

ZÁRÓJELENTÉS

*A kéntartalmú anyagokkal indukált rezisztencia molekuláris alapjainak vizsgálata
Tobamovirusokkal fertőzött dohány és paprika növényekben*

című OTKA kutatási pályázatról (K77641)

Vezető kutató: Dr. Gullner Gábor

Pályázat futamideje: 2009. április 1. - 2014. március 31.

Bevezetés

Az elmúlt években előtérbe került egy új, mikrobiális patogénnel szembeni rezisztencia-mechanizmus, az ún. kéntartalmú vegyületek által indukált rezisztencia vizsgálata. A jelenséget kezdetben agronómiai, szabadföldi vizsgálatok során írták le. A nagy kén-igényű növények (pl. repce) termesztésénél megfigyelhető volt, hogy kénhiányos talajban növekedve a növények fogékonyabbá váltak különböző gombabetegségekkel szemben. A kezdeti megfigyelések után a kéntartalmú vegyületek által indukált rezisztencia molekuláris hátterét jelenleg már világszerte kutatják, de elsősorban a patogén gombák által okozott növényi betegségek esetében. Mivel a vírusfertőzésekkel kapcsolatban a jelenséget még nem vizsgálták meg részletesen, a kutatómunkánk során a kéntartalmú vegyületek által indukált rezisztencia biokémiai, molekuláris mechanizmusait vizsgáltuk meg tobamovirusokkal fertőzött dohány és paprika növényekben.

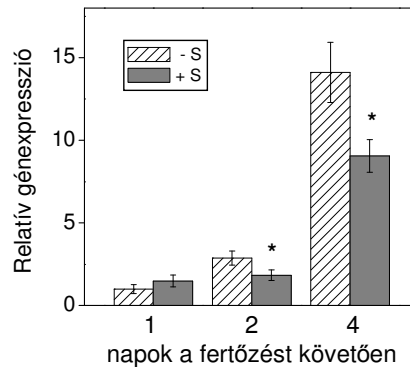
A kén főleg a cisztein, metionin és a tripeptid glutation (GSH) bioszintéziséhez szükséges növényekben. A gyökerek által felvett szulfátot a növény több lépésben ciszteinné alakítja. A cisztein pedig a tripeptid glutation (GSH) előanyaga, amelyről ismert, hogy a különböző fertőzésekkel szemben aktiválódó növényi védekezési reakciókban fontos szabályozó szerepet játszik.

Kompatibilis dohány-TMV kölcsönhatás vizsgálata

A pályázati munka első részében megvizsgáltuk a kéntartalmú vegyületek által indukált rezisztencia molekuláris alapjait dohány mozaikvírussal (TMV) fertőzött, genetikailag fogékony Samsun-nn dohánynövények leveleiben. A dohánynövényeket két különböző tápoldattal láttuk el: az egyik tápoldat szulfát-mentes volt (-S kezelés), míg a másik a növény számára elégséges szerves szulfátot tartalmazott (+S kezelés). A

különböző szervesetlen szulfát-ellátottságú dohánynövényeket TMV-vel fertőztük, majd különböző időpontok után a fertőzött és kontroll levelekből kivonatokat készítettünk, amelyeket reverz transzkripció - polimeráz láncreakció (RT-PCR) illetve kvantitatív, valósídejű RT-qPCR módszerrel vizsgáltunk.

Meghatároztuk a TMV köpenyfehérjét kódoló génjének kifejeződését a TMV fertőzött és kontroll levelekben. A megfelelő szulfát ellátottság mellett nevelt növényekben jelentősen kisebb mértékű volt a TMV köpenyfehérjét kódoló génjének kifejeződése, mint a szulfáthiányos növényekben. Ez arra utal, hogy a megfelelő szulfát-ellátottság mellett a vírus felszaporodása a levelekben lassabban következik be, mint hiányos szulfát ellátottság mellett (1. ábra).

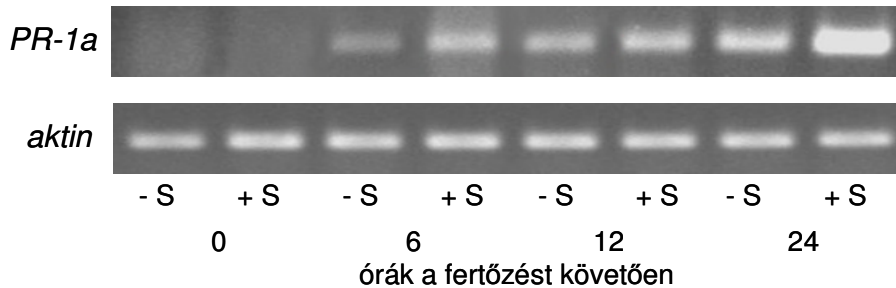


1. ábra. A TMV köpenyfehérjét kódoló génről termelt mRNA szintje a TMV-fertőzött Samsun-nn dohánylevelekben a fertőzést követő különböző időpontokban, valósídejű RT-qPCR módszerrel meghatározva. Jelölések magyarázata: -S és +S jelölik a kénhiányos illetve a megfelelő szulfát-ellátottságú növényeket. Az ábra három független biológiai kísérlet eredményeinek átlagát mutatja \pm a szórást. A * jel mutatja a szignifikáns eltéréseket $p < 0,05$ valószínűségi küszöbnél.

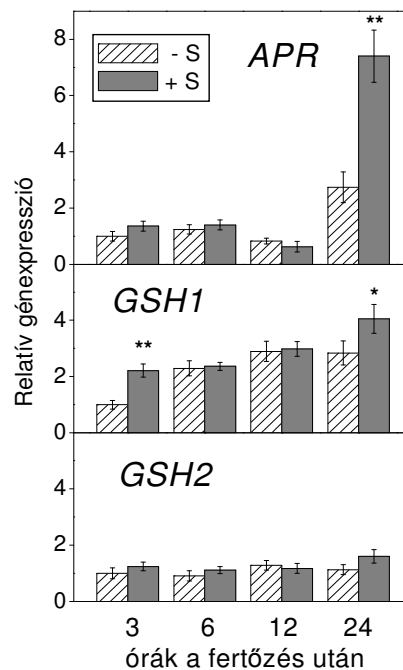
A kórfolyamathoz kapcsolt fehérjék (pathogenesis related proteins, PR-fehérje) ismert rezisztencia markerek, kódoló génjeik kifejeződése a vírushatások hatására igen jelentősen megemelkedik rezisztens növényekben. Megvizsgáltuk a dohány PR-1a fehérjét kódoló gén expressziójának a változásait a TMV-fertőzött és kontroll Samsun-nn dohánylevelekben. Kimutattuk, hogy a *PR-1a* gén expressziójának a mértéke nagy mértékben függ a szulfát-ellátottságtól: a megfelelő szulfát ellátottság (+S növények) esetében a gének kifejeződés erősebb volt mint a szulfát-hiányos (-S) állapotban (2. ábra).

Megvizsgáltuk a cisztein bioszintézisben meghatározó szerepet játszó adenzin-5-foszfoszulfát reduktáz (APR), valamint a GSH bioszintézisét végző gamma-glutamil-ciszteinszintetáz (GSH1) és a glutation-szintetáz (GSH2) enzimeket kódoló dohány gének aktiválódását a TMV fertőzés következtében. A GSH2 enzimet kódoló gén expressziója nem

változott szignifikánsan a Samsun levelekben a TMV fertőzés hatására, sem a -S, sem a +S kezelés esetében. Ezzel szemben az APR és GSH1 enzimeket kódoló gének kifejeződése lényegesen megemelkedett a vírushatás hatására (3. ábra).



2. ábra. A kórfolyamathoz kapcsolt PR-1a fehérjét kódoló gén aktiválódása TMV-fertőzött Samsun-nn dohánylevelekben, szemikvantitatív RT-PCR módszerrel vizsgálva. Egy dohány aktin gén kifejeződését vizsgáltuk kontrollként. Jelölések magyarázata: - S és + S jelölik a kénhiányos illetve a megfelelő szulfát-ellátottságú növényeket. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja.

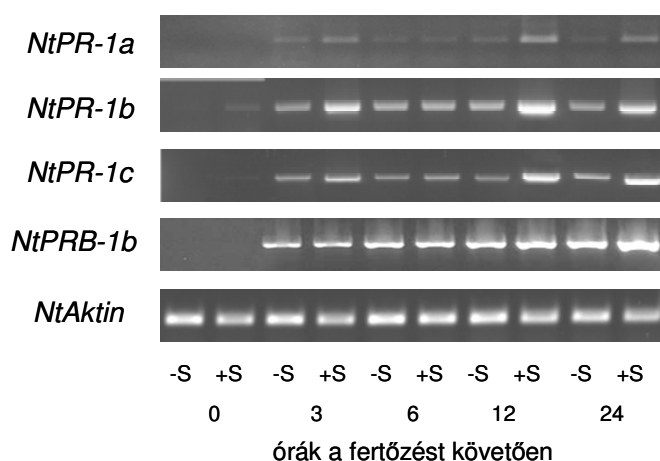


3. ábra. Az adenzin-5-foszfoszulfát reduktáz (*APR*), γ -glutamilsztein szintetáz (*GSH1*) és a glutation szintetáz (*GSH2*) gének expressziójának a változásai TMV-fertőzött Samsun-nn dohánylevelekben a fertőzést követő különböző időpontokban, valósídejű RT-qPCR módszerrel meghatározva. Jelölések magyarázata: -S és +S jelölik a kénhiányos illetve a megfelelő szulfát-ellátottságú növényeket. Az ábra három független biológiai kísérlet eredményeinek átlagát mutatja \pm a szórást. A * és ** jelek mutatják a szignifikáns eltéréseket $p < 0,05$ és $p < 0,01$ valószínűségi küszöbönél.

A +S kezelés mellett nevelt növények leveleiben az APR és GSH1 gének expressziójának az aktiválódása lényegesen nagyobb mértékű volt mint a -S kezelés esetében. Ezek a vizsgálatok igazolták a kén-ellátottság szerepét a dohánylevelek TMV-vel szembeni rezisztenciájában.

Inkompatibilis dohány-TMV kölcsönhatás vizsgálata

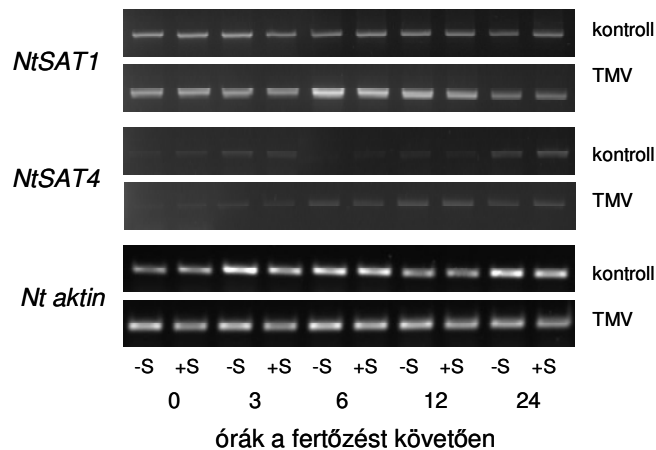
A pályázat további szakaszában a TMV fertőzéssel szemben rezisztens Samsun-NN dohánylevelek védekezési reakcióit vizsgáltuk meg különböző szulfát-ellátottság mellett, a TMV fertőzést követő különböző időpontokban. A TMV fertőzés hatására jelentős mértékben indukálódott a dohánylevelekben a kórfolyamathoz kapcsolt *PR1a*, *PR1b* és *PR1c* gének átíródása, ami már ismert folyamat. Kimutattuk azonban, hogy mindhárom gén átíródásának a mértéke igen jelentősen függ a növények szulfát-ellátottságától. A megfelelő szulfát-ellátottság esetén sokkal erősebb mRNS felhalmozódást tapasztaltunk mindhárom gén esetében, mint hiányos szulfát-ellátottság mellett (4. ábra).



4. ábra. A kórfolyamathoz kapcsolt *NtPR-1a*, *NtPR-1b*, *NtPR-1c* és *NtPRB-1b* gének expressziójának aktiválódása TMV-fertőzött Samsun-NN dohánylevelekben, szemikvantitatív RT-PCR módszerrel vizsgálva. Egy dohány aktin gén kifejeződését vizsgáltuk kontrollként. Jelölések magyarázata: -S és +S jelölik a kénhiányos illetve a megfelelő szulfát-ellátottságú növényeket. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja.

Megvizsgáltuk a cisztein bioszintézis út egyes enzimei kódoló génjeinek az expressziós változásait is a rezisztens Samsun-NN dohánylevelekben. A kórfolyamathoz kapcsolt fehérjéket kódoló génekhez képest a cisztein bioszintézis út génjei jóval kisebb mértékben indukálódtak a fertőzés hatására illetve sok esetben nem észleltünk fokozott expressziót. Így az O-acetilszerin-(tiol)-liáz izoenzimeket kódoló *NtOAS1* és *NtOAS7* gének illetve a szulfít-

reduktázt kódoló *NtSIR* gén expressziója nem változott meg jelentős mértékben a Samsun NN dohánylevelekben a TMV fertőzés hatására. Ezzel szemben a szerin acetil-transzferáz izoenzimeket kódoló *NtSAT1* és *NtSAT4* gén expressziója szignifikánsan megemelkedett a TMV-fertőzés következtében. A szulfát-ellátottság mértéke viszont nem volt jelentős hatással a *NtSAT1* és *NtSAT4* gének kifejeződésére (5. ábra).

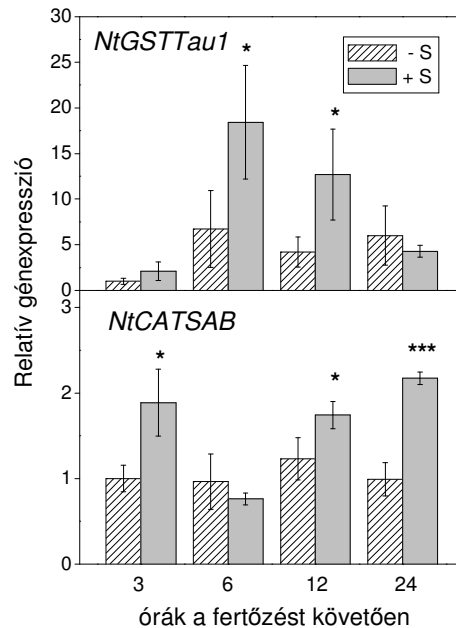


5. ábra. A cisztein bioszintézisben szerepet játszó szerin acetil-transzferáz izoenzimeket kódoló *NtSAT1* és *NtSAT4* gének expressziójának aktiválódása TMV-fertőzött Samsun-NN és kontroll (mock-inokulált) dohánylevelekben, szemikvantitatív RT-PCR módszerrel vizsgálva. Egy dohány aktin gén kifejeződését vizsgáltuk kontrollként. Jelölések magyarázata: -S és +S jelölik a kénhiányos illetve a megfelelő szulfát-ellátottságú növényeket. Az ábra két független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

A glutation bioszintézis enzimeit kódoló gének (*GSH1* és *GSH2*) valamint a cisztein bioszintézisben meghatározó szerepet játszó adenzin-5-foszfoszulfát reduktázt kódoló gén (*APR*) esetében a szulfát-ellátottság nem gyakorolt jelentős hatást a gének átíródására, szemben a fogékony Samsun nn növények esetében megfigyeltekkel. A vizsgálatok arra utalnak, hogy a kompatibilis dohány-TMV kölcsönhatás esetében a szulfát-ellátottság nagyobb mértékben befolyásolja a cisztein- és glutation bioszintézis géneinek az átíródását, mint az inkompatibilis dohány-TMV kölcsönhatás esetében.

A szulfát-ellátottság növekedésével erőteljesen emelkedett mind a fogékony Samsun-NN, mind a rezisztens Samsun-NN növények leveleiben az endogén cisztein és glutation mennyisége. Feltételeztük, hogy ezen tiol vegyületek megemelkedett szintje korrelációt mutat egyes stresszhelyzetekben aktiválódó ill. antioxidáns enzimeket kódoló gének expressziós szintjével. A kérdés megválaszolásához megvizsgáltuk egy tipikus stressz-enzimet, a Tau

osztályba sorolható glutation S-transzferáz enzimet kódoló gén (*NtGSTTau1*), valamint az antioxidáns szalicilsav-kötő katalázt (*NtCATSAB*) kódoló gén expressziójának a változásait a TMV-fertőzött Samsun-NN dohányfajta leveleiben. Mindkét gén expresszióját jelentősen befolyásolta a szulfát-ellátottság, a +S növényekben szignifikánsan erősebben indukálódott a gének átíródása a -S növényekhez képest (6. ábra).

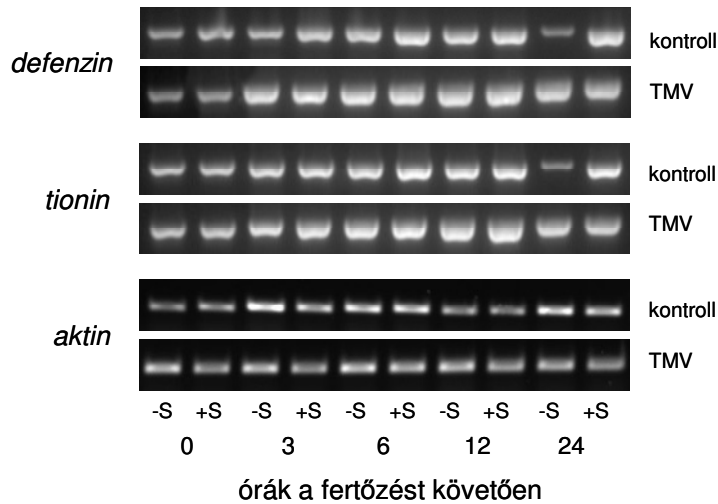


6. ábra. Egy Tau osztályba sorolható glutation S-transzferáz (*NtGSTTau1*) valamint a szalicilsavkötő kataláz (*NtCATSAB*) gének indukciója TMV-fertőzött rezisztens Samsun-NN dohányok leveleiben, valósidejű RT-qPCR módszerrel meghatározva. Jelölések magyarázata: -S és +S jelölik a kénhiányos illetve a megfelelő szulfát-ellátottságú növényeket. Az ábra három független biológiai kísérlet eredményeinek átlagát mutatja \pm a szórást. A * és *** jelek mutatják a szignifikáns eltéréseket $p < 0,05$ és $p < 0,001$ valószínűségi küszöböknel.

Magas kéntartalmú defenzin és tionin fehérjéket kódoló gének vizsgálata

Ismert, hogy a magas cisztein (kén)-tartalmú defenzin és tionin fehérjék fontos szerepet játszanak a fertőzött növények védekezési reakcióiban. Feltételeztük, hogy a szervesetlen szulfát-ellátottság jelentősen befolyásolja ezen fehérjék bioszintézisét, a kódoló génjeik expresszióját. Ezért megvizsgáltuk egy defenzin és egy tionin fehérjét kódoló dohány gén expresszióját TMV-vel fertőzött Samsun-NN növényekben. Összehasonlítottuk a szulfátmentes (-S kezelés), valamint az elégséges szervesetlen szulfátot tartalmazó tápoldattal kezelt (+S kezelés) növények viselkedését. A TMV fertőzés erősen megnövelte mind a defenzin, mind a tionin kódoló génjének az átíródását a fertőzést követő korai időpontokban. A szulfát-

ellátottság mértéke viszont nem volt jelentős hatással sem a defenzin sem a tionin kódoló géneinek kifejeződésére (7. ábra).



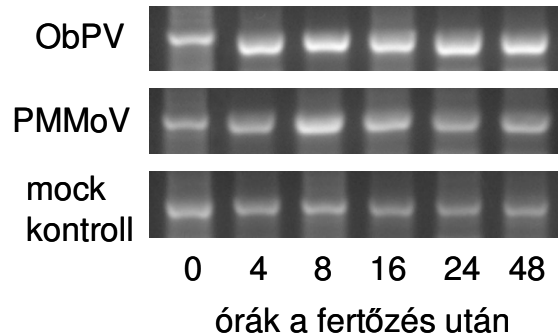
7. ábra. Egy defenzin és egy tionin gén expressziójának aktiválódása TMV-fertőzött és kontroll (mock-inokulált) Samsun-NN dohánylevelekben, szemikvantitatív RT-PCR módszerrel vizsgálva. Egy dohány aktin gén kifejeződését vizsgáltuk kontrollként. Jelölések magyarázata: -S és +S jelölik a kénhiányos illetve a megfelelő szulfát-ellátottságú növényeket. Az ábra két független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

Paprika-tobamovírus kölcsönhatások

A kompatibilis és inkompatibilis dohány-TMV kölcsönhatások mellett tanulmányoztuk a tobamovírusokkal fertőzött paprikanövények vírus-rezisztencia mechanizmusait is. Megvizsgáltuk az L^3 rezisztenciagént hordozó "TL 1791" paprika fajta védekezési reakcióit kétféle Tobamovirussal történő fertőzéseket követően. Ezen fajta leveleinek a fertőzése *Óbuda paprika vírussal* (ObPV) nekrotikus léziókat okozott (inkompatibilitás), míg a *Paprika enyhe tarkulás vírussal* (PMMoV) történő fertőzés szisztemikus tüneteket idézett elő (kompatibilitás).

Elsőként megvizsgáltuk két magas cisztein-tartalmú védekezési fehérjét, egy paprika defenzint és egy tionint kódoló gén expressziójának a változásait a kétféle tobamovirussal fertőzött paprikanövények leveleiben. Az ObPV fertőzés hatására lényegesen megemelkedett a defenzint kódoló gén expressziója már a fertőzést követő 4. órában, míg a PMMoV fertőzés hatására csak egy jóval gyengébb gén-aktiválódás volt megfigyelhető (8. ábra). A defenzin génnel szemben a másik magas cisztein-tartalmú védekezési fehérjét, egy tionint kódoló gén

expressziója nem változott meg jelentősen az ObPV fertőzés hatására, ami arra utalt hogy ennek a génnek nincs szerepe a vírus-rezisztencia kialakulásában.



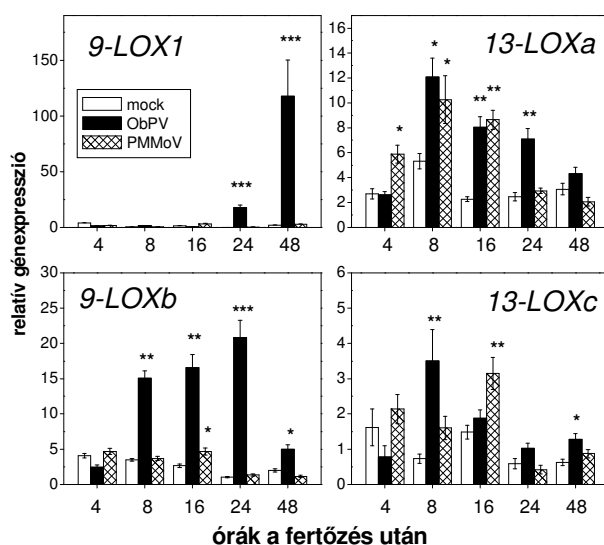
8. ábra. Egy defenzin és egy tionin gén expressziójának aktiválódása ObPV és PMMoV-fertőzött illetve kontroll (mock-inokulált) paprikalevelekben, szemikvantitatív RT-PCR módszerrel vizsgálva. Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

Kén anyagcsere és a lipoxigenáz enzimek

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a növényi kén-anyagcsere egyik legfontosabb reakcióútja, a cisztein bioszintézis erősen befolyásolható a növényi hormon jázmonsavval (Jost *et al.*, Photosynthesis Research, 86: 491-508, 2005). Mivel a jázmonsav bioszintézisében kulcsszerepet játszanak a növényi 13-lipoxigenáz (13-LOX) enzimek, szoros kapcsolat áll fenn a cisztein bioszintézis és a lipoxigenázok működése között. Korábban már kimutattuk, hogy az inkompatibilis kapcsolat esetében a nekrotikus tünetek megjelenésével párhuzamosan jelentősen megemelkedett a fertőzött paprika levelek lipoxigenázok össz-enzimaktivitása, míg a kompatibilis kapcsolatban kismértékű LOX indukció volt tapasztalható.

A kérdéskör szisztematikus vizsgálata érdekében először meg kellett szekvenálnunk több paprika lipoxigenáz enzimet kódoló gént. A szekvenálások során két *9-LOX* és egy *13-LOX* gén teljes fehérjekódoló régiójának a szekvenciáját meghatároztuk, míg egy további *13-LOX* gén esetében részleges szekvenciát tudtunk meghatározni (a fenti gének GenBank-i nyilvántartási számai sorrendben: **DQ473539**, **DQ473540**, **JF304313**, **KC404864**). A lipoxigenáz reakcióúthoz kapcsolódó paprika 9-allénoxid szintetáz (*9-AOS*) gén részleges szekvenciáját szintén meghatároztuk (**KC404862**). A megismert génszekvenciák segítségével gén-specifikus PCR primereket terveztünk, majd valós-idejű RT-qPCR technikával jellemeztük a paprika lipoxigenáz enzimeket kódoló gének kifejeződését az ObPV és

PMMoV-fertőzést követő különböző időpontokban. Két *9-LOX* és két *13-LOX* gén expresszióját vizsgáltuk valósídejű RT-qPCR technikával, egy paprika aktin gént használva kontrollként. Mindkét vírusfertőzés jelentősen megváltoztatta a LOX gének expresszióját, de a *9-LOX* gének esetében az inkompatibilis paprika-ObPV kapcsolatban jóval gyorsabb és erőteljesebb gén-indukciókat tapasztaltunk, mint a kompatibilis paprika-PMMoV kapcsolatban (9. ábra). A *13-LOX* gének is szignifikánsan aktiválódtak a fertőzések hatására, de az inkompatibilis és kompatibilis kapcsolatban megfigyelt reakciók nem tértek el olyan jelentős mértékben, mint a *9-LOX* gének esetében (9. ábra). Az eredmények utalnak, hogy a *9-LOX* enzimeknek szerepük lehet a paprika tobamovírusokkal szembeni rezisztenciájában. A *13-LOX* enzimek indukciója a jázmonsav képződésen keresztül jelentősen aktiválhatja a cisztein bioszintézist is, ennek bizonyítása további vizsgálatokat igényel, elsősorban a jázmonsav szintjének meghatározását a fertőzött levelekben.

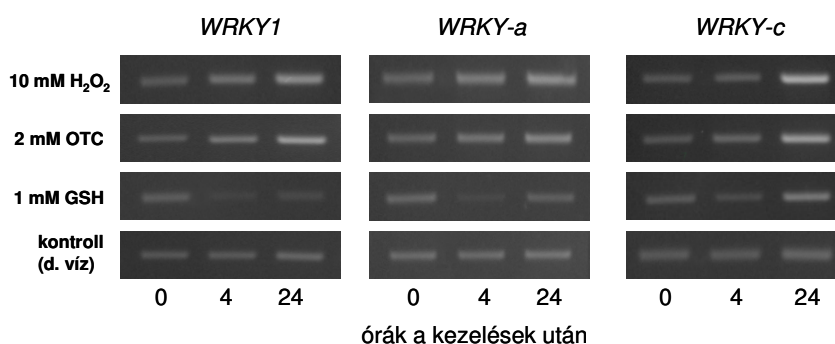


9. ábra. Két *9-LOX* és két *13-LOX* gén aktiválódása paprika levelekben ObPV és PMMoV fertőzések hatására, valósídejű RT-qPCR módszerrel meghatározva. A vizsgált gének GenBank-i azonosító számai: *9-LOX1*: **DQ473539**, *9-LOXb*: **FJ377708**, *13-LOXa*: **JF304313**, *13-LOXc*: **KC404864**. Az ábra három független biológiai kísérlet eredményeinek átlagát mutatja \pm a szórást. A *, ** és *** jelek mutatják a szignifikáns eltéréseket $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,001$ valószínűségi küszöböknel.

A paprika WRKY transzkripciós faktorok vizsgálata

A legújabb nemzetközi vizsgálatok szerint a WRKY típusú növényi transzkripciós faktor fehérjék fontos szerepet játszanak a fertőzött növényekben meginduló védekezési

folyamatok szabályozásában. Ezért megvizsgáltuk a kén-ellátottság szerepét a WRKY transzkripciós faktorokat kódoló gének expressziójára paprika levelekben. Paprika levélkorongokat kezeltünk glutationnal, egy glutation prekuzorral, az L-2-oxotiazolidin-4-karboxilsavval (OTC), ami a növényi sejtekben enzimatikusan ciszteinné majd glutationná metabolizálódik, valamint az oxidáló hatású hidrogén-peroxiddal. A három kezelés eltérő módon befolyásolta a WRKY gének kifejeződését. A glutation kezelés visszaszorította a gén-expressziót a vizsgált WRKY gének esetében, míg az OTC kezelés kismértékben fokozta a génkifejeződést. A hidrogén-peroxid kezelések egyes WRKY gének expresszióját kismértékben megnövelték, más gének esetében viszont nem tapasztaltunk szignifikáns változásokat a kontroll növényekhez képest (10. ábra).



10. ábra. Hidrogén-peroxid (H₂O₂), L-2-oxotiazolidin-4-karboxilsav (OTC), és redukált glutation (GSH) hatása három paprika WRKY transzkripciós faktort kódoló gén expressziójára, szemikvantitatív RT-PCR módszerrel vizsgálva. A vizsgált gének GenBank-i azonosító számai: *WRKY1*: **EF468464**, *WRKY-a*: **AY391747**, *WRKY-c*: **AY740531**). Az ábra három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be.

Jellemeztük több WRKY gén kifejeződését az ObPV és PMMoV fertőzött paprika levelekben is, gén-specifikus primerpárok segítségével. A vizsgálataink során meghatároztuk egy új paprika WRKY gén teljes kódoló részének a szekvenciáját (GenBank-i azonosító száma: **KF484401**). Több paprika WRKY gén esetében is kimutatható volt, hogy ezek a gének a rezisztens levelekben korábban és nagyobb mértékben indukálódnak, mint a fogékony levelekben. Az eddig ismeretlen három WRKY gén expresszióját megvizsgáltuk nátrium-szaliciláttal, metil-jazmonáttal valamint ACC-vel kezelt paprika levelekben valós idejű RT-qPCR technikával. Kimutattuk, hogy egy, a WRKY transzkripciós faktorok III. osztályába sorolt gén igen korai időpontban és igen nagy mértékben aktiválódott nátrium-szalicilát

hatására, ami valószínűsíti, hogy ez a WRKY gén jelentős szerepet játszik a védekezési folyamatok korai szabályozásában.

Szulfát-ellátottság hatása nyárfa szövetek glutation tartalmára

A kéntartalmú vegyületek által indukált rezisztencia nemcsak fertőzésekkel, hanem abiotikus stresszhatásokkal szemben is megfigyelhető. Nyárfa növények szulfát-ellátottságát növelve lényeges változások voltak kimutathatóak a levélszövetek glutation tartalmában illetve a nyárfa növények abiotikus stressz-ellenállóképességében, aminek a révén a nyárfa növények fitoremediációban való felhasználhatósága is kedvezőbbé válik.

Következtetések

A jelen kutatási pályázat fő célja annak vizsgálata volt, hogy milyen szerepet játszanak egyes kéntartalmú vegyületek (alacsony molekulatömegű tiolok, szulfátok) a vírusfertőzött növények jelátviteli folyamatainak szabályozásában valamint a vírusfertőzésekkel szembeni növényi rezisztencia indukálásában. A dohány mozaikvírus (TMV) fertőzéssel szembeni védekezést különböző szulfát ellátottságú, rezisztens illetve fogékony dohánynövények esetében hasonlítottuk össze. A megfelelő szulfát ellátottság mellett nevelt fogékony dohánynövényekben jelentősen visszaszorult a vírus-replikáció. Megfigyelhető volt továbbá, hogy a kórfolyamathoz kapcsolt fehérjék kódoló génjeinek az indukciója a megfelelő szulfát-ellátottság mellett jelentősen erőteljesebb volt, mint a szulfáthiányos növényekben. Hasonló változásokat figyeltünk meg több más védekezési fehérjét kódoló gén esetében is, így például a defenzin és tionin gének esetében. Vizsgálataink igazolták a szulfát-ellátottság fontos szerepét a dohánylevelek TMV-vel szembeni rezisztenciájában. Ezeket az eredményeket megerősítették a kompatibilis és inkompatibilis paprika-tobamovirus kölcsönhatásokra irányuló további vizsgálataink. Eredményeink igazolták, hogy a kéntartalmú vegyületek által indukált rezisztencia nemcsak a gombabetegségek, de a vírus-fertőzések esetében is megfigyelhető a tobamovírusokkal fertőzött dohány és paprika növényekben.