 február közepén a Hosui, Nijisseiki és Kieffer fajták pollenjeiben már átmenet mutatkozott az arhesporium és a füzér állapot között, míg az európai körtefajtákban mindenhol még az arhesporiumos állapot volt jellemző.

A termőrügyek fagystressz okozta vizuális vizsgálata is alátámasztotta, hogy az általunk vizsgált fajták között a Bosc kobak volt a legfagyérzékenyebb fajta mind a mélynyugalom alatt, mind a kényszernyugalmi időszakban. A fajták közül a Packham's Triumph mutatta a legkisebb fagykárosodást, illetve elfagyást a különböző nyugalmi időszakok során. Az irodalmi adatok szerint a Kieffer az ökológiai körülményekre nem annyira igényes fajták közé tartozik. A termőrügyek vizuális elemzése során azt tapasztaltuk, hogy a mélynyugalom során a -25 °C -os hideghatásra a rügyek mintegy 20-40 %-a károsodott, illetve fagyott el, a -28 °C , -30 °C -os hűtést követően pedig évjáratától függően csupán maximum 20 % ép rügyet találtunk. A kényszernyugalmi időszakban szintén sok károsodott rügyet regisztráltunk a -18 °C , -20 °C -os hideghatást követően. A japán körtefajták (Hosui, Nijisseiki) hasonlóképpen reagáltak a hidegstresszre, a mélynyugalmi időszakban a termőrügyek 40-60 %-a károsodott, a kényszernyugalmi időszakban viszont mintegy 20 % rügy maradt csak ép. A Packham's Triumph és a japán körtefajták hibridjei jobb fagyűrőnek bizonyultak a *P. pyrifolia* apánál.

Évjáratonként kissé eltérő eredményeket kaptunk a fajták fagyűrésével kapcsolatban, ezt magyarázza, hogy az időjárás nagymértékben befolyásolja a télre való felkészülést, ezáltal a növények fagyűrését a nyugalmi időszakokban. A nyugalmi időszak során bekövetkező fokozatos lehülésnél a növények jobban fel tudtak készülni egy későbbi fagystresszre, míg nagyobb hőingadozások súlyosabb fagykárokat tudtak eredményezni.

Az enzimaktivitás meghatározásoknál (POD, PPO) 2003-ban minden fajta esetében a gallyakban mértük a legalacsonyabb értékeket, melyekből nem tudtunk megbízható következtetéseket levonni. A POD és a PPO izoenzimeket próbáltuk szétválasztani gélelektroforézissal és izoelektromos fókuszálással is. Egyik enzim esetében sem sikerült újabb, jól detektálható frakciókat kimutatni. Így a következő évek során (2004, 2005) a termőrügyek és a rügy alatti szövetek POD, PPO aktivitás változásait követtük nyomon.

A peroxidáz (POD) enzimaktivitás értékei a kezeletlen kontroll esetében minden vizsgált fajtánál magasabbak voltak a rügy alatti szövetekben, mint a rügyekben. A POD aktivitás a kontroll termőrügyekben a mélynyugalmi időszakban nőtt, majd a kényszernyugalmi időszak végére csökkent. A vizsgált években a legfagyérzékenyebb Bosc kobak fajta POD aktivitása szignifikánsan felülmúlta a többi fajtánál mért értékeket végig a nyugalmi időszak során.

A mélynyugalmi időszakban a fagyűrő (pl. Packham's Triumph) vagy kevésbé fagyérzékeny fajták a különböző mértékű hidegkezelésre (-25 , -28 , -30 °C) hasonlóan reagáltak; a termőrügyekben mért POD enzimaktivitásuk nem változott, vagy nem szignifikánsan csökkent. A fagyérzékeny fajták esetében (pl. Bosc kobak) a mélynyugalmi időszak végén a -25 °C -os hidegkezelésre POD aktivitás emelkedését tapasztaltunk (35 %) 2004-ben, ahol ez pozitívan korrelál a rügyelhalás mértékével. A többi vizsgált években ezt a tendenciát nem tapasztaltuk; hasonlóan a fagyűrőbb fajtákhoz a termőrügyek szintén POD

aktivitás csökkenéssel reagáltak a hidegstresszre. A -28, -30 °C-os hidegkezelést követően minden vizsgált fajta rügyének POD aktivitása csökkent, ez a nagyobb mértékű szövetelhalásnak tulajdonítható.

A kényszernyugalom időszakában mind a fagyérzékeny (Hosui, Nijisseiki, Bosc kobak), mind a kevésbé érzékeny fajtáknál (Packham's Triumph) a -15 °C-os hidegstresszre a POD aktivitás kissé megnövekedett, majd a -18 °C-on a termőrügyek POD aktivitása csökkent. 2005-ben az eredményeink az előző éveknek kissé ellentmondtak, ebben az esetben a -20 °C-os hidegstresszre a fajták egy része (pl. Bosc kobak) POD aktivitás emelkedést mutatott (25 %-os), míg más fajták termőrügyeiben nem mértünk változást, illetve csökkenést tapasztaltunk. A rügyvizsgálatok alapján a faggyal szembeni érzékenység különbséget az enzimaktivitás vizsgálatok is megerősítik, mert a hidegszenzitív fajták enzimaktivitás változása több esetben a rezisztens fajtákétól eltérő volt.

A rügy alatti szövetek POD aktivitása minden esetben meghaladta a rügyben mért aktivitás értékeit. A kezelés nélküli szövetekben az aktivitás értékek a mélynyugalmi időszak végéig folyamatosan növekedtek, majd egyes fajtáknál stagnáltak (pl. Nijisseiki, Packham's Triumph), vagy csökkentek (pl. Bosc kobak). A mélynyugalmi időszakban a mért enzimaktivitás értékek – bár különböző mértékben –, de a -25 °C-os hideghatásra emelkedtek, -28 °C-on pedig kb. a kontroll szintjére csökkentek. Ismét kivételt mutatott a 2005-ös év, ebben az esetben az összes fajta termőrügy alatti szöveteiben csökkenést mértünk a különböző mértékű hidegkezelés hatására. Ezt azzal lehetne magyarázni, hogy ebben az évjáratban a virágrügyek előrehaladottabb állapotban voltak, a mikrosporogenezis üteme az előző évekhez képest gyorsabb volt, ezért az érzékenyebb szöveteket jobban károsította a fagy.

A kényszernyugalmi időszakban a fajták rügy alatti szöveteinek POD aktivitása különböző mértékben növekedett a -15 °C-os hidegkezelést követően (rezisztens fajtánál 150 %-kal, fogékonyánál 20 %-kal). A -18, illetve -20 °C-os fagy hatására a szövetekben mért aktivitás csökkent (a fogékonyánál markánsabban).

A nyugalomi időszak során mért kontroll polifenol-oxidáz PPO aktivitás értékek – a POD-tól ellentétesen – a mélynyugalom végére érték el minimumukat a termőrügyekben és a kényszernyugalomban általában növekedtek. A rügy alatti szövetekben nem mutatkozott ilyen egyértelmű tendencia, egyes fajtáknál a mélynyugalomhoz képest a kényszernyugalomban magasabb kontroll PPO aktivitás értékeit mértünk, más esetekben fordítottat.

A mélynyugalomban 2004-ben és 2005-ben azt tapasztaltuk, hogy a termőrügyekben a -25 °C-os hideghatásra a PPO aktivitás megnövekedett, majd -28, -30 °C-nál csökkent. Az aktivitás növekedések az érzékeny fajtákban voltak kifejezőbbek. 2003-ban viszont a rügyekben PPO aktivitás csökkenés figyelhető meg a hidegstresszre, de ebben az esetben is a szenzitív fajtákban lehetett nagyobb változásokat kimutatni. A kényszernyugalomban a japán körtefajták és hibridjeik termőrügyében PPO aktivitás növekedés következett be a -15 °C-os hidegstresszre, a többi fajtánál csökkenést mértünk. A -20 °-os fagyhatásnál szintén hasonló tendenciát tapasztaltunk, a japán körtefajták és a Bosc kobak termőrügyeiben növekedés következett be, az ellenállóbb fajtákban pedig szignifikáns változás nem játszódtott le.

A rügy alatti szövetekben a mélynyugalom során a termőrügyekhez képest a -28 °C-os hideghatásra folyamatos PPO aktivitás növekedést tapasztaltunk, majd ez az érték a -30 °C-os fagystresszre csökkent, mely szövetelhalással magyarázható. A kényszernyugalmi időszakban az ellenállóbb fajtákban -18 °C-os hidegkezelést követően PPO aktivitás növekedést mértünk, míg az érzékenyebb fajtákban lényeges változás nem volt kimutatható, vagy csökkenés történt.

Fagystressz okozta enzimaktívias változások elemzésekor azt találtuk, hogy a rügy alatti szövetek enzimaktivitása (POD) minden időszakban és kezelés esetében meghaladta a rügyben mért értékeit. Megállapítottuk, hogy a rügy alatti szövetekben az enzimaktivitásban bekövetkező változások jobban korreláltak a hidegstressz mértékével és a növény endogén

ritmusával. Az enzimaktivitásokban bekövetkező változások azt is megmutatták, hogy a rügy alatti szövetek kevésbé szenvedtek fagykárosodást, mint a termőrügyek. A fagy hatására általánosságban emelkedő enzimaktivitások védő funkciót tudtak betölteni. Arra következtetünk, hogy a növény általános és oxidatív stresszre adott védekezési mechanizmusai a rügy alatt találhatóak és ezért a hosszabb távú túlélés szempontjából jelentősebb szövetekben – ahonnan termőrügy elhalás után még kihajthat – markánsabbak.

Az összfenoltartalmat értékelve megállapítottuk, hogy mind a rügyekben, mind a rügy alatti szövetekben a hidegstresszre hasonló változások játszódtak le, mint azt az enzimaktivitás (POD, PPO) változásoknál már ismertettük. A kezeletlen kontroll rügyekben minden időpontban a legmagasabb értékeket a Bosc kobak fajtánál mértük (hasonlóan a POD-nál); e fajta rügyeiben az összfenoltartalom végig növekvő tendenciát mutatott a nyugalmi időszakban. A többi fajtánál a fenoltartalom ebben az időszakban nagyjából állandó volt. Hidegkezelésre (-25 °C) a termőrügyekben minden fajta fenoltartalom növekedéssel reagált a mélynyugalmi időszakban, ez az emelkedés az érzékeny Bosc kobak fajtánál volt a legmarkánsabb (60 %-os). A -28 °C-os fagy hatására a fenoltartalom nem növekedett tovább. A kényszernyugalmi időszakra a rügyben mért kontroll összfenol értékek csökkentek – kivétel a Bosc kobak fajtánál –, ezek az értékek a -18 °C-os hideghatásra szignifikánsan nem változtak, esetleg enyhén csökkentek. A kontroll rügy alatti szövetekben a mélynyugalmi időszakban – a rügyekhez hasonlóan – a Bosc kobakban mértük a legnagyobb értékeket, majd a kényszernyugalmi időszakban az ellenálló Packham's Triumph-ban mért értékek meghaladták a többi fajtákét. A mélynyugalomban az érzékeny fajta (Bosc kobak) rügy alatti szövetei reagáltak legnagyobb mértékben a hideghatásra, az itt mért összfenoltartalom érte el a legmagasabb szintet, illetve a kontrollhoz képest a -25 °, és a -28 °-os fagystresszre a legnagyobb mértékben növekedett. Ez megegyező tendenciát mutat a PPO aktivitás változásokkal ezekben a szövetekben ugyanilyen kezelésekk mellett. A kényszernyugalmi időszakban a rügy alatti szövetekben 5-6-szor magasabb fenoltartalmakat mértünk, mint ugyanebben az időszakban a rügyekben. A -18 °C-os hidegkezelést követően az értékek – a rügyhöz hasonlóan – szignifikánsan nem változtak. Ezekben a szövetekben mért magas fenoltartalom is alátámasztja azt a megállapítást, hogy a rügy alatti szövetekben lejátszódó védekezési mechanizmusok erőteljesebbek.

Irodalmi adatok és saját eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a különböző szénhidrát frakciók koncentrációja és az abiotikus stressztűrő-képesség között a különböző növényfajoknál összefüggések mutathatók ki. A vizsgált növényi mintában – rügy alatti szövetek, rügy, gally – legnagyobb mennyiségben glükózt, fruktózt és szacharózt-, kisebb koncentrációban pedig raffinózt detektáltunk az alkalmazott mérési feltételek mellett.

A kontroll minták összehasonlításakor megállapítottuk, hogy az érzékeny Bosc kobak fajtában legnagyobb arányban szacharóz volt jelen a termőrügyekben, mely koncentráció a mélynyugalom végén érte el maximumát, majd a kényszernyugalmi időszakban folyamatosan csökkent. A fruktóz-koncentráció kicsit meghaladta a glükóz-koncentrációt; a rügyekben mért két monoszacharid koncentrációja hasonló tendenciát követve kissé növekedett kényszernyugalmi időszakban. A rezisztens fajtában a glükóz-szint meghaladta a többi detektálható cukor koncentrációját ebben a nyugalmi időszakban.

A nyugalmi időszak alatt az első mintavételi időpontban (január 12.) a vizsgált fajták termőrügyeiben mért cukorfrakciók eltérő tendenciával változtak a hidegstressz hatására, mint a későbbi időpontokban. Ekkor a 3 fő cukorkomponens (glükóz, fruktóz, szacharóz) a -25 °C-os hideghatásra erőteljesen csökkent a kontroll értékekhez képest. Az érzékeny fajták termőrügyeiben ennél sokkal kisebb arányú csökkenés történt a glükóz és szacharózsintekben, a fruktóz koncentrációja pedig enyhén növekedett. A későbbi mintavételi időpontokban a fogékony és rezisztens fajtákban általában ellenkező válaszreakció indukálódott a fagy hatására. A fogékony fajtákban a -25 °C-os hideghatást

követően a termőrügyekben jelentősen emelkedett a glükóz, illetve fruktóz szint (2,5-szeresére), majd kissé továbbnövekedett a -28 °C-os fagy hatására. A szacharózsztintben – bár a fajtákban nem egységes mértékben – szintén növekedés mutatkozott. A mélynyugalmi időszak végén/kényszernyugalmi időszakban a glükóz, illetve szacharózkoncentráció egységesen emelkedett a -20 ° és -25 °C-os hidegstresszre a fogékony fajta termőrügyeiben, míg a rezisztens fajában a glükózsztint kisebb mértékben csökkent. A fruktózsztint változás egyik genotípusban sem volt markáns. A -18 °C-os fagykezelés hatására a fogékony fajtában szintén 40 %-os glükózkoncentráció emelkedés történt, míg a rezisztens fajtában kisebb mértékű (30 %-os) csökkenést mértünk.

A mérések alapján a vizsgált növényi részek közül a rügyekben mért glükóz mennyisége hozható leginkább összefüggésbe a fajták természetői, illetve nemesítői tapasztalatok alapján ismert fagyűrő-képességével. A dárdák és gallyak vizsgálatával kapott eredmények kevésbé alkalmasak összefüggések levonására.

A biotikus stressz hatásának értékeléséhez körtefajták *Erwinia*-fogékonyságának/rezisztenciájának mértékét vizsgáltuk éretlen körtegyümölcsökön (2003-2006, virágokon (2003-2004) és mikroszaporított növényeken (2006). A fertőzéseket körtéről izolált virulens *E. amylovora* törzsekkel (Ea 21, Ea 23) végeztük $5 \cdot 10^8$ sejt/ml töménységben. A gyümölcsöket és termőgallyakat a KekTK Kísérleti Üzeméből gyűjtöttük, a mikroszaporított növényeket pedig az Érdi Gyümölcs- és Dísznövénytermesztő Kutató Fejlesztő Kht. állította elő. A különböző *virágszervek* fogékonyságát külön értékeltük a fertőzést követő 4. napon egy 0-3 fokozatú skálával. Korábbi megállapításaink szerint a fajták fogékonyságát legjobban a vacokon jelentkező tünetekkel értékelhetjük. Ez alapján erősen fogékonynak tűnt a Packham's Triumph, a Bosc kobak mérsékelt fogékonyságot mutatott, míg japán körtefajták és a Kieffer az ellenállóbb csoportba tartoztak.

Hús körtefajta éretlen gyümölcseit fertőztük a fogékonyság megállapítása céljából, ezek között a fontosabb árufajták, történelmi körtefajták, új, honosítás alatt álló- és japán körtefajták voltak. Az éretlen gyümölcsök alacsony cukortartalma (1-2 % glükóz, fruktóz, szacharóz) ideális a baktérium szaporodásához, mert érettebb gyümölcsökben, magasabb koncentrációjú cukortartalom mellett (10 % felett) a kórokozó szaporodása lelassul. A fajták között fogékonyság/rezisztencia különböző fokozatait tudtuk elkülöníteni a mesterséges fertőzést követően. A gyümölcsökben biokémiai vizsgálataikhoz azokat a fajtákat jelöltük ki, amelyeknél a betegség lefolyása eltérő volt. A biotikus stresszválaszt rezisztens (Pap körte) és fogékony (Piros Vilmos) európai körtefajtákon és egy fertőzésre mérsékelt fogékony japán körtefajtán (Hosui) tanulmányoztuk részletesebben. A Pap körte fertőzött gyümölcssei rezisztens típusú reakciót mutattak, sötét színű, beszáradt foltjaival tűnt ki a többi fajta közül. Ezzel szemben a Piros Vilmos gyümölcssei nagyon fogékonyak voltak a fertőzésre, erre utaltak a szúrás helyén kialakult diffúz (folyamatosan növekedő, vízzel átitatott) foltjai.

A biotikus stresszválasz követésére a gyümölcs szöveteiből mintát vettünk a fertőzés pillanatától (0. óra) folyamatosan a tünetek kialakulásáig. A mintákat a szúrás helyén (A), a szúrás melletti szövetekből (B, illetve C) vettük 1 cm átmérőjű dugófúróval. Mértük a kontroll és fertőzött szövetekben a POD és PPO enzimaktivitásokat- és a szénhidrátartalom változását a már korábban említett módszerekkel.

Eredményeinket a következő kérdések köré csoportosítottuk.

- Megállapítható-e a fajtákra jellemző mértékű enzimaktivitás szint?
- A vizsgált két enzim közül (POD, PPO) melyikkel jellemezhető markánsabban a fogékony, illetve rezisztens gazdaválasz?
- Van-e összefüggés az enzimaktivitás változás és a tünetek kialakulása között?

- A különböző szénhidrátok időfüggő mennyiségi változásainak vizsgálata alkalmas-e a stresszválasz nyomonkövetésére?

A fajtákban mérhető PPO enzimaktivitási szintekben jelentős különbségek voltak. A Piros Vilmos fajtánál (fogékony) mértük a legalacsonyabb értékeket, magasabb értékeket mértünk a Pap körténél (rezisztens). Kiugróan magas enzimaktivitás szinteket mértünk a mérsékelt rezisztenciával rendelkező Hosui fajtánál. A legalacsonyabb POD enzimaktivitás értékeket a Pap körténél tapasztaltuk, magasabb aktivitás értékeket mértünk a Piros Vilmos fajtánál. A fajták között a legmagasabb enzimaktivitás értékeket mutatott a Hosui fajta. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a fenti enzimek aktivitásának mértéke nem csak a fajták rezisztencia fokozatával hozható összefüggésbe, hanem ez a tulajdonság fajhoz, illetőleg fajtához köthető „fajtabélyeg” is.

A betegség az idő függvényében az inokulációs ponttól kiindulva fokozatosan terjedt a környező szövetek felé a korábban említett tünetformák szerint. A baktériumos fertőzésre mind a rezisztens- mind a fogékony fajta enzimaktivitás emelkedéssel (POD, PPO) reagált. A POD aktivitás emelkedés a fertőzési pontban a Pap körtében (rezisztens) a fertőzést követő második napon vált jelentős mértékűvé (60 %-kal nőtt), amely aktivitás a 4. napig emelkedést mutatott az inokuláció helyén (A). A hiperszenszenzitív típusú szövetelhalás ennél a fajtánál az 5. naptól alakult ki. A 7. napon, mikor az inokuláció helyén (A) a szövetnekrozis teljesen kifejlődött, POD aktivitás emelkedést már nem mértünk. Ez a jelenség a szövetek elpusztulásával magyarázható. A fertőzés melletti szövetrészekben (B, C) szintén folyamatos POD aktivitás emelkedést mértünk a 7. napig, amely azonban alatta maradt az inokuláció helyén mért értéknek.

A Piros Vilmos fajtánál (fogékony) a betegség gyorsabb lefutású volt, mint a rezisztens fajtában, amely tükröződött a stressz-indukált enzimaktivitás válaszában is. A POD aktivitás emelkedést mutatott az inokuláció helyén már az 1. naptól, amely a 3. napig folyamatos volt. Mikor a tünetek a vízzel átitatott állapotot mutatták (4. naptól), az inokuláció helyén a POD aktivitás szint lecsökkent. Az inokulációs pont melletti szövetekben (B, C) a tendencia hasonló volt, de időbeni eltolódással (később) jelentkezett.

A Hosui fajtánál (tapasztalatok alapján mérsékelt rezisztens) a fertőzést követő 2. és 3. napon mértük a legmagasabb POD aktivitás értékeket az inokulációs pontban, amely csökkent a 7. napra. Ez a csökkenés az előrehaladott szövetpusztulásnak tulajdonítható.

A biotikus stressz hatására kialakult PPO aktivitás változás kevésbé jó markernek bizonyult. A fogékony fajta gyümölcsseiben az inokulációs pontban (A) a 2. napon jelentkezett egy nem szignifikáns PPO aktivitás emelkedés. Ezzel párhuzamosan az inokulációs ponttól távolabbi szövetekben (B, C) is megnövekedett a PPO aktivitás. A 7. napra viszont számottevő emelkedés következett be az inokuláció helyén. Ekkorra már a kórokozó annyira elszaporodott ezen a területen, hogy az aktivitás növekedés esetleg a baktériumban található enzimek működésének a következménye. A Hosui gyümölcsseiben már a 2. napon szignifikánsan emelkedett a PPO aktivitás (32 %-kal) az inokuláció helyén, majd ez a szint a betegség előrehaladtával folyamatosan tovább emelkedett a környező szövetekben is, egészen a szövetpusztulásig. A rezisztens fajta gyümölcsében csak a 3. napon mérhettünk 25 %-os PPO aktivitás emelkedést a fertőzési pontban, mely érték folyamatosan a 7. napig stagnált. A környező szövetekben szintén mérhettünk PPO aktivitás emelkedést, amely a 7. napon meghaladta az inokulációs pontban mértet.

Az éretlen gyümölcsminták szénhidrát frakcióinak koncentrációi alapján megállapítjuk, hogy a négy, – az alkalmazott vizsgálati feltételek mellett – jól detektálható szénhidrát közül (glükóz, fruktóz, szacharóz, szorbitol) a glükóz bizonyult a legjobb markernek, amit más gazda-patogén kapcsolatok vizsgálatának eredményeivel is alátámasztható. Az *E. amylovora* baktérium mindegyik detektálható cukorfrakciót gyorsan és

teljesen hasznosítja, de közülük a glükózt és a szacharózt használja fel először. A kontroll mintáknál a fogékony fajtában magasabb glükóz koncentrációt mértünk az ellenállóhoz viszonyítottan. A fogékony fajtában a fertőzés hatására ez az érték a második napon a fertőzési pontban jelentősen csökkent (a kontroll értékének 40 %-ára) a fertőzési ponttól távolabbi szövetekben ebben a mintavételi időpontban pedig nem változott. A fertőzést követő 3. napon a fogékony fajtánál további glükóz csökkenés volt tapasztalható a fertőzési pontban (8,8 %). Az ellenálló fajtánál is hasonló tendenciájú változást mérhettünk, de kisebb intenzitással. A fertőzést követő 3. napon a fertőzési pontban csak enyhe glükóz koncentráció-csökkenést tapasztalhattunk (91,9 %), a 4. napra ez a szint tovább süllyedt (31 %). A mért szacharóz koncentráció a fogékony fajtában kisebb volt, mint a rezisztensben; a fertőzés hatására bekövetkező csökkenés mértéke a két fajtában eltérő, de a változás tendenciája hasonló volt. A fruktóz koncentráció a fertőzés hatására csak kisebb mértékben változott. Míg a fogékony fajtában a csökkenés már a 2. napon elkezdődött, az ellenálló fajtánál csak a 4. napon mértünk fruktóz csökkenést (39 %). A fogékony fajta gyümölcsében a fertőzést követő 3. napon az inokulációs ponttól távolabbi szövetekben (B, C) glükóz, illetve fruktózsint növekedést mértünk. Ez a jelenség esetleges transzportfolyamatra utal, vagy a szacharóz invertálódása során keletkező monoszacharidok pótlásából adódik. Ugyanezt a tendenciát a rezisztens gyümölcsnél nem tapasztaltuk. A szorbitol koncentráció – a fruktózhoz hasonlóan – szintén csak enyhe változást mutatott a fertőzést követően, az értékek lassan, folyamatosan csökkentek a fertőzési folyamat során. A következő évben megvizsgáltuk a fertőzést követő 2 órával a fertőzési pontban lezajló folyamatokat, és megállapítottuk, hogy a rezisztens gyümölcsben ebben az időpontban nem történt változás, a fogékonyban pedig már itt enyhe csökkenést figyelhettünk meg. Ez a tendencia a fertőzési folyamat során végig jellemző maradt.

A mikroszaporított növényekkel végzett vizsgálatokat modellkísérleteknek tekintjük, ezért a betegség folyamatát két fajtán (Packham's Triumph – fogékony; Harrow Sweet – rezisztens) követtük nyomon. Megállapítottuk, hogy a mikroszaporított növényeken is jól modellezhető a tüzelhalás betegség folyamata. A fertőzést E. a. szuszpenzióba mártott ollóval, az alsó levelek bevágásával végeztük. A tünetek a fertőzés után az 5. napon jelentkeztek, a biokémiai vizsgálatokhoz a fertőzést követő 1., 4., 6., 8., és 12. napon történt mintavétel. Hasonlóan a gyümölcsfertőzésnél tapasztalt eredményekhez, a POD aktivitás itt is folyamatosan emelkedett mindkét vizsgált fajtánál, a tünetek kifejlődésével párhuzamosan. A betegséggel szemben ellenálló Harrow Sweet fajtában magasabb kiinduló POD aktivitás szintet mértünk a fogékony Packham's Triumph-hoz képest. A rezisztens fajtában a fertőzést követő 6. napon jelentkezett erőteljes POD aktivitás növekedés (135 %-os a kontrollhoz képest); a fertőzetlen és fertőzött szövetek POD aktivitás különbsége a 12. napig állandó maradt. A fogékony Packham's Triumph szöveiben a fertőzést követő 4. napon mértünk jelentős POD aktivitás emelkedést a kontrollhoz képest (mintegy ötszörösre emelkedett), amely különbség a fertőzést követő 12. napra lecsökkent. A peroxidáz enzimre PAGE gélen megfuttattuk a mintákat, melyet 3 amino 9 etil karbazollal festettünk. Azt tapasztaltuk, hogy a 6. napon bekövetkező POD aktivitás emelkedés egy izoenzim növekedésével járt együtt, amely a kontrollban nem volt kimutatható. A mikroszaporított növényekben a PPO aktivitás annyira alacsony volt, hogy nem tudtunk mérni.

A mikroszaporított növényekben vizsgált összfenol tartalom a fogékony növényben – a POD aktivitáshoz hasonlóan – a fertőzést követő 4. napon jelentősen növekedett (92 %-kal); a fertőzést követő későbbi időpontokban viszont a kontroll értékéhez képest nem mértünk szignifikáns növekedést. A rezisztens növényben a 6. és a 8. napon nem tapasztaltunk jelentős összfenol-tartalom növekedést a kontrollhoz képest, mely különbség számottevővé vált a 12. napra (60 %-kal nőtt).

Kísérleteink alapján a következő megállapításokat tudtuk levonni: A peroxidáz/polifenol-oxidáz enzimaktivitások változása kevésbé adott megbízható eredményeket a különböző genotípusok faggyal szembeni fogékonyságának markerezésében. Esetleg más enzimek (pl. glutation reduktáz) pontosabb eredményekre vezethetnek. Az összfenoltartalom vizsgálata során is hasonló, bár a stresszhatást jobban követő eredményekre jutottunk. Ebből azt a következtetést tudtuk levonni, hogy az összfenoltartalom jobb markere a fagystressznek a POD és PPO enzimaktivitáshoz képest, de egyik sem alkalmazható megbízható markerként a fagytolerancia számszerűsítésére és a genotípusok összehasonlítására

A cukorfrakciókban (különösen a glükózban) a stressz hatására bekövetkezett változás jól nyomon követi a rezisztens és fogékony típusok válaszreakcióit a különböző fajták termőrégeiben. Véleményünk szerint ez az egyszerű szénhidrát változása jól mutatja a fagystresszre adott fiziológiás válaszreakció nagyságát, tehát alkalmas markere lehet a fagyűrőképesség megállapítására és a fajták hidegstresszel szembeni elkülönítésére.

A biotikus stresszel szembeni tolerancia vizsgálatánál úgy találtuk, hogy mind a peroxidáz aktivitás, mind a polifenol-oxidáz aktivitás változása jól nyomon követte az *E. amylovora* fertőzés terjedését a gyümölcsben. A peroxidáz aktivitás változása markánsabban tükrözte mind a rezisztens, mind a fogékony fajták válaszreakcióit a polifenol-oxidáz aktivitáshoz képest.

Elsősorban a glükóz, de egyéb vizsgált cukrok (fruktóz, szacharóz) mennyiségének változása is jól jelezte a bakteriális fertőzés kialakulását és a különböző fajták fertőzéssel szembeni rezisztenciájának mértékét a gyümölcsben.

A mikroszaporított növényekben a peroxidáz aktivitás és az összfenoltartalom bizonyult használható markernek a fogékony és rezisztens gazdaválasz elkülönítésében.