

Szakmai Zárójelentés a T 046548 számú OTKA Pályázat Támogatásával Megvalósult Kutatásokról

A pályázat címe: **Az abiotikus és a biotikus stressz és stresszellenállóság kapcsolata növényekben**

A kutatómunka egyik alappilléret azok a vizsgálatok jelentették, amelyekben abiotikus környezeti stresszek hatását vizsgáltuk növények betegség- és oxidatív stresszellenállóságára. A kísérletek egy másik csoportja olyan növényi gének stresszélettani szerepének vizsgálatára irányult, melyeknek fehérjetermékei bizonyíthatóan reaktív oxigén- és nitrogénfajtákat termelnek, vagy azok mennyiségét módosítják.

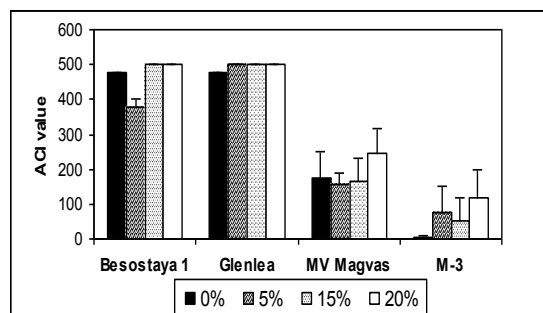
A kutatómunka két kutatóintézet együttműködésében valósult meg 2004 - 2008 között. A közreműködő kutatócsoportok az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének kórélettani csoportja, valamint az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetének növényi stresszélettani csoportja és Kalászos Gabona Rezisztencia Nemesítési Osztálya voltak.

1. VIZSGÁLATOK KALÁSZOS GABONAFÉLÉKKEL

1.1. Ozmotikus stressz hatása búza *Drechslera tritici-repentis* fogékonyságára

A *Drechslera tritici-repentis* (DTR) gabonaféléken levélfoltosságot, levélszáradást okozó nekrotrof gombakórokozó (teleomorf alakja: *Pyrenophora tritici-repentis*). Vizsgálataink arra irányultak, hogy növekvő koncentrációjú polietilén-glikol (PEG-6000) jelenléte Hoagland-tápoldatban hogyan befolyásolja a gombával szemben eltérő fogékonysággal rendelkező búza genotípusok érzékenységet. A PEG kezelés ozmotikus stresszt jelent a növények számára, ami szárazságstresszhez hasonló körülmények üvegházban, folyadékkultúrában történő előállítását teszi lehetővé megismételhető módon.

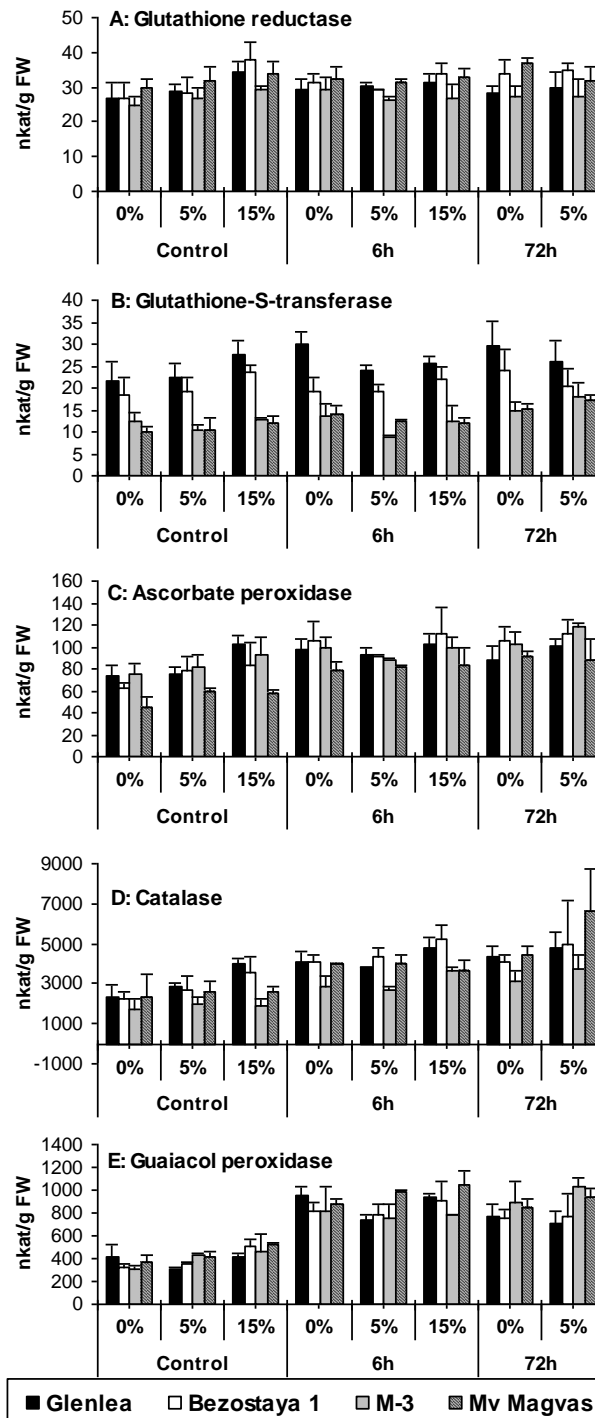
A búzanövények friss biomassa tömegét az ozmotikus stressz jelentősen csökkentette. A gombafertőzés szintén csökkentette a növények biomassa tömegét és ez a csökkenés természetes módon a két fogékony fajta esetében (Bezostaja-1 és Glenlea) nagyobb mértékű volt, mint a két rezisztens genotípus esetében (Mv Magvas és M-3). A két stressz együttes alkalmazása halmozottan gyengítette a növények friss biomassa képzését. A DTR-rel való fertőzést 6 órával megelőző, és a kór folyamat kialakulása során is folyamatosan fenntartott enyhébb mértékű ozmózis stressz (a tápoldatban 5 % PEG) a fogékony Bezostaja-1 genotípusban a kezeletlen növényekhez képest kissé visszaszorította a DTR tüneteinek kifejlődését, amit az alkalmazott statisztikai próba (kettényezős varianciaanalízis) is megerősített. A rezisztens M-3 genotípus esetében pedig a legmagasabb (20 %-os) PEG koncentráció idézett elő szignifikáns változást, ami az ellenállóság bizonyos fokú visszaszorulásában (tehát fogékonyság növekedésben) nyilvánult meg (1. ábra).



1. ábra. Növekvő koncentrációjú PEG kezelések hatása négyféle búza genotípus DTR fogékonyságára. A növényeket 6 órával a PEG kezelés elindítása után fertőztük a gombával. Az ACI érték (= average coefficient of infection) a léziók típusát és méretét együttesen tükröző jelzőszám. $SzD_{5\%}=79$.

Az eredményekből az szűrhető le, hogy az ozmotikus stressznek olyan élettani hatásai vannak a növényben, ami a *Drechslera tritici-repentis* közel azonos időben bekövetkező fertőzésének kimenetelét kissé befolyásolja, de alapvetően nem változtatja meg.

Tekintettel arra, hogy a növényi abiotikus és biotikus stresszek egymásra gyakorolt kölcsönhatásában a reaktív oxigénfajták szerepének vizsgálata alapvető célunk volt, ezért megmértük 5 antioxidáns enzim aktivitásának változását PEG-kezelés és DTR fertőzés hatására. Az öt vizsgált antioxidáns enzim a glutation-reduktáz (GR), a glutation-S-transferáz (GST), az aszkorbát-peroxidáz (APX), a kataláz (KAT) és a gvajakol-peroxidáz (GPX) volt (2. ábra).



2. ábra. Antioxidáns enzimek aktivitásának mértéke olyan búzanövényekben, amiket 0, 5, vagy 15% PEG tartalmú Hoagland-tápolatba helyeztünk, majd 6, vagy 72 órával később *Drechslera tritici-repentis* gombával fertőztünk.

Megállapítottuk, hogy a DTR fertőzés erősebben befolyásolta az antioxidáns enzimek aktivitását, mint a PEG kezelés. A GST aktivitása az egyes búzagenotípusokban nagy eltérést mutatott. Nem tapasztaltunk ugyanakkor összefüggést az antioxidáns enzimek működése és a növények ozmotikus stressztoleranciája, vagy DTR-ellenállósága között.

1.2. Alacsony hőmérsékleti stressz hatása búza levélrozsda fertőzésére

Ebben a kísérletben azt vizsgáltuk, hogy az előzetesen alkalmazott alacsony hőmérsékleti stressz miként befolyásolja búzanövények fogékonyságát a levélrozsda (*Puccinia triticina*) betegsége iránt. A vizsgálatokhoz három búzafajtát használtunk: a Bezosztaja érzékeny a levélrozsdára, az Mv Marshall és az Mv Laura pedig rezisztens. A Marshallnál fertőzés hatására hiperszenzitív reakció lép fel, míg a Lauránál nem ismert a rezisztencia típusa, de a növényen semmilyen látható tünet nem fejlődik ki. A növényeket üvegházban neveltük, egy-egy csoportjukat két leveles stádiumban 3 illetve 6 napig hidegben tartottuk (4 °C), majd levélrozsdával fertőztük. Az enzimaktivitás és a szalicilsav (SA) mérésekhez a fertőzést követő 4. napon gyűjtöttünk mintát. Az antioxidáns enzimek közül a katalázt (KAT), az aszkorbát-peroxidázt (APX), a gvajakol-peroxidázt (GPX), a glutation-reduktázt (GR) és a glutation-S-transzferázt (GST) mértük. A KAT, a GST és a GR aktivitásában nem tapasztaltunk változást a kontrollhoz viszonyítva. Az APX aktivitása az érzékeny Bezosztajában a 3 napig és a nem hidegkezelt növényekben lecsökkent a fertőzést követően, míg a 6 napig hidegkezeltben nem változott. A rezisztens fajtákban nem tapasztaltunk változást. A GPX aktivitása az érzékeny Bezosztajában nem változott, míg a rezisztens fajtákban (Marshall, Laura) a 3 illetve 6 napig hidegkezelt növényekben a fertőzést követően megnőtt az aktivitása.

A szabad SA szintje a hideg hatására nem változott Bezosztajában, de a fertőzött 6 napig hidegkezelt növényekben lecsökkent. A rezisztens fajtákban a szabad SA szintje a hidegkezelés hatására kismértékben csökkent, de a fertőzés hatására megemelkedett és elérte azt a szintet, amennyi a nem hidegkezelt növényekben volt. Hasonló változásokat tapasztaltunk a kötött szalicilsav esetében is, azzal a különbséggel, hogy a 6 napos hidegkezelés hatására Bezosztajában is lecsökkent a SA szint, de a fertőzést követően megemelkedett.

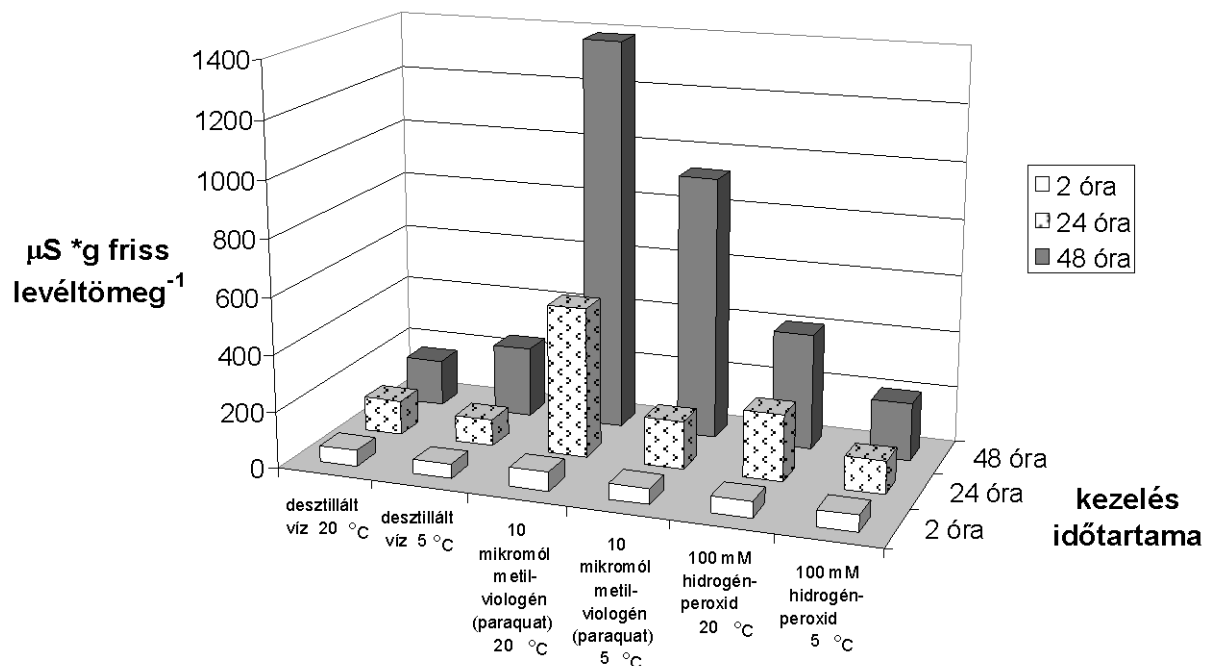
A növények egy csoportját nem gyűjtöttük be a fertőzést követő 4. napon, hanem hagytuk, hogy a fertőzés kifejlődjön és megfigyeltük a tüneteket rajtuk. A Bezosztajánál a nem volt különbség a fertőzési tünetek kifejlődésében a kontroll és a hidegben is tartott növények között. A Marshallnál a hidegkezelt növényeknél a fertőzés klorózist indukált. Mindhárom fajtánál megfigyelhető volt a levélvég száradása a hidegkezelt növényekben és ez a fertőzés hatására előbb alakult ki.

1.3. Hidegdedzés hatása kalászos gabonafélék metil-viologén (paraquat) és hidrogén-peroxid toleranciájára

Ezeket a kísérleteket azért végeztük, mert ismert volt az, hogy kalászos gabonafélék hideg-előkezelése serkenti az antioxidáns enzimek működését (Janda et al. 2003, Baek és Skinner 2003). Azt vizsgáltuk tehát, hogy ez a fokozott antioxidáns védelem valóban segíti-e a növényt egy később bekövetkező oxidatív stressz károsító hatásával szemben.

Megállapítottuk, hogy búzanövények előzetes hidegkezelése toleranciát idéz elő egy következő, oxidatív stresszt okozó kémiai kezeléssel szemben. Emese fajtájú ősibúza növények egyedeit 4 héten keresztül 5 °C-on tartottuk

(hidegzés), a kontroll növényeket pedig azonos megvilágítás mellett 20 °C-on neveltük. Az előkezelést követően a leveleket 1 cm-es darabokra vágtuk, majd desztillált vízben, 10 µM metil-viologén (paraquat) oldaton, vagy 100 mM hidrogén-peroxid oldaton úsztattuk. A paraquat gyomirtószer hatóanyag a kloroplasztiszokban szuperoxid szabadgyökök képződését váltja ki. A hidegzett növények oxidatív stresszel szembeni toleranciáját az inkubáló oldatok vezetőképességének mérésével, a növényi sejtek károsodását jelző elektrolit kiáramlás detektálásával hasonlítottuk össze. A levelek ionkiáramlását három időpontban: 2, 24 és 48 óra elteltével mértük. Az első időpontban (2 óra elteltével) nem észleltünk szignifikáns különbséget a kezelések között. 24 óra után viszont mind paraquat oldaton, mind hidrogén-peroxid oldaton jelentősen megnőtt az úztatott levelek elektrolit kiáramlása (desztillált vízhez képest). A hidegzett búzanövényekről származó levelek mindkét oldat toxikus hatásával szemben toleránsabbak voltak, ez az eredmény megerősítette korábbi feltevésünket. Paraquat oldaton a hidegkezelést növények leveleinek ionkibocsátása mindössze 30 %-a, hidrogén-peroxid oldaton pedig 50 %-a volt a kontroll növények esetében mért értéknek. A 3. időpontban (48 óra elteltével) hasonló különbségeket mutattunk ki a hidegkezelést és a kontroll növényekről származó levelek között, mint 24 óra után, annyi eltéréssel, hogy a paraquatot észlelt nagy érzékenységbeli különbség csökkent, de nem tűnt el (3. ábra).



3. ábra. Hidegzés hatása búza metil-viologén és hidrogén-peroxid toleranciájára. A hidegzett (5 °C-on tartott) növények levelei lényegesen jobban tűrik a 10 µM metil-viologén vagy 100mM hidrogén-peroxid oldaton való úztatást, mint a 20 °C-on tartott növények levelei. A leveleket tartalmazó folyadék vezetőképességét mértük, ami jelzi a levélszövetet alkotó sejtek pusztulását.

Lehetőségünk nyílt arra, hogy a hidegzés transzkripciós mintázatra gyakorolt hatását egy árpa biochip segítségével elemezzük, amely mintegy 1500 különböző árpa cDNS klónt tartalmazott. A cDNS klónok többsége olyan géneket képviselt, melyeket korábban már valamilyen stresszre adott válasszal összefüggésbe hoztak. A

vizsgálathoz hidegedzett és edzetlen Hardy fajtájú ősziárpa növényeket használtunk, leveleiből RNS-t tisztítottunk, majd az RNS mintákból reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk Cy3- és Cy5-dUTP fluoreszcens jelölést alkalmazva. A jelölt cDNS mintákat chipok felületére hibridizáltuk, végül a lemezeket szkenneltük.

Korábbi vizsgálataink arra utaltak, hogy az ősziárpa esetében hidegedzés hatására bekövetkező oxidatív stressztolerancia ősziárpában kevésbé jelentkezik (bár szerényebb mértékben ott is megfigyelhető), ennek ellenére mégis árpa vizsgálata mellett döntöttünk a rendelkezésre álló biochip jellege miatt.

A kísérlet eredményeit értékelve megállapíthatjuk, hogy viszonylag kevés olyan gént tudtunk kimutatni árpanövényekben, melyeknek transzkripciója megváltozik hidegedzés következtében (1. táblázat). Meglepő módon az indukált gének között nem találhatóak antioxidánsok, jóllehet a chip tartalmazott számos antioxidáns enzim génre specifikus cDNS klónt. Megjegyezzük, hogy kalászos gabonafélék hidegedzésével kapcsolatban ismert az a tény, hogy hidegkezelés fokozza az antioxidáns enzimek működését, ami megjelenik egyrészt transzkripció szinten (Baek és Skinner 2003), másrészt az enzimek aktivitásának mértékében is (Janda et al. 2003). Feltételezzük, hogy biochip kísérletünkben azért nem tudtuk ezeket a változásokat kimutatni, mert az antioxidáns enzimek génjei alacsony szinten fejeződtek ki, ezért a chip felületén nem érzékeltük indukciójukat sem.

1. táblázat

Hidegedzés során indukálódó és represszálódó gének árpanövényben. A transzkripcióban bekövetkezett változásokat egy 1500 árpa cDNS klónt tartalmazó biochipel elemeztük.

Név	ID	Rel.expr.	SE
APETALA2-like protein	HX01C17	0,652 ±	0,054
Aquaporin	Flon1H02	1,927 ±	0,121
Cell wall-associated hydrolase	HC03P03	0,604 ±	0,078
Chloride channel	HO17G16	0,717 ±	0,064
D subunit of Photosystem I	Flon1D10	3,002 ±	1,157
Glucan endo-1-3-beta-glucosidase	HP08M16	2,073 ±	0,154
Glutathione transferase	HQ01C03	0,609 ±	0,127
MYB transcription factor	HT08K15	0,719 ±	0,072
NBS-LRR disease resistance protein homologue	HO13E17	0,732 ±	0,047
NPK1-related protein kinase-like protein	HM10O10	0,637 ±	0,052
Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	HP10M10	1,516 ±	0,104
Photosystem II 44 kDa reaction center protein	HO15K23	0,328 ±	0,036
Photosystem II chlorophyll a-binding protein psbC precursor	HB25K03	0,382 ±	0,031
Polyubiquitin (ubq3)	HW05D19	1,782 ±	0,414
Probable Peroxidase	HA03D02	0,585 ±	0,079
Putative acid phosphatase	HW08E14	4,663 ±	2,120
Putative acid phosphatase	HW01P13	2,980 ±	0,376
Putative acid phosphatase (bci-3)	HX10I11	3,172 ±	0,792
Putative blue copper-binding protein	HA27O24	0,564 ±	0,080
Putative pollen allergen	HX06G03	0,567 ±	0,115
Putative receptor-type protein kinase LRK1	HO04F04	1,862 ±	0,339
Putative transcription factor NtWRKY4	HP11H01	0,658 ±	0,057
Ribulose-1-5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	HD11G07	2,473 ±	0,158
Senescence-associated Cystein-Protease	Flon1H01	4,602 ±	1,939
Thionin	HC14G11	0,564 ±	0,066
Thionin precursor	HC11E06	0,543 ±	0,063

Azt, hogy a kimutatott transzkripció változások szerepet játszhatnak-e a növények fokozott paraquat- és hidrogén-peroxid toleranciájában, később fogjuk elemezni.

Baek, K.-H. and Skinner, D.Z. (2003): Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Sci.* 165, 1221-1227.

Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzalez, K., Veisz, O. and Páldi, E. (2003): Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Sci.* 164, 301-306.

2. VIZSGÁLATOK DOHÁNY (*NICOTIANA TABACUM*) NÖVÉNYEKEN

2.1. Hidegelőkezelés hatása hiperszenzitív dohány-TMV gazda-parazita kapcsolatra

Dohány mozaik vírus (TMV) fertőzésével szemben hiperszenzitív nekrotizist adó dohányvonal (Xanthi-nc) egyedeit hidegstressznek tettük ki (1 nap - +15 °C, 6 nap - +10 °C), majd visszahelyeztük őket +22 °C-ra és néhány órával később TMV-vel inokuláltunk növényenként 2-2 azonos levélemeleten található levelet. A tüneteket 5 nappal később értékeltük. Kontrollként olyan Xanthi-nc dohánynövényeket fertőztünk, amiket folyamatosan +22 °C-on tartottunk.

Megállapítottuk, hogy a hidegelőkezelés jelentősen befolyásolta a TMV fertőzés nekrotikus tüneteit, azok fokozott mértékben jelentek meg az alacsony hőmérsékletnek kitett növényeken. A lézió átmérő szignifikánsan növekedett ($3,06 \pm 0,46$ mm) a hidegkezelésben nem részesült kontroll növények értékéhez képest ($2,27 \pm 0,34$ mm). A léziók száma is jelentősen megemelkedik (4. ábra).



5 °C-on tartott Xanthi-nc növények

22 °C-on tartott Xanthi-nc növények

4. ábra. Dohánynövények hidegelőkezelése fokozza a TMV nekrotikus lézióinak méretét rezisztens Xanthi-nc növényeken (a kép bal oldalán látható 3 növényt hidegelőkezelés után fertőztük a vírussal, a jobb oldali 3 növény viszont nem esett át hidegstresszen az inokuláció előtt).

2.2. Alacsony szalicilsav-szintű transzgenés Nah-G dohány hidegtűrésének vizsgálata

Ezzel a kísérlettel az volt a szándékunk, hogy a szalicilsav szerepét vizsgáljuk növények alacsony hőmérséklettel szembeni ellenállóságában. Janda és munkatársai (1999) korábban kimutatták azt, hogy a szalicilsav fokozza fiatal kukoricánövények hidegtűrését. Ebben a munkában *Pseudomonas putida*-ból származó szalicilsav-hidroxiláz gént kifejező transzgenikus dohánynövények (Nah-G dohány) hidegtűrését vizsgáltuk. A növényeket 6 napon keresztül hidegedzésnek tettük ki (1 nap - +15 °C, 5 nap - +10 °C), majd ezt követően 0 °C hőmérsékleten tartottuk őket. Kontrollként olyan vad típusú és Nah-G dohánynövényeket használtunk, amelyek nem estek át hidegedzésen, hanem amelyeket +22 °C-ról rögtön 0 °C-ra helyeztünk. A növények hidegellenállóságát a levelek klorofill fluoreszcencia indukciójának mérésével követtük nyomon.

Vizsgálatainkban nem tudtunk különbséget kimutatni a vad típusú és a Nah-G dohány hidegtűrése között. Mindössze magának a hidegedzésnek a jelentőségét sikerült igazolnunk, ami abban nyilvánult meg, hogy az

előzetes hidegdedzésnek kitett növények klorofill fluoreszcenciája kevésbé csökkent a 0 °C-os hidegstressz hatására, valamint gyorsabban regenerálódtak a +22 °C-ra való visszahelyezést követően.

Janda, T., Szalai, G., Tari, I. and Páldi, E. (1999): Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208, 175-180.

ÖSSZEFOGLALÁS

Tekintettel arra, hogy az eddig bemutatott kísérletek nagy részében abiotikus környezeti stresszek hatását vizsgáltuk növények betegség- és oxidatív stresszellenállóságára, tehát logikailag összetartoznak, ezért megpróbáljuk az eredményekből levonható következtetéseket összefoglalni.

Eredményeinkből (és korábbi vizsgálatokból) egyrészt jól látszik az, hogy a növényt ért abiotikus stressz képes toleranciát előidézni egy következő abiotikus stressz, vagy oxidatív stresszt okozó kémiai kezelés kedvezőtlen hatásaival szemben (dohány alacsonyhőmérsékleti stressz kísérlet, gabonafélék paraquat és hidrogén-peroxid kezelései kísérlete, valamint Janda et al. 2003). Ez a fajta védelem azonban növényi kórokozók fertőzésével szemben nem, vagy csak nagyon korlátozott mértékben hatásos, és ott is úgy tűnik legfeljebb abban az esetben, ha a behatoló kórokozó iránt a növény egyébként fogékony (enyhe mértékű ozmotikus stressz csökkentette fogékony Bezostaja-1 búzafajta érzékenységét a *Drechslera tritici-repentis* gomba fertőzésével szemben). Rezisztens növény-kórokozó kapcsolatok esetében viszont az előzetesen alkalmazott abiotikus stressz csökkentette a növény ellenállóságát, amit három kísérletben is megfigyeltünk (ozmotikus stressz hatása rezisztens M-3 búzagenotípus *Drechslera tritici-repentis* ellenállóságára, alacsony hőmérséklet hatása rezisztens Marshall búzafajta levélrozsda ellenállóságára és alacsony hőmérséklet hatása inkompatibilis Xanthi-nc dohány TMV ellenállóságára). Kísérleteink eredményei alapján nem tudunk egyelőre választ adni arra a kérdésre, hogy vajon a reaktív oxigén fajták anyagcseréje és az antioxidánsok működése milyen mértékben játszik szerepet ezekben a stressz-kölcsönhatásokban.

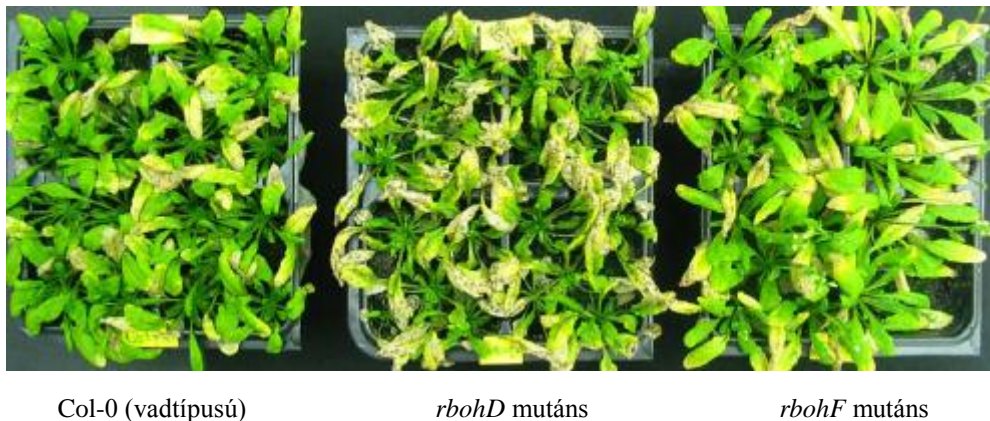
3. VIZSGÁLATOK *ARABIDOPSIS THALIANA*-VAL

3.1. NADPH-oxidázok által termelt reaktív oxigén fajták szerepe növény-gomba kölcsönhatásban

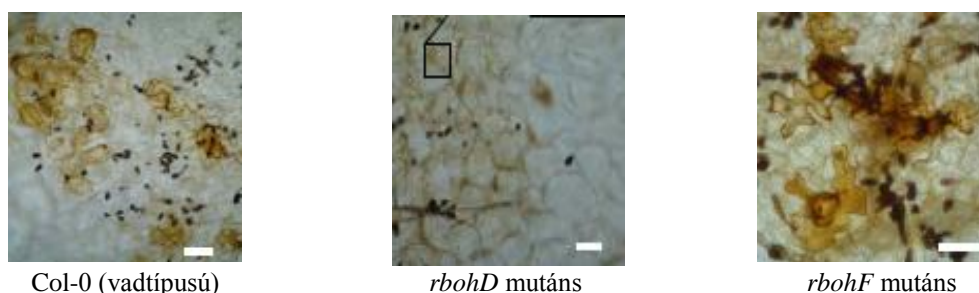
A humán neutrofil granulocita és makrofág fehérvérsejtek NADPH-oxidáz enzimkomplexét részben alkotó gp91^{phox} fehérjeegység génjének növényi ortológjai az *rboh* gének. Fehérjetermékeik (az RBOH enzimfehérjék) a sejtmembránban helyezkednek el, és kórokozók fertőzésekor reaktív oxigénfajtákat termelnek, amelyek a sejtközötti állományban halmozódnak fel. A kutatómunka arra irányult, hogy az RBOH NADPH-oxidáz enzimek kórfolyamatban játszott szerepét jobban megvilágítsuk. *Arabidopsis thaliana*-ban tíz *rboh* ortológot tartanak nyilván, a levelekben azonban ezek közül csupán kettő fejeződik ki mRNS szinten számottevő mértékben: az *rbohD* és az *rbohF*. A kísérletekben olyan két mutáns *Arabidopsis* genotípust használtunk, melyekben az *rbohD* illetve az *rbohF* gének nem expresszázódtak. A növényeket egy nekrotrof gombakórokozóval, az *Alternaria brassicicola*-val fertőztük.

Megállapítottuk, hogy az RBOHD fontos szabályozó szereppel bír a gomba fertőzése által előidézett növényi programozott sejthalál jelenségében. Az *rbohD* mutáns levelein a gomba által okozott nekrotikus tünetek gyorsabban jelentek meg és erősebbek voltak, mint a vad típusú (Col-0) növényeken, vagy az *rbohF* mutáns

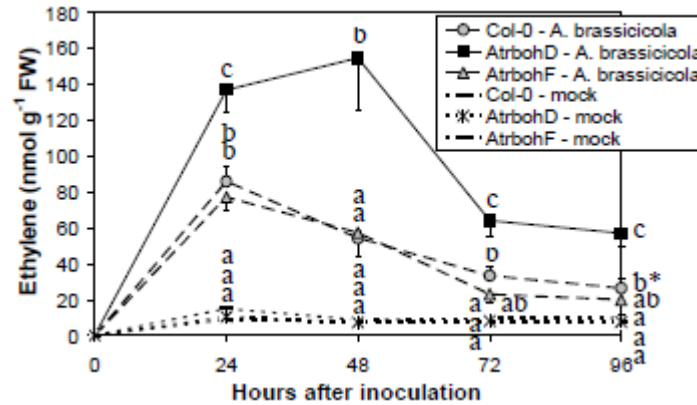
levelein (5. ábra). Ez arra utal, hogy az RBOHD fehérje működése szükséges a gomba okozta nekrotizisok terjedésének visszaszorításához. A fertőzött levelek infiltrálása reaktív oxigénfajták kimutatására alkalmas kémiai vegyülettel (3,3'-diaminobenzidine =DAB), majd a levelek mikroszkópos vizsgálata rávilágított arra a tényre, hogy a Col-0 növényekben (és az *rbohF* mutánsban) hidrogén-peroxid halmozódik fel a fertőzött sejtekben, míg az *rbohD* mutánsban ez a növényi válasz nem következik be, nyilvánvalóan az RBOHD fehérje működésének kiesése miatt (6. ábra). Kimutattuk azt is, hogy az RBOHD NADPH-oxidáz az etilén és a szalicilsav növényi hormonokkal kölcsönhatásban fejt ki szabályozó hatását a programozott sejthalálban (7. ábra). Végül felállítottunk egy új működési modellt arra vonatkozóan, hogy az RBOHD NADPH-oxidáz által termelt reaktív oxigén fajták hogyan fejthetik ki hatásukat *Arabidopsis*-ban, ha a növényt megtámadja egy nekrotrof gombakórokozó. A vizsgálatok eredményeit tartalmazó kézirat jelenleg bírálati szakaszban van. Az elvégzett kísérletek abba nyújtanak betekintést, hogy a reaktív oxigénfajták termeléséért felelős egyik legfontosabb enzimszisztéma (a sejtmembránban található NADPH-oxidázok) milyen feladatot tölt be a növényi sejt kórokozók fertőzésére adott válaszában. A kérdés azért jelentős, mert a reaktív oxigénfajták felhalmozódása számtalan növény-kórokozó kölcsönhatásban megfigyelhető, funkciójuk azonban vitatott.



5. ábra. *Alternaria brassicicola* gombafertőzés tünetei Col-0, *rbohD* és *rbohF* *Arabidopsis* növényeken 12 nappal az inokuláció után. A kórokozó nekrotikus tünetei az *rbohD* mutáns levelein (középen) lényegesen gyorsabban terjednek.



6. ábra. Hidrogén-peroxid felhalmozódás kimutatása DAB-festéssel *Alternaria brassicicola*-fertőzött *Arabidopsis* levelekben 3 nappal az inokuláció után. A vad típusú növényekben (Col-0) és az *rbohF* mutánsban a fertőzött sejtek intenzív hidrogén-peroxid felhalmozódást mutatnak, ami az *rbohD* mutánsban nem következik be.



7. ábra. *Alternaria brassicicola*-val fertőzött Col-0, *rbohD* és *rbohF* *Arabidopsis* növények etiléntermelése gázkromatográffal mérve. A gombafertőzés fokozott etilénképződést indukál mindhárom genotípusban, de az *rbohD* mutáns etilénkibocsátása nagyobb mértékben emelkedik, mint a másik két genotípusé.

3.2. NADPH-oxidáz és nitrogén-monoxid-szintáz mutáns *Arabidopsis thaliana* genotípusok hideg-ellenállóságának vizsgálata

A reaktív oxigén fajták (ROF) és a nitrogén-monoxid (NO) a növények stresszválaszának fontos, többnyire gyöktermészetű, jelátvivő tagjai. A ROF és az NO termeléséért felelős génekkel kapcsolatos ismereteink egyre inkább bővülnek. *Arabidopsis thaliana*-ban a NADPH-oxidázokat kódoló *rboh* (respiratory burst oxidase homologue) génekkel, illetve az *AtNOS1* (*AtNOA1*) génnel kapcsolatban bizonyított az, hogy közvetlenül vagy közvetve részt vesznek a ROF, és az NO képződésében (Torres et al. 2005, Guo et al. 2003). Kísérleteinkben olyan *Arabidopsis* mutánsokkal, és kettős mutánsokkal dolgoztunk, amikben az említett gének nem fejeződnek ki. Eredményeink arra utalnak, hogy az *AtNOS1* mutáns növények fejlődését jobban lelassítja tartós (több hetes) hidegkezelés (5 °C), mint a vad típusú növényekét, illetve ha idősebb korban helyezük őket alacsony hőmérsékletre, akkor kevesebb antocián vegyületet halmoznak fel. A NADPH-oxidáz mutáns növények esetében nem tapasztaltunk eltérést a vad típusú növényekhez képest.

Guo FQ, Okamoto M and Crawford NM (2003): Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302, 100–103.

Torres MA, Jones JDG and Dangl JL (2005): Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 37, 1130-1134.

A pályázat támogatásával készült közlemények listája:

Pogány M., von Rad U., Grün S., Dongó A., Bahnweg G., Barna B. and Durner J. (2009): Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria* pathosystem. *Plant Physiol.* submitted

Harrach B.D., Fodor J., Pogány M., Preuss J. and Barna B. (2008): Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* 121, 21-33.

Janda T., Cséplő M., Németh Cs., Vida Gy., Pogány M., Szalai G. and Veisz O. (2008): Combined effect of water stress and infection with the necrotrophic fungal pathogen *Drechslera tritici-repentis* on growth and antioxidant activity in wheat. *Cereal. Res. Commun.* 36, 53-64.

Künstler A., Király L., Pogány M., Tóbiás I. and Gullner G. (2007): Lipooxygenase and glutathione peroxidase activity in tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic virus. *Acta Phytopath. Ent. Hung.* 42, 197–207.

Pogány M., Harrach B.D., Hafez Y., Barna B., Király Z. and Páldi E. (2006): Role of reactive oxygen species in abiotic and biotic stresses in plants. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 41, 23-35.

Németh Cs., Cséplő M., Vida Gy., Bedő Z., Veisz O. (2006): Az abiotikus (szárazság) és a biotikus [*Pyrenophora (Drechslera) tritici-repentis* (Died.) Drechsler] stressz-ellenállóság kapcsolatának vizsgálata búzafajtákban. *Növénytermelés* 55, 141-151.

Pogány M., Harrach B.D. és Barna B. (2007): A növényi növekedésszabályozó anyagok szerepe a növény-kórokozó kölcsönhatásokban. *In: Gáborjányi, R. és Király Z. (Szerk.): Molekuláris Növénykórtan. Agroinform, pp. 305-312.*

Barna B., Pogány M. és Király Z. (2007): A növények fiziológiai állapota és a betegség- és stresszellenállóság összefüggése. *In: Gáborjányi, R. és Király, Z. (Szerk.): Molekuláris Növénykórtan. Agroinform, pp. 318-325.*