

A pályázat címe:

A szisztemikus szerzett rezisztenciában szerepet játszó molekuláris mechanizmusok vizsgálata

A kutatási téma - elméleti háttér és megvalósítandó célok:

Bizonyos fertőzések és kémiai kezelések olyan változásokat indukálhatnak a növényekben, melyek eredményeként a növények védettséget nyernek a később bekövetkező fertőzések és élettelen károsító tényezők hatásai ellen (Strobel and Kuć, 1995; Sticher et al., 1997). A növényi rezisztencia mesterséges fokozása stratégiailag nagy jelentőséggel bír a mezőgazdaság területén. Egyrészt a növényi rezisztencián alapuló növényvédelem kevesebb peszticidet használ fel, ami költségmegtakarítást és kisebb környezetszennyezést eredményez. Másrészt az abiotikus stressz, pl. a talaj magas sótartalma káros hatásainak jobban ellenálló növények olyan körülmények között is termesztethetők, melyek különben nem teszik lehetővé a gazdaságos növénytermesztést. A szisztemikusan szerzett rezisztencia (SAR) mechanizmusa még nem teljesen tisztázott (Mou et al., 2003), de az indukciót során többnyire megfigyelhető a reaktív oxigénformák (ROS) felhalmozódása (Lamb és Dixon, 1997; Grant és Loake, 2000). Emellett gyakran kimutatható az endogén szalicilsav-szint emelkedése, az ún. patogenezissel kapcsolatos gének fokozott expressziója és az antioxidáns kapacitás növekedése (Malamy et al., 1990; Ward et al., 1991; Fodor et al., 1997).

Korábbi kutatásaink szerint (Király et al., 2002) Xanthi-nc dohány esetében az antioxidáns rendszer több fontos tagja, pl. a szuperoxid-dizmutáz, a glutation, a glutation-reduktáz, glutation S-transzferáz fokozott aktivitást mutat a rezisztencia indukcióját követően. Ezzel szemben a Xanthi-nc dohányból előállított transzgenikus NahG dohányban a SAR nem indukálódott a szalicilsavat (SA) lebontó SA-hidroxiláz hatásának eredményeként, s elmaradt az antioxidánsok aktiválódása, ami alátámasztja azt a hipotézist, hogy az antioxidánsok fontos szerepet játszhatnak a SAR mechanizmusában.

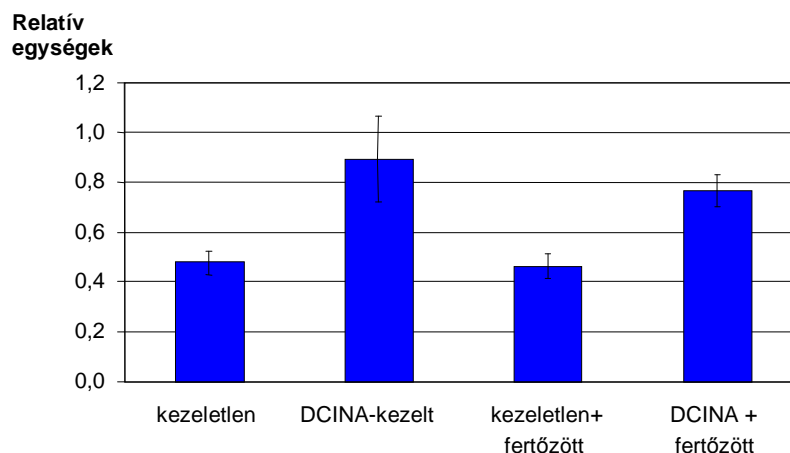
Célul tűztük ki, hogy jobban megismerjük a növények természetes ellenálló képességének erősödése mögött meghúzódó biokémiai és molekuláris szintű változásokat. Az említett kutatási előzmények alapján a pályázat során a következő kérdésekre kerestünk választ:

- 1) Pontos mérésekkel ellenőrizni, hogy a SAR indukciója után hogyan alakul a szuperoxid és a hidrogén-peroxid koncentrációja a növényekben, és magyarázattal szolgálni rá
- 2) Kideríteni, hogy az antioxidáns gének fokozott expressziója felelős-e a SAR-ral rendelkező növényekből kimutatható nagyobb antioxidáns kapacitásért
- 3) A dohányon kívül más növényeket és rezisztenciát indukáló eljárásokat is bevonni az addig dohányra, dohány mozaik vírusra (TMV) és szalicilsavra alapozott kutatásba

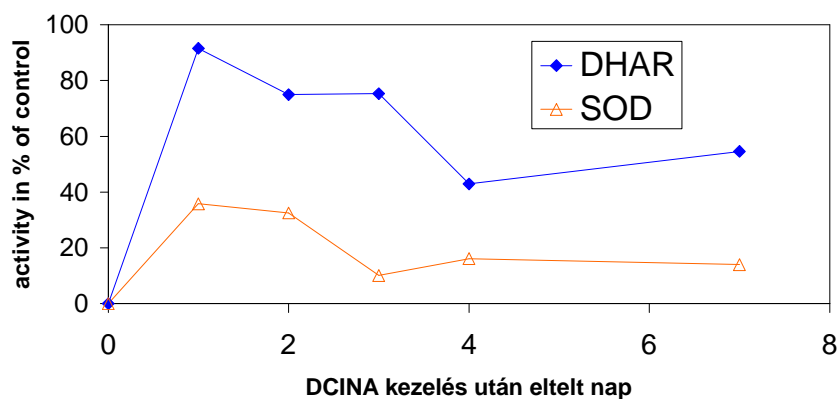
Az alábbiakban témakörönként tárgyalom az **eredmények részletes ismertetését**. Előfordul, hogy egy téma vizsgálata egyszerre több célt is szolgál a fenti három közül.

Egy egyszikű növény, az árpa INA-kezelés hatására tapasztalható lisztharmattal szembeni fokozott rezisztenciája az antioxidánsok gátlásán és a prooxidánsok indukcióján keresztül érvényesül

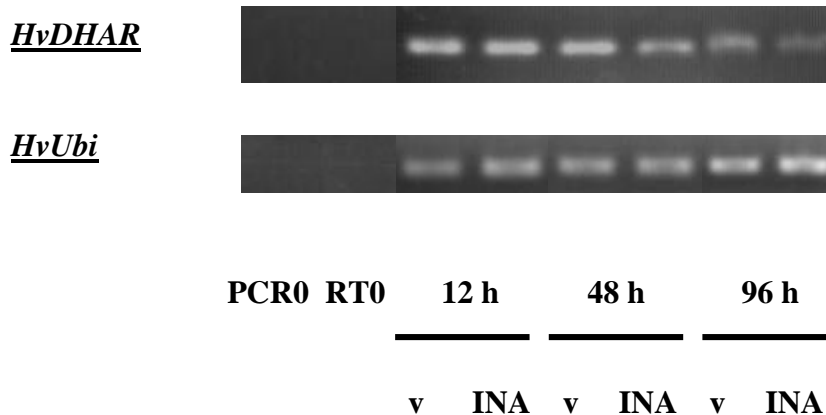
Ezek az eredmények nem jelentek meg nyomtatásban, ezért részletesebben térek ki rájuk. Az árpa (*Hordeum vulgare*) esetében alkalmazott rezisztencia-indukáló szer, a 2,6-diklór-izonikotinsav (INA) a hatásmechanizmusát tekintve egy szalicilsav-analóg (Kogel et al., 1994), ami rezisztenciát idéz elő az árpalisztharmattal (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) szemben. Az eredetileg fogékony, de INA-val kezelt növények (8 mg INA/l talaj) leveleiben a fertőzések helyén nagyobb arányban jelennek meg hiperszenzitív típusú nektrózisok, és a hidrogén-peroxid szintje is jelentősen emelkedik a kezeletlen növényekben mérthez képest (**1. ábra**). A kezelt levelekben (fertőzetlenben és lisztharmat-fertőzöttben) mind a szuperoxid-dizmutáz (SOD), mind a dehidroaszkorbát-reduktáz (DHAR) aktivitása jelentősen csökkent (**2. ábra**). Egy árpa *DHAR* gén expressziója a INA kezelése után 2-4 nappal kismértékben csökkent (**3. ábra**), de az eredmény nem volt megbízhatóan reprodukálható. Egy árpa Cu-Zn SOD gén, a *SOD1* expressziója vizsgálata során sem tapasztaltunk változást (**4. ábra**). E kísérletek alapján feltételezzük, hogy az antioxidatív kapacitás alulszabályozása kapcsolatban van az INA-val kezelt és fertőzött levelekben a ROS-felhalmozódással és a hiperszenzitív típusú nektrózisok megjelenésével, ill. a rezisztenciával.



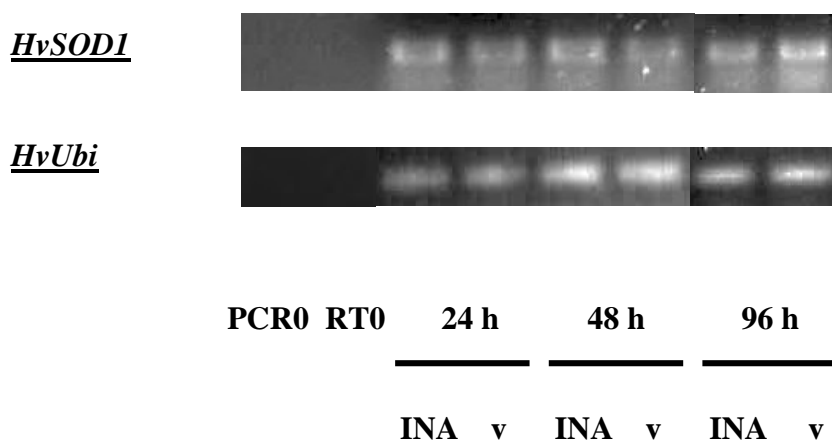
1. ábra: H₂O₂ felhalmozódása árpa levelekben 2,6-diklór-izonikotinsav (DCINA) kezelés és lisztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) fertőzés hatására. A 2',7'-diklór-fluoreszcein kivonását követően mért fluoreszcencia intenzitás a H₂O₂ mennyiségére utal. A spektrofluorimetriás mérésből kapott fotonszámot relatív egységben adjuk meg. A növényeket a DCINA kezelés után 4 nappal fertőztük lisztharmattal, a mérés 2 nappal a fertőzés után történt



2. ábra: Dehidroaszorbát-reduktáz (DHAR) és szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimaktivitások spektrofotometriásan mérve DCINA kezelés hatására árpa levelekben. Az adatokat a kezeletlen növényben mértékhez viszonyítottuk



3. ábra: Egy citoplazmás dehidroaszorbát-reduktáz fehérjét kódoló árpa gén (*HvDHAR*) mRNS-szintű expressziójának változásai INA (2,6-diklór-izonikotinsav) kezelés hatására árpa levelekben. v = vizes kontroll. A génexpressziót egy kétlépéses reverz transzkripció - polimeráz láncreakció módszerrel (RT-PCR) mértük, referenciának egy árpa ubikvitin gén (*HvUbi*) expresszióját tekintettük. RT 0 = a reverz transzkripció negatív kontrollja (nincs RNS templát); PCR 0 = a polimeráz láncreakció negatív kontrollja (nincs cDNS templát).



4. ábra: Egy citoplazmás SOD fehérjét kódoló árpa gén (*HvSOD1*) mRNS-szintű expressziójának változásai INA (2,6-diklór-izonikotinsav) kezelés hatására árpa levelekben. v = vizes kontroll. A génexpressziót egy kétlépéses reverz transzkripció/polimeráz láncreakció módszerrel (RT-PCR) mértük, referenciának egy árpa ubiquitin gén (*HvUbi*) expresszióját tekintettük. RT 0 = a reverz transzkripció negatív kontrollja (nincs RNS templát); PCR 0 = a polimeráz láncreakció negatív kontrollja (nincs cDNS templát).

Az INA által indukált SAR során tapasztalható mRNS-szintű génexpresszió kimutatására real-time PCR technikát is segítségül hívtunk. DHAR, SOD és glutation-reduktáz (GR) antioxidánsok esetében. Az INA-val kezelt árpa növényekben kismértékben nőtt a GR aktivitása a csökkent a DHAR aktivitás mellett. Azonban a real-time PCR segítségével mért génexpresszió nem változott a kezelés nyomán egyik antioxidáns esetében sem. Valószínűleg az enzimaktivitás változásokért a transzkripció után zajló szabályozás a felelős. Összefoglalva a pályázat keretében végzett kísérleteink eredményeit megállapítható, hogy az INA által indukált rezisztencia szoros kapcsolatban van a növények hidrogén-peroxid tartalmával és az antioxidáns/prooxidáns arányok változásaival. Korábbi vizsgálataink utaltak már rá, hogy a H₂O₂ lokális felhalmozódása a lisztharmat kórokozó által megtámadott sejtekben szoros kapcsolatban áll a rezisztenciával (Hückelhoven et al., 1999). Jelen vizsgálatok annyiban járultak hozzá a folyamat megértéséhez, hogy kvantitatív mérésel mutattuk ki a ROS felszaporodását a rezisztencia indukciója során, valószínűsíthető, hogy a DHAR és SOD antioxidánsok gátlása elősegítheti a ROS felhalmozódását, és az enzimek regulációjában nem tudtuk megerősíteni a génexpresszió szerepét. Elképzelhető, hogy a több izoenzim miatt egyéb, nem vizsgált gén átírása változik meg, vagy a fehérjék szintjén történik további szabályozás.

A H₂O₂ szerepének további tisztázása érdekében az árpaleveleket a hidrogén-peroxid előállítására alkalmas glükóz és glükóz-oxidáz keverékével infiltráltuk, így magában a növényben állítottuk elő a H₂O₂-t. Northern-blot technika alkalmazása révén megállapítottuk, hogy a H₂O₂ hatására a SAR ismert marker génje, a *PR-1b* expressziója aktiválódott (Schultheiss et al., 2003). Ez az eredmény alátámasztja azt az elképzelést, hogy a SAR ismert marker génje szabályozása a redox egyensúly megváltozása révén valósulhat meg. Egy másik vizsgált marker gén, az oxálsav-oxidázt kódoló gén expressziója nem változott (Schultheiss et al., 2003).

A dohány TMV-fertőzés és kémiai kezelés hatására kialakuló TMV-vel szemben jelentkező indukált rezisztenciája a szuperoxid és hidrogén-peroxid csökkenő szintjével és antioxidáns jellegű gének indukációjával mutat összefüggést

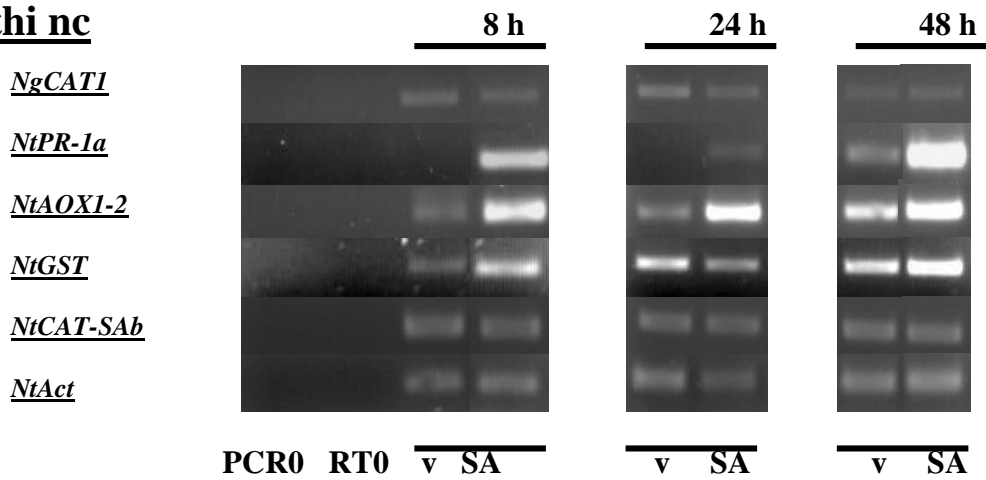
Eredményeinket részben megjelentettük már (Hafez et al., 2004), ezeket csak röviden ismertetném. A TMV-vel fertőzött rezisztens Xanthi-nc dohányban lokális nekrotikus tünetek alakulnak ki a fertőzés helyén. A nekrotikus léziók száma és átmérője, tehát a sejthalál mértéke csökken abban az esetben, ha egy korábbi TMV-fertőzés, szalicilsavas, vagy a

szalicilsavval analóg benzotiadiazolos (BTH) kezelés SAR-t indukál a növényben (Fridrich et al., 1996). Kimutattuk, hogy a ROS, melynek a programozott sejthalál indukációjában szerepet tulajdonítanak, csökkenő szintet mutat a SAR indukációjának hatására. TMV-fertőzést követően alacsonyabb szuperoxid és a hidrogén-peroxid koncentrációkat mértünk a SAR-ral bíró Xanthi-nc növényekben, mint a megfelelő NahG párjukban. A NahG transzgenikus dohányokban a szalicilsav nem tud felszaporodni, ezért bennük nem indukál a TMV-fertőzés szisztémikus rezisztenciát, és a vírusfertőzés után a nekrotikus tünetek is súlyosabbak. A NahG dohány levelein a léziók nagyobbak és nem korlátozódnak a fertőzött növényi részekre, hanem továbbterjednek. A NahG dohányokban a TMV-fertőzéssel megkísérelt sikertelen SAR indukációnak a következtében nem változott a prooxidánsok szintje, ahogy a nekrotikus tünetek szintjén sem volt különbség kimutatható. Ez arra enged következtetni, hogy az aktív oxigén formák szerepet játszanak a TMV okozta tünetek kialakulásában, illetve az antioxidánsoknak a SAR kialakulásával együtt bekövetkező indukciója hatékonyan tudja csökkenteni a szabadgyökök mennyiségét a dohányban (Hafez et al., 2004).

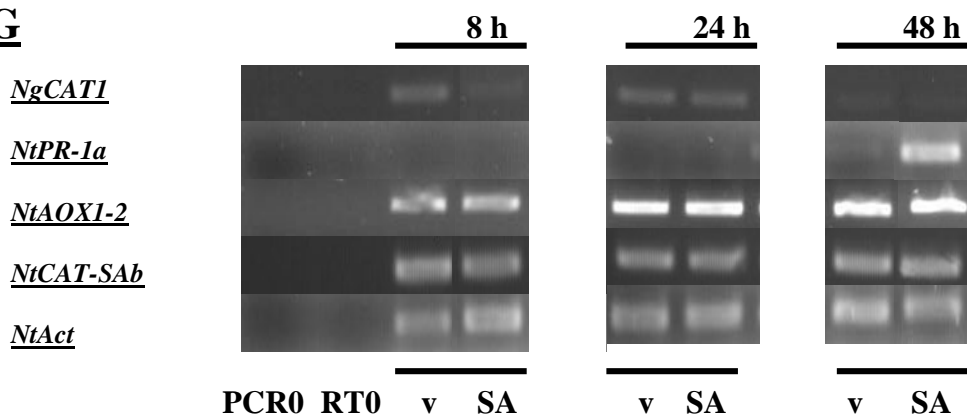
A BTH kezelés azonban mind a vad típusú Xanthi-nc, mind a transzgenikus NahG dohányokban rezisztenciát indukált, ami megfelelt az előzetes várakozásunknak. A BTH kezelés eredményeképpen a szuperoxid, és a H_2O_2 koncentrációja is csökkent mindkét dohány TMV-fertőzött levelében. Valószínűnek tűnik ezen adatok fényében, hogy a szabad gyököknek fontos szerepük van a TMV okozta nekrotikus tünetek kialakulásában. Kimutattuk továbbá, hogy a TMV-vel és BTH-val indukált SAR hatására is csökken a vírustartalom a fertőzött dohánylevelekben, és nem csak a nekrotikus tünetek szorulnak vissza.

A szalicilsav (SA) dohányban a TMV-fertőzéssel azonos mechanizmus szerint szerzett rezisztenciát indukál és fokozza az antioxidáns kapacitást (Sticher et al., 1997; Fodor et al., 1997). A szalicilsav hatásmechanizmusa további tisztázásához vizsgáltuk a SA által indukált védekezési (részben antioxidáns) gének expressziós mintázatát reverz transzkripcióval egybekötött polimeráz láncreakció (RT-PCR) módszer segítségével. Vizsgálataink egyik eredménye szerint egy dohány kataláz gén (*NgCAT1*) mRNS szintű expresszióját a SA kissé csökkenti 8 órával a kezelést követően (**5. ábra**). Irodalmi források szerint az *NgCAT1* gén expressziója TMV fertőzés és szalicilsav kezelés után átmenetileg visszaszorul (Yi et al., 2003). A többi vizsgált gén esetében a SA kezelés növelte az mRNS-szintű expressziót, ezt tapasztaltuk egy patogenezissel kapcsolatos fehérjét kódoló gén (*NtPR-1a*), valamint egy alternatív-oxidáz (*NtAOX1-2*) és egy glutation S-transzferáz (GST) gén expressziójánál (**5. ábra**).

Xanthi nc



NahG



5. ábra: A szerzett rezisztenciával kapcsolatos gének (kataláz-1, patogenezis-gén-1a, alternatív oxidáz 1-2, glutation S-transzferáz mRNS-szintű expressziójának változásai dohánylevél korongokban, vad típusú (cv. Xanthi nc) és szalicilsav felhalmozásra képtelen transzénikus NahG növényekben, 0,2 mM szalicilsavas kezelés után, különböző időpontokban. v = vizes kontroll. A génextpressziót egy kétlépes reverz transzkripció/polimeráz láncreakció módszerrel (RT-PCR) mértük, referenciának egy dohány aktin gén (*NtAct*) expresszióját tekintettük. RT0 = a reverz transzkripció negatív kontrollja (nincs RNS templát); PCR0 = a polimeráz láncreakció negatív kontrollja (nincs cDNS templát)

Az említett gének SA hatására kapott expressziós mintázatát megvizsgáltuk a szalicilsav felhalmozására képtelen transzgenikus NahG dohányokban is. A SAR-ral kapcsolatos vizsgált gének (*NgCAT1*, *NtPR-1a*, *NtAOXI-2*,) expressziója/indukciója a NahG dohányokban általában jóval kisebb mértékű volt, ill. később (vagy egyáltalán nem) jelentkezett, mint a vad típusú növényekben, kivéve az *NtCAT-SAb* gént, amelynek kifejeződése egyáltalán nem változott (**5. ábra**). A NahG növényekben tapasztalt

génexpresszió-változások jól párhuzamba állíthatók a szalicilsav-felhalmozás és a szerzett rezisztencia hiányával.

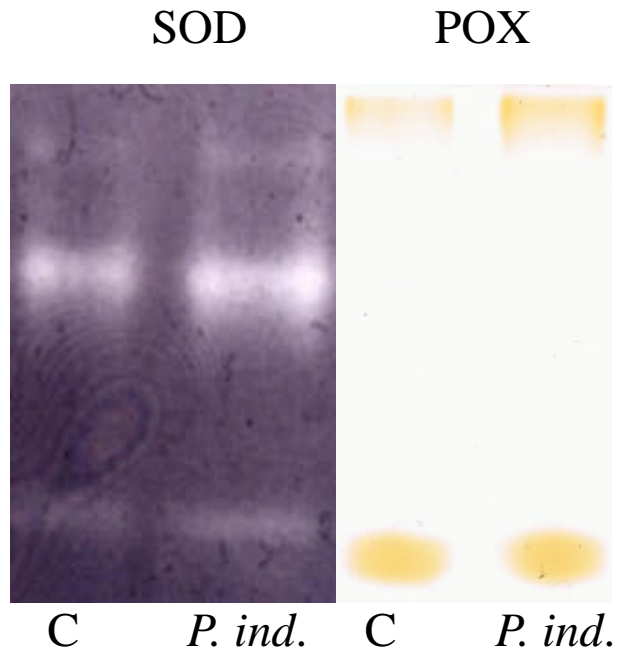
Eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy a SA dohánylevelekben fokozza az antioxidáns kapacitást az alternatív oxidáz és a GST génexpressziójának növelése révén. A szerzett rezisztenciában szerepet játszó, részben antioxidáns hatású gének expressziójának fokozódásával együtt jár a TMV fertőzés nekrotikus tüneteinek visszaszorulása.

A Piriformospora indica gyökérlakó szimbióta gomba által indukált szisztémikus rezisztencia szintén antioxidánsok indukciójával kapcsolatos

A szerzett rezisztencia indukciója árpában is lehetséges mikroorganizmusok segítségével. A már SAR már korábban tanulmányozott kémiai indukcióján kívül lehetőségem nyílt kutatni a *Piriformospora indica* gyökérlakó gomba által indukált szisztémikus rezisztencia mechanizmusát is. A pályázat benyújtásakor erről a lehetőségről még nem volt tudomásom, ezért ez a vizsgálat előre nem tervezett ugyan, de jól illeszkedik a pályázat témakörébe és hasznosan egészíti az egyszikűekre vonatkozó, eddig kizárólag kémiai SAR indukción alapuló vizsgálatainkat.

A *P. indica* gombával fertőzött növények gyökerében kimutatható a fertőzést követően a H₂O₂ lokális felszaporodása, ami a rezisztens növényi válaszreakció jellemzője. Azonban a ROS felhalmozódása átmeneti jellegű, és a növény - gomba szimbiózis kialakulása után már nem található oxidatív folyamatokra utaló jel. Az indukált árpanövényekben vizsgáltuk az antioxidánsok indukcióját, különös tekintettel az aszkorbinsavra. Kimutattuk, hogy az aszkorbinsav koncentrációja jelentősen emelkedik a gombával kezelt növények gyökerében, s a redukált aszkorbát aránya is nőtt az oxidált formához viszonyítva (Waller et al., 2005). A gyökerekben szignifikánsan nőtt a DHAR enzim aktivitása, ami összhangban van az aszkorbinsavas eredményekkel. Emelkedett a kezelt növények gyökerében a SOD és az egyik peroxidáz izoenzim aktivitása is (**6. ábra**). Kimutattuk, hogy a *P. indica* gombával előzetesen fertőzött növények nagyfokú rezisztenciát mutattak sóstressz és a szintén gyökereket fertőző *Fusarium culmorum* kórokozóval szemben. A levelekben a redukált glutation mennyisége és a glutation-reduktáz indukálódott a *P. indica* fertőzés hatására. Kimutattuk, hogy az indukció szisztémikus rezisztenciát eredményezett a leveleket fertőző árpalisztharmat ellen. Feltételezzük, hogy a *P. indica* gombával kezelt árpa nagyobb antioxidáns kapacitása úgy járul hozzá a fokozott rezisztenciához, hogy erősíti a gazdanövény védelmét a kórokozó ellen

termelődött káros ROS ellen, mely nemcsak a kórokozóra, hanem a gazda sejtjeire is kártékony hatást fejt ki.



6. ábra: *Piriformospora indica* gombával fertőzött 3 hetes árpa gyökereiben mért szuperoxid-dizmutáz (SOD) és peroxidáz (POX) aktivitás natív gélelektroforézis és specifikus festés után. C = kontrol kezeletlen növény, *P. ind.* = a gombával kezelt növény

A kutatási eredmények hasznosításának lehetőségei, a kutatási téma további lehetséges irányai

- A kísérleti eredményekből világossá vált, hogy az SAR indukciója hatására a növények antioxidáns kapacitása általában fokozódik, s ez elsősorban az abiotikus stressz és a nekrotróf kórokozók elleni rezisztencia során érvényesül pozitívan. Konkrét esetekben azonban tapasztalunk eltéréseket, s ez óvatos általánosításra int minket a különböző növények, illetve a különböző SAR-indukciós mechanizmusok összehasonlítása során.
- Kutatási eredményeink azt is mutatják, hogy a növényt nem károsító kis töménységű hidrogén-peroxid képződése ill. mesterséges alkalmazása immunstimuláló hatású és fokozza az antioxidáns kapacitást.
- Az enzimaktivitások szintjén tapasztalt változásokat a génexpressziós vizsgálatok csak részben támasztották alá, ami adódhat technikai problémából, fakadhat az aktivitásbeli különbségek nem túl jelentős mértékéből, vagy abból, hogy az antioxidáns enzimek többsége módosul a fehérjeszintézist követően.

- A *P. indica* gomba által indukált rezisztencia nemcsak kórokozók, hanem abiotikus stressz esetén is hatásos lehet, s ez esetben is kapcsolatba hozható a fokozott antioxidáns kapacitással. A fokozott sótolerancia annak lehetőségét villantja fel, hogy a mezőgazdasági termelés a Föld nem csekély részére kiterjedő száraz és sós talajok esetében is eredményes lehet, ha alkalmazzuk az indukált rezisztencia e sajátos formáját. Ez a lehetőség azért kézzelfogható, mert a *P. indica* mesterséges táptalajon könnyen fenntartható és szaporítható gomba. Vizsgálatát tovább szeretnénk folytatni egy új OTKA pályázat keretében, amely 2006-tól indul.

Idézett irodalom

- Fodor, J., Gullner, G., Ádám, A. L., Barna, B., Kömives, 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 Physiol.* 114, 1443–1451.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M. G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Métraux, J.-P., Kessmann, H., Ryals, J. 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10, 61–70.
- Grant, J.J., Loake, G.J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124, 21-29.
- Hafez, Y. M., Fodor, J., Király, Z. 2004. Establishment of acquired resistance confers reduced levels of superoxide and hydrogen peroxide in TMV-infected tobacco leaves. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 39, 347-360.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C., Kogel, K.-H. 1999. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* 119, 1251-1260.
- Király, Z., Barna, B., Kecskés, A., Fodor, J. 2002. Down-regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by TMV. *Free Rad. Res.* 36, 981–991.
- Kogel, K.-H., Beckhove, U., Dreschers, J., Münch, S., Rommé, Y. 1994. Acquired resistance in barley: the resistance mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a

- phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiol.* 106, 1269-1277.
- Lamb, C., Dixon, R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., Raskin, I. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250, 1002–1004.
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935-944.
- Schultheiss, H., Dechert, C., Király, L., Fodor, J., Michel, K., Kogel, K.-H., Hüchelhoven, R. 2003. Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Sci.* 165, 1275-1280.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 235–270.
- Strobel, N. E., Kuć, J. 1995. Chemical and biological inducers of systemic resistance to pathogens protect cucumber and tobacco plants from damage caused by paraquat and cupric chloride. *Phytopathology* 85, 1306-1310.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hüchelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D., Franken, P., Kogel, K.-H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13386-13391.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P., Ryals, J. A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- Yi, S.Y., Yu, S.H., Choi, D. 2003. Involvement of hydrogen peroxide in repression of catalase in TMV-infected resistant tobacco. *Mol. Cells* 15, 364-369.