

Harpin fehérjék a növényvédelemben

Czobor Ádám – Hajdinák Péter

Összefoglalás

A mezőgazdaság számára jelentős problémát okoz a növények bakteriális, gombás, vírusos és egyéb kártevőkkel történő fertőződése. Ezek ellen jelenleg főleg kémiai növényvédőszerrel védekezünk, amelyek egy része súlyos és hosszú távú környezeti hatásokat okozhat. Több törekvés irányul arra, hogy a hagyományos növényvédőszerrel környezetbarát biopeszticidekre cseréljük. A környezetkímélő megoldások egyik ígéretes vonala lehet az elicitor (aktivációs szignál) hatású harpin fehérjék alkalmazása. Harpin fehérjék segítségével számos növényben ki lehet váltani rezisztenciát rovarokkal, vagy éppen bakteriális eredetű fertőzésekkel szemben, de alkalmasak lehetnek a növények növekedésének, termés hozamának javítására is. Ennek hátterében az elicitor által kiváltott biotikus stressz áll, amely során a szignálként is funkcionáló reaktív oxigénvegyületek mennyisége hirtelen megemelkedik, ezzel beindítva a növényi immunválaszt, így a környezet elhanyagolható mértékű terhelése mellett fokozható a növény vitalitása.

A ROS és az antioxidáns rendszer egyensúlya

A molekuláris oxigén számos biokémiai reakcióban elektron akceptorként vesz részt, így fontos szerepet játszik az aerob élőlények metabolismusában. Felhasználása azonban veszélyeket is rejt, mivel a növények által felhasznált oxigén közel 1%-ából reaktív oxigénvegyületek (*Reactive Oxygen Species*, ROS) keletkeznek (Bhattacharjee, 2012). A reaktív oxigénvegyületek oxigéntartalmú molekulák és szabadgyökök, amelyek erősen reaktívak, és ezáltal toxikusak az élőlények számára. Legfontosabb képviselői a szuperoxid gyök ($O_2^{\bullet-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a

hidroxilgyök ($OH^{\bullet}$), valamint a szinglet oxigén (1O_2). Reaktív oxigénvegyületek keletkezhetnek a növényi sejtek normális működése során, például a fotoszintézis és a glikolízis melléktermékeként, valamint abiotikus és biotikus stressz hatására. Akkumulációjuk oxidatív stresszt okoz a sejtekben, amely során károsodhatnak a sejt fehérjéi, lipidjei, szénhidrátjai, valamint DNS állománya (Gill & Tuteja, 2010).

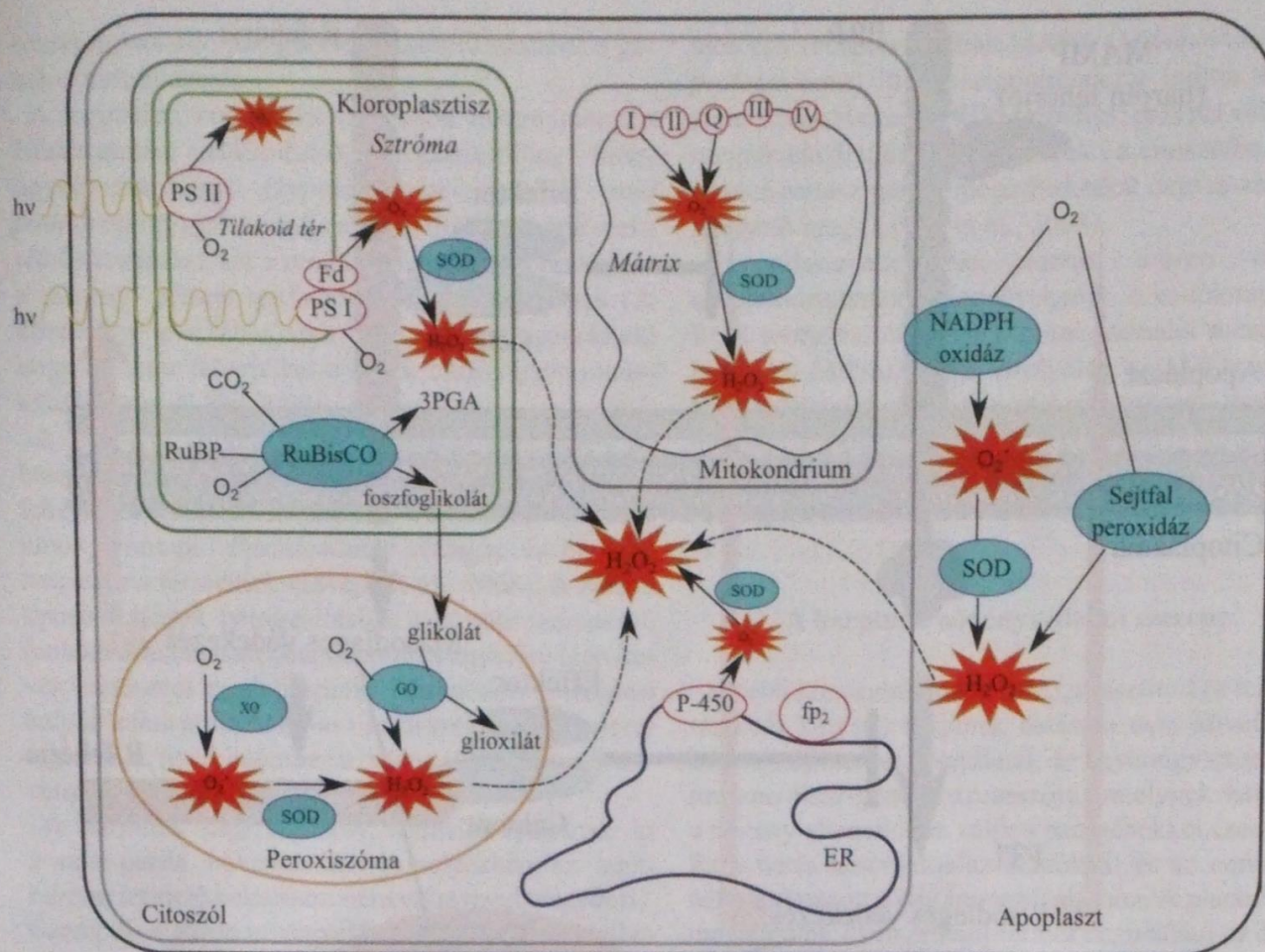
Fotoszintetizáló növényekben, világosban a ROS legfőbb forrás helye a kloroplasztisz és a peroxiszóma, míg sötétben és nem-zöld szövetekben a mitokondrium (Foyer & Noctor, 2003; Rhoads et al., 2006; Schmitt et al., 2014; Tripathy & Oelmüller, 2012). Ezeken kívül keletkezik ROS az endoplazmatikus retikulumban, a glioxiszómában, a membránlipidek peroxidációjával, a sejtmembránban található NADPH-oxidáz, valamint a sejt falban lévő oxidázok és peroxidázok működéséről is (Bhattacharjee, 2012). Fontos, hogy a növényi sejtek képesek legyenek védekezni mind a nyugalmi állapotban keletkező, mind a stressz hatására megnövekedett mennyiségű ROS káros hatásai ellen. Ilyen védelmi mechanizmusok megtalálhatók mind az egyes ROS termelő organellekben (pl.: mitokondrium), mind sejt szinten. A fent említett feladatot az úgynevezett antioxidáns védelmi rendszer látja el, melynek tagjai két fő részre oszthatók: enzimatisz antioxidánsok és nem enzimatisz antioxidánsok (**1. táblázat**). A ROS és az antioxidánsok adott körülmények közötti megfelelő egyensúlya létfontosságú a növények számára (Gill & Tuteja, 2010).

ROS a patogének elleni küzdelemben

Növény-patogén kölcsönhatás esetén létrejövő biotikus stressz során az egyik legkorábbi sejtválasz az úgynevezett oxidatív kitörés (*oxidative burst*), amely a reaktív oxigénvegyületek szintjének hirtelen

1. táblázat: A növényi antioxidáns rendszer elemei

Enzimatisz antioxidánsok	Nem enzimatisz antioxidánsok
szuperoxid diszmutáz	C-vitamin (aszcorbinsav)
kataláz	glutathion
aszcorbát peroxidáz	prolin
monodehidroaszcorbát reduktáz	α -tokoferol
dehidroaszcorbát reduktáz	karotinoidok
glutathion reduktáz	flavonoidok
glutathion peroxidáz	
glutathion S-transzferáz	
gvajakol peroxidáz	



1. ábra: ROS források a növényi sejtekben

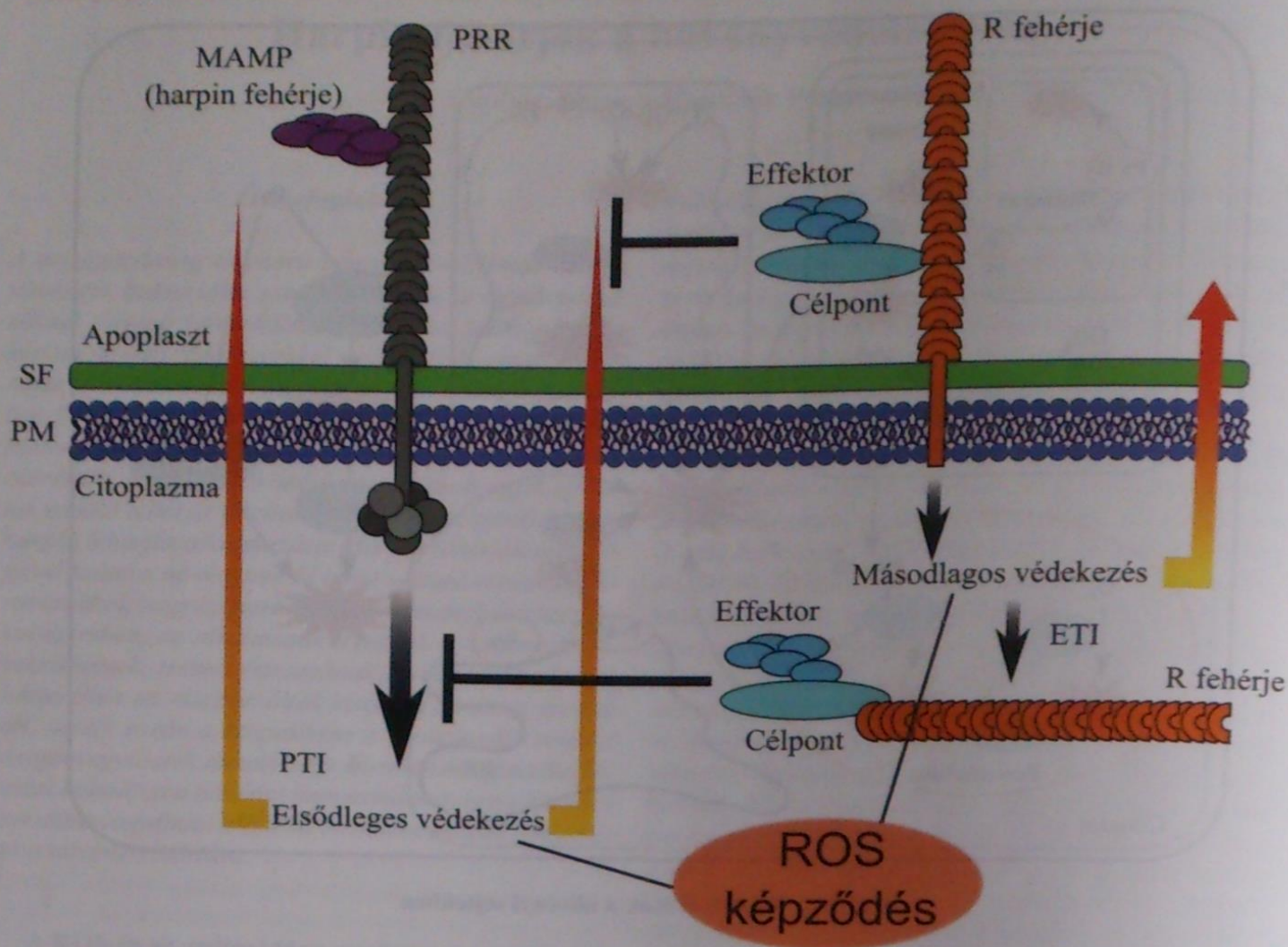
emelkedésével jár. A folyamatért főként a plazmamembránban elhelyezkedő NADPH-oxidázok működése felelős (1. ábra) (Bhattacharjee, 2012). A kitörés során keletkező reaktív oxigénvegyületek kettős védelmi szerepet töltenek be. Akkumulációjuk nagy reaktivitásuknak köszönhetően közvetlenül károsítja a patogént, ezen felül szignálmolekulaként is funkcionálnak, ezáltal részt vehetnek további védekező mechanizmusok beindításában, amelyek további ROS képződéssel járhatnak. A szignálok hatására indukálódó változatos természetű reakciók irányulhatnak a homeosztázis visszaállításában segédkező enzimek (antioxidáns termelő és regeneráló, javító és védő hatású enzimek) expresszió-, illetve aktivitás növelésére, megfelelően magas ROS szint esetén a programozott sejthalálhoz vezető kaszkád beindítására, illetve a fizioológiától eltérő, magas ROS szint fenntartására. A reaktív oxigénvegyületek emelkedett szinten tartása segít a növénynek a patogén elleni küzdelemben, míg a programozott sejthalál beindítása igen fontos védelmi eszköz erőteljes stresszhatás esetén. Azzal, hogy a stressznek leginkább kitett sejtek „elpusztítják magukat”, a növény egészére nézve csökkenthetők az elszennvedett károk. A védelmi szerep ellátásához elegendő, de a gazdasejt számára nem fatális mennyi-

ségű ROS szint fenntartásához az antioxidáns rendszernek reagálnia kell (Bhattacharjee, 2012; Gill & Tuteja, 2010).

A növényi immunválasz

A növények – csakúgy, mint minden más többsejtű organizmus a Földön – különféle fertőzéseknek vannak kitéve, amelyekkel szemben elengedhetetlen a védekezés. A növények immunrendszere két védelmi vonallal rendelkezik, és mindkettőben fontos szerep jut a már említett oxidatív kitörésnek (Bhattacharjee, 2012).

Az első védelmi vonal a patogénekben lévő bizonyos molekulárszkeletonoknak, az ún. MAMP/PAMP-oknak (*microbe/pathogen-associated molecular patterns*, mikrobához/patogénhez kapcsolt molekuláris mintázat) a növény általi felismerése révén kiváltott immunreakció. A MAMP megfelelő receptorok (*pattern recognition receptor*, PRR) általi érzékelése után igen gyorsan beindul a ROS termelés, és kis amplitúdóval, viszonylag rövid ideig tart. Szerepe kettős: az ekkor termelt ROS egyrészt szignálként funkcionál a további immunreakciók beindításához, másrészt károsítja a patogént. Ilyenkor a ROS termelésért főleg a plazma-



2. ábra: A növényi immunrendszer két védelmi vonala

membránban elhelyezkedő NADPH-oxidázok felelősek, amelyek a sejtben lévő NADPH oxidációjával és az apoplasztban található molekuláris oxigén redukciójával szuperoxid gyököket állítanak elő, amelyek gyorsan hidrogén-peroxiddá alakulnak spontán módon vagy szuperoxid-diszmutáz enzim katalizálta reakcióban. Ezt az immunreakciót „*pattern-triggered immunity* (PTI)”-nek nevezzük (2. ábra).

Az evolúció során bizonyos patogének alkalmazkodtak ehhez a védekezési mechanizmushoz, és olyan effektorok termelésébe kezdtek, amelyek a sejtbe jutva elnyomják a PTI-t. Ennek ellensúlyozására második védelmi vonalként megjelentek az R fehérjék (*plant resistance proteins*, R proteins) a növényi sejtekben, amelyek feladata a patogén által termelt effektorok felismerése, és ezáltal a megfelelő válaszreakciók beindítása, amelyeket együttesen „*effector-triggered immunity* (ETI)”-nek nevezünk (2. ábra). Ilyen esetben kétfázisú oxidatív kitörés figyelhető meg. Az első fázis gyors, kis amplitúdójú (feltehetőleg szintén MAMP felismerése váltja ki), míg a második szakasz

hosszú időtartamú és magas intenzitású. Az ETI során a NADPH-oxidázok mellett az egyéb intracelluláris ROS források is szerephez jutnak. Az effektorok által kiváltott reakciósorozat leggyakrabban hiperszenzitív sejtthalálhoz vezet, amelynek pontos módja a felismert effektortól függően más és más lehet (de Wit, 2007) *plants recognize microbe-associated molecular patterns* (MAMPs).

A harpin fehérjék

A bakteriális virulencia faktorok genetikai elemzése kimutatta, hogy a patogén baktériumokat az különbözteti meg nem patogén társaiktól, hogy úgynevezett patogenitási géneket tartalmaznak. Ezek a gének gyakran úgynevezett „patogenitási szigetekbe” szerveződve találhatók a genomban, amely valószínűleg annak köszönhető, hogy az evolúció során horizontális géntranszferrel kerültek az adott baktériumba. Ezt a feltevést alátámasztja, hogy egymással távoli

rokonságban álló patogének is hasonló virulencia géneket tartalmaznak.

A leginkább konzervált (azaz sok növénypatogén baktériumban előforduló), megközelítőleg hús-, úgynevezett *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*) gén kódolja a III-as típusú fehérje szekréción rendszerét. Ez a rendszer fehérjecsatornát alkot a növényi célsejt sejtfalában és membránjában (3. ábra), így téve lehetővé a bakteriális patogéneknek, hogy effektor fehérjeiket a sejtek citoszóljába juttassák (Büttner & He, 2009).

A harpinek olyan savas, hőstabil, glicinben és leucinban gazdag fehérjék, amelyeket III-as típusú fehérje szekréción rendszerrel rendelkező baktériumok, mint pl.: *Pseudomonas syringae* és *Erwinia amylovora* termelnek (Livaja et al., 2008). A harpin típusú fehérjék patogenitásban betöltött szerepéről, molekuláris hatásmechanizmusáról egyelőre igen kevés ismerettel rendelkezünk. Fertőzéskor működési helyük a fent említett III-as típusú szekréción rendszer csatornája, így feltehetően a bakteriális effektorok növényi sejtbe juttatásában vesznek részt.

A harpinek hiperszenzitív sejthalált váltanak ki a nem-gazda növényekben (amelyekben az adott harpint termelő baktérium nem okoz megbetegedést). Szerepük a gazda növényekben egyelőre tisztázatlan (Livaja et al., 2008).

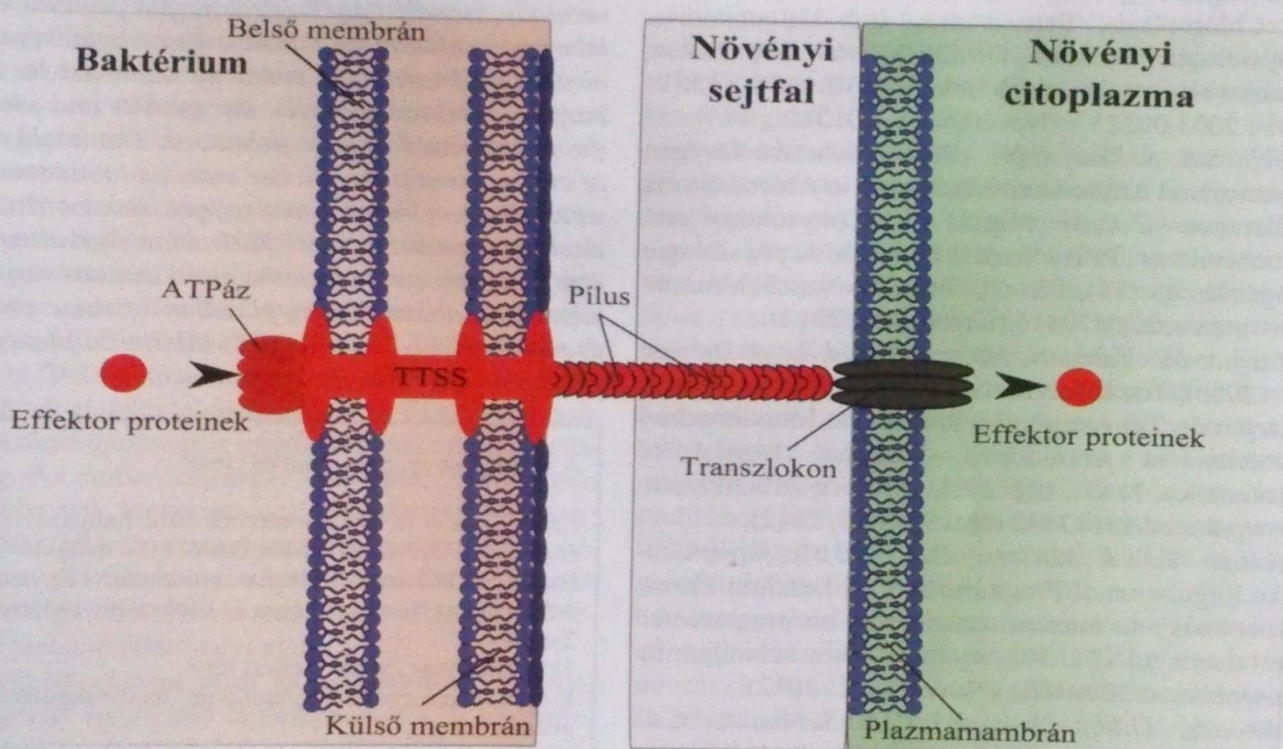
A harpineket a növényi sejtek receptorai PAMP-ként ismerik fel, miután a fehérje a plazmamembránhoz kötődött. A sejthalálhoz vezető reakciókat ezt köve-

tően egy receptor-mediált MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) függő szignálrendszer indítja. Ennek során megnövekedett ROS termelés, erős pH változás, megnövekedett kalcium beáramlás a citoszólba, és az immun-válasz gének megnövekedett expressziója figyelhető meg (Livaja et al., 2008).

A válaszreakciókban fontos szerep jut a mitokondriumnak. Megnövekedik a mitokondriális ROS termelés, csökken a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$), ebből kifolyólag az ATP termelés. Ezen felül megfigyelhető a citokróm c gyors citoszólba juttatása a mitokondriumból, amelyet a programozott sejthalál előszobájaként tartanak számon (Reape & McCabe, 2010).

A harpinek növényvédelmi szerepe

Kisebb koncentrációban (nM), a tisztított (a termelő törzsből kinyert) harpinek hatására nem következik be szükségszerűen a sejthalál, de ugyanúgy megnő az immunválasz-gének expressziója, amelynek hatására a növény ellenállóbbá válik a patogénnel szemben. Ez a hatás hasonlatos az állatoknál és az emberek-nél alkalmazott aktív immunizáláshoz. A piacon már megjelentek ilyen jellegű termékek, például az Eden Bioscience Messenger® STS nevű növényvédő szere, amely 3% harpin fehérjét tartalmaz aktív összetevőként (Livaja et al., 2008). A patogén támadással szembeni védelem felül a harpinokkal kezelt növényekben



3. ábra: A III-as típusú szekréción rendszer (TTSS)

számos előnyös hatás figyelhető meg, mint például a növény nagyobb terméshozama és intenzívebb növekedése, amely a gyártók által megadott adatok szerint akár 10-30% növekményt is jelenthet. A fent említett hatások miatt a harpinek ígéretes biopeszticidek lehetnek.

A harpin tartalmú permetszerek az Amerikai Környezetvédelmi Hatóság (*United States Environmental Protection Agency*) tanúsítványai szerint nem károsak környezetre és az emberi egészségre, valamint gyors felszívódásuknak köszönhetően akár 24 órával a betakarítás előtt is alkalmazhatóak. További előnye a hagyományos peszticidekkel szemben, hogy az aktív összetevő (harpin fehérje) a növény immunrendszerét indukálja, nem pedig a patogént támadja, így a rezisztencia kialakulásának esélye jóval kisebb.

Irodalomjegyzék

Bhattacharjee, S. (2012): The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Journal of Botany*, 2012: 22.

Büttner, D. & He, S.Y. (2009): Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant physiology*, 150 (4), 1656–64. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2719110&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (August 19, 2014).

Foyer, C.H. & Noctor, G. (2003): Redox Sensing and Signalling Associated with Reactive Oxygen in Chloroplasts, Peroxisomes and Mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119 (3), 355–64. <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x> (November 5, 2012).

Gill, S.S. & Tuteja, N. (2010): Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 48 (12), 909–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870416> (October 27, 2012).

Livaja, M., Palmieri, M.C., von Rad, U. & Durner, J. (2008): The Effect of the Bacterial Effector Protein Harpin on Transcriptional Profile and Mitochondrial Proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of proteomics*, 71 (2), 148–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617142> (November 5, 2012).

Reape, T.J. & McCabe, P.F. (2010): Apoptotic-like Regulation of Programmed Cell Death in Plants. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 15 (3), 249–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20094801> (November 1, 2012).

Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C. & Siedow, J.N. (2006): Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress

and Interorganellar Signaling. *Plant physiology*, 141 (2), 357–66. <http://www.plantphysiol.org/content/141/2/357.full> (November 5, 2012).

Schmitt, F.J. et al. (2014): Reactive Oxygen Species: Re-Evaluation of Generation, Monitoring and Role in Stress-Signaling in Phototrophic Organisms. *Biochimica et biophysica acta*, 1837 (6), 835–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530357> (July 29, 2014).

Tripathy, B.C. & Oelmüller, R. (2012): Reactive Oxygen Species Generation and Signaling in Plants. *Plant signaling & behavior*, 7 (12), 1621–33. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3578903&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

De Wit, P.J.G.M. (2007): How Plants Recognize Pathogens and Defend Themselves. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 64 (21), 2726–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17876517> (November 5, 2012).

Harpin proteins in plant protection

Á. Czobor – P. Hajdinák

The infection of plants by bacterial, viral and fungal agents or other pests is still a severe problem in the agriculture. Presently, the main method to protect the plants, are the chemical pesticides, which could have serious and long term environmental effects. There are many attempts to change these traditional chemicals to biopesticides. The promising, environmentally friendly PAMP-effect harpin proteins could be a great solution for this. Resistance against insects or bacterial infections could be achieved by these harpin proteins, moreover the growth and yield of the plants could be also enhanced. The background of this reaction is the elicitor induced biotic stress, in which the level of reactive oxygen species (ROS) is increased suddenly. These ROS act as signalling molecules, which can induce the plant immune response, mentioned above. The application of these proteins grants increased vitality and viability to plants with negligible effects to the environment.

A szerzők neve, beosztása és címe:

Czobor Ádám II. évf. Biomérnök MSc hallgató
Hajdinák Péter II. évf. Biomérnök MSc hallgató
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi
Tanszék
1111 Budapest, Szent Gellért tér 4.
E-mail: adam.czobor@gmail.com; hajdinakpeter@gmail.com