Enzimek szerepe a növények fertőzéssel szembeni védelmének hatástalanításában

Tárgyszavak: növény; kórokozó; fertőzés; szaponin; tomatináz enzim.

A növények fertőzés elleni védekezése és a kórokozók küzdelme a védelmi rendszer ellen

A növények fertőzéssel szembeni védelmének több módja van, pl. a szerkezeti gátak kialakulása vagy antimikrobiális szekunder metabolitok kialakítása. További védekező mechanizmusok is ismertek, pl. a lokális sejthalál (hiperérzékeny válasz). A kórokozók különféle stratégiákat használnak a szerkezeti vagy indukált védelmi rendszerek legyőzésére, pl. lebontják az antimikrobiális vegyületeket, esetleg olyan molekulákat termelnek, amelyek elnyomják az indukált védelmi mechanizmust. Az alábbiak olyan kétkomponensű mechanizmust mutatnak be, amelyben egy kórokozó gomba átalakítja a gazdaszervezetben előzőleg kialakult antimikrobiális vegyületet, és arra használja, hogy megzavarja az indukált védelmi mechanizmust. Első lépésben a gomba egy szaponin-detoxikáló enzimje hidrolizálja az antimikrobiális hatású szaponint. A hidrolízis bomlásterméke elnyomja az indukált védelmet azzal, hogy zavarja a rezisztenciát kiváltó alapvető jelátadási folyamatot.

A szaponinok és szerepük különféle növényekben

Sok burgonyaféle termel glikozilezett szteroidot és/vagy szteroid-alkaloid szaponint. A *Lycopersicon* fajokban, pl. a paradicsomban (*L. esculentum*) a fő szaponin az α-tomatin nevű gliko-alkaloid, amelynek erős gombaölő hatása van. A paradicsom levelét megtámadó gomba, a *Septoria lycopersici* tomatinázt, egy sejten kívüli enzimet termel, amely hidrolizálja a glükózt az α-tomatinról és β_2-tomatin képződik, amely jóval kevésbé gátolja a gomba növekedését. A *S. lycopersici* kevés tomatinázt termelő mutánsai szemmel láthatóan ugyancsak képesek betegséget okozni a növényben, de ezek sejthalált váltanak ki, ami a növény védelmi génjeinek nagyobb fokú expresszióját váltja ki a fertőzés kezdetén. Ez lehet, hogy a vad és a mutáns típus eltérő növekedé-

sére vezethető vissza. Azt is jelentheti viszont, hogy a tomatináz megzavarja a betegséggel szembeni rezisztencia kialakulását a növényben. Ennek ellenőrzésére megvizsgálták, hogy a *S. lycopersici* meg tud-e fertőzni egy másik burgonyafélét, a *Nicotiana benthamiana*-t, amely azért alkalmas a vizsgálatra, mert erre a növényfajra vírusindukált géncsendesítési módszert (VIGS) fejlesztettek ki.

Fertőzés mutáns gombatörzsekkel

Három *S. lycopersici* törzset (NEV, 16R és NY) oltottak *N. benthamiana* levelekre, amelyek mind terjedő betegséget és komoly szövetsérülést okoztak. A gomba a légzőnyílásokon keresztül fertőz, és a sejtek közötti térben szaporodik a mezofil szövetben, V alakú elágazásokat képezve, akárcsak a paradicsom esetében. A tomatinázban szegény NEV mutáns esetében nem alakult ki fertőzés a *N. benthamiana* levelén, bár festéssel ki lehet mutatni, hogy a fertőzés helyén lokális sejthalál alakul ki. A sejthalál 2 nappal a fertőzés után alakul ki, ami a hiperérzékeny válasz mechanizmusával összhangban van.

Két független tomatinázgént helyettesítő mutánssal és két ekotop transzformánssal végzett kísérletek azt bizonyították, hogy a megfigyelt hatások specifikus kapcsolatba hozhatók a tomatinázgén mutációjával, és nem egyéb mutációk következményei. Polimeráz láncreakcióval és reverz transzkripciós kísérletekkel azt is igazolni lehetett, hogy a tomatinázban szegény mutánsok a korai fertőzési fázisban a védekezéshez kapcsolódó gének nagyobb mértékű expresszióját eredményezték. A tomatináz távollétében a gomba nem tud szaporodni a *N. benthamiana* levelében, és csak lokalizált sejthalált vált ki.

Az indukált védekezési mechanizmus tanulmányozásakor kihasználták azt a tényt, hogy az SGT1 protein kulcsszerepet játszik a növények védekezési mechanizmusában a szignál-transzdukciós (jelátadási) folyamatban. VIGS vizsgálatokat végeztek, amelyben a *N. benthamiana* növényeket olyan dohány bronzfoltosság vírussal (TRV) fertőzték, amely a *N. benthamiana* SGT1 cDNS-ének 419 bázispárját tartalmazta (TRV:SGT). Az ellenőrző minták között voltak olyanok is, amelyeket nem inzertált TRV vírussal fertőztek (TRV:00), és amelyeket csak 0,01%-os Tween 80-as detergens oldattal kezeltek. 3 héttel később a növényeket a vad típusú *S. lycopersici* NEV törzzsel vagy a tomatinázban szegény NEV 2D2 törzzsel fertőztek meg.

A TRV:00-val kezelt, majd NEV törzs hatásának kitett minták esetében jelentkeztek a betegségtünetek, de ellenállóak voltak a 2D2 törzzsel szemben. A 2D2 mutáns szövet-nekrózist okozott az SGT1 génre nézve elcsendesített növényekben, és a fertőzés korai fázisában a kórokozó behatolt a légzőnyílásokon keresztül, és anélkül növekedett a mezofil sejtek körül, hogy kiváltotta volna a sejthalált. Ez azt bizonyítja, hogy az a hiperérzékenység jelensége, amelyet a 2D2-vel megtámadott *N. bethamiana* növényen megfigyeltek, az

SGT1-től függött. Ebből arra lehet következtetni, hogy a tomatinázban szegény mutánsok szaporodásának gátoltsága a vad típusú *N. benthamiana* levelein nem a gazdanövényben levő antibiotikumokkal vagy táplálékhiánnyal magyarázható, és a tomatináznak valamilyen más szerepe van a betegség kialakulásában.

A fertőzés mechanizmusának kutatása

Mivel a *N. benthamiana* leveleiben a *S. lycopersici* intracellulárisan (sejten belül) nő, a tomatináz pedig sejten kívül ható enzim, megvizsgálták az apoplasztikus nedvek tomatináz-aktivitását, amelyeket 6-192 órával a fertőzés után nyertek a levelekből. Az enzimaktivitást jól lehetett detektálni a vad típusú *S. lycopersici* NEV törzzsel fertőzött leveleken 12 órával a fertőzés után, de nem jelentkezett a csak detergenssel kezelt, vagy a tomatinázszegény mutánssal előkezelt minták esetében. Vagyis a tomatináz a *N. benthamiana* vad típusú *S. lycopersici*-vel történő fertőzése során ürül az apoplasztikus folyadékba. A tomatináz szerepének pontosabb megértése érdekében a leveleket beáztatták vízbe, tisztított tomatinázba, és β_2-, valamint α-tomatinba, majd 30 perccel később vad típusú *S. lycopersici* NEV törzzsel, vagy a tomatinázban szegény 2D2 mutáns NEV törzzsel megfertőzték őket. Azok a levelek, amelyeket tisztított tomatinázzal vagy β_2 tomatinnal kezeltek, érzékenyek voltak a tomatinázszegény törzzsel való fertőzésre, az α-tomatinnal kezeltek viszont rezisztensek maradtak. A vad típusú *S. lycopersici* NEV törzs minden levélen betegségtüneteket mutatott. Azok a levelek, amelyeket előzőleg beáztattak a tisztított vegyületek vizes oldatába, de amelyeket fertőzés helyett csak Tween 80 oldattal kezeltek, egészségesnek tűntek, az α-tomatinnal kezeltek kivételével, amelyek a kezelt területen enyhe klorózisos tüneteket mutattak. Ebből arra következtettek, hogy a β_2-tomatinnal való előkezelés lehetővé teszi a 2D2 törzs növekedését a *N. benthamiana* levelein, az α-tomatin viszont nem. Ebből az következik, hogy a tomatináz hatását a fertőzésre az enzimatikus hidrolízis termékei okozzák, és nem maga az enzim. Mivel ezek a termékek az apoplasztban keletkeznek, a védekezési mechanizmus elnyomásához jelátadási mechanizmusra van szükség, amely az apoplasztból átviszi a jelet a növényi sejtek belsejébe.

A tomatináz szerepének újragondolása

A tomatinázt hagyományosan olyan detoxikáló enzimként tartották számon, amely lehetővé teszi a gombák növekedését a növényben azáltal, hogy hatástalanítja a növényben képződött antibiotikumot. Az is elterjedt vélemény

volt, hogy ezek a vegyületek passzív védelmi vonalat képeznek a növények külső rétegében. Az itt leírt eredmények arra utalnak, hogy a tomatináznak kettős hatása van, és szerepe nem csupán annyi, hogy a szaponint detoxikálja, hanem segít elnyomni a növény alapvető rezisztenciafolyamatát is. A *N. benthamiana* nem termel α-tomatint és szaponintartalmát nem vizsgálták. Egyéb *Nicotiana* fajok azonban szintetizálnak szteroid glikoalkaloidokat és szteroid szaponinokat. Ismerve a tomatináz szubsztrátumspecificitását meg lehet jósolni, hogy a *N. benthamiana* endogén szubsztrátuma egy szteroid glikoalkaloid vagy egy glikozilezett szteroid lehet, amelynek terminális helyzetében D-glükóz molekula van. Jelenleg folyik ennek a vegyületnek az azonosítása. Fontos lesz megvizsgálni, hogy más kórokozók, esetleg szimbionták is használnak-e hasonló mechanizmust a gazdanövényben történő szaporodásuk elősegítésére.

(Bánhegyiné Dr. Tóth Ágnes)

Bouarab, K.; Melton, R. stb.: A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. = Nature, 418. k. 6900. sz. 2002. aug. 22. p. 889–892.

Austin, M. J.: Regulatory role of SGT1 in early *R* gene-mediated plant defences. = Science, 292. k. 5552. sz. 2002. jan. 4. p. 2077–2080.

Azevedo, C.: The RAR1 interactor SGT1, an essential component of *R* gene-triggered disease resistance. = Science, 292. k. 5552. sz. 2002. jan. 4. p. 2073–2076.