

A jelentett pályázat címe:

Prooxidáns és antioxidáns növényi gének a nem-gazda betegségrezisztenciában - funkció meghatározás géncsendesítéssel

A kutatási téma - elméleti háttér és megvalósítandó célok

A természetben a növényfajok sokféle fertőző ágenssel kerülnek kapcsolatba, de megbetegedésre nem kerül sor, hiszen a gazdanövény csak egy-két specifikus kórokozóval szemben fogékony, az össze többivel szemben azonban ellenálló: ez a *nem-gazda rezisztencia*, amely általában tünetmentes vagy lokális sejt/szöveti nekrotizációval (hiperszenzitív reakció, HR) jár. A nem-gazda rezisztencia a legáltalánosabb, leghatékonyabb, ill. a legtartósabb ellenállósági forma, ugyanis azt jelenti, hogy egy adott növényfaj valamennyi egyede rezisztens egy kórokozó összes rasszával szemben (Thordal-Christensen, 2003; Mysore és Ryu, 2004; Oh et al., 2006). Ezzel szemben az ún. gazda rezisztenciánál csak egy adott növényfajta ellenálló-képességéről van szó. Régóta ismert, hogy a gazda rezisztencia során az ún. reaktív oxigénszármazékok (ROS) vagy más néven prooxidánsok (pl. szuperoxid / O_2^- /, hidrogén-peroxid / H_2O_2 /) gyors felhalmozódása okozhatja a kórokozók előlését és/vagy HR-t, de a növényi antioxidáns kapacitás fokozódását is a szomszédos egészséges szövetekben (Levine et al., 1994; Lamb és Dixon, 1997; Grant és Loake, 2000; Torres et al., 2006, Király et al., 2007; Miller et al., 2009). A nem-gazda rezisztenciáról viszont keveset tudunk, mechanizmusa még egyáltalán nincs tisztázva. Amennyiben ez sikerül, úgy a nem-gazda rezisztencia a jövőben jelentősen hozzájárulhat az eredményesebb rezisztencia-nemesítéshez.

A pályázat fő célja volt a prooxidáns/antioxidáns egyensúly nem-gazda rezisztenciában játszott szerepének jobb megismerése, többek között a közreműködő növényi gének expressziójának vizsgálata és tényleges funkciójuk tisztázása által.

Nem-gazda rezisztencia vizsgálatok – az antioxidánsok szerepe

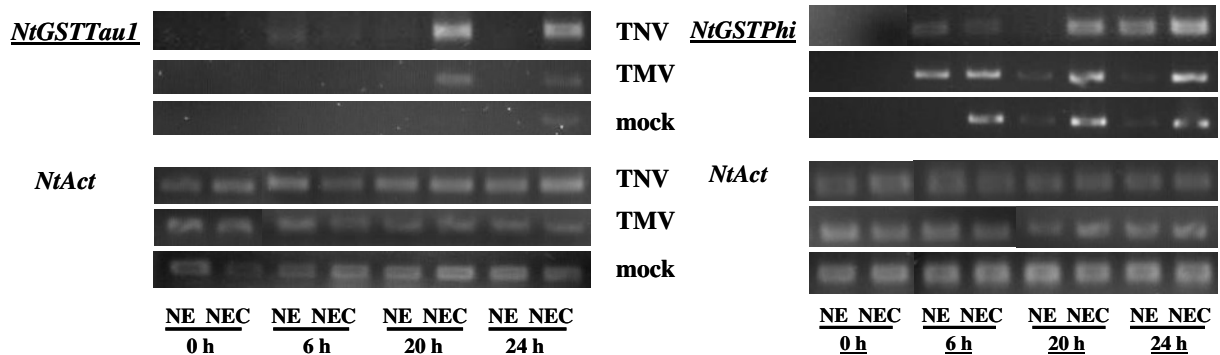
A pályázati időszak első évében megkezdtük a lokális nekrozissal járó nem-gazda rezisztencia vizsgálatát vírusfertőzött *Nicotiana edwardsonii* és *N. edwardsonii* var. Columbia növényekben. A növényeket gazda-, ill. nem-gazda rezisztenciát kiváltó vírusokkal (dohány mozaik vírus, TMV és dohány nekrozis vírus, TNV) fertőztük. Korábbi kutatásaink szerint mindkét vírus lokális nekrotikus léziókat okoz az említett növényeken, de a 'Columbia' növények fokozottan rezisztensek, amely a kisebb léziószámában, ill. méretben és alacsonyabb vírustiterben is megnyilvánul (Cole et al., 2004; Király et al., 2006).

A növényi kórokozók és abiotikus stresszek által előidézett nekrotikus tünetek elleni rezisztencia egyik alapja a gazdanövény fokozott antioxidáns kapacitása (Mittler et al., 1999; Baltruschat et al., 2008). Ezt a hipotézist az MTA NKI-ban folyó régebbi kutatások az elsők között igazolták: egy nagy antioxidáns kapacitású dohány vonal ugyanis fokozott ellenálló képességet mutatott többféle, abiotikus és biotikus (patogének által indukált) stressz során kialakuló nekrotikus tünetekkel szemben (Gullner et al., 1991; Barna et al., 2003).

Az antioxidánsok nem-gazda rezisztenciában játszott szerepe alig ismert. Mellersh és munkatársai (2002) szerint egy lisztharmat gombával (*Erysiphe cichoracearum*) fertőzött

tehenborsóban egy antioxidáns enzim (kataláz) injektálása a levelekbe a nem-gazda rezisztencia részleges gátlását eredményezte. Saját, korábbi kutatásaink szerint *N. edwardsonii* és *N. edwardsonii* var. Columbia növényekben egy antioxidáns, ill. antioxidáns hatású enzimet kódoló gén (kataláz és alternatív-oxidáz, *NgCAT1* és *NtAOX1-2*) expressziója viszont nem mutatott a nem-gazda vírus rezisztenciára specifikus változásokat (Künstler et al., 2007).

Az enzimatisz antioxidánsok egy másik típusa, a glutation-S-transzferázok (GST) nem-gazda rezisztenciában játszott szerepére utal az a régebbi eredményünk, miszerint TNV-fertőzött dohányban a GST enzimaktivitás jelentősen megemelkedik (Gullner et al., 1995). Kíváncsiak voltunk arra, hogy a GST aktivitás mRNS-szinten is hasonló módon változik-e? Két, különböző típusú GST fehérjét kódoló gén expressziója (*NtGSTTaul* és *NtGSTPhi*) (Dean et al., 2005) a nem-gazda rezisztenciát kiváltó TNV-fertőzés után kb. 20-24 órával erősen indukálódott a fokozottan rezisztens 'Columbia' növényekben (szemikvantitatív RT-PCR módszerrel mérve). **A kérdéses GST-gének nem-gazda rezisztenciához való hozzájárulása azonban csak részlegesnek tekinthető**, ugyanis **1/** az *NtGSTTaul* és *NtGSTPhi* gének expresszióját gazda rezisztenciát kiváltó vírus (TMV) fertőzések mérve közel ugyanazt az eredményt kaptuk, mint a TNV-re: erős gén-indukció a fertőzés után 20-24 órával de csak a fokozottan gazda rezisztens 'Columbia' növényekben **2/** kontroll-inokulált - mechanikai stressznek kitett - növényekben a gén-indukció közel akkora volt, mint vírusfertőzéskor (1. ábra). A TNV, ill. TMV fertőzés után 2-5 nappal viszont már nem volt különbség az *NtGSTTaul* és *NtGSTPhi* gének expressziójában a kétféle növénytípus között. Ez arra utal, hogy ezek a védekezéssel kapcsolatos gének a vírusfertőzés előrehaladott állapotában már nem befolyásolják a nem-gazda, ill. gazda rezisztenciát.



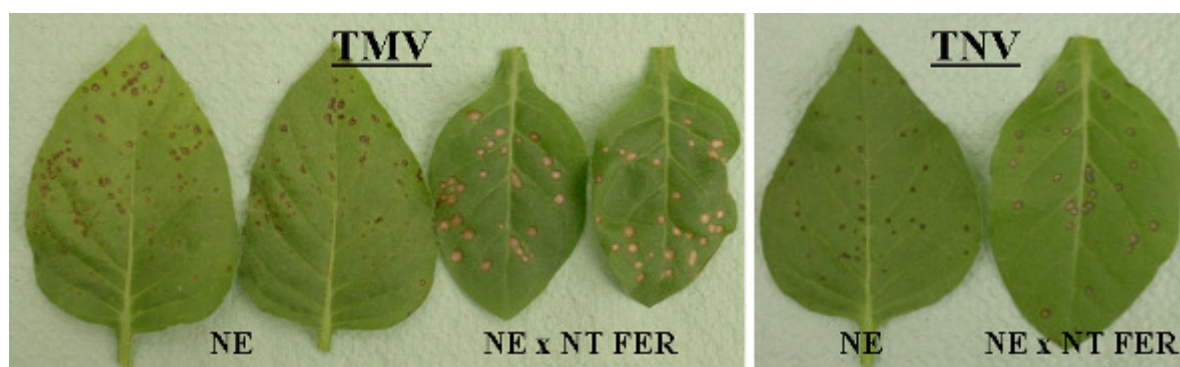
1. ábra: Két glutation-S-transzferáz gén (*NtGSTTaul* és *NtGSTPhi*) expresszió változásai HR-rel együtt járó nem-gazda és gazda rezisztenciánál, dohány nekrotízis-, ill. dohány mozaik vírussal (TNV és TMV) fertőzött *N. edwardsonii* (NE) és *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) növényekben, a vírusfertőzés után különböző időpontokban. Mock = kontroll inokulált (mechanikai stressz). A génexpressziót szemikvantitatív RT-PCR-rel mértük, referenciának egy dohány aktin gén (*NtAct*) expresszióját tekintettük.

Nem-gazda rezisztencia vizsgálatok – a prooxidánsok szerepe

A pályázat egyik fő célja volt tisztázni a prooxidánsok (reaktív oxigénszármazékok) szerepét a nem-gazda rezisztenciában. Korábbi eredményeink szerint, ha dohánylevelekre viszonylag alacsony koncentrációban (5-10 mM) permetezünk hidrogén-peroxidot, a növényeket immunizálni lehet nem-gazda rezisztenciát kiváltó, nekrotikus tüneteket előidéző kórokozók fertőzésével szemben is (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*) (Hafez et al., 2004; publikáció előkészítés alatt).

A hidroxil gyök (OH⁻) lehetséges funkciója nem-gazda rezisztenciában

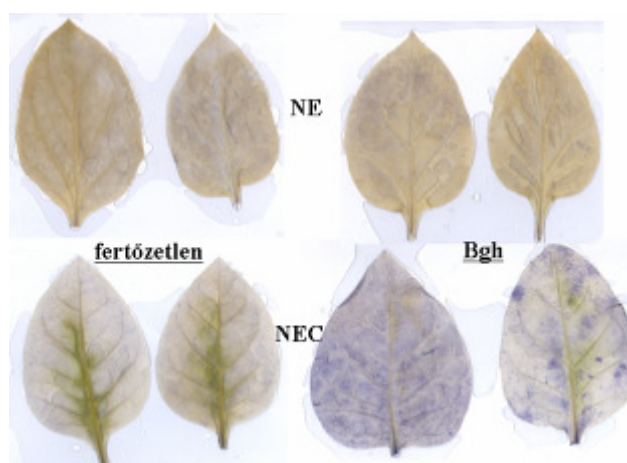
A prooxidánsok nem-gazda rezisztenciában betöltött szerepének további tisztázásához először egy olyan *N. edwardsonii* x *N. tabacum* F1 fajhibridet állítottunk elő, amely a dohány szülőitől származó lucerna ferritin transzgén (Deák et al., 1999) fejez ki. A ferritin fehérje - a szabad vas megkötése révén - képes a hidrogén-peroxidból keletkező hidroxil gyök (OH⁻) termelődését gátolni. Az F1 fajhibrid növényeket a korábban említett vírusokkal (TMV és TNV) fertőztük. A vírusfertőzött F1 hibridekben nagyobb volt a nekrotikus léziók mérete, de ez elsősorban a TMV-fertőzött növényekben volt szembevető (kb. háromszor akkora lézióméret, mint az *N. edwardsonii*-ban), míg a TNV-fertőzött hibridnél a különbség csak 1,3-1,5-szeres volt (2. ábra). Ezek szerint **a hidroxil gyök fontos komponense lehet mindkét rezisztenciaformának, de a gazda-típusú betegség ellenállóságban van inkább kulcsszerepe**. A kérdés tisztázásához azonban szükséges lesz a két vírus replikációját is figyelemmel kísérni a fertőzött növényekben, amit a közeljövőben tervezünk.



2. ábra: HR-rel együtt járó nem-gazda és gazda rezisztencia dohány nekrozis- és dohány mozaik vírussal (TNV és TMV) fertőzött *N. edwardsonii* (NE) és *N. edwardsonii* x *N. tabacum* lucerna ferritin transzgén kifejező F1 fajhibrid (NE x NT FER) növényekben a vírusfertőzések után 5 nappal.

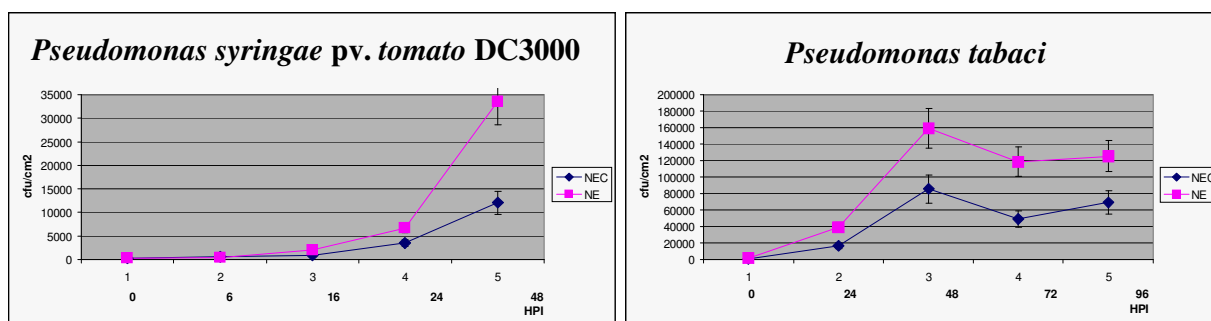
A szuperoxid (O₂⁻) szerepe Nicotiana fajok nem-gazda rezisztenciájában

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a hidroxil gyökön kívül van-e más prooxidánsnak is szerepe a *N. edwardsonii* nem-gazda rezisztenciájában? A szuperoxid (O₂⁻) általában abiotikus stresszek és fertőzések hatására keletkezik nagyobb mennyiségben, és további reakciói során hidrogén-peroxid, ill. hidroxil gyök is felhalmozódhat. A kérdés megválaszolásához *N. edwardsonii* és *N. edwardsonii* var. *Columbia* növényeket fertőztünk árpalisztharmattal (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*). Ebben az esetben a nem-gazda rezisztencia tünetmentes, de a fertőzött levelekben a szuperoxid -felhalmozódást nitro-blue-tetrazolium (NBT) infiltrálásával (lásd Király et al., 2002) láthatóvá téve **a 'Columbia' növények fokozottabb szuperoxid-felhalmozódást mutattak**, a fertőzés után már 1-2 nappal. Érdekes, hogy az erős szuperoxid-felhalmozódás már az egészséges 'Columbia' levelekben is látszott (3. ábra), ami arra enged következtetni, hogy a magas szuperoxid szint szerepet játszhat a 'Columbia' növények korábban általunk leírt, vírusfertőzésekkel szembeni fokozott nem-gazda és gazda rezisztenciájában is.



3. ábra: Szuperoxid (O_2^-) detektálása egészséges (fertőzetlen) *N. edwardsonii* (NE) és *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) növényekben és tünetmentes nem-gazda rezisztenciánál, árpalisztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, A6) (Bgh) fertőzés után két nappal A szuperoxid detektálásához 0,1 %-os nitroblue-tetrazolium (NBT) oldatot infiltráltunk a fertőzött levelekbe (lásd Király et al., 2002).

A szuperoxid és a nem-gazda rezisztencia összefüggéseinek további vizsgálatához a *N. edwardsonii* és *N. edwardsonii* var. Columbia növényeket a mindkét növényvonalban tünetes nem-gazda rezisztenciát (hiperszenzitív nekrosis, HR) kiváltó *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000-el fertőztük. Ez a baktérium kórokozó (7×10^5 cfu/ml inokulum koncentrációnál) a Columbia fajhibridben az infiltrált levélzónán belül legfeljebb feleakkora léziókat okozott, és a baktériumszám a fertőzést követő 48 órán belül is csak kb. 50 %-a volt a *N. edwardsonii*-ban mért értékeknek (4. ábra). Nagyobb inokulum koncentrációnál (7×10^8 cfu/ml) viszont a Columbia növények fokozott rezisztenciája nem vagy csak kevésbé érvényesült. Feltételezhető tehát, hogy a viszonylag magas endogén szuperoxid szint hozzájárul a Columbia növények fokozott nem-gazda rezisztenciájához. A mindkét növényben kompatibilis fertőzést (normoszenzitív nekrosis) okozó *Pseudomonas tabaci* baktérium fertőzésével szemben a Columbia növények szintén ellenállóbbnak bizonyultak (kb. 50 %-al kisebb nekrotizált terület az infiltrált levélzónában és 50 %-al kisebb baktériumszám), de szintén csak az alacsonyabb inokulum koncentrációnál (7×10^5 cfu/ml) (4. ábra). Eredményeink szerint tehát a **Columbia növényekben található viszonylag nagy mennyiségű szuperoxid fontos tényezője lehet az ún. alap (bazális) rezisztenciának, amely nem-gazda rezisztenciát és fogékonyságot kiváltó kórokozók fertőzésekor egyaránt érvényesülhet.**

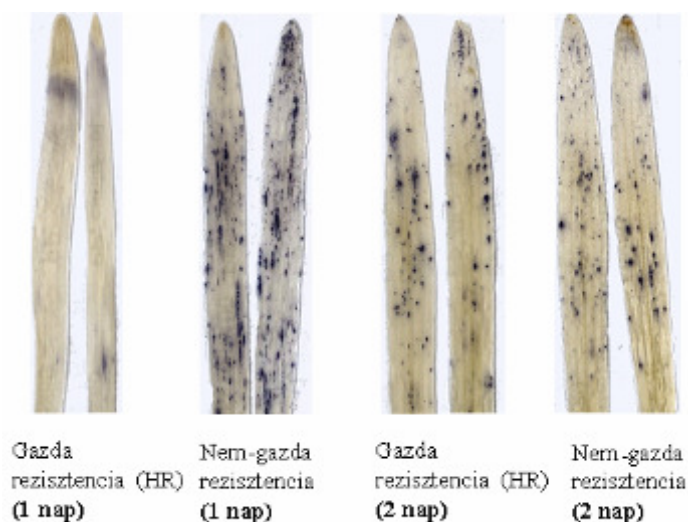


4. ábra: A baktérium szaporodás időbeni változása *N. edwardsonii* (NE) és *N. edwardsonii* var. Columbia (NEC) növényekben tünetes nem-gazda rezisztenciát (HR) kiváltó *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 és kompatibilis fertőzést (normoszenzitív nekrosis) kiváltó *Pseudomonas tabaci* baktérium fertőzésénél. Az inokulum koncentráció mindkét esetben 7×10^5 cfu/ml volt.

A szuperoxid (O_2^-) szerepe gabonafélék (árpa, búza) nem-gazda rezisztenciájában

Árpanövények búzalisztharmattal (*B. graminis* f.sp. *tritici*) szembeni nem-gazda rezisztenciája során nem alakulnak ki szabad szemmel látható tünetek. Korábbi előkísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a tünetmentes nem-gazda rezisztencia egyik oka árpában is a prooxidánsok felhalmozódása lehet: ha antioxidáns enzimeket (szuperoxid-dizmutáz és kataláz) infiltráltunk a fertőzött levelekbe, esetenként kialakultak a fogékony gazda-kórokozó kapcsolatra jellemző lisztharmatos tünetek (Fodor, Hafez, Künstler és Király, publikálatlan eredmények). A prooxidánsok szerepére utaltak a gazda rezisztenciával kapcsolatos korábbi eredményeink is: árpában az endogén hidrogén-peroxid szint növelése rezisztenciát eredményez az árpalisztharmattal szemben (Hafez és Király, 2003; Király et al., 2004). Mivel a szuperoxid egy olyan prooxidáns, melynek reakcióból hidrogén-peroxid, ill. hidroxil gyök is keletkezhet, kézenfekvő volt, hogy ennek a vegyületnek a nem-gazda rezisztenciában játszott szerepét is megvizsgáljuk árpában, ill. más gabonafélékben.

A szuperoxid-termelés gabonafélék nem-gazda rezisztenciájában játszott szerepét vizsgálva először árpát (cv. Ingrid, *Mla*) fertőztünk árpalisztharmattal (gazda rezisztencia) és búzalisztharmattal (nem-gazda rezisztencia). Búzalisztharmat-fertőzésnél a szuperoxid-felhalmozódás NBT festéssel detektálva már 1 nappal a fertőzés után jelentkezett, míg az árpalisztharmat-fertőzésnél csak kb. 24 órával később (5. ábra). A fogékony (kompatibilis) árpa/lisztharmat kapcsolatban viszont szuperoxid-felhalmozódás egyáltalán nem volt detektálható.

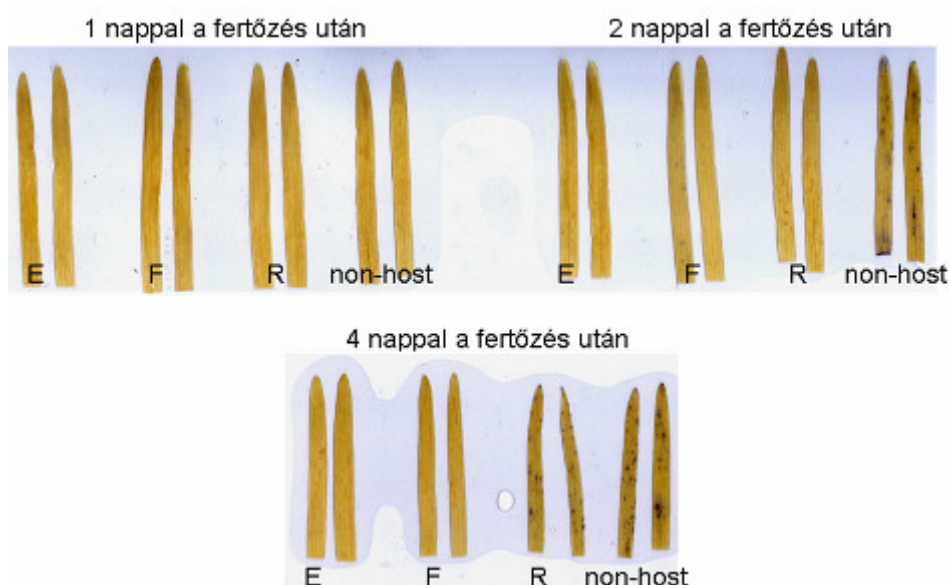


5. ábra: Szuperoxid (O_2^-) detektálása gazda- és nem-gazda rezisztenciánál, árpában (cv. Ingrid *Mla*), a fertőzés után egy és két nappal. Az árpalisztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzés gazda rezisztenciát (HR), míg a búzalisztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, magyar 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).

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a fokozott korai szuperoxid-felhalmozódás, mint az árpa tünetmentes nem-gazda rezisztenciájának egyik feltételezhető komponense megfigyelhető-e más kórokozók fertőzésénél is? A továbbiakban árpát (cv. Ingrid) fertőztünk árparozsdával (*Puccinia hordei*, gazda rezisztencia) és búzarozsdával (*Puccinia triticina*, nem-gazda rezisztencia). A lisztharmat-fertőzéses kísérleteinkhez hasonlóan, búzarozsda-fertőzésnél a szuperoxid-felhalmozódás már 1 nappal a fertőzés után jelentkezett, míg az

árparozsda-fertőzésnél csak kb. 24 órával később. A fogékony (kompatibilis) árpa/árparozsda kapcsolatban szuperoxid-felhalmozódást nem tapasztaltunk.

Annak további tisztázásához, hogy a szuperoxid-termelés meghatározó szerepet játszhat-e egy másik gabonaféle tünetmentes nem-gazda rezisztenciájában is, búzanövényeket fertőztünk búzarozsdával (*Puccinia triticina*, gazda rezisztencia), zabrozsdaival (*P. coronata* f.sp. *avenae*, nem-gazda rezisztencia) és árparozsdával (*P. hordei*, nem-gazda rezisztencia). A korábbi, árpán végzett fertőzéses kísérleteinkhez hasonlóan, zabrozsdaival és árparozsdával fertőzött búzában a szuperoxid-felhalmozódás már 2, ill. 3 nappal a fertőzés után jelentkezett, míg a búzarozsda-fertőzésnél csak 4 nappal a fertőzés után. A fogékony (kompatibilis) búza/búzarozsda kapcsolatban szuperoxid-felhalmozódást nem tapasztaltunk.



6. ábra: Szuperoxid (O_2^-) detektálása gazda- és nem-gazda rezisztenciánál, búzában, a fertőzés után egy, két és négy nappal. E = egészséges növény; F = fogékonyt eredményező búzarozsda (*Puccinia triticina*) fertőzés; R = gazda rezisztenciát (HR) eredményező búzarozsda fertőzés; non-host = tünetmentes nem-gazda rezisztenciát eredményező zabrozsda (*P. coronata* f.sp. *avenae*) fertőzés. A szuperoxid detektálásához 0,1 %-os nitrobluetetrazolium (NBT) oldatot infiltráltunk a fertőzött levelekbe (lásd Király et al., 2002).

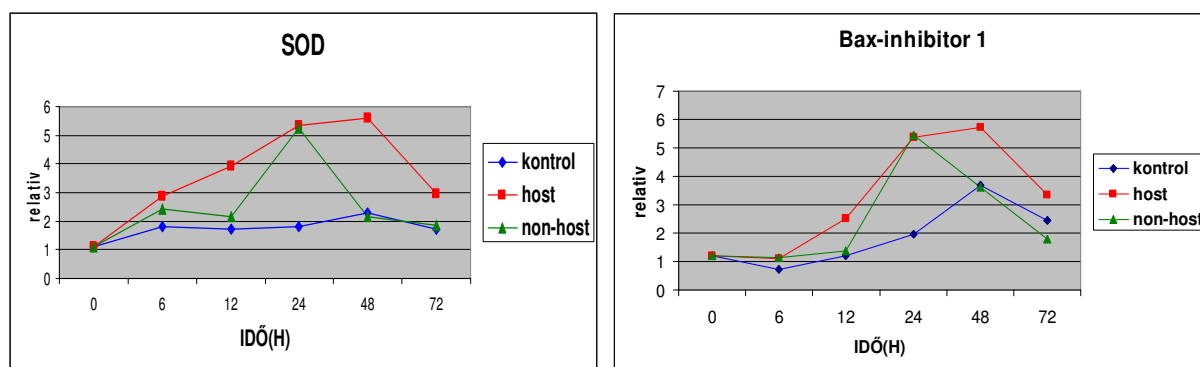
A fent említett kísérleteink eredményei alapján tehát a fogékony (kompatibilis) gazda/patogén kapcsolatokban nincs szuperoxid-felhalmozódás, a gazda- rezisztenciát mutató kombinációkban van szuperoxid-képződés ill. akkumuláció, és a nem-gazda rezisztenciát mutató kombinációkban, amelyek tünetmentesek (nincs HR) szintén van, de általában korábban észlelhető a felhalmozódás (8. ábra). **Feltételezhető, 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 lokális sejt/szöveti nekrotizációnak (HR), amely sokszor 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 ellenállóképeséget. Erre utal az a korábban már említett eredményünk, hogy ha antioxidáns enzimeket (szuperoxid-dizmutáz és kataláz) infiltráltunk liztharmattal fertőzött

árpalevelekbe, esetenként kialakultak a fogékony gazda-kórokozó kapcsolatra jellemző lizsthartatos tünetek.

A szuperoxid (O_2^-) felhalmozódásához köthető génexpressziós változások nem-gazda rezisztenciát kifejező növényekben

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a nem-gazda rezisztencia során tapasztalható fokozott, korai szuperoxid-felhalmozódás milyen génexpressziós változásokra vezethető vissza? A kórfolyamatokkal kapcsolatos szuperoxid termelésért növényekben elsősorban a NADPH-oxidázok felelősek (Torres et al., 2006, Király et al., 2007; Miller et al., 2009). Valós idejű RT-PCR-rel mérve azonban egyik esetben sem változott meg egy általunk vizsgált árpa NADPH-oxidáz gén expressziója lizsthartat fertőzés hatására. A szuperoxidot általában a szuperoxid-dizmutázok (SOD) konvertálják hidrogén-peroxiddá (Mittler, 2002). Eredményeink szerint lizsthartat-fertőzött árpában egy szekvenciája alapján feltételezhetően *SOD* gén expressziója jellegzetes eltérést mutatott a gazda rezisztencia, ill. nem-gazda rezisztencia eseteiben. Ha az árpát saját lizsthartatgombájával fertőztük (gazda rezisztencia), a *SOD* génexpresszió fokozódott a fertőzés után, és tartósan így is maradt. Nem-gazda rezisztenciánál (árpa/búzalizsthartat) viszont a *SOD* gén expressziója a szuperoxid megjelenésével nagyjából egy időben - a fertőzés után 24 órával - de csak átmenetileg emelkedett meg jelentősebben. Később az expresszió visszaesett az eredeti szintre, feltehetően azért, mert a patogén korán elhalt (7. ábra). Feltételezhető, hogy a sejt- és szöveti nekrotizáció (HR) hiánya ennél a rezisztencia-formánál 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/búzalizsthartat kombinációban a szuperoxid megjelenésével egy időben, de csak átmenetileg fokozódott (7. 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 búzalizsthartat fertőzést követő 24 óra után a *BAX-inhibitor 1* génexpresszió csökkenése is ezzel függ össze.

Érdekes, hogy egyes antioxidáns (GST) gének fokozott, korai expressziója a szuperoxidot egészségesen is felhalmozó *N. edwardsonii* var. Columbia növényekben a HR-rel együtt járó nem-gazda rezisztenciához köthető (lásd a korábban ismertetett eredményeket). Ezek szerint **a nem-gazda rezisztencia mechanizmusának egyik kulcslépése lehet az antioxidáns kapacitás korai, gyors indukciója** a kórokozó ágens által megtámadott növényi szövetekben.



7. 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 árpalizsthartat (*B. graminis* f.sp. *hordei*, A6) fertőzés gazda rezisztenciát (HR), míg a

búzalisztharman (*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.

A gazda- és nem-gazda rezisztencia mechanizmusának összefüggései - rezisztencia gén(ek) funkcionális vizsgálata

Mind *Nicotiana edwardsonii*-ban, mind a *Nicotiana* nemzetség más fajaiban is a TMV-vel, ill. TNV-vel szembeni gazda-, ill. nem-gazda rezisztencia végeredménye a fertőzési helyeken kialakuló lokális nekrotikus léziók (HR) megjelenése. Régóta ismert, hogy ezekben a növényekben a TMV-vel szembeni gazda rezisztenciáért általában az *N* gén a felelős (Holmes, 1938; Whitham et al., 1994). A TNV-vel szemben ható rezisztencia gént/géneket viszont még nem azonosították. Felmerül a kérdés, hogy **az *N* gén csendesítése hogyan befolyásolja a más, TMV-vel nem rokon vírusokkal (pl. TNV) szembeni nem-gazda rezisztenciát *N. edwardsonii*-ban?**

*Az *N* rezisztencia gén csendesítésének hatása a TMV-vel szembeni gazda rezisztenciára*

A kérdés megválaszolásához egy külföldi csoporttal (Jim Schoelz kutatócsoportja, University of Missouri, USA) együttműködve az *N* gén 1. exonjára tervezett hairpin konstrukciót kifejező transzgenikus *N. edwardsonii* növények vírus rezisztenciáját vizsgáltuk. Az említett transzgén-konstrukció révén a növények egy részében az *N* gén csendesítve van, ezért a TMV-vel szembeni gazda rezisztencia láthatóan sérül (később megjelenő, kisebb és jóval kevesebb léziók) (8. ábra), bár a TMV titer - ELISA módszerrel mérve - nem változik a vad típusú növényekhez képest (Balaji et al., 2007; saját vizsgálataink). A külföldi partnerrel együtt azonban azt is kimutattuk, hogy az *N* gén-csendesített *N. edwardsonii* növények nagy részében a redukált lézió képzés valóban együtt jár a TMV-rezisztencia sérülésével, ugyanis **1/** fokozódik a sejtről-sejtre történő vírus terjedés mértéke az inokulált levelekben. A zöld fluoreszcens fehérje gént kifejező TMV konstrukcióval (TMV-30B-GFP) fertőzött *N* gén-csendesített növényekben a vírus terjedés mértékét jelző zöld fluoreszcencia (UV fényben detektálva) jóval erősebb volt, mint a vad típusú növényekben **2/** az *N* gén csendesítésének hatására a TMV-fertőzésre jellemző szisztémikus nekrozis (Cole et al., 2004) kb. 3-5 nappal korábban jelentkezett, mint a vad típusú *N. edwardsonii*-ban (8. ábra). Ezek az eredmények tehát arra utalnak, hogy az *N* gén csendesítése valóban **csökkentette a TMV-vel szembeni gazda-rezisztenciát**, elsősorban a TMV sejtről-sejtre történő és szisztémikus terjedésének fokozásával.

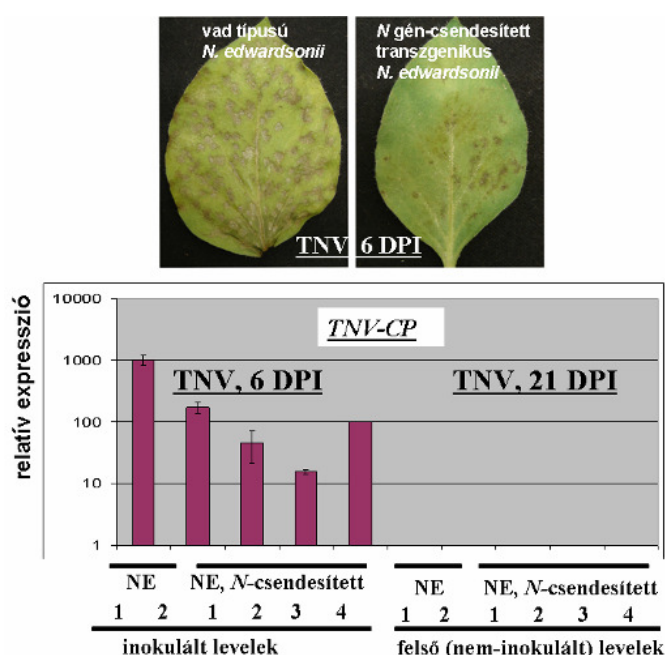


8. ábra: HR-rel együtt járó gazda rezisztencia látható sérülése dohány mozai vírus (TMV) fertőzés után 5 és 9 nappal, *N* gén-csendesített transzgenikus *N. edwardsonii* inokulált (fekete háttér), ill. szisztémikus (világoskék háttér) leveleiben.

Az N rezisztencia gén csendesítésének nem várt hatása a TNV-vel szembeni nem-gazda rezisztenciára

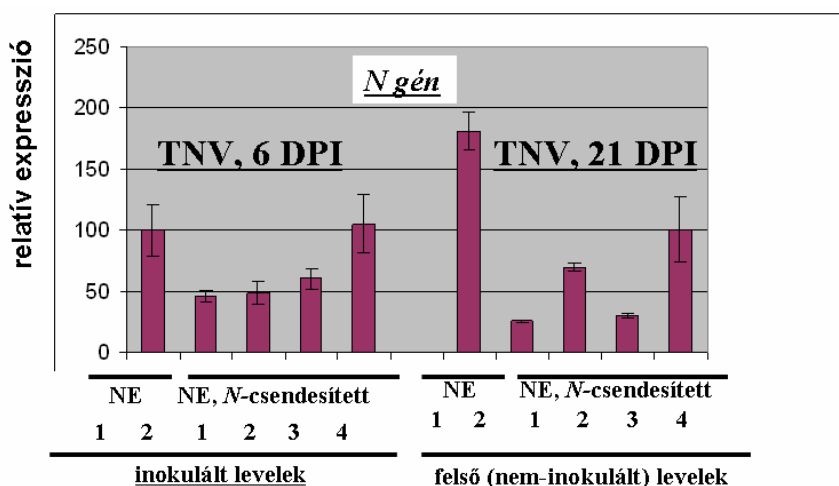
Eredményeink szerint az N gén-csendesített *N. edwardsonii* növényekben a TMV-vel nem rokon TNV-vel fertőzve a vad típushoz képest szintén kisebb és jóval kevesebb lokális nekrotikus lézió képződik (gyakran tünetmentesség tapasztalható) (9. ábra). Annak tisztázására, hogy a kevesebb lézió a nem-gazda vírusrezisztencia csökkenését vagy ellenkezőleg, fokozódását jelzi, a TNV koncentrációt szemikvantitatív RT-PCR-rel vizsgáltuk az inokulált és szisztémikus levelekben.

Az első (2007-es) előkísérletekben a TNV köpenyfehérje gén kódoló régiójára tervezett degenerált primerpárt használva az eredmények nem voltak egyértelműek. A TNV-vel inokulált levelekben az N gén-csendesített *N. edwardsonii* minták kb. felénél a csökkent lézióképzés együtt járt a víruskoncentráció enyhe emelkedésével, de később ezt nem sikerült reprodukálni. A kérdés tisztázásához szekvenáltuk a degenerált primerpár által amplifikált TNV génszakaszt majd ez alapján terveztünk egy új, a templátnak pontosan megfelelő primerpárt. A TNV titert az új primerpár segítségével, szemikvantitatív RT-PCR-rel mérve a víruskoncentráció valamennyi N gén-csendesített *N. edwardsonii* mintában (inokulált levelek, 6 nappal a fertőzés után) a vad típusban mértnek csupán töredéke volt. A szisztémikus levelekben (21 nappal a fertőzés után) a TNV egyáltalán nem volt detektálható, se a vad típusú, se az N gén-csendesített növényekben. Az eredményeket kvantitatív (valós idejű) RT-PCR mérésekkel is megerősítettük (9. ábra).



9. ábra: HR-rel együtt járó nem-gazda rezisztencia fokozódása N gén-csendesített transzgenikus *N. edwardsonii* növényekben. Felső kép (fekete háttér): tünetek az inokulált levelekben a dohány nekrotízis vírus (TNV) fertőzés után 6 nappal. Alsó kép: a TNV titer alakulása vad típusú (NE) és N gén-csendesített transzgenikus *N. edwardsonii* inokulált és szisztémikus leveleiben, a vírushatás után 6, ill. 21 nappal. A TNV titert a vírus köpenyfehérje génjének (*TNV-CP*) relatív expressziója fejezi ki (valós idejű RT-PCR-rel mérve). **1000** = a vad típusban detektált génextpresszió (2 növény átlagából).

Annak tisztázására, hogy a transzgenikus *N. edwardsonii* növényekben a TNV fertőzés visszaszorulása az *N* gén csendesítésének következménye-e, valós idejű RT-PCR-rel mértük az *N* gén expresszióját az inokulált levelekben 6 nappal a TNV fertőzés után, ill. a szisztémikus levelekben 21 nappal a TNV fertőzés után, a külföldi partnerünk által publikált módszer szerint (Balaji et al., 2007). Mind az inokulált, mind a szisztémikus levelekben az *N* gén expressziójának jelentős csökkenését detektáltuk a vad típusú növényekhez képest (10. ábra). Mindez arra utal, hogy a TNV titer csökkenése az *N* gén csendesítése által beindított folyamat következménye lehet.



10. ábra: Az *N* gén expressziója vad típusú (NE) és *N* gén-csendesített transzgenikus *N. edwardsonii* inokulált és szisztémikus leveleiben, a dohány nekrózis vírus (TNV) fertőzés után 6, ill. 21 nappal. Valós idejű RT-PCR. **100** = a vad típusban detektált génextpresszió (2 növény átlagából).

Eredményeink szerint tehát *N. edwardsonii*-ban az *N* gén csendesítésének hatására a TNV-vel szembeni nem-gazda rezisztencia fokozódott. Ezek szerint egy TMV ellen ható vírus rezisztencia gén (*N*) terméke egy nem rokon vírus (TNV) fertőzésekor fogékonysági faktorként hathat. Korábbi vizsgálatok alapján azonban ismert, hogy a *N. edwardsonii*-ban található *N* gén szekvenciája 9 nukleotidnál mutat eltérést a Whitham et al. (1994) által elsőként publikált dohány szekvenciától és ezekből 2 pontmutáció eredményezi az aminosav szekvencia megváltozását (Cole et al., 2004). Elképzelhető tehát, hogy az *N* gén által kódolt fehérje *N. edwardsonii*-ban működő változata a TMV-vel szemben rezisztenciát határoz meg, míg egy másik vírus, a TNV esetén fogékonysági faktorként hat. Jelenleg természetesen nem kizárható az sem, hogy ezt a faktort egy az *N* génnel rokon gén kódolja, hiszen egy adott gén csendesítése a vele legalább 80 %-ban homológ szekvenciájú rokon gének működését is gátolja (Baulcombe, 1999). Erre utalnak külföldi partnerünk eredményei: egy az *N* génnel 83 %-ban homológ *N. edwardsonii* szekvencia csendesítésével is sérül a TMV-vel szembeni gazda rezisztencia (Balaji et al., 2007): akár ez vagy egy hasonló *N* gén-homológ is kódolhatja a TNV fogékonysági faktort.

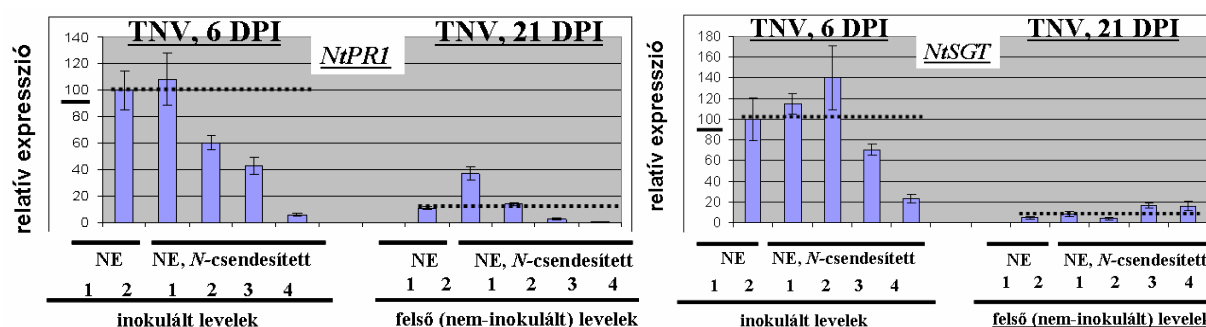
Előkísérleteket kezdtünk vad típusú és a dohány-eredetű *N* gént kifejező transzgenikus *N. benthamiana*-ban: arra vagyunk kíváncsiak, hogy ezekben a növényekben a TNV fertőzés kimenetelét hogyan befolyásolja a kérdéses *N* gén fehérjeterméke? Jelenlegi ismereteink szerint a TNV csak a *N. benthamiana*-t képes szisztémikusan megfertőzni (Molnár et al., 1997). Az általunk használt TNV törzs (E) mind a vad típusú, mind az *N* génre transzgenikus növényeken szisztémikus nekrózist okoz, de a tünetek a transzgenikus növényeken korábban jelennek meg, ill. jóval kifejezettebbek. Ezek szerint a dohány-eredetű *N* gén fehérjeterméke *N. benthamiana*-ban valóban a TNV fertőzés fogékonysági faktora lehet. A kérdés

megválaszolásához szükséges lesz a TNV titer mérése is: ezek a vizsgálatok jelenleg folyamatban vannak.

Az N rezisztencia gén csendesítése fokozza a TNV-vel szembeni nem-gazda rezisztenciát, de nem a védekezési gének indukcióján keresztül

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az *N* gén-csendesített *N. edwardsonii*-ban a TNV-vel szembeni nem-gazda rezisztencia erősödése együtt jár-e egyes védekezési gének fokozott indukciójával? Egy patogenezissel kapcsolatos és a szalicilsav glikozilálás kulcsenzimjét kódoló gén (*NgPRI* és *NtSGT*) expresszióját vizsgáltuk a vad típusú és *N*-gén csendesített növényekben, az inokulált levelekben 6 nappal a TNV fertőzés után, ill. a szisztémikus levelekben 21 nappal a TNV fertőzés után. A két védekezési gén expressziója az *N* gén-csendesített növényekben a TNV fertőzést követően kb. ugyanolyan mértékben vagy kevésbé indukálódott, mint a vad típusban (11. ábra). Ezek szerint az *N* gén-csendesítés hatására *N. edwardsonii*-ban kialakuló, TNV-vel szembeni fokozott nem-gazda rezisztenciában nincs szerepe a védekezési gének emelt szintű indukciójának.

A fentiek alapján TNV fertőzésnél a HR-t kiváltó, fokozott nem-gazda rezisztencia oka valószínűleg az *N. edwardsonii*-ban található *N* gén vagy egy homológja által kódolt fogékonysági faktor(ok) hiánya és nem a védekezési rendszer „felpörgetése”. A pontos válaszhoz azonban szükséges a kérdéses védekezési gének expresszióját egészséges növényekben is megvizsgálni, ezek a vizsgálatok jelenleg folyamatban vannak.



11. ábra: Védekezési gének (*NgPRI* és *NtSGT*) expressziója vad típusú (NE) és *N* gén-csendesített transzgenikus *N. edwardsonii* inokulált és szisztémikus leveleiben, a dohány nekrozis vírus (TNV) fertőzés után 6, ill. 21 nappal. Valós idejű RT-PCR. **100** = a vad típusban detektált génextpresszió (2 növény átlagából).

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

A széleskörű kutatások ellenére ma is vitatott kérdés, hogy közvetlenül mi gátolja olyan hatásosan a kórokozót a nem-gazda rezisztenciát mutató növényekben? Pályázatunk eredményei szerint a nem-gazda rezisztencia egyik kulcsfontosságú oka a prooxidánsok – elsősorban a szuperoxid – felhalmozódása lehet. A nem-gazda ellenálló képességhez hasonlóan korai és gyors lefolyású a gazda rezisztencia egyik speciális formája, az ún. extrém rezisztencia is, amely tünetmentes és elsősorban vírusfertőzések ellen hat (Bendahmane et al., 1999; Hajimorad et al., 2006). A jelen pályázat kutatói közül ketten is részt vesznek egy, az MTA NKI-ban futó újabb OTKA pályázatban, melynek fő célja a prooxidánsok extrém rezisztenciában játszott szerepének feltárása.

Pályázatunk eredményei arra is rámutatnak, hogy egy adott kórokozó ellen ható rezisztencia gén terméke egy másik kórokozó fertőzésekor pontosan ellenkező hatást válthat ki, fogékonysági faktorként hathat. Az *N* gén-csendesítésének hatásaival kapcsolatos munkánk távolabbi célja a vírusfertőzésekkel kapcsolatos nem-gazda rezisztencia mechanizmusának alaposabb feltárása egy potenciális - az *N* génnel rokon - TNV fogékonyságot elősegítő gén(ek) azonosítása és jellemzése által. Ezt a munkát a továbbiakban is a fent említett külföldi együttműködő partnerrel (Jim Schoelz kutatócsoportja, University of Missouri, USA) közösen tervezzük kivitelezni. A vírusokkal szembeni nem-gazda rezisztenciát befolyásoló gének azonosítása/jellemzése a jövő rezisztencia-nemesítését teheti még eredményesebbé.

Idézett irodalom

Balaji, B., Cawly, J., Angel, C., Zhang, Z., Palanichelvam, K., Cole, A., Schoelz, J. 2007. Silencing of the *N* family of resistance genes in *Nicotiana edwardsonii* compromises the hypersensitive response to Tombusviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 1262-1270.

Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K-H., 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., Ádám, A., Király, Z. 1993. Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* 80, 420-422.

Bendahmane, A., Kanyuka, K., Baulcombe, D.C. 1999. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11, 781-791.

Cole, A.B., Király, L., Lane, L.C., Wiggins, E.B., Ross, K., Schoelz, J.E. 2004. Temporal expression of PR-1 and enhanced mature plant resistance to virus infection is controlled by a single dominant gene in a new *Nicotiana* hybrid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 976-985.

Dean, J.D., Goodwin, P.H., Hsiang, T. 2005. Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Clavotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and involvement of one in resistance. *J. Exp. Bot.* 56, 1525-1533.

Deák, M., Horváth, G.V., Davletova, S., Török, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Király Z., Dudits, D. 1999. Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotechnology* 17, 192-196.

Gullner, G., Fodor, J., Király, L. 1995. Induction of glutathione-S-transferase activity in tobacco by tobacco necrosis virus infection and by salicylic acid. *Pesticide Sci.* 45, 290-291.

Gullner, G., Kőmíves, T., Király, L. 1991. Enhanced inducibility of antioxidant systems in a *Nicotiana tabacum* L. biotype results in acifluorfen resistance. *Z. Naturforsch.* 46c:875-881.

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, L., Fodor, J., Király, Z., 2004. Immunization of tobacco with hydrogen peroxide to oxidative stress caused by viral, bacterial and fungal infections. 14-th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Cracow, Poland. Abstract. *Acta Physiol. Plant.* 26(Suppl. 3), 126.

Hafez, Y.M., Király, Z. 2003. Role of hydrogen peroxide in symptom expression of barley susceptible and resistant to powdery mildew. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 38, 227-236.

Hajimorad, M.R., Eggenberger, A.L., Hill, J.H. 2006. Strain-specific P3 of *Soybean mosaic virus* elicits *Rsv1*-mediated extreme resistance, but absence of P3 elicitor function alone is insufficient for virulence on *Rsv1*-genotype soybean. *Virology* 345, 156-166.

Holmes, F.O. 1938. Inheritance of resistance to tobacco mosaic virus disease in tobacco. *Phytopathology* 28:553-561.

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. 2004. Role of prooxidants and antioxidants in natural and INA-induced powdery mildew resistance of barley leaves. International Joint Workshop on PR-Proteins and Induced Resistance, Helsingør, Denmark p. 119, Poster No. 57.

Király, L., Künstler, A., Schoelz, J.E. 2006. Enhanced resistance to virus infections in *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia can suppress both local necrotic symptoms and virus titers and is dependent on salicylic acid. Symposium on Non-specific and Specific Innate and Acquired Plant Resistance, Budapest, Hungary. Abstract, p. 68.

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.

Künstler, A., Hafez, Y.M., Király, L. 2007. Transient suppression of a catalase and an alternative oxidase gene during virus-induced local lesion formation (hypersensitive response) is independent of the extent of leaf necrotization. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 42, 185–196.

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. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.

Mellersh, D.G., Foulds, I.V., Higgins, V.J., Heath, M.C. 2002. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant J.* 29, 257-268.

Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M.A., Shulaev, V., Dangl, J., Mittler, R. 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* 2, ra45.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.

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.

Molnár, A., Havelda, Z., Dalmay, T., Szutorisz, H., Burgyán, J. 1997. Complete nucleotide sequence of tobacco necrosis virus strain D^H and genes required for RNA replication and virus movement. *J. Gen. Virol.* 78, 1235-1239.

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

Oh, S-K., Lee, S., Chung, E., Park, J.M., Yu, S.H., Ryu, C-M., Choi, D. 2006. Insight into Types I and II nonhost resistance using expression patterns of defense related genes in tobacco. *Planta* 223, 1101-1107.

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.

Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., Baker, B. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78, 1101-1115.

