

## Másodlagos hírvivő mechanizmusok kórokozó-növény kapcsolatban” című OTKA kutatási program eredményei

### A kutatás célja, a munkatervben vállalt kutatási program

A projekt célja másodlagos hírvivő mechanizmusok szerepének pontosabb megismerése a rezisztens és fogékony növény-kórokozó kapcsolat kialakulásában. Az újabb kutatási eredmények világosan mutatják, hogy a rezisztencia-, illetve avirulencia-/virulenciagének jelenléte mellett a növény-kórokozó kölcsönhatás szabályozásában nagy szerepük van az ún. másodlagos hírvivő (jelátvivő) rendszereknek, mint pl. az etilén, a reaktív oxigén fajták (ROF), a  $Ca^{2+}$ , a NO, a lipid eredetű másodlagos hírvivők, a jázminsav, a citokininek vagy a szalicilsav (SA), illetve a hő sokk fehérjék. A másik fontos új felismerés, hogy ezek a rendszerek szoros kölcsönhatásban vannak egymással, egymás működését erősen befolyásolják. Ezért nem elég egy-egy másodlagos jelátvivő rendszert kiemelni és tanulmányozni, hanem lehetőleg minél több rendszert kell vizsgálni figyelembe véve az egymásra gyakorolt kölcsönhatásaikat.

Az alábbiakban röviden összefoglalom a projekt során a témában elért eredményeket.

### Az elért eredmények

#### *Árpa – árpalisztharmat kapcsolat*

A munkatervnek megfelelően különböző típusú rezisztencia génnel rendelkező közel izogén árpa vonalak lisztharmat gomba fertőzéskor aktiválódó antioxidánsok aktivitását spektrofotometriásan és gélelektroforetikusan, a lipidperoxidáció mértékét az etán, illetve a másodlagos hírvivő etilén gázkromatográfiás mérésével, valamint a membránok permeabilitás változását vezetőképességi mérésekkel határozzuk meg. Az árpa lisztharmat (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) biotróf kórokozó, amelynek A6-os rassza az Mla rezisztencia génnel rendelkező árpában szemmel látható, az Mlg génnel rendelkező árpában csak egy sejtre kiterjedő, nem látható hiperszenzitív reakciót (HR) indukál. Ugyanakkor az mlo génnel rendelkező árpában minden árpalisztharmat fertőzés hatására erős papilla képződés, HR nélkül, akadályozza meg a kórokozó terjedését. A közel-izogén árpa vonalak A6-os rasszal való fertőzésekor a következő eredményeket kaptuk. A fogékony vonal 20-szoros etilén

termelést, 8-szoros elektrolit kiáramlást (ami a membrán károsodás jelzője), 5-szörös gvajakol peroxidáz, 3-szoros szuperoxid dizmutáz, 2-szeres aszkorbát peroxidáz, glutation reduktáz és glutation-S-transzferáz antioxidáns enzim aktivitást mutatott egy héttel a fertőzés után a kontrolhoz képest. A nem enzimatis antioxidáns glutation mennyisége is 50%-kal megemelkedett ezekben a növényekben. Ugyanakkor csak az Mla gént tartalmazó vonalak mutattak gyenge etilén termelés, elektrolit kiáramlás és antioxidáns növekedést a fertőzés hatására, a többi rezisztens vonal egyáltalán nem, ezzel összhangban a reaktív oxigén H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyisége a rezisztens vonalakban megnőtt és változatlanul maradt, míg a fogékony kapcsolatban egy hét után jelentősen lecsökkent (Harrach et al. 2008).

Ezek az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy fogékony kapcsolatban a lisztharmatfertőzés egy késői fázisban stressznek tekinthető (etilén termelés, membránkárosodás), ugyanakkor a biotróf kórokozó az antioxidánsok indukálása révén megvédi magát és a növényi szövetet a reaktív oxigének káros hatásától. Ezen kívül a mért eredmények új információkat adnak a reaktív oxigének, a nemenzimatis és enzimatis antioxidánsok és az etilén szerepéről a fogékony, illetve hiperszenzitiv és nem hiperszenzitiv típusú növényi rezisztencia kialakulásában.

Prediszpozíciós hőkezelésekkel, fenti közel-izogén árpa vonalakban a lisztharmat gombával szembeni fogékonyt növelni tudtuk mindegyik rezisztencia génnel rendelkező vonal, sőt a fogékony genotípus esetében is. A fogékony növekedése részben a telep/léziószám megemelkedésében, részben a fény és epifluoreszcenciás mikroszkópos vizsgálatokkal és speciális festéssel bizonyított fokozott gombafejlődésben mutatkozik.

Vizsgáltuk ezekben a közel-izogén árpa vonalakban lisztharmat-fertőzés és hő sokk hatását (külön-külön és kombinálva is) néhány gén kifejeződésére. Hőkezeléssel lisztharmat-fogékonyt indukáltunk 'Ingrid' árpafajta lisztharmattal szemben nem-specifikus rezisztenciát kódoló mlo rezisztenciagént hordozó vonalában. E jelenség hátterének tanulmányozásához génexpresszió-analízist végeztünk félkvantitatív RT (reverz transzkriptáz)-PCR, illetve kvantitatív (real-time) RT-PCR módszerrel. Olyan gének kifejeződését vizsgáltuk, amik szerepet játszhatnak a növények biotikus-(lisztharmat fertőzés) és vagy abiotikus (hőkezelés) stresszekre adott válaszaiban. Érdekes módon, az Mla árpavonalakban is hasonló irányú változásokat tapasztaltunk mint az mlo, és a részben eltérő változásokat a vad típusú fogékony vonalban a vizsgált gének (ubikvitin, HSP70, BI-1, PR-1, WRKY1, WRKY2) kifejeződésében. Félkvantitatív RT-PCR-rel kimutattuk, hogy a HSP70 hő sokk-fehérje átíródása additív módon indukálódik a hő kezelés és fertőzés hatására.

Hasonlóképpen alakult a BI-1 (Bax Inhibitor-1, a programozott sejthalált gátló fehérje) kifejeződése is. A két WRKY fehérje gén (a növények kórokozók elleni védekezésében és stressz válaszaiban szerepet játszó transzkripciós faktorok) különböző képen reagált a fertőzésre, illetve a hő stresszre.

Ezek az eredmények egyértelműen igazolják, hogy a rezisztencia géneken kívül hő sokk fehérjék, sejthalál gátló fehérjék vagy transzkripciós faktorok génjei fontos szerepet játszhatnak a növényi rezisztencia vagy fogékonyság kialakulásában.

### *Árpa - Pirifomospora indica kapcsolat*

A gyökér endofita *Pirifomospora indica* gomba által indukált stressz-ellenállóság mechanizmusát vizsgáltuk árpában. Már korábban megállapítottuk, hogy nemcsak a gyökérokórokozó *Fusarium culmorum*, hanem a biotróf *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* lisztharman gombával szemben is rezisztenciát indukál ez a szimbionta gomba. Ezúttal árpában só-stresszel szembeni tolerancia indukció elemzésekor kimutattuk, hogy az endofita szignifikánsan növelte az enzimatis antioxidánsok aktivitását, valamint a nem enzimatis antioxidáns aszkorbinsav mennyiségét. Ugyanakkor csökkentette a só-stressz által indukált hő emissziót és lipid peroxidációt. Véleményünk szerint a megnövekedett antioxidáns kapacitás fontos része lehet a *Pirifomospora indica* által indukált sótűrő képesség megemelésének árpában (Baltruschat et al. 2008).

### *Különböző stressz-ellenállóságú dohányvonalak vizsgálata*

Munkánk egyik célja az volt, hogy megvizsgáljuk a különböző fokú stressz-rezisztenciával rendelkező dohányvonalak ROF és NO által indukált nekrotizációval szembeni ellenállóságát. *Nicotiana tabacum* L. Samsun kontroll fajtát (PS) és *in vitro* szelektált paraquat-toleráns vonalát (PT), Petit Havana fajtát (SR1) és citokinin túltermelő transzgenikus vonalát (CTKm), Xanthi nc. (X) fajtát és szalicilát hidroxilázt termelő transzgenikus vonalát (NahG) üvegházban neveltük. A levelek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és NO (mindkét anyag másodlagos hírvivőnek tekinthető) ellenállóságát a nekrotizált terület és az ionkiáramlás mérésével határoztuk meg. Az antioxidáns aktivitásokat gélelektroforetikus módszerrel és specifikus festéssel, illetve spektrofotometriásan, a membránok lipidösszetételét GLC vagy TLC és denzitometriás

módszerrel mértük. Azok a dohánylevelek, amelyek nagyobb toleranciával rendelkeznek nekrozist okozó kórokozókkal és abiotikus stresszekkel szemben (fiatal levelek, PT, CTKm és X) fokozott toleranciát mutattak mind  $H_2O_2$  mind  $NO$  ellen, mint a megfelelő stressz-érzékeny párjuk (idős levél, PS, SR1 és NahG) (1. Táblázat).

1. Táblázat. A  $NO$  generáló nátrium nitropruszid oldat befecskendezés hatása paraquat érzékeny (PS), paraquat toleráns (PT), Xanthi-nc. NahG, SR1 és citokinin túltermelő (CtKm) dohányvonalak idősebb (older) és fiatalabb (younger) leveleibe. Az adatok az elhalt szövet nagyságát ( $mm^2$ ), illetve a saját kontrol százalékát jelzik

	SNP 5 mM				SNP 1.66 mM			
	Older leaves	%	Younger leaves	%	Older leaves	%	Younger leaves	%
<b>Xanthi-nc Control</b>	10.00	100	1.4	14	0.20	100	0.10	50
<b>NahG</b>	22.75	228	6.82	68	5.40	2700	6.20	3100
<b>PS Control</b>	8.57±0.17	100	3.80±0.20	44	4.57±0.52	100	1.15±0.35	25
<b>PT</b>	2.90±1.10	34	0.48±0.06	6	0	0	0.24±0.24	5
<b>SR1 Control</b>	8.71±0.71	100	7.15±0.85	82	2.28±0.72	100	1.34±0.26	59
<b>CTKm</b>	4.19±1.02	48	4.37±1.22	50	0.76±0.13	33	1.43±1.08	63

A citokinin hormonok bioszintézisének kulcsenzimével (izopentenil transzferáz) és konstitutív (CaMV 35S) vagy sebzéssel (protenáz II), illetve fénnel (RubiscoSS) indukálható promoterral transzformált dohányvonalak fokozott ellenállóságot mutattak a kontrolhoz képest baktériumok által indukált hiperszenzitív reakcióval szemben (Barna et al. 2008). Ez az eredmény összhangban van azokkal a korábbi adatainkkal, amelyek szerint ugyanezen dohányok fokozott Dohány Nekrózis Vírus (TNV) ellenállóságot mutattak (Pogány et al. 2004). Kimutattuk, hogy a megemelkedett ellenállóság, legalább részben, a nagyobb antioxidáns enzim aktivitásnak és csökkent hidrogénperoxid termelésnek, illetve a membránok lipid összetétel változásának köszönhető, ugyanis CTKm dohány levelekben nagyobb foszfolipid/szterol arányt mértünk, mint az SR1 kontrol dohányéban, ami a membránok nagyobb stabilitására utal (Barna et al. 2008).

Hasonló módon, a fiatal és a paraquat toleráns dohány levelek a nagyobb antioxidáns aktivitás mellett, csökkent  $H_2O_2$  termelést, és nagyobb poláris lipid/szterol arányt mutattak mint az idősebb és paraquat szenzitív levelek (Barna et al. 1993, Barna et al. 2003, Harrach and Barna 2003).

„Shooter” *Agrobacterium tumefaciens* mutáns segítségével agrotranszformációs módszerrel is megvizsgáltuk a citokinin hormon rezisztencia, illetve fogékonyság indukáló szerepét dohányon. Meglepő módon a transzformált Xanthi nc. dohány leveleken több DMV léziót kaptunk, mint a kontrol leveleken. A jelenségre valószínűleg régi eredményeink adnak magyarázatot, amelyek szerint a kinetin kezelés ideje és módja különböző képen hat a lézió képződésre és a vírus szaporodásra (Balázs et al. 1976).

Lengyel kutatókkal együttműködésben vizsgáltuk a dohány-dohányozó vírus (DMV) kapcsolatban a másodlagos hírvivő szalicilsav szerepét a szisztemikus szerzett rezisztenciában (SzSzR), a lipid peroxidációban, lipid összetételben, membrán fluiditásban, illetve a hőtermelésben. Már korábban kimutattuk, hogy a SzSzR kialakulásában a fokozott antioxidáns aktivitásnak fontos szerepe van (Fodor et al. 1997, Király et al. 2002). Megállapítottuk, hogy a szalicilsav hiányos NahG dohányokban az alacsonyabb hőtermelés (anyagcsere intenzitás) és kisebb etán termelés (lipidperoxidáció) DMV fertőzésre a kontrol fertőzött dohány szintjére emelkedik, illetve a stigmaszterol : szitoszterol és a linolsav : linolénsav arány kontrolénál jobban megemelkedik (Fodor et al. 2007).

Mindezek az eredmények nemcsak a szalicilsav, hanem a lipid összetétel és a lipid peroxidáció a SzSzR kialakulása során játszott kritikus szerepét támasztják alá.

#### *Repce – hideg stressz, illetve Pseudomonas kapcsolat*

Lengyel együttműködésben vizsgáltuk új növényi hormoncsalád, egyben másodlagos jelátvivők, a brassinoszteroidok szerepét a hideg stressz ellenállóságban. A kísérletek során 24-epibrassinolide (BR<sub>27</sub>) vizes oldatával előkezelt repce sziklevele, illetve primer levele fokozott hideg ellenállóságot mutatott, amit az ion kiáramlási és klorofill lebomlási mérések is igazoltak (Janeczko et al. 2007a).

Ugyanezen olajrepce fajtákkal megvizsgáltuk a brassinoszteroid kezelés hatását inkompatibilis *Pseudomonas* baktérium által indukált hiperszenzitív reakcióra. Izotermál kaloriméter jelentős hő kibocsátást mutatott a baktériummal fertőzött levelekben, ami fokozott anyagcsere aktivitásra utal. Érdekes módon, a BR<sub>27</sub> előkezelés fokozta a fertőzött levelek hő kibocsátását, ugyanakkor mind a látható nekrotizációt, mind pedig a membrán permeabilitás növekedését csökkentette (Janeczko et al. 2007b).

Mindkét előbb említett kísérlet megerősítette azt a feltételezést, hogy a brassinoszteroidoknak, más fiziológiai hatásuk mellett, fontos szerepük lehet a biotikus és abiotikus stresszek kivédésében.

#### *Arabidopsis – Alternaria kapcsolat*

*Arabidopsis thaliana*-ban a NADPH-oxidázokat kódoló *rboh* gének, illetve az AtNOS1 (AtNOA1) gén közvetlenül vagy közvetve részt vesznek a reaktív oxigének és a NO képződésében. Mi olyan *Arabidopsis* mutánsokkal, és kettős mutánsokkal dolgoztunk, amikben az említett gének nem fejeződnek ki. Kimutattuk, hogy az AtNOS1 mutáns növények fejlődését jobban lelassítja tartós hidegkezelés (5 °C), mint a vad típusú növényekét, illetve ha idősebb korban helyezük őket alacsony hőmérsékletre, akkor kevesebb antocián vegyületet halmoznak fel.

Adataink szerint az *rbohD* „knockout mutáns” *Arabidopsis thaliana* az *Alternaria brassicicola* gomba fertőzés hatására nagyobb kiterjedésű nektrózissal reagál makroszkópikus szinten. Ugyanakkor mikroszkóposan jelentősen különbözik az *AtrbohD* mutánsban mind a sejthalál, mind a reaktív oxigének képződése a kontrol, vad típusú növényétől. Míg a szalicilsav analóg benzothiadiazole indukálja a sejthalált, ugyanakkor az etilen inhibitor aminoethoxyvinylglycine alkalmazása gátolja a sejthalált. Véleményünk szerint a funkcionális RBOHD a megtámadott sejtben sejthalált indukál, de párhuzamosan a szomszédos sejtekben a szabad szalicilsav és etilén szint csökkentése révén gátolja a sejthalált (Pogány et al. 2009).

Eredményeinket két összefoglaló munkában is megjelentettük (Pogány et al. 2006, Király et al. 2007).

Összefoglalva a projekt munkáját megállapíthatjuk, hogy a másodlagos hírvívő anyagok külön-külön és egymással szoros kölcsönhatásban is jelentősen befolyásolják mind a rezisztens, mind a fogékony növény-kórokozó kapcsolat kialakulását.

## Irodalom

Balázs, E, Barna, B. Király, Z. (1976) Effect of kinetin on lesion development and infection sites in Xanthi-nc tobacco infected by TMV: Single-cell local lesions. Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung, 11, 1-9.

Barna, B., Ádám, A., Király, Z. (1993) Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to disease and other stresses. Naturwissenschaften, 80,420-422.

Fodor, J., Gullner, G., Ádám, A. L., Barna, B., Kőmíves, T., Király, Z. (1997) Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco: Role in systemic acquired resistance. Plant Physiology, 114, 1443-1451.

Harrach, B. Barna, B. (2003) Stress resistance and antioxidant capacity in tobacco plants. Proceedings of the 4 th International Conference of PhD Students. Miskolc, 41-47.

Barna, B. Fodor, J., Pogány, M., Király, Z. (2003) Role of reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance. Pest Management Science, 59,459-464.

Pogány, M., Koehl, J., Heiser, I., Elstner, E.F., Barna, B. (2004) Juvenility of tobacco induced by cytokinin gene introduction decreases susceptibility to Tobacco necrosis virus and confers tolerance to oxidative stress. Physiological and Molecular Plant Pathology 65, 39-47

Pogány, M., Harrach, BD, Hafez, YM., Barna, B., Király, Z., Páldi, E. (2006) Role of reactive oxygen species in abiotic and biotic stresses in plants. Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 41, 23-35

Janeczko, A., Gullner, G., Skoczowski, A., Dubert, F., Barna, B. (2007a) Effects of brassinosteroid infiltration prior to cold treatment on ion leakage and pigment contents in rape leaves. Biol. Plantarum 51, 355-358

Király, L, Barna, B., Király, Z. (2007) Plant resistance to pathogen infections: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. J. Phytopathol 158, 385-396.

Janeczko A, Tóbiás I, Skoczowski A, Dubert F, Gullner G, Barna B (2007b) Bacterial infection and pre-treatment with 24-epibrassinolide markedly affect the heat emission and membrane permeability of rape cotyledons. Thermochemica Acta 458: 88-91.

Fodor J, Harrach BD, Janeczko A, Barna B, Skoczowski A (2007) Metabolic response of tobacco to induction of systemic acquired resistance. Thermochemica Acta 466: 29-34.

Harrach BD, Fodor J, Pogány M, Preuss J, Barna B (2008) Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *Eur J Plant Pathol* 121: 21-33.

Baltruschat H, Fodor J, Harrach BD, Niemczyk E, Barna B, Gullner G, Janeczko A, Kogel KH, Schäfer P, Schwarczinger I, Zuccaro A, Skoczowski A (2008) Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist* 180: 501-510.

Barna B, Smigocki AC, and Baker JC (2008) Transgenic Production of Cytokinin Suppresses Bacterially Induced HR Symptoms and Increases Antioxidative Enzyme Levels in *Nicotiana*. *Phytopathology* 98: 1242-1247.

Pogány M, vonRad U, Grün S, Dongó A, Bahnweg G, Barna B and Dürner J (2009) Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria* pathosystem. *Plant Physiology* 151: 1459-1475.