

Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont

II. ATK Tudományos Nap

Velünk Élő Tudomány



2013. november 8.
Martonvásár



II. ATK Tudományos Nap

Velünk Élő Tudomány

**Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont**

II. ATK Tudományos Nap

Velünk Élő Tudomány

Szerkesztette

JANDA TIBOR

Lektoráló bizottság

**JANDA TIBOR
KOCSY GÁBOR**

PÁL MAGDA

**RAKSZEGI MARIANN
SZALAI GABRIELLA
VÁGÚJFALVI ATTILA**

**2013. november 8.
Martonvásár**

Kiadja: Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont, Martonvásár
Felelős kiadó: Bedó Zoltán

Nyomdai munkák: Corvin Style Kft., Gyál
Felelős vezető: Király István

ISBN: 978-963-8351-41-8

TARTALOM

Plenáris előadások

<i>Barnabás Beáta, Bedő Zoltán: Mindennapi kenyérünk</i>	10
<i>Schmidt János, Zsedely Eszter: Bypass takarmányok a nagy laktációs termelésű tehének takarmányozásában</i>	14
<i>Tóth Zoltán: Innovatív kutatások a Pannon Egyetem Georgikon karán</i>	19

Állatorvosi és állattenyésztési kutatások

<i>Bene Szabolcs, Kecskés Borbála Sarolta, Polgár J. Péter: Kifejlett magyar sportló tenyészkancák élősúlya, testméretei és ízületi szögei</i>	24
<i>Bercsényi Miklós, Havasi Máté, Beliczky Gábor, Gál Dénes, Balikó Tímea, Székely Csaba, Merth János, Pál László: Kísérletek a lesóharcsa (<i>Silurus glanis</i>) intenzív tömegtermelésének megalapozására. (I-II) (n-formák megjelenése, etetési gyakoriság hatásai)</i>	28
<i>Dublecz Károly, Pál László: Baromfi tápok fitáz és xilanáz enzim-kiegészítésének hatása az aminosavak emészthetőségére</i>	32
<i>Gyuranecz Miklós, Dénes Béla, Sulyok Kinga, Kreizinger Zsuzsa, Simor Zoltán, Bajnóczi Pál, Hornok Sándor, Szeredi Levente, Balla Eszter, Sugár László, Dán Ádám: A Q-láz állategészségügyi helyzete Magyarországon</i>	36
<i>Nagy Szabolcs Tamás: Időparaméteres spermatológiai vizsgálatok áramlási citometria alkalmazásával</i>	39
<i>Szabó Ferenc: Ujhelyi Imre öröksége a magyaróvári állattenyésztési kutatásokban</i> .	42
<i>Szmolka Ama: Multirezisztens E. coli törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia tulajdonságai és potenciális közegészségügyi jelentősége</i>	46
<i>Khayer Bernadett, Magyar Tibor, Wehmann Enikő: Humán és állati eredetű bordetella bronchiseptica törzsek összehasonlító vizsgálata PCR-RFLP-vel és filogenetikai analízissel</i>	50
<i>Varga László: Hasznos mikroorganizmusok az élelmiszerekben</i>	54

Növénynemesítési és növénytermesztési kutatások

<i>Árendás Tamás, Berzsényi Zoltán, Bónis Péter, Micskei Györgyi, Fodor Nándor: Martonvásár agrotechnikai kutatásainak eredményei a magyar növénytermesztésben</i>	58
<i>Bidló András, Berki Imre, Gálos Borbála, Gribovszki Zoltán, Móricz Norbert, Mátyás Csaba: Termőhelyi tényezők szerepe erdőterületen, az extrém időjárási helyzetek kiegyenlítésében</i>	63
<i>Láng László, Kuti Csaba, Bedő Zoltán: Búzafajták nemesítési értékének becslése</i>	67
<i>Neményi Miklós: A fenntartható növénytermelés tudományos háttere, különös tekintettel a precíziós, termőhely specifikus technológiákra</i>	71

<i>Kollaricsné H. Margit, Aranyi Nikolett Réka, Taller János, Hoffmann Borbála:</i>	
A nitrogén-kezelés hatása burgonyafajták klorofill tartalmára	217
<i>Lehoczky Éva, Gólya Gellért, Radimszky László, Riczu Péter, Tamás János:</i>	
Gyomflóra vizsgálatok trágyázási tartamkísérletben	221
<i>Khayer Bernadett, Sulyok Kinga, Wehmann Enikő, Magyar Tibor: Nyúl eredetű</i>	
<i>Bordetella bronchiseptica</i> törzsek antibiotikum érzékenysége	225
<i>Micskei Györgyi, Pók István, Árendás Tamás, Bónis Péter, Berzsenyi Zoltán,</i>	
<i>Jócsák Ildikó: A kukorica fotoszintetikus aktivitásának változása vetésidő</i>	
és nitrogén műtrágyázás hatására	229
<i>Molnár Orsolya, Szécsi Árpád: A <i>fusarium verticillioides</i> és a <i>fusarium musae</i></i>	
előfordulása Magyarországon forgalmazott banánon	233
<i>Nagy Veronika Anna, Pogány Miklós, Bozsó Zoltán, Tóth Evelin: Fehérjelebontó</i>	
faktorok szerepének vizsgálata <i>Arabidopsis thaliana</i> kórokozókkal	
szembeni rezisztenciaválaszában	237
<i>Ragályi Péter, Kádár Imre, Szemán László, Csontos Péter: Fajösszetétel-változás</i>	
telepített gyeppen különböző tápanyag-ellátottsági szinteken	241
<i>Sándor Renáta, Rajkai Kálmán, Fodor Nándor: Homoktalaj nedvesség és</i>	
hőmérséklet dinamikája növénytermesztési kísérlet kezeléseiben	246
<i>Szabó Réka, Gyuris Éva, Wehmann Enikő, Magyar Tibor: Hazai baromfi fajokból</i>	
és vadmadarokból izolált <i>Bordetella avium</i>, <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	
és <i>Riemerella anatipestifer</i> törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata .	251
<i>Szili-Kovács Tibor, Takács Tünde, Máthé-Gáspár Gabriella, Anton Attila:</i>	
Talaj mikrobiális válaszok nehézfémekkel szennyezett árterületen	
(Toka-patak, Gyöngyösoroszi)	254
<i>Takács Tünde, Füzy Anna, Murányi Attila, Uzinger Nikolett, Anton Attila:</i>	
Fitostabilizációs technológiák optimalizálása irányított mikorrhizációval	258
<i>Tarján Zoltán László, Péntes J. Judit, Tóth P. Róza, Benkő Mária: Circovírus</i>	
vizsgálatok evolúciósan ősbib gerincesekben	263
<i>Sváb Domonkos, Horváth Balázs, Maróti Gergely, Tóth István: Szarvasmarha</i>	
eredetű atípusos <i>Escherichia coli</i> O157 törzsek genetikai vizsgálata	268
Titoktartási felhívás	273

FEHÉRJELEBONTÓ FAKTOROK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA *ARABIDOPSIS THALIANA* KÓROKOZÓKKAL SZEMBENI REZISZTENCIAVÁLASZÁBAN

NAGY VERONIKA ANNA, POGÁNY MIKLÓS, BOZSÓ ZOLTÁN, TÓTH EVELIN

MTA Agrártudományi Kutatóközpont
Növényvédelmi Intézet, Kóréletani Osztály
1022 Budapest, Herman Ottó út 15.
nagy.veronika@agr.ar.mta.hu

Közel 80 fehérjelebontó folyamataiban sérült *Arabidopsis thaliana* inszerciós mutáns vonalat vizsgáltunk *Alternaria brassicicola* gomba fertőzése iránti fogékonyság szempontjából. A vizsgált genotípusok közül három vonal esetében észleltünk komolyabb eltérést a gomba- okozta tünetek szintjén vad típusú növényekkel összehasonlítva. Az így kiválasztott lókuszokkal kapcsolatban feltételezzük, hogy szerepet játszhatnak a növény *Alternaria*-val szemben megnyilvánuló betegségellenállóságában. Célunk, hogy e három korábban nem tanulmányozott *Arabidopsis* gén rezisztenciában betöltött szerepét jellemezzük, amit a negyedik kromoszómán található *At4g10540* lókusz vizsgálatával kezdtünk meg. Ez a gén a nukleotidsorrendje alapján szubtiláz aktivitású szerin-proteáz fehérjét kódol. Valós idejű PCR módszerrel meghatároztuk a gombabiomassza mennyiségét a vad típusú *Columbia* illetve az inszerciós mutáns növényekben. A mutáns növények esetében nagyobb gombabiomassza mennyiséget detektáltunk, ami valóban megnövekedett fogékonyságra utal. A gén jelentőségét komplementálási valamint túltermeltetési vizsgálatokban szeretnénk bizonyítani, sejtben való lokalizációját pedig GFP fúziósfehérje konstrukciókkal határozzuk meg. A szükséges klónozási lépéseket elvégeztük, a gént megszekvenáltattuk. cDNS biochip módszer segítségével elemezzük, hogy az *At4g10540* gén működésének hiánya miként befolyásolja a növény transzkripciós mintázatát kórokozóval történő fertőzés során.

Bevezetés

A különböző növényi védekezési folyamatok megismerése fontos információkat szolgáltat a betegségeknek jobban ellenálló növények előállításához. A rezisztencia több egymásra épülő folyamat eredménye, amely egyaránt tartalmaz növényi sejtelhalás nélküli és sejtelhalással járó folyamatokat (Bozsó és mtsai. 2009). A rezisztencia kialakulása szoros kontroll alatt álló folyamat, amely során számos élettani, biokémiai változás játszódik le a sejtekben.

Munkánk során a fehérjelebontó folyamatok egyes elemeinek szerepét tanulmányozzuk különféle rezisztencia típusokban. Saját és irodalmi adatok azt mutatták, hogy e géncsoport tagjai nagy számban változtatják meg aktivitásukat mikrobiális kórokozók támadása során, védekezésben betöltött szerepükről azonban keveset tudunk (Rautengarten és mtsai. 2005, Schmid és mtsai. 2005). A növényi fehérjelebontó rendszerek a védekezési reakciók különböző pontjain vehetnek részt a rezisztencia kialakításában: a felismerési reakciók létrehozásától kezdve (pl. az elicitor felszabadítása) a válaszreakció szabályozási folyamatainak kialakulásáig, például transzkripciós faktorok és egyéb jelátviteli folyamatban résztvevő fehérjék lebontása révén (Rose és mtsai. 2010).

Kutatómunkánk során elsősorban egy szerin-proteázt, a lúdfű 4. kromoszómáján lokalizált *At4g10540*-es szubtilázt vizsgáljuk, mert a lókuszhoz kapcsolódó mutáció tüneti szinten fogékonyságot okoz az *A. brassicicola* nekrotróf gombakórokozó fertőzése iránt.

A szubtilázokra jellemző, hogy egy három aminosavból álló katalitikus doménnel rendelkeznek mely aszparaginsavból, hisztidinből és szerinből áll, ahol az aszparaginsav feltételezhetően szubsztrát kötőhelyet alkot.

Magasabb rendű növényekben több szubtiláz géncsalád képviselteti magát, lúdfűben 56, rizsben 63 tagját ismerjük. Lúdfűben van a legnagyobb csoport a proteínlebontásban szerepet játszó faktorok között (Schaller 2004). A növényi szubtilázokról kimutatták, hogy a gázcserenyílás- illetve magfejlődésben és az apikális merisztéma és a sejtfal védelmében játszanak szerepet, valamint közreműködnek peptid természetű növekedési faktorok szintézisében és az abiotikus környezetre való válaszáadásban is (Rose és mtsai. 2010). Eddig két olyan szubtilázról ismertek le, amelyek a patogének elleni védelemben játszanak szerepet. Egyikük a paradicsomból izolált P69 nevű szubtiláz fehérje, a másik pedig a szójában található GmSub Peppoli peptid (Tornero és mtsai. 1996, Pearce és mtsai. 2010).

Anyagok és módszerek

Fertőzési és gombabiomassza-mérési kísérleteinkhez 6 hetes *Arabidopsis thaliana* 'Columbia' valamint T-DNS inszerciós mutáns növényeket használtunk fel (SALK_142870C, SALK_097102C, SALK_082139C). A növényeket burgonya-dextróz táptalajon tenyésztett *Alternaria brassicicola* gombaszuszpenzióval, permetezéssel fertőztük. A fertőzés mértékét a leveleken kifejlődő nekrotikusléziók száma és mérete alapján állapítottuk meg. A tüneteket 9 nappal az inokuláció után értékeltük. Gombabiomassza-mérési kísérleteinkhez az inokuláció utáni 3., 9. valamint 13. napon vettünk mintát a felső és az alsó levelekből. Ezt követően DNS-t vontunk ki GE Healthcare Phytopure Kit-tel. Majd a DNS mennyiségek kiegyenlítése után a real-time PCR reakcióhoz Kapa SybrFast Kit-et használtunk. Kontrollként a konstitutív kifejeződésű *At4g26410* gént használtuk (Czechowski és mtsai. 2005), a gombabiomassza detektálásához *Alternariabrassicicola* ITS régiójára tervezett primereket alkalmaztunk. A mintavételt és a mérést 3 ismétlésben végeztük. A statisztikai értékelést Student féle t-próbával végeztük el.

A komplementálási vizsgálatainkhoz előzetesen a szubtilázgénnel komplementer szekvenciával, Kozak-szekvenciával valamint restriktív helyel ellátott primereket terveztünk a gén start kodonjától körülbelül 700 bázispárnyira, hogy a gént a távoli szabályozó elemeivel együtt tudjuk amplifikálni a vektorba klónozáshoz. A gén felszaporításához Phusion High Fidelity polimerázt használtunk. Ezt követően Viogene Gel-M gélizóláló kittel tisztítottuk a fragmentet. Az inszert klónozását *pGreen II* bináris vektorrendszerrel végeztük. A plazmidot Dh5 α kompetens sejtbe transzformáltuk, a sikeresen klónozott és transzformált telepek kiválasztása kék-fehér szelekción alapult. A klónok kiválasztása után plazmidot tisztítottunk Bio 101 Miniprep Express kittel majd a tisztított plazmidot szekvenáltattuk. A túltermeltetéshez valamint a GFP fúziósfehérje vizsgálatokhoz, gyökérből RNS-t izoláltunk Trizollal, ezt követően cDNS-t szintetizáltunk Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit-tel, majd a szubtiláz gént tervezett primerekkel amplifikált PCR terméket pGEM-TEasy vektorba klónoztuk és Dh5 α kompetens sejtbe transzformáltuk. A klónok kiválasztása után a plazmidtisztítást Bio 101 Miniprep Express kittel végeztük, az inszertet szekvenáltattuk.

Az *At4g10540* T-DNS inszerciós mutáns homozigóta állapotát és a mutáció pontos helyét bizonyítandó, az inszercióra specifikus valamint a mutációt szenvedett gént tervezett primerekkel meghatároztuk a proteáz mutánsok genotípusát. A növények DNS kivonását Sigma RED Extract-N-Amp Tissue PCR Kit segítségével végeztük.

A génexpressziós mintázatot AgilentArabidopsis (V4) Gene Expression cDNS biochip rendszerrel vizsgáltuk fertőzött vad típusú, valamint szubtiláz mutáns növények cDNS mintáiból.

Eredmények és következtetések

A fertőzési vizsgálatokban három genotípuson észleltünk megnövekedett fogékonyságot illetve ellenállóságot a vad típushoz képest. Az *At4g10540* inszerciós mutáns, amely az általunk részletesebben vizsgált szerin-proteáz génben sérült vonal, valamint az *At2g38590* gént mutáns, mely egy F-boksz fehérjében sérült genotípus esetében nagyobb mértékű volt a

nekrotikusléziók száma. Az *At4g23520* génben sérültvonal esetében mely egy cisztein-proteáz mutáns (*At4g23520*), a növények gombafertőzésre nagyobb mértékű ellenállóságot mutattak.

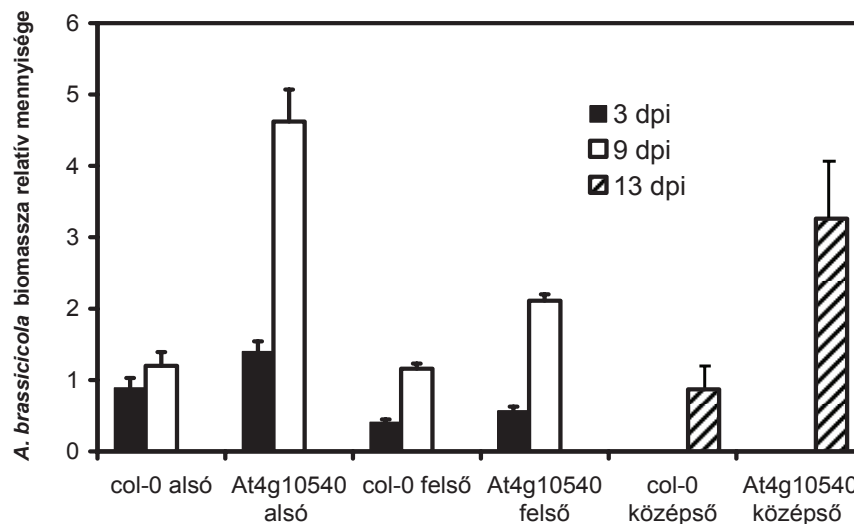
A valós idejű PCR-es kísérletek során megfigyeltük, hogy a fertőzés utáni 9. napon az *At4g10540* mutáns növények esetében erőteljesen megnövekedett a gombabiomassza mennyisége a vad típushoz képest, a relatív gombabiomassza mennyiség az alsó levelekben intenzívebb volt (1. ábra). A fertőzés utáni 13. napon a mutáns levelekben a biomassza mennyiség szintén magasabb volt. (A fertőzés utáni 3. napon nem tapasztaltunk még szignifikáns gombabiomassza növekedést.) Ezek az adatok arra utalnak, hogy a vizsgált gén által kódolt szubtiláz izoforma nem csupán a gomba által előidézett nekrotikus tünetek kifejlődésének gátlásában játszhat szerepet, hanem a gomba növekedését limitálni képes növényi rezisztencia kialakításában is.

Szekvenálás eredménye igazolta, hogy valóban a kívánt szekvenciát amplifikáltuk és klónoztuk, ami most már rendelkezésünkre áll komplementálási vizsgálatokhoz.

Genotipizálással igazoltuk a mutáció pontos jelenlétét az *At4g10540* gén mindkét allélje esetében.

A cDNsbiochip vizsgálat eredményei a kezünkben vannak, jelenleg elemezzük őket.

RT-PCR reakcióval bizonyítottuk, hogy a génről történik mRNS átíródás, ami azért lényeges, mert korábban kérdéses volt, hogy a gén kifejeződik-e.



1. ábra. *Alternaria brassicicola* gombabiomassza relatív mennyisége vad típusú (Col-0) és *At4g10540* mutáns *Arabidopsis* növények alsó, felső és középső leveleiben. A vad típusú és a mutáns növények gombabiomassza átlagai 9 és 13 nappal a fertőzés után szignifikánsan különböznek egymástól $P < 0,001$ (9 dpi) és $P < 0,05$ (13 dpi) szinten.

Irodalom

- Schaller, A. (2004) A cutabovethe rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220: 183-197.
- Bozsó, Z., Maunoury, N., Sztamari, A., Mergaert, P., Ott G, P., Zsíros, L., Szabó, E., Kondorosi, É., Klement, Z. (2009) Transcriptome analysis of a bacterially induced basal and hypersensitive response of *Medicago truncatula*. *Plant Mol. Biol.* 70:627-646.

- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., Scheible, W.F. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139: 5–17.
- Pearce, G., Yamaguchi, Y., Barona, G., Ryan, C.A. (2010) A subtilisin-like protein from soybean contains an embedded, cryptic signal that activates defense-related genes. *PNAS* 107:14921-14925.
- Rautengarten, C., Steinhauser, D., Bussis, D., Stintzi, A., Schaller, A., Kopka, J. (2005): In ferring hypotheses on functional relationships of genes: Analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. *PLoS Comput Biol* 1: e40
- Rose, R., Schaller, A., Ottmann, C. (2010): Structural features of plant subtilases. *Plant Signaling & Behavior* 5:2, 180-183
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D., Lohmann, J.U. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* 37: 501-506.
- Tornero, P., Conejero, V., Vera, P. (1996): Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6332-6337