

A jelentett pályázat címe:

## **Rezisztencia-formák felhasználása a növények immunizálására és ellenálló, transzgenikus növények nemesítésére**

### **A kutatási téma - elméleti háttér és megvalósítandó célok**

A növények ún. veleszületett betegség rezisztenciája ("innate immunity") lehet gazda- és nem-gazda típusú. A gazda-rezisztenciánál egy adott növényfajta rezisztenciája érvényesül vagy egy adott kórokozó rasszal szemben (rassz-specifikus) vagy a kórokozó összes rasszával szemben (nem rassz-specifikus). A rassz-specifikus rezisztencia biokémiai és genetikai háttéréről részletes ismereteink vannak. A reaktív oxigénszármazékok (ROS) gyors felhalmozódása (pl. szuperoxid  $/O_2^-/$ , hidrogén-peroxid  $/H_2O_2/$  hidroxil gyök  $/OH^{\cdot}/$ ), mint korábbi vizsgálatainkból is kiderült, kettős hatással jár. Okozója lehet a kórokozók előlésének (azaz a rezisztenciának) és okozója lehet a növényi sejtnekrózisoknak, így a hiperszenzitív reakciónak (HR) is (lásd pl. Lamb és Dixon, 1997; Grant és Loake, 2000; Torres et al., 2006, Király et al., 2007). A rassz-specifikus rezisztencia, amely legtöbbször HR kialakulásával jár, rezisztencia-nemesítésre csak korlátozott sikerrel alkalmazható, ugyanis a kórokozó populációban pár éven belül megjelennek a rezisztenciát áttörő új, virulens törzsek. A növényvilágban leggyakoribb és legtartósabb, de kevésbé tanulmányozott ún. nem-gazda rezisztenciánál viszont egy adott növényfaj valamennyi egyede rezisztens egy kórokozó összes rasszával szemben, és ez a rezisztencia gyakran tünetmentes, azaz nem jár együtt HR-rel (lásd pl. Thordal-Christensen, 2003; Mysore és Ryu, 2004). A nem-gazda rezisztenciáról keveset tudunk, és ennek jobb megismerése a jövőben jelentősen hozzájárulhat az eredményesebb rezisztencia-nemesítéshez.

A pályázat fő célja volt annak tanulmányozása, hogy a nem HR-típusú rezisztencia-formák milyen módon használhatók fel növények immunizálására valamint betegség-ellenálló, transzgenikus növények nemesítésére.

### **Nagy antioxidáns kapacitású transzgenikus növények fokozott rezisztenciája sejt- és szöveti elhalást okozó abiotikus és biotikus stresszel szemben**

A saját és mások korábbi vizsgálatai alapján rezisztens növényekben a kórokozók gátlásának, ill. előlésének fő oka a ROS vegyületek felhalmozódása (cf. Baker és Orlandi, 1995; Barna et al., 2003). Ez elsősorban a biotróf (élő gazdasejteket preferáló) kórokozókra igaz, míg a nekrotrof kórokozók és abiotikus stresszek által előidéztet növényi tünetek (sejt- és szövetelhalás) elleni rezisztencia alapja a fokozott antioxidáns kapacitás és az ezzel együtt járó alacsony ROS koncentráció lehet (Mittler et al., 1999). Régebbi kutatásaink szerint egy nagy antioxidáns kapacitású dohány vonal fokozott ellenálló képességet mutat többféle, ROS vegyületek által generált abiotikus és biotikus (patogének által indukált) stresszel szemben (Barna et al., 2003).

Megkíséreltük két antioxidáns gént külön-külön és egyszerre túlkifejező transzgenikus dohány előállítását. A szuperoxid-dizmutáz (SOD) a szuperoxidot hidrogén-peroxiddá alakítja, ez utóbbi ROS vegyület azonban nagyobb mennyiségben szintén nem kívánt sejthalált okozhat, eliminálásáért főleg a peroxidáz és kataláz (CAT) enzimek felelősek.

Ismeretes, hogy *SOD* és aszkorbát-peroxidáz (*APX*) transzgéneket együttesen kifejező dohány és burgonya fokozottan ellenáll egy ROS-generáló herbicid (paraquat) által okozott sejt- és szöveti elhalásnak (Kwon et al., 2002; Tang et al., 2006). Mi egy paradicsomból származó *SOD*, valamint egy kukorica *CAT* gént kívántunk dohányba és burgonyába transzformálni. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a *SOD* és *CAT* géneket egyaránt túlkifejező vonalak fokozottan ellenállnak-e nemcsak abiotikus stresszek, de nekrotróf kórokozók indukálta sejt- és szöveti elhalásnak is?

A dohány- és burgonyanövények transzformációját az *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404-es törzsének segítségével végeztük, amely az említett kukorica *CAT*, ill. paradicsom *SOD* gént külön-külön, ill. a két gént együttesen hordozó bináris plazmid vektorokat hordoz. Először két *SOD*-túlkifejező transzgenikus vonalat sikerült azonosítanunk. A transzformált és regenerált növényekben a *SOD* transzgén beépülését PCR (polimeráz láncreakció) módszerrel, míg a transzgén mRNS-szintű expresszióját reverz transzkripció PCR-rel (RT-PCR) igazoltuk.

Az MTA MGKI Genomikai Osztályával együttműködésben Balázs Ervin segítségével sikerült további, összesen 19 *SOD*, *CAT* és *SOD+CAT* transzgenikus dohány vonalat (cv. Samsun és Xanthi) előállítani, amelyekben szintén igazolva van a transzgén beépülése. Eddigi vizsgálataink szerint a *SOD* transzgenikus vonaloknál 11 vonalból csak egy mutatott a vad típusnál szignifikánsan nagyobb *SOD* enzimaktivitást, míg a *CAT* vonaloknál 4-ből egy, a *SOD+CAT* vonaloknál pedig 4-ből 2 vonal mutatott a vad típusnál szignifikánsan nagyobb *SOD* és *CAT* enzimaktivitást. A jövőben a nagyobb *SOD*, ill. *CAT* enzimaktivitást mutató transzgenikus ( $T_0$  generáció, hemizigóta) dohányokból először homozigóta vonalakat kívánunk nyerni majd megvizsgáljuk a növények abiotikus stresszek és nekrotróf kórokozók indukálta sejt- és szöveti elhalással szembeni rezisztenciáját.

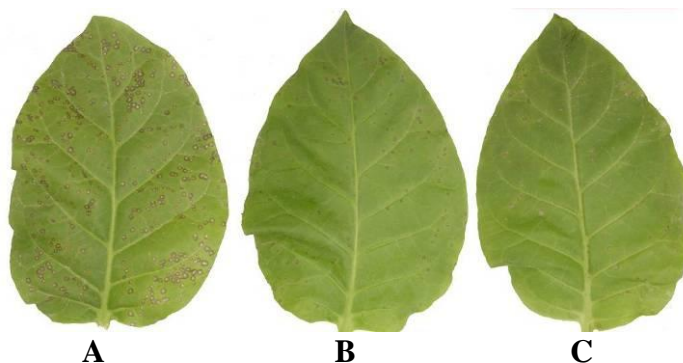
Megkezdtük az említett *SOD* és *CAT* transzgéneket túlkifejező burgonyavonalak előállítását is. A 'White Lady 194' kontroll vonalból kiindulva hatféle transzgenikus vonalat nyertünk (*WL CAT3*, *WL SOD5*, *WL SOD8*, *WL SOD17/2*, *WL SOD19*, *WL SOD6/CAT*), míg a 'Somogyi Kifli' fajtából eddig az *SK SOD2* transzgenikus vonalat sikerült előállítanunk. A transzgén jelenlétének és kifejeződésének ellenőrzése folyamatban van. A transzformált növények betegség- és stressz rezisztenciájának jellemzésére csak ezután kerülhet sor.

### **Növények immunizálása nekrotikus tünetekkel járó fertőzések ellen kis koncentrációjú hidrogén-peroxid alkalmazásával**

A reaktív oxigénformák közül a hidrogén-peroxid egyrészt a fertőzés helyén kialakuló sejt- és szöveti elhalás (nekrózis) egyik okozója és jelátvivője, másrészt a szomszédos egészséges sejtekben a ROS vegyületeket semlegesítő antioxidáns enzimek génjeit is indukálhatja (Levine et al., 1994; Chamnongpol et al., 1998; Gechev et al., 2002; Yi et al., 1999, 2003). Más ROS vegyületekkel együtt a hidrogén-peroxid nagy koncentrációban közvetlenül felelős elsősorban a biotróf kórokozók szembeni rezisztencia kialakításáért, ugyanakkor kis koncentrációban a sejt- és szöveti elhalást okozó abiotikus stresszek és nekrotróf kórokozók elleni rezisztenciához járul hozzá, feltehetően antioxidánsok indukációján keresztül. Gechev és munkatársai (2002) dohánynövényeket kis koncentrációjú (5 mM) hidrogén-peroxiddal előkezelve gyakorlatilag immunissá tették a növényeket sejt- és szöveti elhalást okozó abiotikus stresszel szemben. Ez a munka adta az ötletet, hogy a kis koncentrációjú hidrogén-peroxid előkezelés hatását kipróbáljuk nekrotikus tüneteket okozó vírus, baktérium és gomba kórokozók ellen.

Dohánynövényeket (cv. Xanthi) 5, 7, 10 és 12.5 mM hidrogén-peroxiddal permetezve jelentős mértékben (több mint 50 %-al) visszaszorultak a dohány mozaik vírus (*Tobacco*

*mosaic virus*, TMV) által okozott lokális nekrotikus léziók (HR) (1. ábra és 1. táblázat). Hasonló változást tapasztaltunk, ha a hidrogén-peroxiddal előkezelte növényeket HR-t kiváltó *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* baktériummal vagy a terjedő szövetelhalást okozó nekrotrof *Botrytis cinerea* gombával fertőztük, a nekrotikus tünetek erőssége ilyenkor is jelentősen csökkent (2. és 3. ábra). A vírusos és baktériumos fertőzéseknél a nekrotikus tünetek visszaszorulása együtt járt három antioxidáns enzim (kataláz, aszkorbát-peroxidáz, gvajakol-peroxidáz) aktivitásának kb. 50 %-os emelkedésével (4. és 5. ábra).



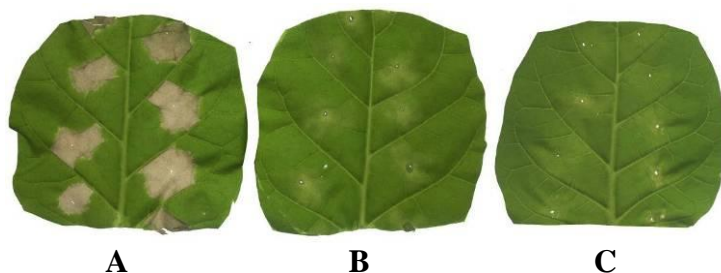
**1. ábra:** Lokális nekrotikus léziók (HR) gátlása kis koncentrációjú hidrogén-peroxiddal előkezelte vagy antioxidáns enzimekkel infiltrált, dohány mozaik vírussal (TMV) inokulált rezisztens dohány (cv. Xanthi) levelekben (A): TMV-vel inokulált levél (B): A TMV inokuláció előtt egy nappal 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal előkezelte (permetezett) levél (C): TMV-vel inokulált levél közvetlenül az inokuláció után SOD és CAT enzimkeverékkel (3000, ill. 5000 unit/levél) infiltrálva.

1. táblázat

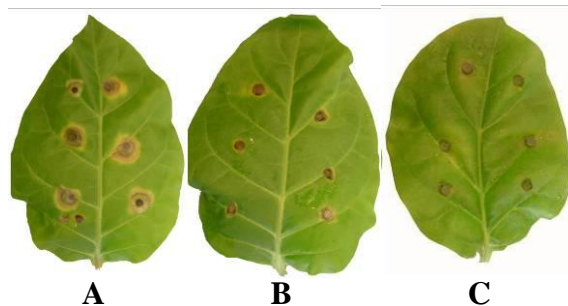
**Lokális nekrotikus léziók (HR) gátlása kis koncentrációjú hidrogén-peroxiddal előkezelte vagy antioxidáns enzimekkel infiltrált, TMV-vel inokulált rezisztens dohány (cv. Xanthi) levelekben<sup>1</sup>**

Kezelés	Léziószám (cm <sup>-2</sup> )	Lézióméret (mm)
TMV	8.53 ± 1.85	1.57 ± 0.29
7 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + TMV	5.80 ± 1.30 **	0.70 ± 0.11 *
10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + TMV	5.90 ± 1.25 **	0.77 ± 0.20 *
12.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + TMV	6.07 ± 1.7 **	0.84 ± 0.15 *
SOD + CAT + TMV	5.90 ± 1.05 **	0.79 ± 0.14 *

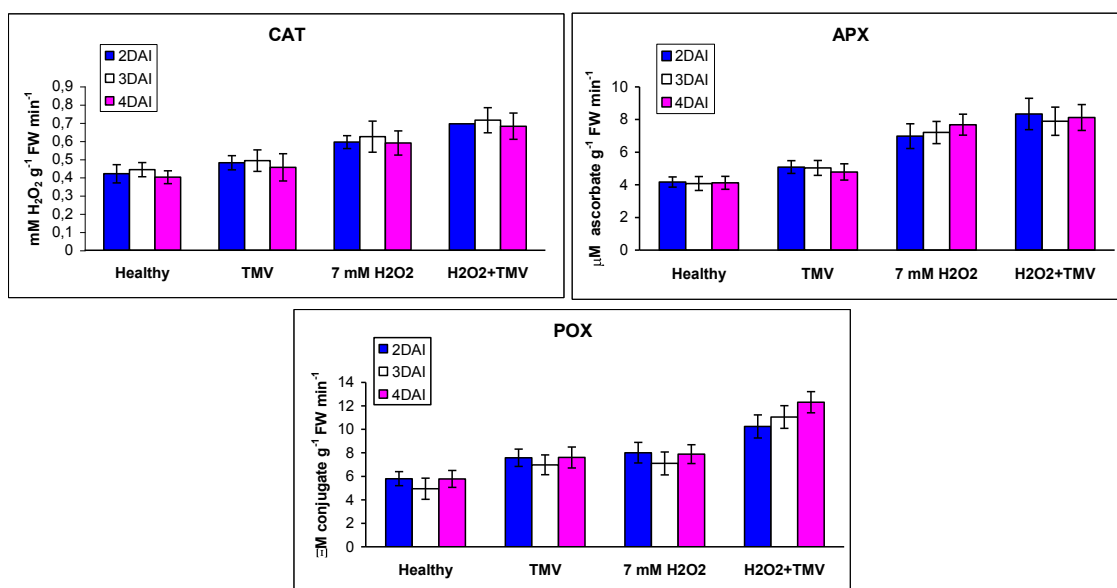
<sup>1</sup> Kezelések és fertőzések az 1. ábránál leírtak szerint. Az értékek három független kísérlet átlagát ± SD jelentik. \* Szignifikáns különbség a kezeletlen és kezelt (hidrogén-peroxid vagy SOD+CAT), TMV-fertőzött növények között, (p < 0.05) \*\* (p < 0.01).



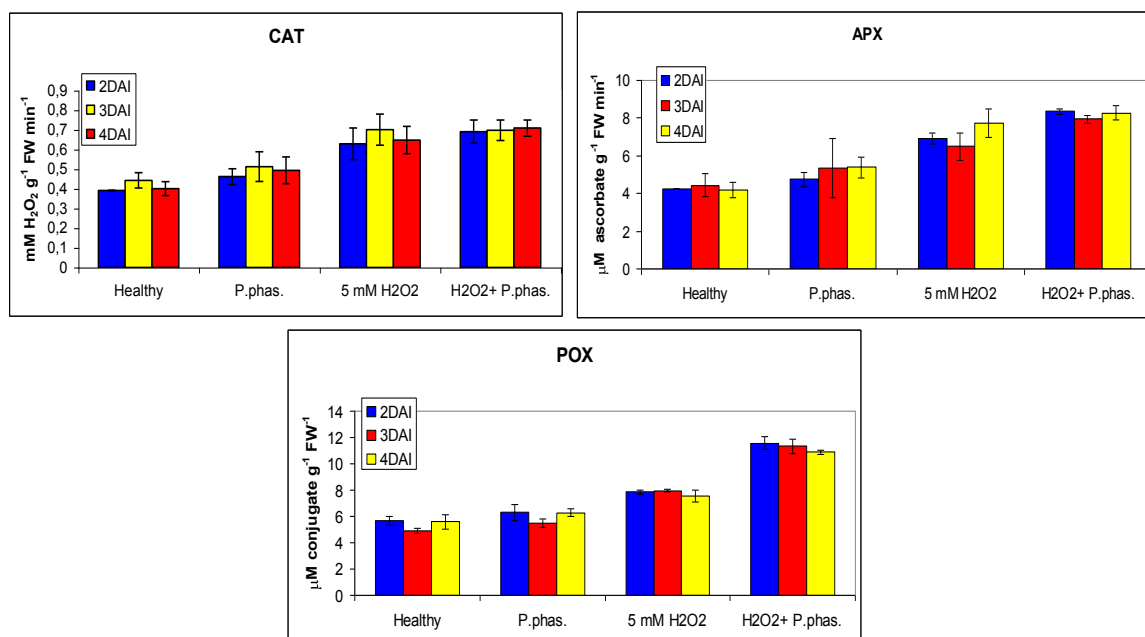
**2. ábra:** Lokális nekrotikus léziók (HR) gátlása kis koncentrációjú hidrogén-peroxiddal előkezelt vagy antioxidáns enzimekkel infiltrált, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* baktériummal inokulált rezisztens dohány (cv. Xanthi) levelekben (A): *P. syringae* pv. *phaseolicola*-val inokulált levél (B): A baktérium inokuláció előtt egy nappal 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal előkezelt (permetezett) levél (C): Baktériummal inokulált levél közvetlenül az inokuláció után SOD és CAT enzimkeverékkel (3000, ill. 5000 unit/levél) infiltrálva.



**3. ábra:** Nekrotikus tünetek gátlása kis koncentrációjú hidrogén-peroxiddal előkezelt vagy antioxidáns enzimekkel infiltrált, *Botrytis cinerea* gombával inokulált dohány (cv. Xanthi) levelekben (A): Gombával inokulált levél (B): A gomba inokuláció előtt egy nappal 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal előkezelt (permetezett) levél (C): Gombával inokulált levél közvetlenül az inokuláció után SOD és CAT enzimkeverékkel (3000, ill. 5000 unit/levél) infiltrálva.

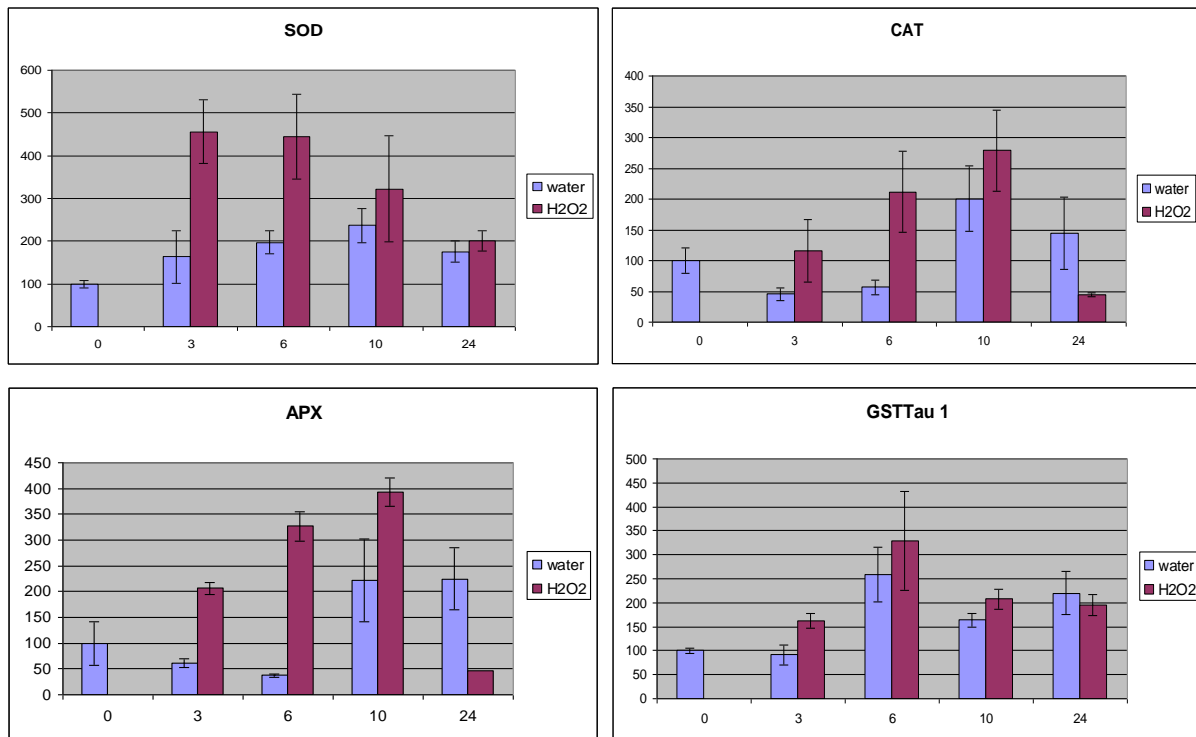


**4. ábra:** Kis koncentrációjú hidrogén-peroxid előkezelés hatása TMV-vel inokulált rezisztens Xanthi dohányylevelek (8-10 hetes növények) kataláz (CAT), aszkorbát-peroxidáz (APX) és gvajakol-peroxidáz (POX) enzimaktivitására, a vírus inokuláció után 2, 3 és 4 nappal. **Egészséges (healthy):** vízzel előkezelt és kontroll (mock) inokulált levelek. **TMV:** vízzel előkezelt és TMV-vel inokulált levelek. **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal előkezelt (permetezett) és kontroll (mock) inokulált levelek. **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+TMV:** 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal előkezelt (permetezett) és TMV-vel inokulált levelek.



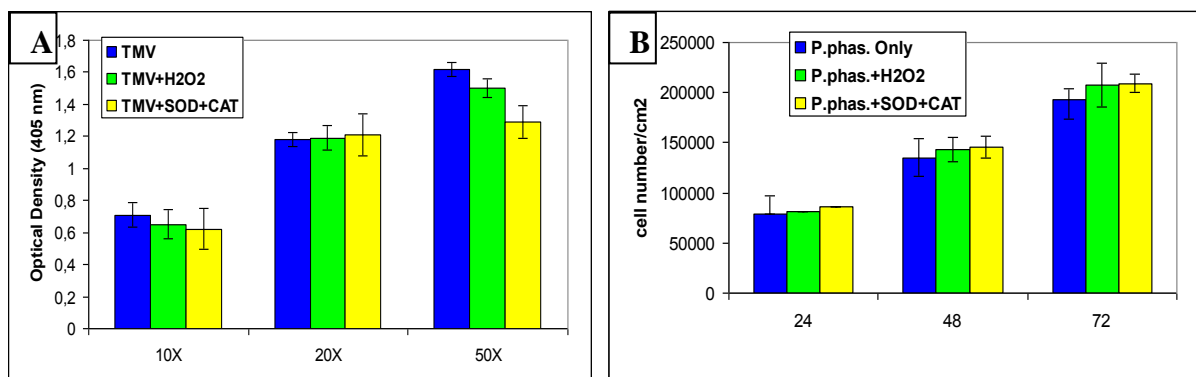
**5. ábra:** Kis koncentrációjú hidrogén-peroxid előkezelés hatása *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*-val inokulált rezisztens Xanthi dohányylevelek (8-10 hetes növények) kataláz (CAT), aszkorbát-peroxidáz (APX) és gvajakol-peroxidáz (POX) enzimaktivitására, a baktérium inokuláció után 2, 3 és 4 nappal. **Egészséges (healthy):** vízzel előkezelt és kontroll (mock) inokulált levelek. **P.phas.:** vízzel előkezelt és baktériummal inokulált levelek. **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal előkezelt (permetezett) és kontroll (mock) inokulált levelek. **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+P.phas.:** 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal előkezelt (permetezett) és baktériummal inokulált levelek.

Annak tisztázására, hogy a fokozott antioxidáns kapacitás valóban szerepet játszik-e a hidrogén-peroxid nekrotikus tünetekkel szembeni immunizáló hatásában, a fertőzött növények leveleit SOD és CAT enzim meghatározott arányú keverékével (2500 EU SOD/ml és 5000 EU CAT/ml) infiltráltuk. Az infiltrált és fertőzött levelekben a hidrogén-peroxid előkezeléshez hasonló immunizáló (tünet-gátló) hatást tapasztaltunk (1., 2. és 3. ábra, 1. táblázat). Feltételezhető tehát, hogy a kis koncentrációjú hidrogén-peroxid fokozza a növényi antioxidáns kapacitást, amely, ROS-vegyületek semlegesítésén keresztül, végül a kórokozó fertőzések során keletkező nekrotikus tünetek visszaszorulásához vezet. Ezt a feltételezést támasztja alá az az eredményünk is, hogy hidrogén-peroxiddal immunizált, TMV-fertőzött dohányban egy *SOD*, *CAT* és *APX* gén expressziója a fertőzés utáni 3. és 6. órában több mint kétszeresére emelkedik a nem immunizált kontrollokhoz képest (valós idejű RT-PCR-rel mérve). Hasonló, de jóval kisebb mértékű (20-30 %-os) expresszió növekedést tapasztaltunk egy másik antioxidáns génnél (glutathion-S- transzferáz Tau1, *GSTTau1*) (6. ábra).



**6. ábra:** Kis koncentrációjú (5 mM) hidrogén-peroxid előkezelés hatása antioxidáns gének (*SOD*, *CAT*, *APX* és *GSTTau1*) expressziójára TMV-vel inokulált rezisztens Xanthi dohánylevelekben (8-10 hetes növények), a fertőzés után 0-24 órával, valós idejű RT-PCR-rel mérve. **Víz (water):** Vízrel előkezelt levelek. **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** 5 mM hidrogén-peroxiddal előkezelt levelek. Az előkezelések a TMV inokuláció előtt egy nappal történtek. **100** = a fertőzés után 0 órával detektált génextpresszió. Az ábrázolt génextpressziós értékek a kontroll (mock) inokulált levelekben kapott értékekre lettek normalizálva.

A nekrotikus tünetek (sejt- és szöveti elhalás) visszaszorulása nem szükségszerűen jelenti a kórokozó szaporodásának gátlását. Eredményeink szerint mind a hidrogén-peroxid, mind a SOD-CAT enzimkeverék immunizáló (tünet-gátló) hatása csak a nekrotikus tünetekkel szemben érvényesül, a TMV és a *P. syringae* pv. *phaseolicola* baktérium mennyisége a fertőzött levelekben nem változik egyik előkezelés hatására sem (7. ábra). Az immunizáló hatásra a fertőzött levelekben valószínűleg a *Botrytis cinerea* gomba mennyisége sem változik számottevően, ugyanis a mesterséges táptalajon tenyésztett gombakultúra növekedését 5 mM hidrogén-peroxid hozzáadása egyáltalán nem befolyásolja.



**7. ábra: A):** A vírus titer alakulása kis koncentrációjú hidrogén-peroxiddal előkezelt vagy antioxidáns enzimekkel infiltrált, TMV-inokulált rezisztens dohány (cv. Xanthi) levelekben 3 nappal a fertőzés után. **TMV:** TMV-vel inokulált levelek. **TMV+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** A TMV-inokuláció előtt egy nappal 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal előkezelt

(permetezett) levelek. **TMV+SOD+CAT:** A TMV inokuláció után közvetlenül SOD és CAT enzimkeverékkel (3000, ill. 5000 unit/levél) infiltrált levelek. **10x, 20x, 50 x:** az ELISA méréshez használt növényi kivonat hígításai. **B):** A baktériumszám alakulása kis koncentrációjú hidrogén-peroxiddal előkezelt vagy antioxidáns enzimekkel infiltrált, *P. syringae* pv. *phaseolicola* baktériummal inokulált rezisztens dohány (cv. Xanthi) levelekben a fertőzés után különböző időpontokban. **P.phas.:** *P. syringae* pv. *phaseolicola*-val inokulált levelek. **P.phas.+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** A baktérium inokuláció előtt egy nappal 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal előkezelt (permetezett) levél. **P.phas+SOD+CAT:** A baktérium inokuláció után közvetlenül SOD és CAT enzimkeverékkel (3000, ill. 5000 unit/levél) infiltrált levelek.

### Következtetések:

- Dohánynövények kis koncentrációjú hidrogén-peroxiddal történő előkezelése tüneti rezisztenciát idéz elő. A vizsgált vírus-, baktérium- és gombabetegségeknél csak a nekrotikus tünetek ellen immunizál, a kórokozók felhalmozódását nem befolyásolja.
- Az immunizáló hatás a növényi antioxidáns kapacitás fokozásán keresztül érvényesül.

### **A nem-gazda rezisztencia lényegének biokémiai és molekuláris tisztázása**

A természetben előforduló leggyakoribb növényi betegség-ellenállóság, azaz a „nem-gazda rezisztencia” lényege, ill. alapjai a mai napig nem tisztázódtak. A jelenséggel ellentétes folyamat, az un. *gazda rezisztencia* azonban központi témája volt a közelmúlt vizsgálatainak, mert ez az utóbbi jelenség közvetlen kapcsolatban van a növényneveléssel. A kétféle ellenállósági forma lényegét a következő gazda/patogén párok leírásával lehet érzékeltetni: Az árpa lisztharmatbetegségét olyan gombakórokozó idézi elő, amely csak az árpát betegíti meg, a többi növényfajt nem. Az árpán, mint gazda-fajon belül azonban lehetnek olyan *fajták*, amelyek rezisztenciát mutatnak a kórokozó ellen. Ez tehát az un. *gazda rezisztencia*. Ha az árpát a búzára specializált búzalisztharmat fertőzné meg akár a természetben, akár mesterségesen (a kísérletező kutató által), az árpa minden fajtája ellenálló lesz, mert az árpa nem gazdája a búzalisztharmatnak. A természetben a növényfajok sokféle fertőző ágenssel kerülnek kapcsolatba, de megbetegedésre nem kerül sor, hiszen a gazdanövény csak a specifikus kórokozójával szemben fogékony, az össze többivel szemben azonban ellenálló: ez a *nem-gazda rezisztencia*, amely általában tünetmentes. Ez az utóbbi forma a legáltalánosabb, ill. a leggyakoribb ellenállósági forma. Mechanizmusa azonban még egyáltalán nincs tisztázva. A gazdaságilag fontos, un. gazda rezisztencia igen sokszor párosul a hiperszenzitív reakció (HR) megjelenésével, fitoalexinek felhalmozódásával, sejtfalerősődéssel, reaktív oxigénfajták (ROS) felszaporodásával, stb. Előző saját vizsgálataink (Király et al., 1972) igazolták, hogy a HR és a fitoalexinek nem okozói a rezisztenciának, hanem csak az ellenállóság kísérő jelenségei. Saját és mások újabb kísérletei szerint minden bizonnyal a reaktív oxigénfajták (ROS) mikroba ölő hatásának van központi jelentősége a gazda-rezisztenciában (cf. Baker és Orlandi, 1995; Barna et al., 2003).

A nem-gazda rezisztencia lényegének tisztázása érdekében a következő kísérlet-sorozatot hajtottuk végre: Összehasonlítottuk fogékony, gazda rezisztens és nem-gazda rezisztens növény/kórokozó párok esetében a fertőzés utáni szuperoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) felhalmozódást. A szuperoxid általában abiotikus stresszek és fertőzések hatására keletkezik nagyobb mennyiségben, és további reakciói folytán hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ill. hidroxil-szabadgyök (OH<sup>-</sup>) is felhalmozódhat. Ezek a ROS típusok károsíthatják a kórokozót, tehát alapjai lehetnek az ellenállóságnak, de károsíthatják a gazdanövény ill. a nem-gazda sejteit, szöveteit is (HR).

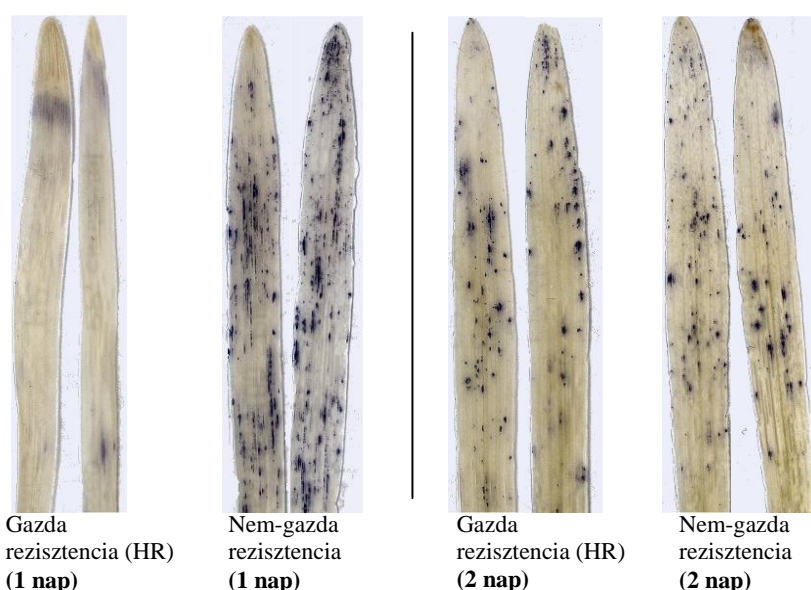
A szuperoxid felhalmozódást az un. nitroblue-tetrazolium (NBT)-festéssel teszteltük (lásd Király et al., 2002). A fertőzések után 1, 2 és 3, olykor 4 nappal mértük a szuperoxid-akkumulációt a fertőzött levelekben. Az egyes gazda/patogén párok esetében kapott eredményeket a 2. táblázat foglalja össze.

**2. táblázat**  
**Szuperoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) detektálása különböző gazda/kórokozó kombinációkban**

<u>Gazda/kórokozó kombináció</u>	<u>Reakció</u>	<u>Szuperoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) detektálása</u>
ÁRPA – árpalisztharmat ( <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> , A6)	gazda <u>fogékonyság</u>	0 (nincs) 2 nap múlva sincs
ÁRPA – árpalisztharmat	gazda <u>rezisztencia</u>	2 nap múlva
ÁRPA – búzalisztharmat ( <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> , magyar izolátum)	nem-gazda <u>rezisztencia</u>	1 nap múlva
-----	-----	-----
ÁRPA – árparozsda ( <i>Puccinia hordei</i> )	gazda <u>fogékonyság</u>	0 (nincs) 2 nap múlva sincs
ÁRPA – árparozsda	gazda <u>rezisztencia</u>	2 nap múlva
ÁRPA – búzarozsda ( <i>Puccinia recondita</i> f.sp. <i>tritici</i> )	nem-gazda <u>rezisztencia</u>	1 nap múlva
-----	-----	-----
BÚZA – búzarozsda	gazda <u>fogékonyság</u>	0 (nincs) 4 nap múlva sincs
BÚZA – búzarozsda	gazda <u>rezisztencia</u>	4 nap múlva
BÚZA – árparozsda	nem-gazda <u>rezisztencia</u>	3 nap múlva
BÚZA – zabrozsda ( <i>P. coronata</i> f.sp. <i>avenae</i> )	nem-gazda <u>rezisztencia</u>	2 nap múlva
-----	-----	-----
DOHÁNY – dohánylisztharmat ( <i>Golovinomyces orontii</i> , BP-1TOB)	gazda <u>fogékonyság</u>	0 (nincs) 1 nap múlva sincs
DOHÁNY – árpalisztharmat	nem-gazda <u>rezisztencia</u>	1 nap múlva
-----	-----	-----
PARADICSOM – paradicsomlisztharmat ( <i>Oidium neolycopersici</i> , BP-P5)	gazda <u>fogékonyság</u>	0 (nincs) 1 nap múlva sincs
PARADICSOM – uborkalisztharmat ( <i>Podosphaera xanthii</i> )	nem-gazda <u>rezisztencia</u>	1 nap múlva
-----	-----	-----
UBORKA – uborkalisztharmat	gazda <u>fogékonyság</u>	0 (nincs) 1 nap múlva sincs
UBORKA – paradicsomlisztharmat	nem-gazda <u>rezisztencia</u>	1 nap múlva
-----	-----	-----
SZŐLŐ – szőlőlisztharmat ( <i>Erysiphe necator</i> )	gazda <u>fogékonyság</u>	0 (nincs) 2 nap múlva sincs
SZŐLŐ – búzalisztharmat	nem-gazda <u>rezisztencia</u>	2 nap múlva



A fent említett kísérletek alapján levonható az a következtetés, hogy a fogékony (kompatibilis) gazda/patogén kapcsolatokban nincs szuperoxid-felhalmozódás, a gazda-rezisztenciát mutató kombinációkban van szuperoxid-képződés ill. akkumuláció, és a nem-gazda rezisztenciát mutató kombinációkban, amelyek tünetmentesek (nincs HR) szintén van, de általában *korábban* észlelhető a felhalmozódás (8. ábra). Jogosnak látszik az a feltételezés, hogy a korai szuperoxid-felhalmozódás az oka a nem-gazda ellenálló képességnek és az ezzel együtt járó tünetmentességnek. A gazda rezisztencia esetében később halmozódnak fel a reaktív oxigénfajták, és ez lehet az oka a rendszerint megjelenő hiperszenzitív válaszreakciónak (HR), amely sok kombinációban jellemzője ennek az ellenállósági formának. A fogékony gazda/patogén pároknál a kórokozók gátlás nélkül fejlődhetnek, hiszen nem képződik szuperoxid, és így a tipikus tünetekkel járó betegség kifejlődhet. Amennyiben a szuperoxid-képződés valóban oka a kétféle rezisztenciának, akkor a szuperoxid-akkumuláció gátlása mérsékelheti vagy meg is szüntetheti az ellenállóképességet. Kísérleti eredményeinket ezért ebből a szempontból is tovább elemeztük.



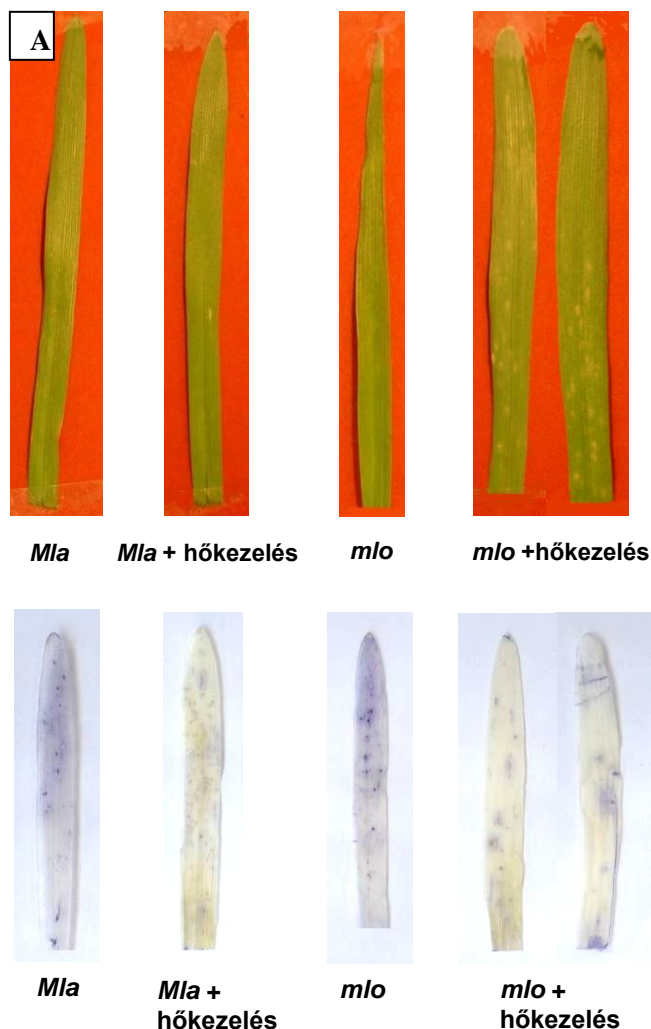
**8. ábra:** Szuperoxid ( $O_2^-$ ) detektálása gazda- és nem-gazda rezisztenciánál, árpában (cv. Ingrid *Mla*), a fertőzés után egy és két nappal. Az árpalisztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzés gazda rezisztenciát (HR), míg a búzalisztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, magyar izolátum) tünetmentes nem-gazda rezisztenciát eredményezett. A szuperoxid detektálásához 0,1 %-os nitroblue-tetrazolium (NBT) oldatot infiltráltunk a fertőzött levelekbe (lásd Király et al., 2002).

Búzalisztharmattal fertőzött árpaleveleket difenil-jodóniummal (DPI) infiltráltuk, azonnal a fertőzés után. A DPI gátolja a szuperoxid-termelődést, várható volt tehát a nem-gazda rezisztencia megváltozása. A kísérletek azonban nem voltak kielégítőek: a fertőzött és DPI-vel kezelt rezisztens árpaleveknek csak 5%-ában észleltünk gyenge lisztharmat-képződést. Feltételezhető, de nem igazolható az, hogy ha a szuperoxid-képződés hatásosabban gátlódna, ez a nem-gazda rezisztencia megszűnéséhez vezetne.

Egy további kísérletben két antioxidáns enzimet, a szuperoxid-dizmutázt (SOD) és katalázt (CAT) infiltráltunk a levelekbe, amelyek ellensúlyozzák a szuperoxid ill. hidrogén-peroxid hatását. Itt sem volt sikeres az a törekvés, hogy a szuperoxidot hatástalanító SOD+CAT –kezelésekkel megváltoztassuk az ellenállóképességet.

Sikerre vezetett azonban a Barna Balázs (MTA NKI) eredeti észlelésére alapozott következő kísérletünk. Eszerint egy hőkezeléses sokk (a levelek  $49^\circ\text{C}$ -os vízbe merítése 45

másodpercig) megváltoztathatja a lisztharmat-rezisztens árpa reakcióját, mind az *Mla* gén által irányított gazda rezisztencia (HR) esetén, mind az *mlo* géntől függő ún. horizontális (minden lisztharmat-rasz ellen érvényesülő) rezisztenciánál. Kimutattuk, hogy a hőhatás a fogékonyági tünet (micélium és konídium képződés) megjelenése előtt szignifikánsan csökkenti, ill. megszünteti az NBT-festéssel detektálható szuperoxid-képződést is (9. ábra).

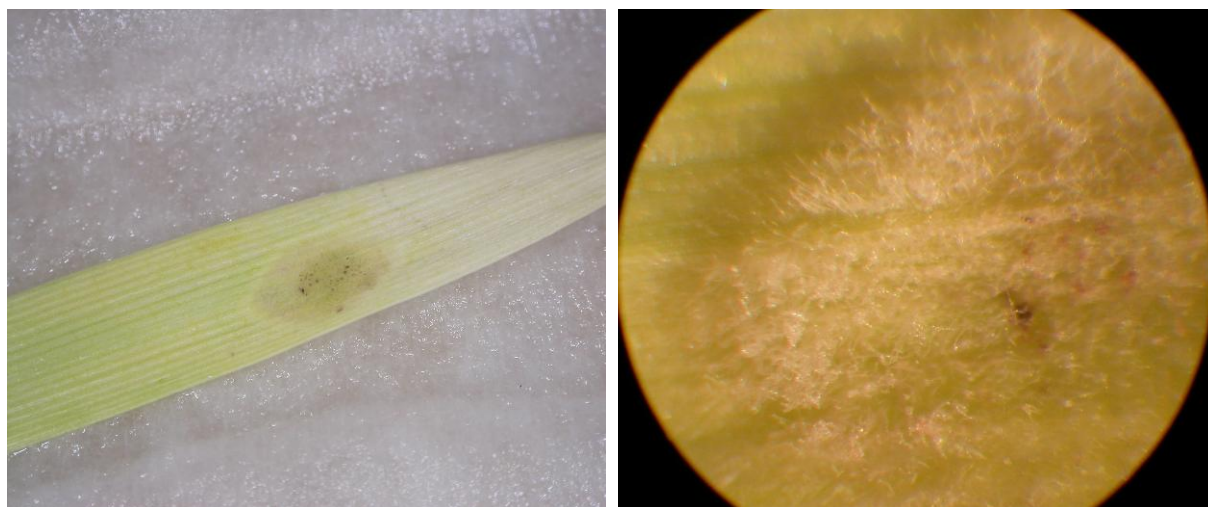


**9. ábra:** Hőkezeléses sokk hatása lisztharmat-rezisztens árpalevelek reakciójára az *Mla* és *mlo* gén által meghatározott rezisztencia-típusnál (rasz-specifikus, ill. horizontális gazda rezisztencia). **A):** Lisztharmatos tünetek az árpalisztharmat (*B. graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzés és hőkezelés után 8 nappal. **B):** A szuperoxid ( $O_2^-$ ) mennyiségének csökkenése az árpalisztharmat fertőzés és hőkezelés után 3 nappal. A hőkezelés (a levelek 49°C-os vízbe merítése 45 másodpercig) közvetlenül a fertőzés előtt, a szuperoxid detektálása a 8. ábránál leírtak szerint történt.

Ezzel kapcsolatban érdemes megfontolni a dohány/TMV gazda/patogén kombinációra gyakorolt 30°C-os léghőhatás mechanizmusát, amelyet előzőleg publikáltunk (Király et al., 2008). A TMV fertőzött Xanthi dohányra gyakorolt tartós magas hőhatás gátolta a szuperoxid-képződésében fontos szerepet játszó NADPH-oxidáz gén expresszióját és a szuperoxid-felhalmozódást is. Ennek hatására a vírus-okozta HR is gátlódott, és a növény vírusfogékony lett.

Az előbb említett ún. *mlo*-rezisztencia az árpaleveleken tünetmentességben nyilvánul meg, azaz az ellenálló képességet nem kíséri a HR nekrotikus tünete. Az *mlo*-rezisztencia ennyiben hasonlít a nem-gazda rezisztenciára. Ez adta az ötletet ahhoz, hogy a hősokkos

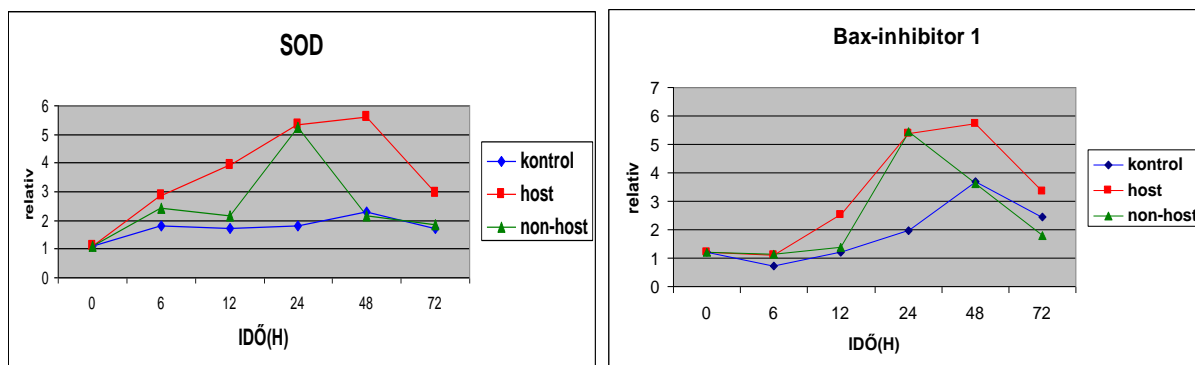
kísérletet elvégezzük egy nem-gazda rezisztenciát eredményező gazda/patogén kombinációnál is (árpa fertőzve búzalisztharmattal). A rezisztens reakció csak akkor változott meg, (csak akkor fordult fogékonyági reakcióba), ha a hőshokot kombináltuk a SOD+CAT kezeléssel is. Gyenge lisztharmat gombatelepek fejlődtek ki az eredetileg rezisztens leveleken, de a lisztharmatos tünetek szomszédságában HR-re utaló nekrotikus léziók is kifejlődtek (10. ábra). Ez arra utal, hogy a tünetmentes nem-gazda rezisztenciát csak részben sikerült fogékony reakcióvá konvertálni. A képződött gombával búzaleveleket fertőztünk vissza, amelyeken normális lisztharmatos betegség-tüneteket észleltünk. Ez igazolta azt, hogy az árpán képződött lisztharmatgomba valóban búzalisztharmat volt. Ez a gombapatogén a nem-gazda rezisztencia részleges gátlása, azaz a szuperoxid-képződés csökkenése miatt tudott gyenge fertőzést létrehozni a nem-gazda árpaleveleken.



**10. ábra:** Hőkezeléses sokk és antioxidáns enzimek (SOD és CAT) infiltrálásának együttes hatása árpalevelek nem-gazda rezisztenciájára, búzalisztharmat (*B. graminis* f.sp. *tritici* magyar izolátum) fertőzés esetén. Gyenge lisztharmatos tünetek (gombatelepek) és HR-re utaló lokális nekrotikus léziók megjelenése a fertőzés és kezelés után 8 nappal. A hőkezelés (a levelek 49°C-os vízbe merítése 45 másodpercig) közvetlenül a fertőzés előtt, az antioxidáns enzimkeverék (SOD és CAT, 3000, ill. 5000 unit/levél) levélbe infiltrálása közvetlenül a fertőzés után történt.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a gazda rezisztencia és a nem-gazda rezisztencia során tapasztalható szuperoxid-felhalmozódás milyen génextpressziós változásokra vezethető vissza? A növényekben a szuperoxid-termelésért többek között a NADPH-oxidázok felelősek. A valós idejű RT-PCR módszerrel mérve azonban egyik esetben sem változott meg egy általunk vizsgált árpa NADPH-oxidáz gén expressziója a fertőzés hatására. Egy *SOD* gén expressziója érdekes módon eltérést mutatott a gazda rezisztencia, ill. nem-gazda rezisztencia eseteiben. Ha az árpát saját lisztharmatgombájával fertőztük, a *SOD* génextpresszió fokozódott a fertőzés után, és tartósan így is maradt. A nem-gazda kombinációban (árpa/búzalisztharmat) viszont a *SOD* gén expressziója csak átmenetileg (a fertőzés után 24 órával) emelkedett meg jelentősebben. Később az expresszió visszaesett az eredeti szintre, feltehetően azért, mert a patogén korán elhalt (11. ábra). Feltételezhető, hogy a HR hiánya ennél a rezisztenciaformánál ezzel a jelenséggel is összefügg. A *BAX-inhibitor 1* gén expressziója az említett *SOD* génhez hasonló változást mutatott: az expresszió a nem-gazda rezisztens árpa/búzalisztharmat kombinációban csak átmenetileg fokozódott (11. ábra). A *BAX-inhibitor 1* génnek, ill. fehérje-termékének hatása abban nyilvánul meg, hogy a programozott sejthalált (pl. a HR-t) gátolja (Hückelhoven, 2004; Watanabe és Lam, 2006). Mivel a nem-gazda

rezisztenciát általában a HR hiánya jellemzi, feltételezhető, hogy a búzalisztharmat fertőzést követő 24 óra után a *BAX-inhibitor 1* génexpresszió csökkenése is ezzel függ össze.



**11. ábra:** Egy antioxidáns (SOD) és egy programozott sejthalál-gátlást meghatározó gén (*BAX-inhibitor 1*) expressziójának változása gazda- és nem-gazda rezisztenciánál, árpában (cv. Ingrid *Mla*), a fertőzést követő három napban. Az árpalisztharmat (*B. graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzés gazda rezisztenciát (HR), míg a búzalisztharmat (*B. graminis* f.sp. *tritici*, magyar izolátum) tünetmentes nem-gazda rezisztenciát eredményezett. A génexpressziót valós idejű RT-PCR-rel mértük. **1** = a fertőzés után 0 órával detektált génexpresszió. **Kontrol** = egészséges (fertőzetlen) növények. **Host** = gazda rezisztencia. **Non-host** = nem-gazda rezisztencia.

### Következtetések:

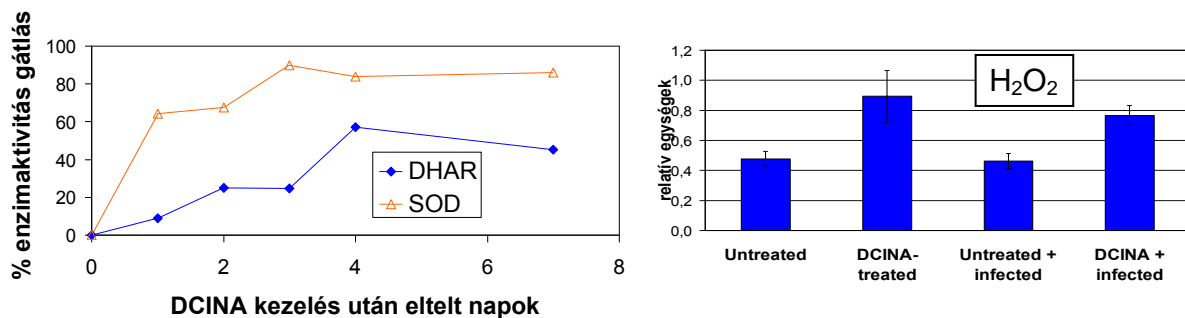
- Az általunk vizsgált fogékony gazda/patogén kapcsolatokban nincs szuperoxid-felhalmozódás, a HR-rel együtt járó gazda-rezisztens árpában viszont 48 óra körül felhalmozódik ez a ROS. A nem-gazda rezisztencia esetében a szuperoxid-akkumuláció korán (24 órával a fertőzés után) következik be, amely összefüggésbe hozható ennek az ellenállósági típusnak tünetmentességével (nincs hiperszenzitív reakció, HR).
- Ha a rezisztens növényben a fertőzés utáni szuperoxid-képződést visszazsorítjuk vagy gátoljuk (pl. hőszökkel), ezzel elősegítjük a fogékonysági tünetek kialakulását az eredetileg ellenálló levelekben.
- A nem-gazda rezisztenciában a *SOD* és a *BAX-inhibitor 1* gén időleges aktiválásának, majd visszazsorulásának szerepe lehet a HR hiányában (a tünetmentességben).
- A rezisztens növényekben a fertőzés után felhalmozódó reaktív oxigénfajták (pl. szuperoxid, feltehetően hidrogén-peroxid és hidroxil szabadgyök) gátolják vagy ölik el a kórokozót.

### **Egy kémiai rezisztencia-fokozó vegyület hatásának összefüggése a ROS-képződéssel**

Az a kísérleti tapasztalatunk, hogy a növényi rezisztencia mechanizmusa ok-okozati összefüggésben lehet a reaktív oxigénfajták (ROS) mikroba ölő hatásával, más módon is igazolható. Az egyik kémiai rezisztencia-indukáló szer, a 2,6-diklór-izonikotinsav (DCINA) fogékony búza- és árpanövényekben HR-típusú ellenállóságot képes előidézni rozsda- és lisztharmat-gombák fertőzésével szemben (Kogel et al., 1994; saját publikálatlan eredményeink).

Ezzel kapcsolatos kísérletünkben kimutattuk azt, hogy a DCINA-val kezelt (talaj-kezelés 8 ppm DCINA-oldattal) fogékony árpa csíranövények (cv. Ingrid) levelei HR-típusú rezisztens reakciót (mikroszkopikus sejthalás) mutattak az árpalisztharmattal szemben, és

gátlódott a szuperoxid dizmutáz (SOD), valamint a dehidroaszorbát-reduktáz (DHAR) enzim aktivitása, de fokozódott a hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) szint (12. ábra). A  $H_2O_2$  kvantitatív felhalmozódását egy spektrofluorometriás eljárással határoztuk meg. A 2,7-diklórfluoreszcin diacetát fluoreszcens festéket levelekbe infiltráltuk, és a levélszövetekből a 2,7-diklórfluoreszcein kivonása után egy FluoroMax-3 spektrofluorométerrel mértük a fluoreszcencia-intenzitást. A  $H_2O_2$  magas szintje a rezisztencia-indukáló szerrel (DCINA)-kezelt levelekben fertőzés nélkül is kimutatható volt, de ez a magas szint megmaradt a liztharmat-fertőzés után is. A  $H_2O_2$  mennyisége kétszeresére emelkedett a DCINA-val kezelt és fertőzött levelekben a nem-kezeltekhez képest. Mint ismeretes, a dehidroaszorbát-reduktáz fontos szerepet játszik a hidrogén-peroxid közömbösítésében. Aktivitásának csökkenése hozzájárulhat az egyik legfontosabb ROS, a hidrogén-peroxid szintjének emelkedéséhez, és a kórokozó előléséhez a fertőzött és rezisztensé vált növényben. Ezzel kapcsolatban legújabbban azt is kimutattuk, hogy fertőzött, levélrozsda-rezisztens búzánövényekben is felhalmozódik a hidrogén-peroxid, a fogékony növényekben azonban nem (Hafez et al., 2009).



**12. ábra:** Egy kémiai rezisztencia-indukáló szer, a 2,6-diklór-izonikotinsav (DCINA) hatása antioxidáns enzimek (szuperoxid-dizmutáz, SOD és dehidroaszorbát-reduktáz, DHAR) aktivitására és a hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) szintre árpában. A DCINA-előkezelés (talaj öntözése 8 ppm DCINA-oldattal) az árpaliztharmattal (*B. graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzött fogékony árpában (cv. Ingrid) HR-típusú rezisztens reakciót váltott ki. A  $H_2O_2$  kvantitatív felhalmozódását egy spektrofluorometriás eljárással határoztuk meg (részleteket lásd a szövegben). **Untreated** = kezeletlen növények. **DCINA-treated** = DCINA-előkezelte növények. **Untreated+infected** = kezeletlen és liztharmat-fertőzött növények. **DCINA+infected** = DCINA-előkezelte és liztharmat-fertőzött növények.

### Következtetés:

- A DCINA mérsékeli a növény antioxidáns kapacitását, és ez ok-okozati összefüggésben van a gombaölő  $H_2O_2$  abnormális akkumulációjával és a kórokozó előlésével, valamint a gazdanövény mikroszkópikus sejtelhalásának (HR) kialakulásával.

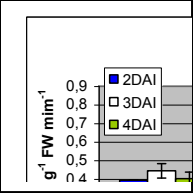
### A kutatási eredmények hasznosításának lehetőségei, a kutatási téma további lehetséges irányai

Kísérleteink szerint a kis koncentrációjú hidrogén-peroxiddal történő immunizálásnak gyakorlati jelentősége lehet, mivel fokozza a növények antioxidáns kapacitását. Ezáltal fokozható a termesztett növények stresszekkel és betegségekkel szembeni tüneti rezisztenciája. Ezzel kapcsolatban előkísérletek indultak a Corvinus Egyetem

Zöldségtermesztési tanszékével együttműködésben, amelyek célja a paprika tárolási betegségekkel szembeni ellenálló képességének fokozása kis koncentrációjú hidrogén-peroxid előkezelésekkel.

### Idézett irodalom

- Baker, C.J., Orlandi, E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:299-321.
- Barna, B., Ádám, A., Király, Z. 1993. Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* 80, 420-422.
- Chamnonpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W. 1998. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5818-5823.
- Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inzé, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., Minkov, I. 2002. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 708-714.
- 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., Király, Z., Manninger, K. 2009. Hydrogen peroxide has a key role in resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*) in several Egyptian and other wheat cultivars. *Cereal Res. Commun. Suppl.* 37, 161-164.
- Hückelhoven, R. 2004. BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 9, 299-307.
- Király, L., Barna, B., Király, Z. 2007. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. *J. Phytopathol.* 155, 385-396.
- Király, L., Hafez, Y.M., Fodor, J., Király, Z. 2008. Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotisation in tobacco at high temperature is associated with down-regulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase. *J. Gen. Virol.* 89, 799-808.
- Király, Z., Barna, B., Érsek, T. 1972. Hypersensitivity as a consequence, not the cause of plant resistance to infection. *Nature* 239, 456-458.
- 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 tobacco mosaic virus. *Free Rad. Res.* 36, 981-991.
- Kogel, K.-H., Beckhove, U., Dreschers, J., Munch, S., Romme, 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.
- Kwon, S.Y., Jeong, Y.J., Lee, H.S., Kim, J.S., Cho, K.Y., Allen, R.D., Kwak, S.S. 2002. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ.* 25, 873-882.
- Lamb, C., Dixon, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Mittler, R., Herr, E.H., Orvar, B.L., van Camp, W., Willekens, H., Inzé, D., Ellis, B.E. 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen



intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14165-14170.

Mysore, K.S., Ryu, C-M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci* 9, 97-104.

Tang, L., Kwon, S.Y., Kim, S.H., Kim, J.S., Choi, J.S., Cho, K.Y., Sung, C.K., Kwak, S.S., Lee, H.S. 2006. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Rep.* 25, 1380-1386.

Thordal-Christensen, H. 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 351-357.

Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141, 373-378.

Watanabe, N., Lam, E. 2006. Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J.* 45, 884-894.

Yi, S.Y., Yu, S.H., Choi, D. 1999. Molecular cloning of a catalase cDNA from *Nicotiana glutinosa L.* and its repression by tobacco mosaic virus infection. *Mol. Cells* 9, 320-325.

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.