

# DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

## **Abiotikus és biotikus stresszorok hatása árpa és dohány növényekre**

Harrach Borbála Dorottya



MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

Budapest

2009

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

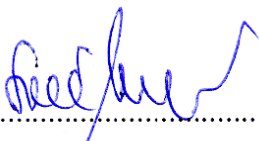
tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok


vezetője: Dr. Tóth Magdolna, D.Sc.  
tanszékvezető egyetemi tanár  
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar  
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Barna Balázs, D.Sc.  
igazgató, tudományos tanácsadó  
Magyar Tudományos Akadémia  
Növényvédelmi Kutatóintézete

Egyetemi konzulens: Dr. Erdei Sára, C.Sc.  
tudományos főmunkatárs  
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar  
Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék

A Jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

  
.....  
Az Iskolavezető jóváhagyása

  
.....  
A Témavezető jóváhagyása

## A MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS A KITŰZÖTT CÉLOK

### **Bevezetés**

Empirikus vizsgálatok alapján az ember – néhány módfelett ritka, fényevő példánytól eltekintve – túlnyomórészt heterotróf táplálkozású fajnak tekinthető, így életfolyamatainak fenntartása alapvetően az autotróf módon szént fixáló növények bekebelezésén és feldolgozásán alapul. Sőt, nem csupán közvetlen fogyasztásra használja a növényeket, de – roppant energiapazarló módon – közvetetten, más heterotróf szervezetek által már eleve nagy energiavesztés árán átalakítva is fogyasztja őket (takarmány-előállítás). Továbbá környezetének megváltoztatására (építkezési alapanyagok), ökológiai optimumának kialakítására (fűtés), sőt, lét- és fajfenntartási szükségletein jócskán túlmutató, kizárólag eme egyetlen fajra jellemző viselkedésformáinak (utazgatás) gyakorlásához („bio”-üzemanyag, etanol) is a növényekre van utalva. A Földön egyre hajmeresztőbb ütemben elszaporodó ember mindig nagyobb és nagyobb mennyiségű növényi anyag előállítását igényli igencsak korlátozott méretű mezőgazdaságilag hasznosítható, megművelhető földterületeken, miközben a klimatikus tényezők is egyre kedvezőtlenebbül alakulnak (szikesedés, sivatagosodás), éppen az ember sok, környezetre káros tevékenysége nyomán. Gondot jelent továbbá az ember számára, hogy az általa megtermelt növények nagy részét más fajok nála fürgébben hasznosítják (kártévők és kórokozók). Az egyre nagyobb megkívánt hozam érdekében azonban nem lehet a Földet a végtelenségig terhelni műtrágyák és növényvédő szerek használatának ilyen ütemben való fokozásával – vagy sürgősen nézhetünk másik bolygó után. Égetően szükséges tehát a növények környezeti stresszekkel, illetve betegségekkel szembeni ellenállóságának a pontosabb megismerése, majd olyan környezetkímélő termesztési és növényvédelmi eljárások kidolgozása, melyek segítségével a termést érő károkat, veszteségeket jelentősen csökkenteni lehet.

### **Oxidatív stressz és antioxidánsok**

A növényeket a környezetükből érő szinte valamennyi, szöveti károsodással járó, abiotikus vagy biotikus eredetű stressz reaktív oxigénformák (ROF) gyors és nagy mennyiségű felhalmozódását idézi elő és így a sejten belül oxidatív mikrokörnyezet alakul ki. A különböző, igen reakcióképes oxigén-vegyületek (mint pl. szuperoxid, hidroxil gyök, hidrogén-peroxid, szinglett oxigén) sejtkárosító hatásának kivédése az antioxidáns rendszerek fontos feladata a növényekben. A sejten belül képződött ROF – melyeknek stresszmentes körülmények között kulcsfontosságú szerepe van különböző jelátviteli folyamatokban – semlegesítése többféle módon lehetséges: egyrészt elektrondonorok segítségével, mint pl. a glutation, aszkorbinsav, karotinoidok, tokoferol; illetve enzimek katalizálta reakciók révén, pl. szuperoxid-dizmutáz, peroxidázok, glutation-S-transzferáz, valamint az aszkorbát–glutacion ciklus enzimeit által.

Az enzimatis és nem-enzimatis antioxidánsok mennyisége és aktivitása jelentős mértékben változik a növények élettani állapotával; tehát a növények kora, tápanyag-ellátottsága, avagy egy korábbi stresszre kialakult válasza nagymértékben befolyásolja az oxidatív stressztűrőképességüket. Az öregedés folyamán általában csökken a növények antioxidáns kapacitása, így oxidatív stressz-ellenállósága is. A szövetek öregedését mesterségesen lassíthatjuk is: a növény juvenilitását növeli a fokozott nitrát nitrogén dózisok alkalmazása, a csúcsrügy eltávolítása, vagy citokininekkel való kezelése, illetve olyan gének beépítése a genomba, melyek a juvenilitás fokozásán keresztül vagy közvetlenül növelik az antioxidánsok szintjét a növényben.

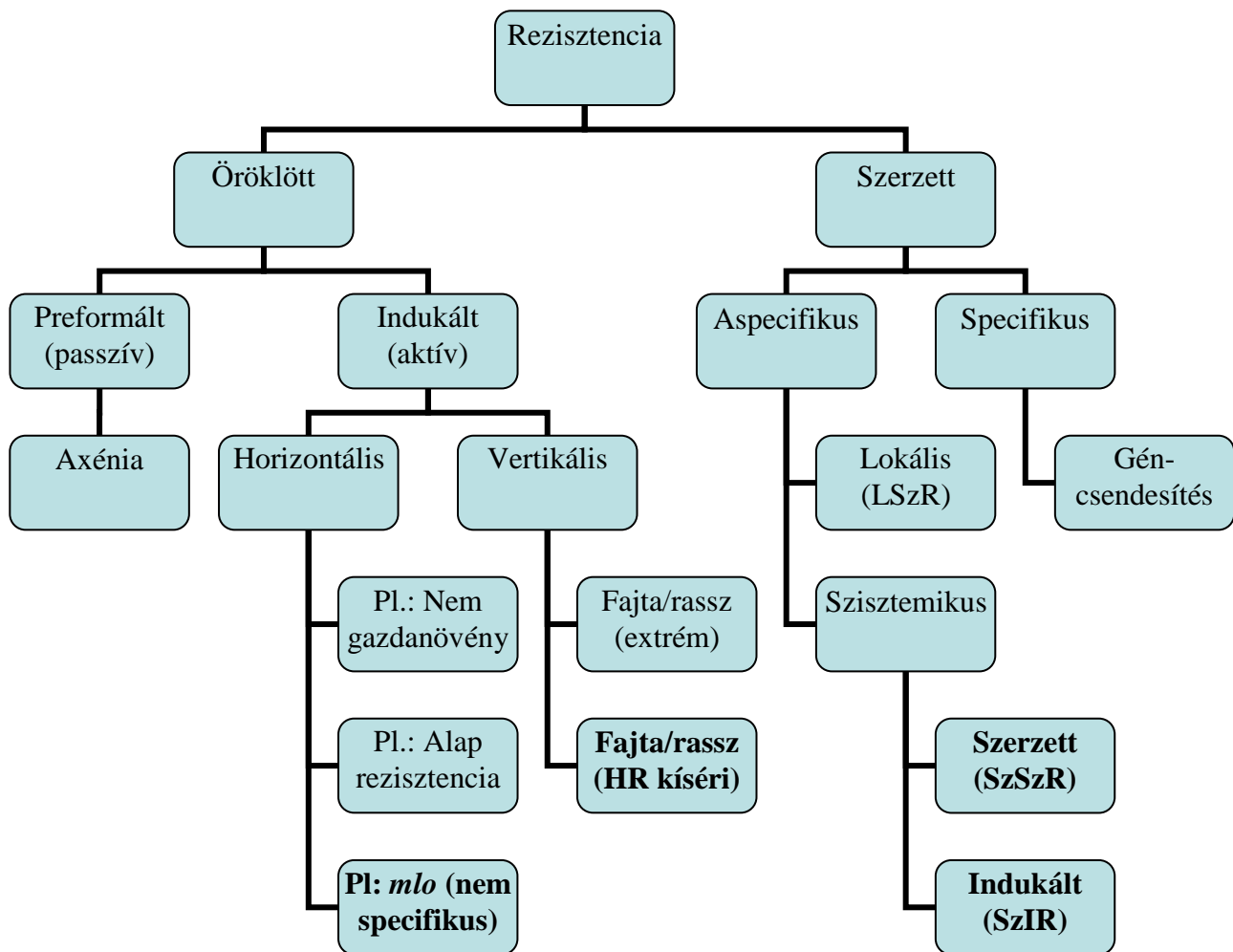
### **Abiotikus stressz**

Az abiotikus eredetű stressz előidézésére egy jellemző példa a nehézfémek okozta oxidatív károsodás. A különböző emberi tevékenységek hatására világszerte jelentősen növekedett az elmúlt évtizedekben az ipari körzetek és városok talajának nehézfém-tartalma. A nehézfémek több enzim aktivitását csökkentik, ami különféle okokból alakulhat ki. Okozhatja a fém közvetlen gátló hatása, de más folyamatok (pl. az oxidatív stressz körülményei között létrejött változások) közvetett hatása is. Ennek eredményeképpen megemelkedett hidrogén-peroxid képződés és lipid-peroxidáció tapasztalható mind a levelekben, mind a gyökerekben.

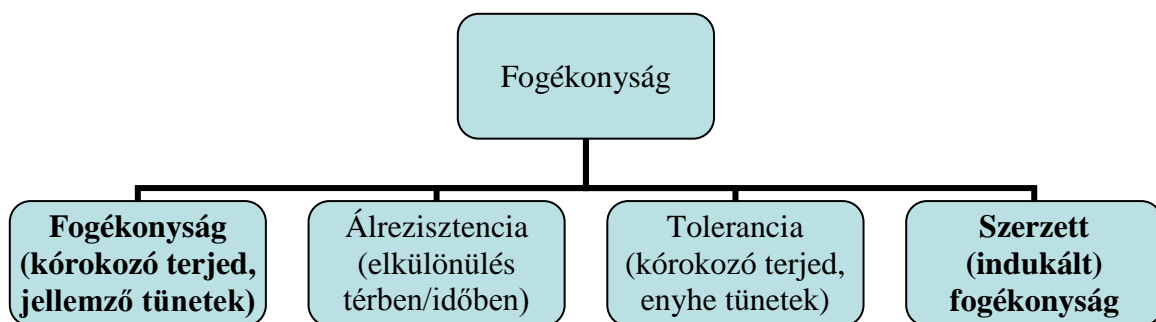
A sóstressz egy másik antropogén eredetű, és sajnos az egyre nagyobb területeket érintő elsivatagosodással párhuzamosan növekvő gondot jelentő abiotikus stressz. A talaj és az öntözővíz magas só-koncentrációja egyike a száraz és félszáraz övezetek mezőgazdasági termelését legjobban veszélyeztető tényezőknek. A többlet ionok jelenléte a gyökérszónában először károsítja a növény gyökereit, majd ezt követően az ionok feldúsulnak a föld feletti növényi részekben, ami komoly károsodást jelent a növényi anyagcsere számára. Mindez végül satnya növekedéshez és csökkent terméshozamhoz vezet. A sós talajokon termesztett növényeknek sótoleranciát biztosítani, azaz a termés kiesést csökkenteni mikorrhiza és endofita gombákkal kialakított szimbiotikus kapcsolattal is lehetséges.

### **Biotikus stressz: növény–kórokozó kapcsolatok**

A növény–kórokozó találkozás kimenetele igen sokféle lehet, és természetesen többféle módon lehetséges ezeket osztályozni. Egy adott kórokozóval szemben a növény lehet alapvetően ellenálló (inkompatibilis kapcsolat; ez a leggyakoribb eset) vagy fogékony (kompatibilis kapcsolat; ez sokkal ritkábban fordul elő). A növények kórokozókkal szembeni ellenálló-képességének (rezisztenciájának) különböző formáit, illetve a fogékonyság típusait az alábbi ábrákon szemléltetjük:



A növényi rezisztencia (ellenállóság) típusai



A növényi fogékonyság típusai

Az ábrákon vastagon szedett rezisztencia- és fogékonyság-formákkal foglalkoztam jelen dolgozatomban, így részletesen csak ezeket tárgyalom a továbbiakban.

## **Vertikális (rassz-specifikus) és horizontális (nem specifikus) öröklött rezisztencia**

Az öröklött rezisztencia többféle típusa is előfordul a termesztett árpafajtákban az árpa lisztharmatos betegségét kialakító *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh) gombával szemben. E biotróf kórokozó az élő, sőt, minél fiatalabb növényi szöveteket kedveli, ezeken tud megfelelően növekedni és szaporodni. A Bgh A6-os rasszával szemben rassz-specifikus (vertikális) rezisztenciát alakít ki árpában az *Mla12* és az *Mlg* gén, míg az *Mlo* gén recesszív *mlo5*-ös allélje széleskörű (nem rassz- és fajtaspecifikus, tehát horizontális) rezisztenciát kölcsönöz évtizedek óta árpának az A6-son túl is, szinte valamennyi lisztharmat-izolátum ellen. E gének a gomba fejlődésének különböző szakaszait gátolják az árpalevélen, fenotípusosan is elkülöníthető módon. Hatékony *Mla* allélek működése következtében a gomba behatolási pontján epidermisz sejtelhalás, vagy az alatta lévő mezofill sejtekre kiterjedő, szemmel is látható elhalásokat eredményező túlérzékenységi reakció (HR: *hypersensitive reaction*) alakul ki a gomba feltartóztatására. Az *Mlg* gén hatására csupán magát a megfertőzött epidermális sejtet érintő, mikroszkopikus HR alakul ki. Az *mlo5* allél viszont még a megtámadott sejtet is életben hagyva, egy hatékony papilla fejlesztésével gátolja a gomba fejlődését. A fogékony árpa epidermiszén azonban a csíratömlőt hajtó lisztharmatspóra apresszóriumot fejleszt, be tud hatolni a sejtbe, ahol létrehozza a tápanyagok felvételéhez szükséges hausztóriumot, valamint a növény felszínén növekedve beborítja azt hífáival.

Az inkompatibilis kórokozók támadására a növények egyik legkorábbi válasza a ROF felhalmozása, mint pl. a szuperoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ) és a hidrogén peroxid ( $H_2O_2$ ). A lisztharmat-fertőzés hatására specifikus festéssel és mikroszkóppal kimutatható korai, erős  $H_2O_2$ -felhalmozódás tapasztalható az *Mla*-, *Mlg*- and *mlo*-típusú rezisztens árpában, a fogékony növényekben viszont nem. A ROF mennyiségi meghatározása és az azokat egyensúlyban tartó antioxidánsok alakulásának vizsgálata a különböző rezisztens árpavonalakban és a fogékony fajtában volt dolgozatom egyik témája.

## **Szisztémikus szerzett rezisztencia**

A növények sokszor szisztémikus, az egész növényre kiterjedő választ adnak a lokális fertőzésekre, s ez széles spektrumú, hetekig, hónapokig fennálló rezisztenciához vezet vírusok, baktériumok és gombák ellen egyaránt. Az indukált betegség-ellenállóság eme formáját szisztémikus szerzett rezisztenciának (SzSZR) nevezzük. Érdekessége, hogy a különböző kórokozók okozta fertőzések ugyanazt a típusú rezisztenciát idézik elő, ami azt sugallja, hogy a sokféle felismerési reakció egy közös útra terelődik a növényi válasz kialakulása során. Az SzSZR jelensége szoros kapcsolatban áll a szalicilsav szintjének emelkedésével és a kórfolyamat-függő (*pathogenesis-related*) fehérjék felhalmozódásával.

Rezisztens dohánynövényekben, mint például a HR-ért felelős *N* gént hordozó Xanthi-nc fajtában, a dohány mozaik vírus (TMV: *Tobacco mosaic virus*) lokalizált fertőzést okoz. A Xanthi-nc növényegyedek vírussal inokulált leveleiben a koordinált, programozott sejthalált a vírus szaporodásának a fertőzés helyét körülvevő kis területekre korlátozódása (léziók) és SzSzR kialakulása kíséri. A Xanthi-nc dohány elsődleges TMV-fertőződése fokozza egy második TMV-támadással szembeni lokalizációs választ, aminek következtében az elsődleges fertőzéshez képest távolabb (feljebb) elhelyezkedő leveleken fertőzés után kevesebb és kisebb kiterjedésű lézió jelenik meg. A SzSzR kialakulása a TMV-fertőzés hatására helyileg és szisztémikusan keletkező szalicilsav felhalmozódásától függ. Kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint az antioxidánsok fokozott aktivitása is hozzájárul a SzSzR során a nekrotikus tünetek visszaszorításához.

A bakteriális eredetű *nahG* gént kifejező transzgenikus Xanthi-nc dohánynövények (továbbiakban: NahG) kevés szalicilsavat tartalmaznak, mivel a gén szalicilát-hidroxiláz enzimet kódol, ami a szalicilsavat katekollá alakítja. E transzgenikus növényekben a *nahG* gén folyamatos kifejeződése elegendő a SzSzR-válasz megszüntetésére. A NahG dohánynövények TMV-fertőzéssel szemben érzékenyebbek, és a vad típusú Xanthi-nc növényekhez képest nagyobb méretű nekrotikus területekkel reagálnak jelezvén, hogy a szalicilsav fokozott termelése alapvetően szükséges a TMV-vel szembeni rezisztenciában.

### **Szisztémikus indukált rezisztencia**

Endofita arbuskuláris mikorrhiza gombákkal kialakult szimbiózis a gazdanövények számára bizonyos fokú védelmet nyújt a kedvezőtlen környezeti tényezők okozta stresszel szemben. A kölcsönösen kedvező kapcsolat képes szisztémikus indukált rezisztenciát kialakítani a növényben kórokozók támadása ellen. Nemrég egy gyökér endofita bazídiumos gomba, a *Piriformospora indica* esetében mutatták ki, hogy fokozza az árpa ellenálló-képességét gyökér- és levéltetvségek ellen, valamint csökkenti enyhe sóstressz károsító hatását. A növény metabolikus aktivitásának és antioxidáns rendszerének az endofita általi indukálása és a gazdanövényben kialakult szisztémikus indukált rezisztencia összefüggéseit vizsgáltuk munkánk következő szakaszában.

### **Szerzett fogékonyság**

Egy elsődleges stressz sokszor ellenállóvá teszi a növényt egy második stresszel szemben, ám bizonyos esetekben ennek fordítottja is lehetséges. Az árpa liztharmatra fogékony 'Ingrid' árpafajtában, valamint annak közel-izogén rezisztens vonalaiban hősokk-kezeléssel fokozhatjuk a fogékonyságot, illetve letörhetjük a rezisztenciát és fogékonyságot indukálhatunk a *Bgh* liztharmat-gombával szemben.

## Célkitűzések

1. Munkánk egyik céljaul tűztük ki dohánynövények élettani állapota (juvenilitása vagy szenescenciája) és abiotikus eredetű oxidatív stresszel – nehézfémekkel (higany-klorid), valamint külsőleg adagolt hidrogén-peroxiddal – szembeni ellenálló-képessége közötti összefüggés tanulmányozását.
2. Összehasonlítottuk a TMV-fertőzésre adott anyagcsere választ (metabolikus aktivitás, lipid-peroxidáció, lipid-összetétel) Xanthi-nc dohányban és annak szalicilsav-felhalmozásban gátolt transzgenikus vonalában (NahG), mely utóbbiban a TMV-fertőzés hatására nem alakul ki SzSzR.
3. A lisztharmat-fertőzést kísérő H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-felhalmozódás mennyiségi meghatározásával párhuzamosan célunk volt az antioxidánsok alakulásának vizsgálata fogékony Ingrid árpafajtában, valamint annak különféle rezisztencia-géneket hordozó, közel-izogén vonalaiban. Továbbá arra kerestük a választ, hogy a különböző mértékű ROF-felhalmozás vajon összefügg-e a fertőzést kísérő membránkárosodással és etiléntermeléssel.
4. A *Piriformospra indica* gyökér endofita gomba által árpában indukált sótűrés biokémiai hátterét kutattuk. Élettani „stressz-jelzőkkel” (anyagcsere aktivitás, zsírsav-összetétel, lipid-peroxidáció) kívántuk jellemezni sótűrő és sóérzékeny árpafajta válaszát erős sóstresszre, *P. indica*-val szimbiózisban vagy a nélkül.
5. Hősokk-kezeléssel indukált lisztharmat-fogékonyságot tanulmányoztuk *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*-rezisztens mlo árpavonalon. A tünetmentes rezisztenciával rendelkező mlo árpán alkalmazott hőkezelés és/vagy fertőzés után RT-PCR-módszerrel vizsgáltuk különböző, a növényi védekezési folyamatokban szerepet játszó gének kifejeződésében a változásokat.



## ANYAG ÉS MÓDSZER

### Dohány

Kísérleteinkhez az alábbi dohányfajtákat és -vonalakat neveltük talajban, üvegházi körülmények között a kezelés/mintavétel időpontjáig, összehasonlító vizsgálat alá vetve a következő párosításokat:

a) *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun dohányfajta öregebb (alulról az ötödik) és fiatalabb (alulról a tizedik, azaz a legfelső teljesen kifejlett) levelei.

b) *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 (a továbbiakban SR1) és citokinin-túltermelő transzgenikus CTKm vonala. Itt mindkét dohányvonalnál öregebb (alulról az ötödik) leveleket használtuk a kísérletekben. A CTKm dohányt az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében állították elő, mégpedig a CaMVp35S-ipt gént *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90RK) törzsével való transzformálás útján vitték be SR1 dohányba.

c) *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc dohány (a továbbiakban Xanthi), ami a *Nicotiana glutinosa* dohányból származó *N* gén révén rezisztens a TMV-vel szemben, és szalicilsavat felhalmozni nem képes transzgenikus NahG vonala. A NOVARTIS Mezőgazdasági Biotechnológiai Központja (Research Triangle Park, NC, USA) volt szíves rendelkezésünkre bocsátani a Xanthi dohány genetikai transzformációjával előállított transzgenikus Xanthi-nc/NahG-10 dohánytörzsét (a továbbiakban NahG).

### Árpa

a) Az árpa lisztharmattal végzett kísérletekhez használt Ingrid árpafajta (*Hordeum vulgare* cv. Ingrid) és visszakeresztezéssel előállított, közel-izogén vonalait (Ingrid Mla12, Ingrid Mlg és Ingrid mlo5) üvegházi körülmények között neveltük.

b) A sóstresszel kapcsolatos vizsgálatok során sóérzékeny 'Ingrid' árpát hasonlítottunk össze sótűrő 'California Mariout' árpafajtaival. A szemterméseket felületi fertőtlenítés után csíráztattuk, majd két nap után a csíranövénykéek egyik felét puffasztott agyag-keverékbe ültettük és fitotronban neveltük.

### Szimbiotikus kezelés

A fenti módon csíráztatott 'Ingrid' és 'California Mariout' szemtermések másik felét kezeltük *Piriformospora indica* gyökér endofita gomba micélium-szuszpenziójával, majd cserepekbe ültettük. A gyökerek gyarmatosításának mértékét egy hetes korban savas fuksinos festés után állapítottuk meg mikroszkóppal.

## **Abiotikus stresszorok**

a) 'Samsun' dohány öreg és fiatal leveleit az ép növényen ecseteltük **higany-klorid** oldattal, majd 24 óra elteltével mintát vettünk a kezelt levelekből.

b)'Samsun' dohány öreg és fiatal leveleiből, illetve SR1 és CTKm dohánylevelekből kivágott levélkorongokat **hidrogén-peroxid** okozta közvetlen oxidatív stressznek tettük ki külsőleg különböző töménységű hidrogén-peroxid oldatokra helyezéssel.

c) **Sókezelés**nek vetettünk alá *P. indica*-val kolonizált és kontroll 'Ingrid' illetve 'California Mariout' árpat: három hetes koruktól fogva 2 héten keresztül folyamatosan öntöttük őket 100 vagy 300 mM-os steril NaCl-oldattal.

d) **Hősokk-kezelést** 7 napos 'Ingrid', Mla, Mlg és mlo árpan hajtottuk végre. A növények egy részét 24 órával később fertőztük árpa lisztharmattal.

## **Biotikus stresszorok**

a) **Dohány mozaik vírussal** (TMV: *Tobacco mosaic virus*) szemben rezisztens Xanthi és szalicilsav-hiányos, transzgenikus NahG dohánynövényeket a vírus U1-es törzsével fertőztük. Az első fertőzés alulról a 3. és 4. leveleken történt, a második fertőzés 14 nappal később az 5. és 6. (felsőbb) leveleken történt. Méréseinket a növények felső, 5. és 6. leveleiből vett mintán végeztük.

b) **Árpa lisztharmattal** (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei* A6-os rassz) fertőztük 7 napos Ingrid, Mla, Mlg és mlo árpavonalak egyedeit. Méréseinket az elsődleges leveleken végeztük.

## **Membránkárosodás vizsgálata**

a) A növényi sejthártyák öregedés, stressz vagy betegség okozta oxidatív károsodását, és az ezzel járó áteresztő-képesség növekedést a sejtekből **kiáramló elektrolitok mennyisége** alapján határoztuk meg. A levéldarabkákat inkubáló oldat vezetőképességét különböző időpontokban mértük konduktivitás-mérő készülékkel. Az adatokat a friss levéltömegre vonatkoztatott vezetőképesség-változás ( $\mu\text{S/g}$  friss tömeg) mértékegységben adtuk meg.

b) A lipid-peroxidáció mértékére a reakcióban termelődő egyik végtermék, az **etán mennyisége** utal. A dohány- illetve árpalevél mintákban a telítetlen  $\omega$ -3 hidroperoxi-zsírsavak *in situ* bomlását etánná rövid hőkezeléssel serkentettük. Gázkromatográfban standard etán gázhoz viszonyítva határoztuk meg mintáink etán-tartalmát.

## **Az etilén stresszhormon gázkromatográfiás kimutatása**

Lisztharmat-fertőzött és kontroll, fertőzetlen elsődleges árpaleveleket tartalmazó kémcsövek légteréből vett minták etilén-tartalmát gázkromatográfjal határoztuk meg.

### **Zsírsv-összetétel meghatározása**

A teljes zsírsv-tartalmat a levélszövetekből kloroform-metanol eleggyel vontuk ki. A szerves fázist nitrogén alatti szárítás után újraszuszpendáltuk kloroformban, szilíciumsavas oszlop-kromatográfiával frakcionáltuk, majd a zsírsv-akat metil-észtereztük. A foszfolipidek zsírsv-összetételét gázkromatográfiás módszerrel állapítottuk meg, az egyes zsírsv-ak viszonylagos mennyiségét belső standardhoz, heptadekánsavhoz viszonyítva. A szterolok meghatározásához acetiláltuk azokat acetanhidrid-piridin eleggyel, majd szeparáltuk kolesztán belső standardhoz viszonyítva.

### **Kalorimetria**

Xanthi és NahG dohány második TMV-fertőzését követően a felsőbb levelekből, illetve sóstressznek kitett árpa első leveleiből vettünk mintát kalorimetriás méréseinkhez. A maximális hőkibocsátási rátát (mW mértékegységben) a minta száraztömegére vonatkoztatva határoztuk meg.

### **Hidrogén-peroxid tartalom fluorimetriás meghatározása**

A 2',7'-diklór-fluoreszcín-diacetát (DCFH-DA) vegyület a sejtekben jelenlévő peroxidázok és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatására oxidálódik, és a fluoreszcens 2',7'-diklór-fluoreszcein keletkezik belőle. A DCFH-DA vegyület oldatát levágott árpalevelek sejt közötti járataiba juttattuk be vákuumos infiltrációval, majd a levelekből készített kivonat relatív fluoreszcenciáját mértük spektrofluoriméteren.

### **Enzimatis és nem-enzimatis antioxidánsok spektrofotometriás meghatározása**

Az szuperoxid-dizmutáz (SOD), gvajakol-függő peroxidázok (POX), kataláz (CAT), aszkorbinsav-peroxidáz (APX), dehidroaszkorbát-reduktáz (DHAR), glutation-reduktáz (GR) és glutation-S-transzferáz (GST) enzimek aktivitásának sejtmentes levélkivonatokból mértük spektrofotométerrel. Az aszkorbát és dehidroaszkorbát koncentrációját aszkorbát-oxidáz enzimmel, az oxidált és redukált glutation mennyiségét GR enzim segítségével mértük.

### **Génkifejeződési vizsgálatok**

A teljes növényi RNS-t guanidin-tiocianátos lízist követő szilika-membrán oszlopos módszerrel vontuk ki árpalevelekből, mennyiségét és tisztaságát spektrofotométeren és elektroforézissel ellenőriztük. Az alacsony példányszámban előforduló transzkriptumok kimutatásához félkvantitatív RT-PCR módszert alkalmaztunk. A cDNS sokszorosítását a folyamat exponenciális fázisában állítottuk le, azaz minden vizsgált génnél olyan PCR-ciklusszámnál, ahol még megmaradtak az etídium-bromidos festéssel kimutatható különbségek a minták között. A PCR során az alábbi géneket vizsgáltuk: *HvHsp70*, *BAX inhibitor 1 (BI-1)*, *HvWRKY1*, *HvWRKY2*.

## AZ EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### A juvenilitás és a magasabb fokú abiotikus stressztűrő-képesség kapcsolata

Korábbi eredmények szerint a fiatal növényi levelek az öregeknél ellenállóbbaknak bizonyultak nekrotróf kórokozók által okozott biotikus stresszel szemben, ezért megvizsgáltuk a szenescencia hatását abiotikus stressz, mint nehézfém-ion, és közvetlen oxidatív stressz esetében. A higany-klorid mint nehézfémstressz nem csak közvetlenül toxikus és a növények növekedését gátolja, hanem oxidatív stresszt alakít ki a növényekben reaktív oxigénformák képződésén keresztül. Fiatal és öreg 'Samsun' dohányleveleket tettünk ki oxidatív stressznek külsőleg alkalmazott higany-klorid illetve hidrogén-peroxid kezeléssel. A membrán épségének mértékét, ami a növényi sejtek különféle abiotikus stressztényezők által okozott oxidatív károsodását jól jellemzi, ion-kiáramlás módszerrel vizsgáltuk.

A higany-klorid kezeléssel kiváltott nehézfémstressz hatására bekövetkező sejtmembrán károsodás következtében fokozott ion-kiáramlást tapasztaltunk, ami a vízzel álcázott kontrollhoz képest az öregebb, szenescens levelek esetében többszöröse volt a fiatal leveleknél észleltékhez képest. Hasonlóképpen megfigyeltük, hogy a hidrogén-peroxid (külsőleg adagolt ROF, azaz közvetlen oxidatív stressz) hatására bekövetkező membránkárosodást jelző elektrolit-kiáramlás gyengébb volt a fiatal levélkorongokból, mint az öregekből. A magasabb fokú stressztűrő-képességgel párhuzamban a hidrogén-peroxidot közömbösítő kataláz enzim aktivitása 'Samsun' dohány fiatal leveleiben kétszerese volt az öreg levelekben mértnek. A ROF közömbösítésének egy másik kulcsenzime, a szuperoxidot hidrogén-peroxiddá és oxigénné alakító szuperoxid-dizmutáz pedig 50%-kal nagyobb aktivitást mutatott a fiatal levelekben az öregekhez képest, ami összhangban van a fiatal levelek nagyobb antioxidáns kapacitásával.

Az előző eredményeket megerősítve az öregedésében gátolt, citokinin-túltermelő CTKm dohánylevelek membránjait kevésbé károsította a hidrogén-peroxid kezelés, mint a kontroll, nem transzgenikus SR1 dohányét. A CTKm dohányban a folyamatos génkifejeződést biztosító konstitutív promóter után beépített *ipt* gén az izopentenil-transzferázt kódolja, ami citokinin-bioszintézis egyik kulcsenzime, így a CTKm dohányokra állandó citokinin-túltermelés jellemző. Ebből következően a CTKm növényeknek hosszasan megmarad juvenilitásuk. Csoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy a CTKm dohányban is fokozott antioxidáns enzimaktivitás tapasztalható, ami minden bizonnyal szerepet játszik a nagyobb mértékű stressz-toleranciában.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a fenti eredmények alátámasztották feltételezésünket, miszerint a magasabb antioxidáns kapacitással bíró, juvenilis növényi szövetek jobban tűrik az abiotikus eredetű oxidatív stressz okozta károkat.

## A szalicilsav szerepe dohány szisztemikus szerzett rezisztenciájában

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy 'Xanthi-nc' dohánylevelek TMV-fertőzése a szalicilsav mennyiségének helyi és szisztemikus növekedését idézi elő, valamint a hőtermelésre, lipid-peroxidációra és zsírsav-összetételre is hatással van. Munkánk célja az volt, hogy a szalicilsav szerepét jellemezzük ezekben a metabolikus válaszokban a szalicilsav-hiányos, transzgenikus NahG dohányvonal segítségével. A NahG dohány nagy mennyiségben termeli a *Pseudomonas putida* baktériumból származó *nahG* gén által kódolt szalicilsav-hidroxiláz enzimet. A szalicilsav-hidroxiláz a szalicilsavat katekollá (1,2-dihidroxi-fenol) alakítja, s ennek eredményeként a NahG dohányban a szalicilsav mennyisége nem tud megnőni.

Az endogén szalicilsavszint emelkedése a TMV-vel fertőzött Xanthi-nc dohánynövényekben hőtermeléssel és energiavesztéssel jár. Megfigyelték azt is, hogy akár külsőleg adagolt, akár TMV-fertőzés nyomán felhalmozódott magas szalicilsavszint a lipid-peroxidáció fokozódását indukálja dohányban. A lipid-összetétel tekintetében a zsírsavak telítettségi szintje búzánövényekben a hidegedzés során a szalicilsav-tartalom emelkedésével párhuzamosan csökken. A lipidek és a lipid-összetevők dinamikájának szerepét a növények SzSzR-jában *A. thaliana* genetikai vizsgálata is megerősítette azáltal, hogy a zsírsav-deszaturáz enzim aktivitását kimutatta. Ezek a kísérletek azt bizonyítják, hogy a szalicilsav szerepet játszik a hőtermelés, a lipid-peroxidáció és a lipid-összetétel alakulásában is.

Mivel a membránok kulcsszerepet játszanak a növényi sejtek HR-jában, a foszfolipid-frakció **zsírsav-összetételét** és a **szterol-összetételt** is meghatároztuk gázkromatográfiával. Korábban kimutatták, hogy a zsírsavak telítettségének szintjét Xanthi növényekben a SzSzR indukciója nem befolyásolja. Mi sem találtunk kísérleteinkben TMV-fertőzés hatására jelentős változást egyik dohányvonal zsírsav-összetételében sem, csak fertőzetlen állapotban mutattunk ki a Xanthi növényhez képest a NahG transzgenikus növényekben alacsonyabb trién zsírsav-arányt, amiről korábban transzgenikus módszerrel megállapították, hogy jelentősen növeli a TMV által okozott elhalásos léziókat a vad típusú növényhez képest. A szterol-összetétellel kapcsolatban elmondható, hogy a szalicilsavat nélkülöző NahG növények valamennyivel több kampeszterolt tartalmaztak, mint a Xanthi dohány. A vírusfertőzés a Xanthi növényekben nem befolyásolta a szterol-összetételt, a NahG növények TMV-vel fertőzött leveleiben azonban a sztigmaszterol/szitoszterolhoz viszonyított arányának közel 40%-os emelkedését figyeltük meg. Mivel a sztigmaszterol/szitoszterol arány emelkedése kíséri a dohánylevelek öregedését is, eredményeink arra utalnak, hogy NahG növényekben a TMV-fertőzés szenescenciát idéz elő. A lipid-összetétel változásai a membránok fluiditását és áteresztő-képességét is befolyásolhatják, de fluoreszcencia polarizációs méréseink kimutatták, hogy kezeletlen Xanthi és NahG, valamint SzSzR-rel már rendelkező Xanthi növények levelei megőrizték megfelelő membrán fluiditásukat.

A lipid-peroxidáció és hőtermelés a dohánynövények TMV-fertőzésre adott HR-jának ismert kísérőjelensége. A szalicilsav lipid-peroxidációban és hőtermelésben játszott szerepének jobb megvilágítása céljából az etán- és hőkibocsátás mértékét SzSzR-t mutató, Xanthi dohánynövények és SzSzR-válaszra képtelen, transzgenikus NahG dohánynövények TMV-vel fertőzött leveleiben vizsgáltuk. Ez a rendszer jól használható a dohány TMV-fertőzésre adott, szalicilsav által közvetített, illetve szalicilsavtól független válaszainak elemzésére.

Korábban kimutatták, hogy a TMV-vel fertőzött dohánylevelekben a HR tünetek súlyossága szoros kapcsolatban áll a lipid-peroxidációval. Ezzel szemben mi azt találtuk, hogy Xanthi és NahG dohánynövények TMV-vel fertőzött leveleiben hasonló mértékű volt az **etán-kibocsátás** mérésével detektált lipid-peroxidáció. Ráadásul az etán-termelődés hasonló volt az elsődleges vagy másodlagos TMV-fertőzésen átesett Xanthi növények esetében is, holott mi arra számítottunk, hogy a lipid-peroxidáció csakúgy, mint a HR tünetek, a SzSzR kialakulása után csökkenni fog a dohánynövényekben. Ezek az eredmények megerősítik azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek arra utaltak, hogy a szalicilsav oxidatív stresszt alakít ki és a reaktív oxigénformákkal karöltve fokozza a programozott sejthalált. Ennek megfelelően a Xanthi dohánynövényekben TMV-fertőzéssel aktivált SzSzR egy-egy sejtnyi, mikroszkopikus elhalásokat indukált a fertőzetlen levélterületeken és a fertőzés helyétől távolabb elhelyezkedő leveleken is. Eredményeink arra utalnak, hogy a szemmel látható nekrotikus foltok mellett a csupán egyetlen sejtre kiterjedő elhalások is forrásai lehetnek az etán-kibocsátásnak. Ezt a feltételezést támasztja alá az a tény is, hogy a szalicilsav, illetve ennek biológiailag aktív analógjai a dohány lipid-peroxidációjának fokozódását dózistól függő módon indukálják. Ráadásul a NahG növények fertőzetlen leveleiből felszabaduló etán mennyisége 30%-kal kisebb volt, mint szintén fertőzetlen Xanthi dohányban. Ezzel az eredménnyel összhangban van az a megfigyelés, miszerint a katekol emlőssejtekben a lipoxigenáz enzim aktivitásnak hatásos inhibitora. A megemelkedett lipoxigenáz aktivitás jellemző a HR-rel reagáló dohánynövények TMV-vel fertőzött leveleire, a lipoxigenáz által közvetített lipid-peroxidációról pedig kimutatták, hogy a TMV-vel fertőzött Xanthi dohánylevelekben végbemenő összes lipid-peroxidációnak közel 95%-áért felelős. Emiatt úgy kell tekintenünk, hogy a HR-t kísérő léziók kialakulása során mind a szalicilsav által közvetített, mind az attól független folyamatok is befolyásolják a TMV-vel fertőzött levelek lipid-peroxidációját.

Fokozott hőtermelést figyeltek meg korábban TMV-vel fertőzött Xanthi-növények leveleiben a TMV által kiváltott nekrotikus foltok kialakulásának idején. Ismert, hogy a TMV-vel fertőzött dohányban a nekrotikus léziók kialakulását fokozott oxigén-felvétel és oxidatív kitörés kíséri. Korábban mi is kimutattuk, hogy a saját TMV-dohány rendszerünkben az oxidatív kitörés korrelációban van a TMV által kiváltott nekrotikus foltok számával és méretével. Az **exotherm hőleadás** a növényi szövetekben zajló általános anyagcsere folyamatok intenzitását

tükrözi, tehát a kalorimetriával kapott eredményeink mind a szalicilsav-függő, mind pedig az attól független hőtermelést magukba foglalják. Szignifikáns hőleadási különbséget mértünk a fertőzetlen Xanthi növények javára a szintén fertőzetlen NahG dohányokhoz képest. A fertőzést követően 2-3 nappal, mikorra már kialakultak a TMV-indukálta nekrotikus tünetek, látványosan megnövekedett a fertőzés hatására a hőtermelés. Annak ellenére, hogy a fertőzött növényekben nagy különbségeket tapasztaltunk a látható levélkárosodás mértékében a kezelések között, a hőkibocsátási ráta nem mutatott jelentős különbségeket sem a dohányvonalak milyenségével, sem az SzSzR-t indukáló előzetes fertőzéssel összefüggésben. A szalicilsavról kimutatták, hogy egymagában is képes hőkibocsátást indukálni az alternatív légzés stimulálása, valamint a proton-grádiens megszakítása révén fokozott oxigén-fogyasztáson keresztül. A TMV-vel fertőzött NahG levelek megemelkedett szintű hőkiszugárzása mutatja, hogy a hőtermelés szalicilsavtól független is lehet. Feltételezzük, hogy a NahG dohány esetében a szalicilsav-hiány okozta alacsony hőtermelést az erős oxidatív kitörés ellensúlyozni tudja. Ezzel szemben a Xanthi növényekben a megnövekedett mennyiségű szalicilsav által felfokozott hőkibocsátást a visszaszorított oxidatív kitörés tudja kompenzálni. Ezt a feltételezést korábbi eredményeink is alátámasztják, melyek szerint minél nagyobb mértékű a TMV-fertőzött dohánylevelekben a szöveti elhalás, annál magasabb a felhalmozódott ROF szintje.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy számos bizonyíték utal arra, hogy a szalicilsav indukálhatja a lipid-peroxidációt és a hőkibocsátást. Emiatt a nekrotikus léziók vizuális vizsgálata félrevezető következtetéseket engedhet levonni a dohánynövényekben kialakult SzSzR hasznosságára vonatkozóan. Feltételezésünk szerint a SzSzR-válaszra képes, TMV-vel fertőzött dohánylevelekben a mérsékelt szövetkárosodás biológiai „ára” összevethető (kb. azonos) lehet a SzSzR kialakítására képtelen, NahG dohánynövényekben kialakuló, súlyos szövetkárosodás „árával”. A rezisztencia-válaszokhoz szükséges többlet energiaigény a növények egyéb életfolyamatainak súlyos károsodását eredményezheti, aminek következtében korai öregedés (szeneszencia) illetve növekedésbeni visszamaradás alakulhat ki.

### **Az antioxidánsok szerepe árpa–lisztharmat kapcsolatok alakulásában**

Korábbi megfigyelések az árpa lisztharmat-fertőzést kísérő antioxidáns változásokról leginkább a fogékony és az Mla-rezisztens árpa összehasonlításával születtek, jelen munkánk újdonsága, hogy kiterjesztettük a vizsgálatokat a kevésbé tanulmányozott Mlg és mlo közel-izogén árpavonalakra is. Mértük a lisztharmat-fertőzés „korai” fázisában az **antioxidáns enzimek aktivitásának** változását a fertőzés utáni 15. órában (mielőtt a gomba az epidermisz sejtekbe behatolna), 30. órában (közvetlenül a behatolási kísérlet illetve behatolás után) és 60. órában (miután a betegség vagy a HR kialakul) vett levélmintákkal. A gomba-növény kapcsolat „kései”

fázisát a fertőzés után 4 nappal (a gomba sporulációja előtt), 5 nappal és 7 nappal (a gomba sporulációja után) vett levélmintákkal jellemeztük.

A vizsgált antioxidáns enzimek legtöbbje (POX, SOD, APX, GST és GR), kivéve a kataláz és a DHAR enzimeket, hasonló tendenciájú aktivitás-változásokat mutatott a lizstharvat-fertőzés hatására. A fertőzést követő ötödik és hetedik napra a POX, SOD, APX, GST és GR enzimek jelentős mértékben indukálódtak a fogékony árpában a fertőzetlen kontrollhoz képest. A fogékony növényekben mértekhez nagyon hasonló, de kevésbé markáns változásokat tapasztaltunk az enzimaktivitások terén a közel-izogén, Mla-rezisztens árpában. Feltételezhető, hogy ennek oka a nagyfokú hasonlóság a lizstharvat kezdeti fejlődésében (az első 30 órában) a fogékony és az Mla-típusú rezisztens árpa között. Az Mlg és az mlo vonalakban csak még gyengébben, illetve egyáltalán nem indukálódtak a SOD, GST, APX és GR enzimek a fertőzés hatására.

A **POX aktivitás** viszont mind a négy vizsgált vonalban erősen emelkedett a fertőzés hatására. Legnagyobb mértékben (a kísérlet végére több, mint ötszörösére) a lizstharvat-fertőzött fogékony árpa leveleiben nőtt meg a POX aktivitás, az Mla és Mlg levelekben az ötödik napon mutatott kiemelkedően magas (négyeszeres) aktivitást, míg az mlo árpában a harmadik napon tapasztaltuk a maximumot, azaz a fertőzetlen kontrollban mért aktivitásnak kétszerezését. Korábbi spektrofotometriás, illetve natív gél-elektroforézises enzimaktivitás-mérések is hasonlóan emelkedő POX aktivitás-növekedést mutattak mind a fogékony, mind az Mla árpában a *Bgh*-fertőzést követő 1–5 napon keresztül. Ebből arra következtethetünk, hogy nem tekinthető specifikusnak az izoperoxidázok szerepe a különféle növényi védekezési válaszokban.

A **CAT aktivitás**ban nem mértünk jelentős változást egyik vonalban sem, az egyik mintavételi időpontban sem. Más kutatók enyhén ellentmondásos eredményeket közöltek *Bgh*-fertőzött árpa kataláz aktivitás-növekedésével kapcsolatban, és minden esetben csak egészen korai, a fertőzés utáni 24. óráig tartó mérések alapján. Búzában azonban a lizstharvat (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)-fertőzés nem eredményezett CAT aktivitás-változást.

Az APX és monodehidro-aszkorbát-reduktáz enzimek aktivitásának növekedéséről vannak adatok fogékony árpában 4 nappal *Bgh*-fertőzés után, ami az Mla-típusúban nem következett be. Az **APX enzim aktivitása** a mi kísérleteink kései időpontjaira is megnövekedett a fogékony árpában, ezzel szemben viszont a **DHAR enzim aktivitásának** átmeneti csökkenését mutattuk ki a fertőzés hatására fogékony Ingrid, Mla és Mlg árpában. Az mlo árpában a DHAR aktivitás nem változott szignifikánsan. Eredményeink, miszerint a DHAR aktivitás csökkent a fogékony kapcsolatban a negyedik napig, majd ismét növekedni kezdett a kontroll (fertőzetlen) szint irányába, összhangban van korábbi eredményekkel, és arra enged következtetni, hogy esetünkben az aszkorbát regenerációja nagyrészt a monodehidro-aszkorbát-reduktáz enzim által zajlik, mivel ennek aktivitása



ellensúlyozhatja a tapasztalt alacsony DHAR aktivitást, így biztosítva az aszkorbinsav „pool” redox egyensúlyát.

Sem az összes **aszkorbinsav-tartalom**, sem annak redox állapota nem mutatott különösebb változást a *Bgh*-fertőzés hatására egyik vizsgált ápravonalban sem. Korábbi kutatások sem találtak a levelek aszkorbát-koncentrációjában változást 24 órával a fertőzés után, csak a redukált forma aránya nőtt meg enyhén a fogékony árpában, míg ez az M1a-rezisztens vonalban nem volt megfigyelhető. Mások az aszkorbinsav-tartalom csökkenést találták 4–6 nappal a lisztharmat-fertőzést követően a roppant fogékony cv. Emir árpában. Korábban összefüggést mutattak ki a *Bgh*-rezisztencia és a levélben megemelkedett **glutation-tartalom** között 18–24 órával a fertőzés után. Kísérleteinkben az összes glutation-tartalom 7 nappal a fertőzés után nőtt meg szignifikánsan a fogékony levelekben, míg más kutatók már 4 nappal a *Bgh* támadás után ilyen koncentrációbeli növekedést tapasztaltak.

A *Bgh*-támadásra bekövetkező korai **hidrogén-peroxid felhalmozást** árpalevélben már sokan megfigyelték és leírták, míg a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szintek későbbi alakulása a fertőzés során nem került a tanulmányok homlokterébe. Munkánk során a lisztharmat-fertőzés hatására enyhén megemelkedett H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-koncentrációt találtunk az M1a, M1g és m1o árpa leveleiben, ellenben a fogékony árpalevelekben a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-koncentráció szignifikánsan lecsökkent hét nappal a fertőzés után. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-termelés fokozódása szoros összefüggésben van a növényi védekezéssel a lisztharmat gomba ellen, mitöbb, egyéb kórokozók elleni védekezésben is jelentős szerepe van. Fogékony árpa növények kezelése külsőleg adagolt ROF-forrásokkal megvédi a növényt lisztharmat- vagy rozsdabetegséget okozó gombáktól azáltal, hogy megöli a kórokozó gombát vagy gátolja annak fejlődését. Ha azonban a ROF-kal egyidejűleg antioxidánsokkal is kezeljük a növényt, akkor a ROF toxikus hatása a kórokozóra kivédhető. A feltételezést, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-nak alapvető jelentősége lehet az árpa lisztharmat-rezisztenciájában, tovább erősíti azon eredményünk, miszerint a rezisztens árpával ellentétben a fogékony Ingrid árpalevelekben csökkent a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tartalom *Bgh*-fertőzést követően.

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-felhalmozódás és az **elektrolit-kiáramlással jellemzett membrán-károsodás** között nem találtunk összefüggést. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a rezisztens vonalakban csak minimális számú sejtet érintett a gombatámadás az egész levélhez képest. Míg az M1a-típusú rezisztencia esetében a *Bgh*-támadásra enyhén megnövekedett az ion-kiáramlás, az M1g és m1o vonalakban nem volt változás. Ezzel ellentétben viszont a fogékony árpában már a fertőzés utáni második napra szignifikáns kiáramlás-növekedés jelentkezett, az ötödik napra pedig a fertőzetlen kontrollhoz képest ez nyolcszorosára növekedett.

Az **etilén stresszhormon termelődése** a *Bgh*-fertőzött árpalevelekben is hasonló tendenciát mutatott, mint az ion-kiáramlás. Ebben az esetben is valószínűleg a nekrotizáció által csak kis számban érintett sejtek miatt az M1g és az m1o növényekben nem mértünk változást a fertőzés

hatására, és az Mla növényekben is csak kismértékű növekedést tapasztaltunk. Ellenben a fogékony, fertőzött növényekben már 3 nap után látványos, drasztikusan megemelkedett etilén-termelés volt megfigyelhető. Eme adatokkal megegyezik búzán végzett kísérletek eredménye: búza liztharmattal fertőztetve, különböző kvantitatív rezisztenciával bíró búzafajtákban az etilén-termelés mértéke összefüggésben van a fertőzött leveleken megszámlálható pusztulák mennyiségével.

Figyelemreméltó eredmény még a mutáns *mlo* gént hordozó, fertőzetlen árpában mért fokozott POX aktivitás és ion-kiáramlás mértéke, ami szignifikánsan nagyobb volt a vad típusú, azaz funkcionális *Mlo* gént hordozó másik három árpavonalban (fogékony, Mla és Mlg árpa) mérthez képest. A magasabb POX aktivitás velejárója az öregedési folyamatoknak, s ebben az esetben alátámasztja a korábbi megfigyelést, miszerint az *Mlo* gén mutációja korai szenescenciát indukál árpalevelekben.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a *Bgh*-fertőzés eredményképpen az antioxidatív védekező-rendszer jelentős mértékben indukálódott a fogékony árpában. Feltételezhető, hogy az antioxidánsok szintjének eme megemelkedése megelőzheti a ROF-felhalmozódást a *Bgh* által megtámadott fogékony növényekben. Ezzel összecseng eredményünk, miszerint valóban alacsonyabb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szintet mértünk a fertőzött fogékony árpában, mint a rezisztens kapcsolatokban. Megfigyeléseink alapján nem kizárható az elképzelés, hogy a liztharmat gomba maga felelős antioxidáns vegyületek vagy enzimek termeléséért, amivel védekezhet a növény által termelt ROF ellen. Ezt az elképzelést azok a korábbi eredmények is alátámasztják, miszerint a *Bgh* extracelluláris katalázt választ ki a hausztóriumaiából az árpa megfertőzése során. Munkánk során nem találtunk magasabb CAT aktivitást a *Bgh*-fertőzött fogékony árpában, viszont az enzim aktivitását teljes levél-homogenátumban mértük, nem lokálisan, a gazda és a parazita találkozási pontjánál. Így kérdés marad, hogy a *Bgh*-fertőzött fogékony árpában megfigyelhető megemelkedett antioxidáns szintekért vajon nagyobb részben a növényi sejtek vagy a gomba felelős-e.

### **Szimbiózis szerepe sóstressz leküzdésében**

A termesztett árpa viszonylag sótoleráns kultúrnövénynek számít, de meglehetősen nagy variabilitás figyelhető meg e tekintetben az árpafajták között. Két különböző genotípust, a sótoleráns 'California Mariout' és a sóérzékeny 'Ingrid' árpafajtákat választottuk ki a kísérletekhez, hogy megállapítsuk ezek sókezelésre adott metabolikus válaszait.

Nemrég mutatták ki egy gyökér endofita bazídiumos gomba, a *Piriformospora indica* esetében, hogy képes fokozni az árpa ellenálló-képességét gyökér- és levélbetegségek ellen, valamint csökkenti a közepes erősségű (100 mM NaCl) sóstressz károsító hatását. Jelen munkánkban azt találtuk, hogy a *P. indica* megvédi az árpát még erős sóstressztől is (300 mM NaCl), továbbá vállalkoztunk a *P. indica*-kiváltotta sótolerancia hátterében álló metabolikus

változások vizsgálatára a sóstressz fontos indikátorainak (metabolikus hőtermelés, lipid-peroxidáció és zsírsav-összetétel) mérésével.

Korábbi kutatások csökkent metabolikus aktivitást és légzési rátát mutattak ki sóérzékeny árpában sókezelés után, míg ezek a paraméterek változatlanok maradtak sókezelt sótoleráns növényekben, így a hőkibocsátás kalorimetrikus meghatározása hasznos eszköz lehet a növények sótoleranciájának jellemzésére. A lipid-peroxidáció a sóstressz okozta sejtmembrán károsodással függ össze. NaCl-kezelés magasabb arányú lipid-peroxidációt okozott a sóérzékeny növényekben, mint a sótoleráns kultúrnövényekben. Ezen megfigyelések alapján a lipid-peroxidációs ráta is használható annak jellemzésére, hogy milyen hatékonysággal képesek a *P. indica*-kezelt növények ellenállni a sóstressznek. A zsírsav-telítetlenség is összefügg a növényi sóstresszel: korábban úgy találták, hogy  $\omega$ -3 deszaturáz gének indukálódnak kukoricában magas só-koncentráció hatására. Ezen eredményekkel megegyezően kimutatták, hogy a linolénsav kiemelkedő szerepet játszik a dohánynövények sóstressz elleni ellenállóságában. Ezért a nem-kolonizált és *P. indica*-kolonizált árpa leveleinek zsírsav-telítetlenségét vizsgáltuk sóstressz hatására.

Két héten keresztül sótartalmú vízzel öntözött árpa növekedésében visszamaradt, és korai öregedésnek indult. Magas só-koncentrációnál (300 mM NaCl) a **levelek friss tömege** csökkent mind a három vizsgált kezelésben: nem-kolonizált sóérzékeny Ingrid, *P. indica*-kolonizált Ingrid, és sótűrő California Mariout árpában. Nem-kolonizált növényekkel összehasonlítva, Ingrid hajtások friss tömege a *P. indica*-kezelés hatására kb. kétszeresére növekedett mind kontroll, mind pedig sós körülmények közt. Magas só-koncentrációnál a sótoleráns cv. California Mariout hajtástömege szignifikánsan nagyobb volt, mint a nem-kolonizált cv. Ingridé, de a legnagyobb mért hajtástömeg a *P. indica*-kolonizált Ingrid növények esetében volt megfigyelhető.

Jelen munkánkban világos bizonyítékot mutatunk arra, hogy *P. indica*-kolonizált sóérzékeny cv. Ingrid árpánál a só-indukálta válasz – a hőkibocsátás mértéke és az etán termelés alapján – a sótoleráns növényekben találtakra emlékeztet. Miközben a nem-kolonizált Ingrid árpalevelek **metabolikus hőtermelése** kb. 30%-kal csökkent sókezelés után, a metabolikus aktivitás mértéke növekedett a *P. indica*-kolonizált növényekben. Ezek szerint az endofitával való szimbiózis túlkompenzálja a levél metabolikus aktivitásának só-indukálta gátlását. Korábbi eredmények szerint vad zab biotípus természetes herbicid-rezisztenciájának mértéke szoros összefüggést mutat a herbicid-kezelés kiváltotta hőtermelés mértékével a védekezési válaszhoz szükséges metabolikus folyamatok aktiválódása következtében. Ez arra utal, hogy a fokozott sóstressz-tolerancia összefügghet a *P. indica*-kolonizált árpa intenzívebb metabolikus aktivitásával.

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy külsőleg alkalmazott telítetlen zsírsavak meg tudják védeni az árpát NaCl-indukálta stressz során, ezért a zsírsavak telítetlensége fontos tényezője lehet a sóstresszre kialakuló növényi toleranciának. A *P. indica*-kolonizáció az árpa leveleiben található

olajsav mennyiségének szignifikáns csökkenéséhez vezet, miként azt sókezelt árpa gyökérben is kimutatták. A sókezeléshez hasonlóan a *P. indica* is kissé növelte a linolénsav arányát és a telítetlenségi mutatókat az árpa levelekből izolált foszfolipid-frakcióban. Egy kivétellel (C16:1), a *P. indica* által kiváltott változások a **zsírsav-összetételben** hasonlóak voltak a só okozta változásokhoz. A gazdanövény zsírsav-összetételére való illetén hatás a szimbiotikus adaptív stratégia része lehet, melyet az endofita irányít, hogy gazdanövényével együtt valahogy elviseljék a sóstresszt a kedvezőtlen környezetben. Feltételezzük, hogy a *P. indica* hasonló hatást válthat ki a gazdanövény zsírsav-összetételében származási helyén, a száraz indiai Thar sivatagban is.

Magas só-koncentráció hatására fokozódott az 'Ingrid' levelekben az etán-termelődéssel kimutatott **lipid-peroxidáció**. A *P. indica*-kezelés önmagában nem befolyásolta az etán-kibocsátás mértékét. A só kiváltotta lipid-peroxidációt azonban szignifikánsan csökkentette a *P. indica*-kolonizáció a növényekben. A sejtmembrán-károsodás mint a sóstressz következménye, összefüggésben van a ROF felhalmozódásával. Egy friss közlemény megerősíti eredményeinket miszerint a széles gazdaspektrummal jellemezhető endofita gombák hatékony toleranciát biztosíthatnak gazdanövényeiknek a ROF ellen abiotikus stressz körülmények között.

Egyre több bizonyíték látszik arra mutatni, hogy a magas só-koncentráció oxidatív stresszt vált ki a növényekben, ami legalább részben felelős a szövetkárosodásért. Több kísérlet is kimutatta, hogy a magas sótartalom a sóérzékeny növényeknél tapasztalt szint fölé növeli a sótoleráns növények antioxidáns aktivitását. Korábban kimutatták, hogy a *P. indica* antioxidánsokat indukál árpa gazdanövényben: az **aszorbinsav mennyisége**, a redukált aszkorbát aránya az oxidált aszkorbáthoz képest, és a DHAR aktivitása megemelkedett a gyökerekben. Mivel nem találtunk aszkorbátot a *P. indica*-ban, feltételezhető, hogy a gomba indukálja az aszkorbát felhalmozódását a növényi gyökérsejtekben. A *P. indica*-kolonizált 'Ingrid' növények nagyfokú (300 mM) NaCl-stressz alatt is hatékonyan tartották fenn az aszkorbinsav „pool” redox egyensúlyát, valamint a sókezeletlen kontrollnál magasabb összes aszkorbát-tartalmat. Meg kell hagyni azonban, hogy az idő előrehaladtával az aszkorbát mennyisége csökkent a sókezelt, kolonizált gyökerekben is. Az aszkorbát mennyisége és a redukált aszkorbát aránya az oxidálthoz képest drámai módon csökkent a sókezelt, nem gyarmatosított gyökerekben az egy hetes sókezelés után röviddel. Ezen eredmények egybevágnak korábbi adatokkal, miszerint az aszkorbát mennyisége, illetve redukált formájának aránya csökken sóérzékeny növényekben sóstressz hatására, sótűrő növényekben viszont vagy kevésbé csökken, vagy pedig éppen növekszik. Korábbi vizsgálatok arra utalnak, hogy a növények sóstresszel szembeni ellenálló-képessége összefüggésben áll az antioxidáns enzimek indukciójával. Mi is azt találtuk, hogy a NaCl növelte a vizsgált **antioxidáns enzimek aktivitását** a sóstressz alatt levő árpa gyökerében. Habár az enzimaktivitások csökkentek mind a sóérzékeny, mind pedig a

sótoleráns növényekben a kezdeti indukció után, a csökkenés kisebb mértékben és késleltetve jelentkezett a *P. indica*-kolonizált 'Ingrid' árpában és a sótoleráns cv. California Mariout-ban.

Egyelőre nem ismert a pontos mechanizmus, amin keresztül a *P. indica* fokozni tudja a növények antioxidatív védekezőképességét. Nemrégiben kimutatták, hogy a *P. indica* képes auxint termelni a növények gyökereiben. Másrészt, a *P. indica* növelte a methionin-szintetáz mennyiségét, ami meghatározó szerepet játszik a poliamin- és etilén- bioszintézisben. Poliaminokat túltermelő transzgenikus dohánynövényeknek fokozott sóstressz-ellenálló képessége is van, párhuzamban a sóstressz alatt fokozódó antioxidáns enzimaktivitással. A *P. indica* egyik közeli endofita rokona, a *Sebacina vermifera*, csökkenti *Nicotiana attenuata*-ban az etilén-termelését. Érdekes, hogy előzetes eredményeink arra utalnak, hogy a *P. indica* etilén-bioszintézist indít be az árpa gyökerekben. További kísérletek szükségesek azonban a fitohormonok szerepének tisztázására a *P. indica* által árpában kiváltott sótűrés tekintetében.

Végső megállapításként, eredményeink megmutatták, hogy a magas só-koncentrációjú (300mM NaCl) környezetet sóérzékeny árpa is elviseli, ha előzőleg szimbiózist hoz létre a bazídiumos *P. indica* gombával. Az endofita által kialakított sóstressz-tűrő képesség úgy tűnik, hogy legalább is részben, az aszkorbinsav és az antioxidáns enzimek indukálásának köszönhető. Megfigyeléseink ugyan csak összefüggéseket mutatnak, nem okokat, de alátámasztja ezeket az a tény is, hogy a genetikailag sótűrő cv. California Mariout árpában is megemelkedett antioxidáns aktivitást lehetett kimutatni sós környezetben. Ugyanakkor, többféle szimbiotikus mechanizmus is felelős lehet a sótűrésért. Például a gyökér endofiták hathatnak biológiai közvetítőként úgy, hogy a szimbiózisban élő növényekben gyorsabb és erősebb a stressz-válasz rendszer aktiválódása, mint nem kolonizált növényekben. Mivel a *P. indica* széles egyszikű és kétszikű gazdaspektrummal rendelkezik, valamint növényen kívül, mesterséges tenyészetben is könnyen szaporítható tömegesen, felhívjuk a figyelmet lehetséges felhasználhatóságára a termesztett növények sóstressz elleni védelmében sivatagos és félszáraz mezőgazdasági régiókban.

### **Hősokkal előidézett lisztharmat-fogékonyágban indukálódó jelátviteli gének**

Egy előzetes stressz, mint pl. hőkezelés, hatására kialakulhat rezisztencia árpában lisztharmat-fertőzéssel szemben. Nagyon fontos azonban megjegyezni, hogy a hősokk pontos hőmérséklete illetve időtartama nagymértékben befolyásolja a kiváltott hatást. A mi kísérleteinkben alkalmazott hőmérséklettel és időtartammal, valamint a hősokk és a fertőzés között eltelt idővel éppen ellentétes eredményt tudtunk elérni: egyrészt a fogékony 'Ingrid' árpafajta még fogékonyabbá vált, azaz több sporuláló lisztharmat-telepet találtunk a hősokknak kitett, majd fertőzött elsődleges leveleken. Továbbá a több sejtre kiterjedő HR-rel kísért rezisztenciával rendelkező Mla árpán nagyobb kiterjedésű nekrotikus foltok és sporuláló lisztharmat-telepek is

megjelentek. A szabad szemmel nem látható, egy-egy sejtet érintő HR-elhalásokkal járó Mlg rezisztenciát is letörte az általunk alkalmazott hősök, és a lisztharmat szaporodott a leveleken. A legmeglepőbb eredmény azonban a széleskörű, teljes rezisztenciát kialakító *mlo* gént hordozó árpavonal sikeres lisztharmat-fertőzése volt, így elsőként ebben a vonalban igyekeztünk utána járni a folyamat hátterében húzódó, génkifejeződés szintű változásoknak RT-PCR-technikával.

Az első vizsgált gén, a Hsp70 hősokk-fehérje génjének transzkripciója már 24 órával a hőkezelés után indukciót mutatott, és additív módon indukálódott a két kezelés hatására. Hasonlóképpen alakult a BI-1 (Bax inhibitor 1, egy programozott sejthalált gátló fehérje) génjének kifejeződése is, tehát mind a hősök, mind a lisztharmat-fertőzés indukálta azt. A *BI-1* gén kifejeződésének indukcióját korábban eltérőnek találták fogékony és rezisztens árpában lisztharmat-fertőzést követően, valamint az idő múlásával egyre fokozódó *BI-1* kifejeződést detektáltak, tehát ezért is érdemes lesz vizsgálatainkba bevonni a jövőben a többi közel-izogén árpavonalat is.

Tanulmányoztuk továbbá két *WRKY* fehérje génjének kifejeződését, amikről ismert, hogy a növények kórokozók elleni védekezésében és stressz-válaszaiban szerepet játszó transzkripciós faktorok. Azt találtuk, hogy a *WRKY1* gén kifejeződését a fertőzés gyengébben, a hőkezelés erősebben indukálta, az együttes hatás viszont gyengébb indukciót eredményezett, mint csak a hőkezelés, azaz a fertőzés csökkentette a hőkezelés hatását. A *WRKY2* gén pedig csak a fertőzés hatására indukálódott, és érdekes módon a két kezelés együttes hatása gyengébb volt, mint a fertőzés egyedül, azaz itt meg a hőkezelés csökkentette a fertőzés hatását.

Összefoglalva, eddigi eredményeink a soron következő kutatási feladatom előkísérleteinek tekinthetők, de mindenképpen érdekes és biztató irányvonalat jelölnek ki a közeljövőre nézve. Egy nemrég megjelent munkában izgalmas összefüggést fedeztek föl az Mla-típusú rassz-specifikus rezisztencia és a növények alap- vagy általános rezisztenciája között, amelyek jelátviteli útjai pont az általunk is vizsgált *WRKY* transzkripciós faktorok révén kapcsolódnak, így vizsgálataink következő jelöltje nem is lehet kérdéses.

## Új tudományos eredmények

1. Fiatal és öreg, illetve citokinin juvenilhormont túltermelő transzgenikus és vad típusú dohánylevelek higany-klorid által kiváltott oxidatív stressz, illetve közvetlenül ROF (hidrogén-peroxid) okozta membrán-károsodásának összehasonlításával igazoltuk a juvenilis élettani állapottal együtt járó magasabb antioxidáns kapacitás védő hatását abiotikus oxidatív stresszel szemben.
2. Xanthi-nc és szalicilsav-hiányos NahG dohány TMV-fertőzésre megváltozó hőtermelés-intenzitását és etán-kibocsátását hasonló mértékűnek találtuk. Csak fertőzetlen állapotban mutattunk ki metabolikus és lipid-peroxidációs különbségeket az SzSzR-re képes és képtelen vonal között: mindkét vizsgált paraméter értéke az utóbbiban, azaz a transzgenikus NahG dohányban volt kisebb.
3. Az antioxidáns-szintek indukálódása erősebb volt liztharmat-fertőzésre fogékony 'Ingrid' árpafajtában, mint az *Mla*, *Mlg* vagy *mlo* rezisztenciagént hordozó, közel-izogén vonalaiban. A hidrogén-peroxid tartalom viszont a rezisztens vonalakban nőtt meg jelentősen. Eredményeink így alátámasztják azt a feltevést, miszerint a kórokozó a fogékony kapcsolatban indukálhatja a növényben az antioxidánsokat, az ellene képződött ROF káros hatásának kiküszöbölésére.
4. *Piriformospora indica* gyökér endofita gombával való szimbiotikus kapcsolat enyhítette a sókezelés okozta, anyagcsere aktivitással, zsírsav-összetétel alakulásával és lipid-peroxidációval jellemzett károkat sóérzékeny árpában.
5. Árpában a hőkezeléssel indukált liztharmat-fogékonyság összefüggéseket mutatott egyes abiotikus és biotikus stressz-válaszokban szerepet játszó gének (*BI-1*, *HSP70*, *WRKY1*, *WRKY2*) RT-PCR-módszerrel vizsgált kifejeződésének indukciójával illetve repressziójával.

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT LEGFONTOSABB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

### Folyóiratcikkek:

HARRACH B. D., FODOR J., POGÁNY M., PREUSS J., BARNA B. (2008): Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *European Journal of Plant Pathology* 121: 21–33.

BALTRUSCHAT H., FODOR J., HARRACH B. D., NIEMCZYK E., BARNA B., GULLNER G., JANECKO 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.

FODOR J., HARRACH B. D., JANECKO A., BARNA B., SKOCZOWSKI A. (2007): Metabolic responses of tobacco to induction of systemic acquired resistance. *Thermochimica Acta* 466: 29–34.

POGÁNY M., HARRACH B. D., HAFEZ Y. M., BARNA B., KIRÁLY Z., PÁLDI E. (2006): Role of reactive oxygen species in abiotic and biotic stresses in plants. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 41: 23–35.

### Konferencia kiadványok:

HARRACH B. D., HÜCKELHOVEN R., KOGEL K.-H., BARNA B. (2007): Gene expression changes in heat-induced susceptibility of barley to powdery mildew. XIII. International Congress on Molecular Plant–Microbe Interactions (Sorrento, Olaszország, 2007. július 21–27.) Absztr. p. 333.

HARRACH B. D., BARNA B. (2004): Hydrogen peroxide and mercury tolerance of tobacco with altered antioxidant properties. 14<sup>th</sup> FESPB Congress (Krakkó, Lengyelország, 2004. augusztus 23–27.) *Acta Physiologiae Plantarum* Vol. 26, No. 3 Suppl., p. 216.

HARRACH B. D., BARNA B. (2003): Stress resistance and antioxidant capacity in tobacco plants. 4<sup>th</sup> International Conference of PhD Students (Miskolc, 2003. augusztus 11–17.) Proc. pp. 41–47.