

**POLLEN-SPÓRA INTERAKCIÓ VIZSGÁLATA *BOTRYTIS*
CINEREA KÓROKOZÓN: EGY ÚJ MEGKÖZELÍTÉS
ELŐZETES EREDMÉNYEI**

Kocsis Ivett - Petróczy Marietta - Markó Gábor*

MATE Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszék

*ivett.kocsis95@gmail.com

Összefoglalás

A pollen-spóra interakciót meghatározó háttérmechanizmusokra eddig kevés figyelem irányult. Ezeket a hatásokat részben a mikrobiális kémiai kommunikáció jelensége magyarázhatja. Jelen munka részletesebb, feltáró kutatásunk legfontosabb kezdeti lépéseit kívánja bemutatni. Elővizsgálatunk legfőbb célkitűzése volt, hogy validáljuk az alkalmazott módszertant, illetve teszteljük a konídiumok csírázását befolyásoló legfontosabb tényezőket. A vizsgálat során modellszervezetként a *Botrytis cinerea* növénypatogén gombát választottuk. Kezdeti eredményeink arra utalnak, hogy az alkalmazott módszertan alkalmas a konídiumok kezdeti fejlődésének nyomon követésére. Jelentős különbséget figyeltünk meg a kivonatok típusával kapcsolatban, aminek számottevő idő- és koncentrációfüggő hatása van. Mindez arra utalhat, hogy a *Botrytis cinerea* kórokozó konídiumainak fejlődését olyan szabályozó molekulák befolyásolják, amelyek analóg hatásúak lehetnek a növényi pollenekben található stimulator vegyületekkel.

Kulcsszavak: mikrobiális kommunikáció, quorum sensing, spektrofotometria

Abstract

There is little attention on the spore-pollen interaction, especially their background mechanisms, which microbial communications might partially explain. In this pilot study in *Botrytis cinerea*, we will show some first primary results, such as methodological validation and the role of some influencing factors. The preliminary results suggested valid methodological background to measure the initial growth of conidia development. Furthermore, we obtained a significant difference for the type of extract, which has a detectable time- and concentration-dependent effect. Summarizing, these results may indicate that the development of the pathogenic conidia of *B. cinerea* is influenced by certain regulatory molecules, which may have an analogous biological effect on the stimulatory compounds found in plant pollens.

Keywords: microbial communication, quorum sensing, spectrophotometry

Bevezetés

A légmozgással terjedő növényi pollenek és növénypatogén gombák spórái megfelelő körülmények között nagy mennyiségben kiülepedhetnek különböző növényi felszíneken (pl. kéreg, termés) (Song és mtsai., 2014). Ezekben a természetes pollencsapdákban a felhalmozódott növényi pollenek csapadékkal keveredve ideális közeget biztosítanak az ugyanitt kiülepedett gombaspórák kezdeti fejlődéséhez (Hennebert, 1973). A növénypatogén gombák és a növényi pollenek közötti interakció kutatottsága ellenére (Ogawa és English, 1960) ezidáig csak kevés figyelem összpontosult a serkentő hatást kiváltó háttérmechanizmusokra (Kocsis és mtsai., 2022), amelyet részben magyarázhat a növénypatogén szervezetek között leírt mikrobiális kommunikáció (az ún. „quorum sensing”, QS) jelensége (Padder és mtsai., 2018).

A QS során a mikrobiális szervezetek bizonyos önszabályozó molekulákat választanak ki, amelyek az egyedsűrűség növekedésével felhalmozódnak, így lokálisan érzékelhetik a hasonló

szervezetek denzitását (Mehmood és mtsai., 2019). A szabályozó molekulák hatására a biológiai szervezetek megváltoztatják az addigi életműködésüket, így módosulhat a szaporodásuk, szinkronizálhatják a konídiumok tömeges csírázását (Barriuso, 2015; Lindsay és mtsai., 2012; Padder, 2018; Sato és mtsai., 2004). A QS vegyületek mennyisége az idő és az inokulumok mennyiségének függvényében is változhat (Rosero-Hernández és mtsai., 2020). Elővizsgálatunk során azt feltételeztük, hogy a növénypatogén gombák spórái is kémiai jelek segítségével kommunikálnak egymással, amely hatást a növényi pollenekből diffundáló anyagok pozitívan befolyásolhatják. A vizsgálatunk modell organizmusa a szőlő szürkerothadás betegség kialakulásáért felelős gomba, a *Botrytis cinerea* Pers., amelynek konídiumai a levegőben terjedhetnek és a növényi pollenek mellett természetes pollenspadákban kiülepedhetnek. Jelen kutatásunk során célul tűztük ki az alábbi összefüggések tesztelését: 1) összefügg-e a *Botrytis cinerea* konídiumok csírázási aránya, valamint a csíratömlők átlagos mérete azok abszorbancia szintjével?; valamint 2) milyen tényezők befolyásolják a konídiumok csírázását? A kérdés kapcsán teszteljük a kivonatok típusát, koncentrációját, oldási idejét és időbeli dinamikáját.

Anyag és módszer

Pollen és konídium szuszpenzió előállítása

A pollen szuszpenzió elkészítéséhez napraforgó (*Helianthus annuus*) pollen és steril desztillált víz hozzáadásával két párhuzamos hígítási sort készítettünk (0, 500.000 és 1.000.000 pollen/ml). Az első hígítási sort 20, a második hígítási sort 2 órán keresztül oldottuk vízben. Az oldási idő letelte után az oldatot alacsony fordulatszámon centrifugáltuk, majd a felülúszót a méréshez pipettáztuk. A konídium szuszpenzió előállításához konídiumokat emeltünk le mesterségesen fertőzött szőlőfürt felületéről, majd a fent ismertetett módszerrel hígítási sort készítettünk.

Konídiumok csírázásának nyomon követése

Mérés során friss *Botrytis cinerea* konídiumokat kezeltünk különböző összetételű (kivonat típusa: pollen, konídium), és koncentrációjú (koncentráció: 0, 500.000, 1.000.000 db pollen vagy konídium/ml), valamint különböző ideig oldott (oldási idő: 2 és 20 óra) vizes kivonatokkal. A kivonatok már sem pollent, sem konídiumot nem tartalmaztak. A friss *B. cinerea* konídium szuszpenzió koncentrációja 1.000.000 konídium/ml volt. A konídiumok csírázásának méréséhez MultiScan FC típusú spektrofotométert használtunk (Hernandez és mtsai., 2007), amely a fény elnyelésén keresztül határozza meg a microplate lemez mintahelyeiben található oldatok sűrűségét. A konídiumok csírázási és növekedési aránya tükrözi az áteresztett fény mennyiségét (abszorbancia, transzmisszió). A spektrofotométeres méréseket követően validációs vizsgálatokat végeztünk. Minden kezelésből 50 konídiumot vizsgáltunk és értékeltük a csírázás mértékét egy 0-6-ig terjedő skálán (0: nem csírázik, 1-6: csíratömlő hossza a konídium hosszához képest).

Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzésekhez a konídiumok csíratömlőjének átlagos méretét használtuk. Általánosított lineáris modell (gamma eloszlás) segítségével teszteltük a spektrofotométer által mért abszorbancia értékek összefüggését a konídiumok csírázási arányával, valamint a konídiumok csíratömlőjének átlagos méretével. A modellben függő változóként szerepelt az abszorbancia érték, magyarázóváltozóként a csírázási arány, valamint az átlagos csíratömlő méret. Lineáris kevert modell segítségével teszteltük a kivonat típusa, a koncentráció és az oldási idő hatását a csíratömlők átlagos méretére, míg random faktorként a minták azonosítója szerepelt a modellben. Minden statisztikai elemzést R programkörnyezetben futtatunk.

Eredmények

A konídiumok fejlettségi állapotával kapcsolatos változókat (csírázási arány, csíratömlő átlagos mérete) az abszorbanca értékek igazolhatóan tükrözik. A konídiumok fejlődését több tényező is befolyásolta. A konídiumok alacsonyabb mértékben csíráztak konídiumkivonat hatására a pollenkivonathoz képest. Az idő és a koncentráció függvényében növekvő abszorbanca értékeket kaptunk. Kimutatható hatást váltott ki a kivonat típusa a koncentrációval, valamint az idővel alkotott interakciója is, azaz az egyes kivonat típusok eltérő időbeli és koncentrációbeli növekedési mintázatot indukálnak. Mindezekkel szemben az oldási idő nem befolyásolta a csíratömlők fejlődését.

Eredmények értékelése

Elővizsgálatunk egyik kiemelt célkitűzéseként igazoltuk, hogy spektrofotometriás méréssel megbízhatóan nyomonkövethető a konídiumok csírázása, így a módszer alkalmas a gombák kezdeti fejlődésének nyomon követésére. Kutatásunk másik fontos célkitűzése a különböző, a konídiumok kezdeti fejlődését befolyásoló hatások megismerése volt. Eredményeink igazolják, hogy a kivonatok befolyásolják a *Botrytis cinerea* konídiumok csírázását, amelyek sajátos idő- és koncentrációbeli mintázatot adnak a kivonat típustól függően. A pollenkivonat jelentősebb serkentő hatása miatt azt feltételezzük, hogy több stimulátor anyagot tartalmaznak a konídiumokhoz képest. Továbbá a kivonatok oldási ideje nem befolyásolta jelentős mértékben a konídiumok csírázását, ami feltehetően azt jelenti, hogy a csírázásserkentő anyagok kioldódása, a pollenek és konídiumok esetén is, már két óránál rövidebb idő alatt végbemehetett. Az előzetes eredményeink összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy *Botrytis cinerea* kórokozó szaporítóképleteinek fejlődését bizonyos szabályozó molekulák befolyásolhatják, amelyek analóg hatásúak lehetnek a növényi pollenekben található stimulátor vegyületekkel.

Köszönetnyilvánítás

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült (ÚNKP-22-3). Köszönjük Mikó Sándornak a laboratóriumi mérésekben nyújtott közreműködését. Köszönettel tartozunk azon Intézeti kollégáknak, többek között Mezőfi Lászlónak, akik az inspiráló beszélgetéseikkel hozzájárultak jelen anyag végleges formájához.

Irodalom

- Barriuso, J. 2015. Quorum sensing mechanisms in fungi. *AIMS Microbiology* 1(1). 37-47.
- Hennebert, G. L. 1973. *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia* 7. 183-204.
- Hernandez-Albíter, R. C., Barrera-Necha, L. L. and Bautista-Baños, S. 2007. Antifungal Potential of Crude Plant Extracts on Conidial Germination of Two Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. And Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25(2).180-185.
- Kocsis, I., Petróczy, M., Takács, Z. K. and Markó, G. 2022. Stimulation role of pollen grains in the initial development of *Botrytis cinerea*: The importance of host compatibility, cultivation status and pollen size. *Journal of Phytopathology* 170. 828- 837.
- Lindsay, A. K., Deveau, A., Piispanen, A. E. and Hogan, D. A. 2012. Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 11(10). 1219-1225.
- Mehmood, A., Liu, G. and Wang, X. 2019. Fungal Quorum-Sensing Molecules and Inhibitors with Potential Antifungal Activity: A Review. *Molecules* 24(10). 1950.
- Ogawa, J. M. and English, H. 1960. Blossom blight and green fruit rot of almond, apricot and plum caused by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease Reporter* 44(4). 265-268.
- Padder, S. A., Prasad, R and Shah, A. H. 2018. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiological Research* 210. 51-58.

Rosero-Hernández, E. D. and Echeverri, F. L. 2020. The Search for Quorum Sensing in *Botrytis cinerea*: Regulatory Activity of Its Extracts on Its Development. *Plants* 9(2). 168.

Sato, T., Watanabe, T., Mikami, T. and Matsumoto, T. 2004. Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27(5). 751-752.

Song, X., Bera, S., Yao, Y., Ferguson, D. and Li, C. 2014. Tree barks as a natural trap for airborne spores and pollen grains from China. *Chinese Science Bulletin* 59(19). 2331-2339.