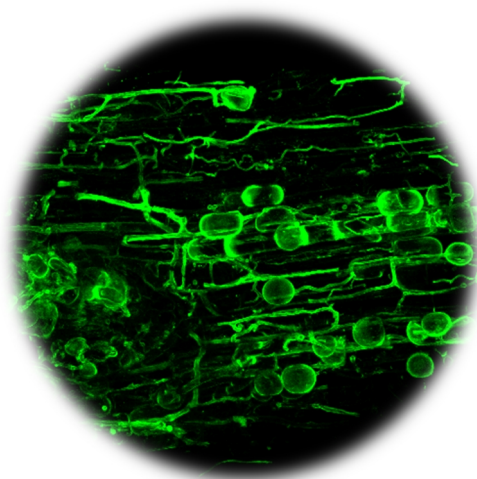


Fluoreszcens *in situ* hibridizációs módszer optimalizálása növény-gomba kölcsönhatások vizsgálatára

XXXI. OTDK Biológia Szekció



Készítette

Horváth Áron

Biológus MSc II. év

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Témavezető

Vági Pál

Tanársegéd



ELTE Biológia Intézet, Növény szerkezet-tani Tanszék
1117, Budapest Pázmány Péter sétány 1/C

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

Bevezetés és Irodalmi áttekintés	3
Problémafelvetés	8
Célkitűzés	11
Anyagok és módszerek.....	11
Oldatok összetétele.....	12
Célszervezetek származása	12
Próba tervezés, szintetizálás és jelölés	13
Minták fixálása és metszése	13
Enzimes kezelés	14
Hibridizáció egy targeten egy vagy két próbával 1.1.....	15
Poszthibridizációs mosás egy targeten egy vagy két próbával 1.2.	15
Hibridizáció két targeten egy próbával	15
Poszthibridizációs mosás két targeten egy próbával	16
Detektálás és dokumentáció	16
Eredmények és megvitatásuk	17
Szimultán jelölés két próbával	17
Enzimátikus emésztés	18
Hőmérséklet és mosási idő tesztek.....	18
Cadophora próba lemosási teszt.....	18
Glomus próba lemosási teszt.....	19
Formamid koncentráció gradiens	19
Működő protokoll Cadophora sp. fluoreszcens megjelölésére	20
Diskusszió	21
Összefoglaló	23
Summary	24
Irodalomjegyzék	25
Köszönetnyilvánítás.....	28
Szerzői hozzájárulás	29

Bevezetés és Irodalmi áttekintés

A többpartneres együttélések iránti érdeklődés folyamatosan növekszik és egyre több tudományterületet ölel fel. A szimbiózisok egyre több olyan biológus figyelmét is felkeltik, akiket elsődlegesen nem maga a szimbiózis érdekel, hanem különböző okokból kifolyólag számításba kell vegyék a szimbionta partnerek molekuláris-, celluláris-, szervezet- és ökoszisztéma-szintű kölcsönhatásait.

Köztudott, hogy a szárazföldi növények túlnyomó többsége él gombahifákkal behálózott gyökérzettel. Ez elég nyomós érv e kapcsolatok megismerésére, így előnyeinek és hátrányainak feltárására. Az utóbbi években egyre inkább reflektorfénybe kerül a szimbiózisoknak ez a csoportja. Ennek az eltérő mértékben specifikus, különböző fajok közötti dinamikus kapcsolatnak a megértésben hívhatjuk segítségül a fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH). A Tanszékünkön olyan FISH technikákat fejlesztünk, melyekben törzs vagy fajspecifikus próbákat alkalmazunk. Ezek a próbák nem csak *in vitro* kísérletek nyomon követésére, de terepi minták vizsgálatára is alkalmasak. Az általam használt gyökérmintákat laboratóriumi körülmények között inokulálták két gyökérkolonizáló gombával: az elterjedt arbuszkuláris mikorrhiza képző *Glomus intraradices*-szel (= *Rhizophagus intraradices*) és a gyakori sötét szeptált gyökér endofiton (DSE) *Cadophora sp.*-vel.

A mikorrhiza képző gombák e két csoportját azért találták megfelelőnek, mert a természetben is előfordulnak együtt, így viszonylag könnyedén összehozhatók egy kísérleti rendszerben. A *Glomus intraradices*-re, mint az arbuszkuláris mikorrhiza képző gombák (AMF) egyik legtöbbet vizsgált modellfajára esett a választás. A *Cadophora* faj a mikológiai laboratórium egyik vizsgálatának alanyaként jött szóba. Ezen felül ez a faj abból a szempontból is fontos, hogy a módszer optimális működése esetén nemcsak a gombák specifikus jelölésre lesz alkalmas, hanem azok morfológiai vizsgálatára is. Így lehetőség nyílik az ezen a téren kevésbé ismert és kutatott DSE gombák által létrehozott struktúrák és magának a szimbiózisnak a strukturális vizsgálatára.

A DSE gombák a gyökérkolonizáló gombák egyik gyakori csoportját képezik. Olyan környezetekben elterjedtek, amelyekben erős abiotikus stressz hat az élőlényekre, mint például a (fél)száraz ökoszisztémákban. Minden fajuk az Ascomycota törzsbe sorolható. Knapp és munkatársai definíciója szerint DSE gomba minden olyan endofiton faj, amely nincsen negatív hatással a növényre és mikroszkleróciumot képez a gyökérben. A száraz és félszáraz területeken a DSE gombákat gyakorinak találták és volt ezek között az élőhelyek

között néhány közös kulcsfaj is. Többek között ezért is fontos a DSE gombák további vizsgálata (Knapp, Pintye, és Kovács 2012).

Az arbuszkuláris mikorrhiza képző gombák mutualista gyökér szimbionták, amelyek az edényes növények 80%-ával élnek együtt és minden szárazföldi ökoszisztémában jelen vannak. Az összes AMF faj a Glomeromycota törzsbe tartozik. Az AMF-ek fontosak, mivel javítják a növényi növekedést a foszfor felvétel fokozásán keresztül és rezisztenciát biztosítanak a növényi patogének ellen (Hijri, Niculita, és Sanders 2007).

Az arbuszkuláris mikorrhiza (AM) tanulmányozásához gyakran szükség van a gombák hifáinak és más képleteinek megfestésére speciális festékekkel. Fluoreszcens festékek, mint például a savas fukszin és a búzacsíra agglutinin konjugátumok kitűnő eredményeket adnak, de ezek a vegyületek vagy veszélyesek vagy nagyon drágák. (Diagne és mtsai. 2011)

Phillips és Hayman kidolgozott egy módszert az AMF struktúrák festésére gyökerekben, amelyben tripánkéket használtak (Phillips és Hayman 1970). A tripánkek mint lehetséges rákkeltő anyag szerepel a Nemzetközi Rákkutató Ügynökség listáján (International Agency for Research on Cancer 1975a). Egy másik gyakran alkalmazott technika (Brundrett, Piché, és Peterson 1984) az esetlegesen rákkeltő chlorazol fekete E festéket használja (International Agency for Research on Cancer 1975b). A savas fukszin, amelyet szintén használnak AMF festésére a gyökerekben (Diagne és mtsai. 2011), szintén karcinogén vegyületnek tűnik (Combes és Haveland-Smith 1982). Ezen túlmenően, a sósavat, jóllehet alacsony koncentrációban, de gyakran alkalmazzák a gyökerek visszasavanyítására KOH-os derítésük után. (Phillips és Hayman 1970). Az ilyen vegyszerek használatát praktikus lenne mellőzni egészségügyi és biztonsági okokból.

Séjalon-Delmas és munkatársai a *Gigaspora gigantea* faj citoplazmájában tapasztalható autofluoreszcenciát használták fel a faj hifáinak láthatóvá tételére növényi gyökérben. Ez a módszer azon felül, hogy káros anyagok felhasználása nélkül használható, alkalmas a *G. gigantea* specifikus azonosítására is. Ez a specifikus azonosítás azonban csak két gombafaj vizsgálata esetén igaz (Sejalon-Delmas és mtsai. 1998).

Az autofluoreszcencián alapuló módszer tehát korlátozott, mivel a *G. gigantea* mellett csak egyetlen gombafaj megkülönböztetése lehetséges. Ezt a két fajt is csak abban az esetben tudjuk megkülönböztetni, ha a másik gombafaj nem autofluoreszkál az adott hullámhosszon.

Diagne és munkatársai egy fluoreszcens festéket, az Uvitex2B-t tesztelték három *Glomus intraradices* által kolonizált növényfajban. Két az AM tanulmányokhoz gyakran használt faj - a modell *Medicago truncatula* és a sárgarépa (*Daucus carota*) - továbbá, egy

aktinorhizával (az *Actinobacteria* törzs egyes fajai által létrehozott gyökérgümő növényi gyökerekben) rendelkező fa, a *Casuarina equisetifolia* esetében (Diagne és mtsai. 2011).

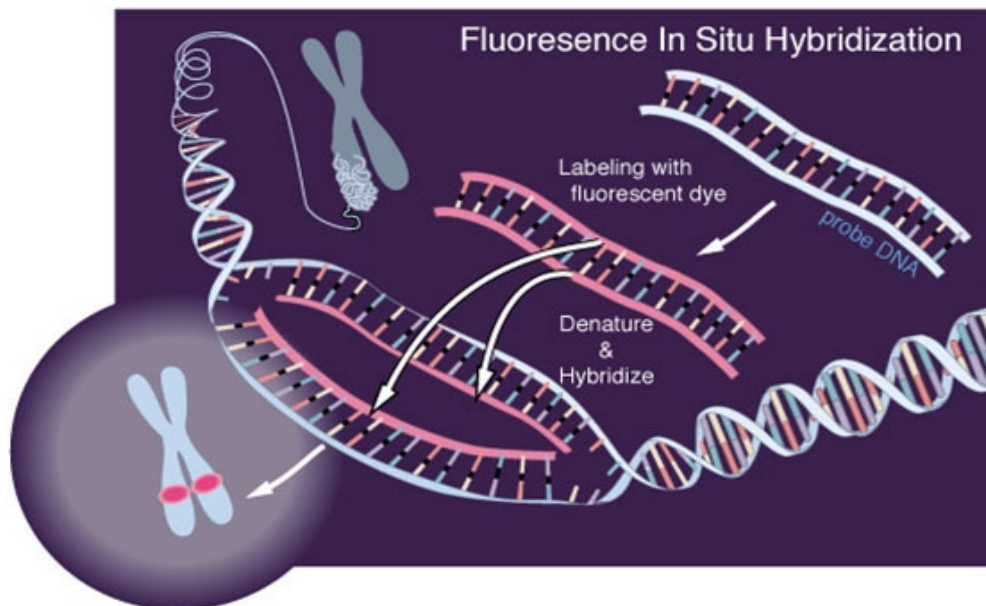
Létezik egy olyan eljárás, amellyel kiküszöbölhetők a festési eljárások hátrányos momentumai, valamint az egyes gombahifák a kívánt specificitással tehetőek láthatóvá. Ez a módszer a fluoreszcens *in situ* hibridizáció, azaz a FISH. Ellentétben a korábban felsorolt módszerek többségével a FISH alkalmazásakor nem használunk rákkeltő vegyszereket és nem csupán speciális tulajdonságokkal rendelkező fajok azonosíthatóak vele. A módszer elméletileg alkalmas bármely nukleinsav fluoreszcens jelölésre, így nem csak tiszta gomba tenyészetek, hanem terepi minták vizsgálatára is felhasználható. Nagy előnye továbbá, hogy a fluorokrómok konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (CLSM) használatára is lehetőséget adnak, amely nagy felbontású megfigyelést biztosít a módszernek.

A FISH, amely nukleinsav szekvenciák specifikus lokalizációjára alkalmas, körülbelül húsz éves múltat tekint vissza. Ez idő alatt a módszer töretlen fejlődést mutatott (Van der Ploeg 2000).

A FISH előnyei a világos látóterű eljárásokkal szemben a következők:

- a fluoreszcencia általában nagyobb érzékenységgel és esetenként jobb feloldással detektálható;
- több kromofór is rendelkezésre áll ahhoz, hogy egyszerre több eltérő próbát azonosítani lehessen;
- végül a fluoreszcens sávozási technika kromoszómák azonosítására is alkalmas (Van der Ploeg 2000).

A FISH elméleti alapját a DNS és RNS azon tulajdonsága képezi, hogy hőkezelés - vagy dimetil-formamid (FA, Sigma) - hatására a kettős szál denaturálódik, azaz időlegesen felnyílnak a hidrogénhidak. Így hozzáférhetővé válik a szintén denaturált egyszálú DNS-próba számára a hibridizációs felület (1. ábra) (Balázs és Ádány, 2001)



1. ábra: A FISH alapmechanizmusa (1. internetes forrás).

A target (célpont) DNS/RNS nem csak tárgylemezre fixált kromoszóma preparátum lehet, hanem interfázisban lévő sejtek magja, metafázisos kromoszómák, m- vagy rRNS is (Sápi és Bodó, 2002).

A rRNS targetnek való választása mellett több érv is szól:

- Minden sejtben megtalálható az rRNS, amelynek összehasonlító analízise a filogenetikai vizsgálatok alapja.
- Ennek következményeként lehetőség van a próbák irányított tervezésére. Az eltérő mértékben konzervált szakaszok megcélzásával a próbák a kísérletnek megfelelően különböző filogenetikai szintre szabhatók.
- A riboszómális RNS nagy kópiaszámban van jelen. A növekvő baktériumsejtekben 10^3 nagyságrendben találunk riboszómákat.
- Emiatt a természetes sokaság miatt teljes, fixált sejteket lehet azonosítani *in situ* fluoreszcensen jelölt rRNS-t célzó próbákkal (Amann és mtsai. 1996).

Nyilvánvaló, hogy az organizmusok saját mikrokörnyezetükben való FISH-es vizsgálatához elengedhetetlen az alkalmazott próbák specificitás szintjének ismerete (Baschien és mtsai. 2008).

A FISH technika szakirodalmát áttekintve jól látszik, hogy mint az esetek többségében, itt is az orvosi alkalmazási terület a leginkább kutatott húzóágazat. De nem lehet

azt állítani, hogy csak ezek a felhasználások fejlődjenek. Egyértelmű, hogy a növényeken végzett kísérletekben is egyre nagyobb teret nyer, és egyre dinamikusabban fejlődik a FISH. A fluoreszcens *in situ* hibridizáció a legfontosabb technika a növényi citogenetikai vizsgálatoknál (Singh, Jiang, és Gill 2006). Elsősorban genetikai térképezéshez (ezen keresztül például filogenetikai kapcsolatok feltárására) használják számos növényfajnál, például *Oryza sativa*-nál (Jiang és mtsai. 1995), *Arabidopsis thaliana*-nál vagy *Brassica rapa* esetében (Zhang és Sang 1999). A szimbiózisok vizsgálatában is szerephez jut a FISH: zuzmók (Cardinale és mtsai. 2008), gyökérgümők és mikorrhizák fajösszetétele meghatározható általa. Az állati/emberi sejtekkel ellentétben, mind a növények, mind a gombák, valamint a baktériumok is sejtfallal rendelkeznek. A sejtfal létének és a szűkebb körű érdeklődésnek köszönhető, hogy e három terület lemaradásban van. Ez méginkább elmondható a FISH-ről, ha a gombák vizsgálatában alkalmazásait vesszük számba. Az elmúlt 15 évben ugyan elszórtan születtek publikációk ebben a témában is (Sterflinger K 1999), a módszer használata a mikológiában mégsem nevezhető általánosnak. Annak ellenére, hogy a rRNS-re tervezett egyedi próbák gombákon történő alkalmazása nem egyedülálló (Baschien és mtsai. 2008; Lischewski és mtsai. 1996), a FISH módszer használata a mikorrhizák vizsgálatában mégis újdonságnak számít.

A közelmúltban a mikorrhiza struktúrák megfigyelését a fluoreszcens festékek és a konfokális lézer pásztázó mikroszkópia (CLSM) kombinációjának használata tovább javította, lehetővé téve a mikorrhizás struktúrák nagyobb felbontású, mechanikai vágás nélküli vizualizálását (Czymmek, Whallon, és Klomparens 1994).

A konfokális lézer pásztázó mikroszkópia lehetővé teszi a fluoreszcensen festődő struktúrák nagy felbontású megfigyelését fixált vagy friss szövetben metszetkészítés nélkül optikai szeletelés által (Czymmek és mtsai. 1994). Egy sor optikai szeletben, amelyek teljes gomba által kialakított struktúrákat fednek le lehetővé válik a struktúrák 3D-rekonstrukciója is. Ezzel a módszerrel a felszínek és térfogatok számszerű becslése is sokkal könnyebben elvégezhető, mint a korábbi módszerekkel (König és mtsai. 1991).

Különböző fluorokrómokat használtak fel gombák citológiájának és differenciálódásának fluoreszcens mikroszkóppal történő tanulmányozására (Butt és mtsai. 1989). Fontos követelmény a mikorrhiza gombastruktúráinak vizsgálatánál és mérésénél, hogy a festék különbséget tesz a gomba és a növényi struktúrák között (Dickson és Kolesik 1999).

A konfokális lézer pásztázó mikroszkópia jól alkalmazható különböző gombákra jellemző tulajdonságok, például a sejtdinamika, gomba-gazda interakciók, organelumok

szerkezete és működése, vagy a citoskeleton lokalizációjának vizsgálatára. Segítségével szinte minden, a hagyományos fénymikroszkópos eljárással megtekinthető minta láthatóvá tehető. Különösen előnyös vastag gomba minták vagy gazda-kórokozó kölcsönhatások vizsgálatára, ahol a gomba mélyen a kolonizált szövetbe ágyazott (Czymbek, Whallon, és Klomparens 1994).

Problémafelvetés

A különböző élő szervezetekre optimalizált FISH protokollok nagyon nagy módszertani különbségeket mutatnak. Mivel még az RNS FISH témakörben is többféle protokollt találunk, ezért nem volt megkerülhető, hogy a receptek közül többet is kipróbáljak. Ennek érdekében kezdtünk bele már létező RNS FISH protokollok (2. internetes forrás, Daims és mtsai. 2005) lépéseinek áttekintésébe. Mivel a fő eltérések a hibridizációs és a poszthibridizációs lépésekben mutatkoznak, ezért munkám során ezek paramétereinek optimalizálásába fogtam bele.

A fenti recept (2. internetes forrás) alapján elvégzett FISH az első alkalommal működőképesnek bizonyult, azonban nem a várt specificitással, így elsődleges célul a módszer specificitását befolyásoló paraméterek optimalizálását tűztük ki.

Vizsgálatokat olyan tiszta tenyészetben fenntartott gombatörzseken végeztük, amelynek célszekvenciája teljes mértékben ismert volt számunkra, így a próbák szekvencia-specificitásában nem volt okunk kételkedni. Ezért a megfelelő hőmérséklet, a FA koncentráció, a mosási idő és az ionerősség jöhetett szóba, mint a hibridizációs szigorúságot befolyásoló tényezők.

Az egymás után végzett kísérletekben kipróbált, módosított hőmérsékletektől a jel specificitásának növekedését vártam. Ennek érdekében a receptben megadott 37 °C helyett 28 °C-ra csökkentettem a hibridizációs hőmérsékletet. A hőmérséklet csökkentésének irányába a mathFISH nevű *in silico* program javaslatára indultam el (4. internetes forrás). A megfelelő oligonukleotid szekvencia és FA koncentráció ismeretében a program számította ki a javasolt hibridizációs hőmérsékletet.

Mivel a módszer specificitása különböző hőmérséklet és a mosási idők alkalmazása esetén sem javult ezért egy egyszerűbb kísérleti elrendezésre váltottam. A laboratóriumi körülmények között inokulált minták bizonytalansága annyit jelent, hogy az inokuláció sem mindig sikerül megfelelően, így az adott gyökérszakasz nem feltétlenül tartalmaz a keresett hifákat. Azért, hogy kizárhassam ezt a bizonytalanságot, kísérleteimet a korábbiakban leírt

módon izolált és fenntartott micéliumok közül a *Cadophora sp.*-ként azonosított tiszta tenyészeiből vett mintákon végeztem. Tovább kívántam egyszerűsíteni a kísérleti körülményeket azzal, hogy egyszerre csak egy próbát alkalmaztam egy kísérletben.

Az előző bekezdésben leírt bizonytalanságok és specificitási problémák miatt a módszer optimalizálása során a mosási hőmérséklet és idő optimumát kerestem. Az RNS FISH specificitását a mosási lépés befolyásolja a legnagyobb mértékben.

A hőmérséklet és a mosási idő módosítása nem bizonyult eléggé hatásosnak a két próba specificitás-tartományának szétválasztásában. Az ionerősség csökkentésének a hibridizációs pufferben negatív hatása lenne a hibridizációs reakció kinetikájára, valamint a DNS-RNS hibridek stabilitásra. Az eddig felsorolt okok miatt került tehát sor a FA koncentráció módosítása is, mivel az említett négy paraméter egymás függvénye is, de a specificitásra mégis eltérő mértékben hatnak. Szoros kapcsolat van a hidrogén hidakkal interferáló FA koncentrációja, a hibridek olvadáspontja és a hibridizáció kinetikáját befolyásoló ionerősség között. Fontos szerepe van ebben a protokollban az SDS-nek, amely a felületi feszültség csökkentése révén elősegíti a hibridizációs oldat komponenseinek eljutását a minta összes pontjára. Az EDTA kelátor képességére szintén nagy szükség van az RNS-DNS hibrideket stabilizáló kétértékű kationok miatt, amelyek jelenléte elősegítené az aspecifikus hibridizációk megmaradását és rontaná a specificitást (Daims és mtsai. 2005).

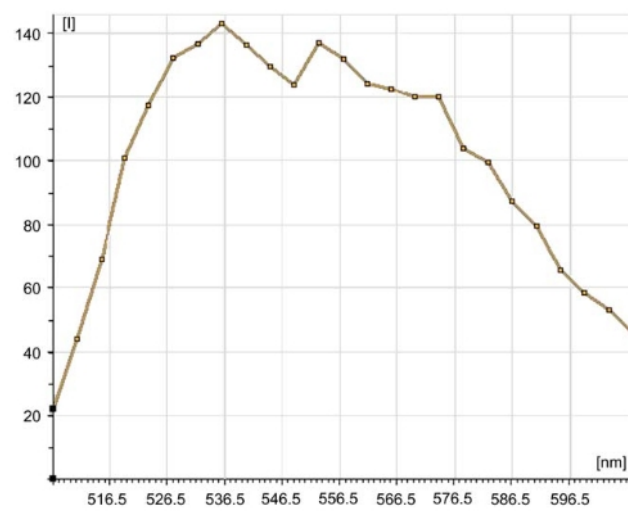
A vastagabb, több sejtsoros növényi minták esetében szükség lehet a próbák szabad diffundálását esetleg megakadályozni képes sejtfalak enzimatisz emésztésére (Prieto, Moore, és Shaw 2007). Problémát okozhat továbbá az, ha a próba aspecifikus kötődése nem szekvenciafüggő. Erre két lehetséges magyarázatot tudunk elképzelni: vagy a festék kikötődését valamely fixált sejtalkotóhoz, vagy a próba illetve a festék fennakadását a sejtfalon.

Ugyanakkor nemcsak az általunk bevitt exogén fluoreszcencia jelenhet meg a mintában. Különösen a sejtfallal rendelkező élőlényekre jellemző jelenség az autofluoreszcencia, amely jelentősen nehezíti a mikroszkópos vizsgálatokat.

Dreyer és munkatársai *Glomus intraradices* és *Glomus clarum* spórákat vizsgáltak epifluoreszcens mikroszkóppal és áramlási citometriával. A *Medicago sativa* mikorrhizas egész gyökereit is elemezték az autofluoreszcencia mérése céljából. A korábbi jelentésekkel ellentétben, az általuk bemutatott eredmények világosan mutatják, hogy az összes gombastruktúra, függetlenül a metabolikus aktivitásától fluoreszkált kék fénnel való gerjesztés hatására (2. ábra). Néhány arbuszkulum, amelyeket gyökerekből izoláltak további

autofluoreszcenciát mutatott zöld fényű gerjesztés mellett. Az autofluoreszcencia forrása a gomba sejtfalban lokalizálódott.

A CLSM-mel megfigyelt eredmények tehát azt mutatták, hogy az AM gomba struktúrák további vizsgálatához nem volt szükség fluorokrómok használatára.



2. ábra: Az arbuszkulikumok fluoreszcens spektruma. A két emissziós csúcs pontos helye 534,7 nm és 552,5 nm (Dreyer és mtsai. 2006).

Munkájuk eredményeként megállapították, hogy bizonyos pálmákban (*Brahea armata*, *Chamaerops humilis*, *Phoenix canariensis* és *Phoenix dactylifera*) található összes AMF struktúra, állapotától függetlenül, autofluoreszcenciát mutatott kék fényű megvilágításra. Az arbuszkulikumok esetében erősebb, míg a gyökéren belüli hifák és a vezikulumok esetében gyengébb autofluoreszcenciát figyeltek meg.

Mivel a fenti eredmények főleg a pálma gyökér/*G. mossae* kísérleti rendszerben születtek, így a más gombákkal vagy növényekkel létrejött más asszociációkra kockázatos lenne ezek alapján általánosítani. Ugyanakkor Ames és munkatársai öt különböző növényfajt kolonizáló különböző *Glomus*, *Gigaspora* és *Acaulospora* taxonok esetében is kimutatták, hogy az autofluoreszcencia megjelenését sem a AMF faj, sem a gazdanövény, sem a növekedési feltételek nem befolyásolják (Ames, Ingham, és Reid 1982). Gange és munkatársai tíz különböző olyan növényfaj intraradikális hifáiban mutattak ki autofluoreszcenciát, amelyek AMF gazdanövények voltak (Gange és mtsai. 1999). Ezzel szintén azt az elképzelést támasztották alá, mely szerint az AM képző gombák autofluoreszcenciája széles elterjedt jelenség (Dreyer és mtsai. 2006).

Mivel a növények is rendelkeznek sejtfallal, ezért náluk is megfigyelhető autofluoreszcencia bizonyos esetekben. Vannak olyan kutatások, amelyekben ez a jelenség kiválóan felhasználható, például a növényi sejtfalak láthatóvá tételére (Diagne és mtsai. 2011). E módszer esetében azonban a növényi autofluoreszcencia jelentősen megnehezítené a mikroszkópos megfigyeléseket és méréseket. Ezért csoportom egy másik tagja már korábban felvette a vizsgálni kívánt két gomba fajjal potenciálisan inokulálható növényfajok teljes spektrumát és kiválasztotta a legmegfelelőbbeket erre a célra. Ezért volt például a kukorica (*Zea mays*) a leggyakrabban használt gazdanövény kísérleteimben.

Az általam vizsgált target organizmusok is sejtfallal bírnak, ezért fennáll az említett aspecifikus kötődés lehetősége. Ez, valamint a különböző protokollok RNáz működést gátló anyagok nélkülözhetetlenségére tett utalásai miatt döntöttünk egy több enzimes teszt mellett.

Nehezíti a *Glomus intraradices* vizsgálatát az a tény is, hogy ez a faj, hasonlóan az AM gombák többségéhez obligát biotróf. Tehát esetében nem lehetséges tiszta tenyészetek fenntartása és így, egyszerűbb kísérleti rendszerként, a csupasz micélium vizsgálata. Emiatt ilyen egyszerűsített jelölési kísérleteket csak a *Cadophora* fajon végezhettem.

Célkitűzés

Munkám célja egy olyan FISH protokoll optimalizálása, amelynek alkalmazásával lehetőség nyílik a vizsgált növényfajok gombapartnereinek specifikus azonosítására. E folyamat részeként célul tűztem ki az egyedi próbák hibridizációs és mosási hőmérséklet-idő és formamid koncentráció optimumának megtalálását, így a próbák maximálisához közeli specificitásának elérését. További célom volt a próbák specifikus kötődésének bizonyítása, és aspecifikus kötődésük lehetőségének kizárása. Végző célom tehát egy olyan paraméterrendszer felállítása volt, amelynek alkalmazása adott próbával és targettel reprodukálható és specifikus eredményt ad.

Anyagok és módszerek

Kísérleteimben részben a korábban említett protokoll (2. internetes forrás), részben pedig más források (Daims és mtsai. 2005) alapján állítottam össze az oldatokat. A fejezet első három és utolsó alfejezete módszer-független, így ezek univerzálisak a teljes munkámra tekintve. Végeztem azonban eltérő hibridizációs és poszthibridizációs lépéseket tartalmazó teszteket is, ezek sajátosságait külön alfejezetekben tárgyalom. A megfelelő oldatok említésekor

hivatkozom az adott protokollra, valamint az attól való eltéréseket külön leírom. A munkámnak vannak egyedi megoldásai is, de ezek kizárólag a technikai megoldásokra korlátozódnak ilyen például, hogy én a mintákat nem tárgylemezre szárítva, hanem az oldatban úsztatva hibridizáltatom.

Oldatok összetétele

- CSK puffer: 100 mM NaCl, 300 mM szacharózban, 3 mM MgCl₂, 10 mM PIPES, 1 % Triton X100, 1 mM EGTA, desztillált vízben, pH=6.8 (2. internetes forrás)
- Fixálószer: 4 % PFA 0.07 M PBS-ben, pH=7.2
- SSC puffer (20x): 3 M NaCl, 0.3 M nátrium-citrát, desztillált vízben, pH=7.0 (3. internetes forrás)
- Próba oldat: 20 µg próba DNS 5 µl TE pufferben (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH=7.5) -20 °C-on tárolva
- Hibridizációs puffer: 20 ml végtérfogatra: 2 ml 20x SSC, 2 g dextrán szulfát (Sigma), 2 mg BSA, 8 ml desztillált víz, 50 % dimetilformamid, (400 µl-es porciókban -20 °C-on tárolva) (2. internetes forrás)
- 1 µl RNáz inhibitor (RiboLock RNase Inhibitor 40 u/µl, Fermentas), 60 µl lazac sperma DNS (10 mg/ml vízben, Sigma) és a próba DNS 400 µl hibridizációs pufferhez lett adva a hibridizáció előtt.
- Mosópufferek (Wb): Wb I.: A hibridizációs pufferhez hasonló, de nem tartalmaz dextrán szulfátot, próbát, lazac sperma DNS-t és RNáz inhibitor; Wb II.: 2x SSC ; Wb III.: 4x SSC
- A FA koncentráció sorozatos hibridizációs oldat: 0-50%-ig 10%-onként változó FA koncentráció és az ehhez tartozó mosó pufferek: Daims és munkatársai szerint (Daims és mtsai. 2005)

Célszervezetek származása

Munkámhoz felhasznált szervezeteket a Tanszék Mikológia laboratóriumából kaptam. A labor dolgozói tizenegy növényfaj gyökereit gyűjtötték be a terepi munka során a három területről. A növényfajokat pedig úgy választották ki, hogy azok különböző életformákat képviseljenek, valamint társulásuk jellegzetes alkotóelemei legyenek (Knapp, Pintye, és Kovács 2012).

A FISH-hez kapott gyökérmintákat fixáltuk (a „Minták fixálása és metszése” alfejezetben leírt módon) és 70%-os alkoholban, – 20 °C-on tároltuk. A módszer optimalizálásához azonban szükségem volt tiszta tenyészetekre is a megfelelő gombákból. Ezek a minták is a Mikológia laboratóriumából származtak.

Próba tervezés, szintetizálás és jelölés

A próbák tervezését a csoportvezető az adott terepi minták korábban megismert nrDNS LSU szekvenciái alapján végezte. Ezekre tervezett komplementer oligonukleotidot a *Glomus intraradices* (= *Rhizophagus intraradices*) és a gyakori gyökérkolonizáló *Cadophora* sp. esetében.

Ezeket egymással és a szekvencia-adatbázisokban fellelhető szekvenciákkal is összehasonlította. Ezután megvizsgálta a kiválasztott szekvenciákat a riboszóma alegységen belüli elhelyezkedésük szempontjából is. Fontos kérdés volt, hogy az adott RNS szekvenciák az intakt riboszóma egy az oligonukleotid próba számára hozzáférhető felszínén helyezkednek-e el.

A fenti vizsgálatok alapján megállapította, hogy az adott szekvenciáknak teljesen eltérő a specificitásuk és képesek a riboszómális RNS-hez hibridizálódni. Így tehát alkalmasak a különböző gombák akár fajszintű azonosítására. Megrendelte az egyszálú DNS oligonukleotidokat, amelyeket szintézisük után az 5' végükön fluoreszcens festékkel (Invitrogen Alexa Fluor® 488 vagy 546) jelöltek meg (Sigma). A kész próbák beszárítva érkeztek. Felhasználás előtt a próbákat TE pufferben feloldottam és 4000 ng/μl koncentrációban 5 μl-enként szétosztottam PCR csövekbe. Kiporciózás után sötétben -20 °C-on voltak tárolva.

Minták fixálása és metszése

A módszer optimalizálása során a különböző megközelítésekhez különböző eredetű hifákat használtam, ezek azonosan módon lettek fixálva. Különbséget csak a mintavétel módja, a vákuumozás és a gyökerek metszése jelentett.

Az első kísérletekben a célszervezetekkel inokulált gyökérmintákon kezdtem el dolgozni. Ez azt jelentette, hogy a lejjebb leírt fixálás elvégzése után a gyökérdarabokat 70%-os etanolban -20-on tároltam a felhasználásig. A fixált mintákat ekkor vízbe helyeztem, hogy rehidratálódjanak a fagyasztó mikrotomos metszéshez. A jégbe ágyazott gyökerekből 90 vagy 120 μm vastagságú hosszmetseteket készítettem.

Másrészről a leegyszerűsített kísérleti elrendezéshez az izolált és fenntartott micéliumokból vettem mintát. A tápközegebe a gombák MMN médiumon (Marx 1969) fenntartott izolátumokból lettek beoltva steril kivágott telepdarabokkal. Pár napos szobahőmérsékleten, sötétben történt inkubáció után a gombák új telepeket képeztek. Ezek egy-két hét alatt megfelelő mennyiségben és méretben álltak rendelkezésre.

Szerológiai pipettával steril fülke alatt kivettem megfelelő számú hifa-csomót és egy 50 ml Falcon csőbe helyeztem át. A mintákat 30 percig inkubáltam CSK pufferben (ld. Oldatok összetétele). Ezután a mintákat újabb 30 percig paraformaldehidben (ld. Oldatok összetétele) fixáltam. Végül a fixálószer 2x Hibridizációs pufferrel (ld. Oldatok összetétele) 10 percig kiöblítettem a mintákból. Ezt követően a csomók a hibridizációs oldatba (ld. Oldatok összetétele) kerültek.

Az MMN táptalajon, celofánon növesztett hifák esetében a telep széléből vágtam ki a 3x3 mm-es mintákat. Ezeket azután 15-30 percig CSK pufferben fixáltam, majd paraformaldehidben további 30 percig. A fixálószer 10 perces kimosása után a mintákat a hibridizációs oldatba helyeztem.

A levegőt tartalmazó minták (pl. gyökerek) esetében vákuumban történt a fixálás, hogy a levegőbuborékok távozzanak a minta minden részéből és átadják helyüket a fixálószernek.

A mintavételt igyekeztem úgy irányítani, hogy a telepek fiatal, metabolikusan aktívabb részeiből történjen. Ez az MMN tápoldatban fenntartott hifa-csomók esetében a kisebbek kiválasztását jelentette. A metabolikus aktivitás fontos volt a kísérlet szempontjából, tekintve, hogy arányos a hifák riboszóma tartalmával így a specifikus fluoreszcens jel erőssége függött tőle.

Enzimes kezelés

A folyadékkultúrában nevelt hifacsomók közül sterilen vettem mintát és 15 percig fixáltam CSK pufferben, majd 15 percig paraformaldehidben. Végül a mintákat 2x hibridizációs pufferben öblítettem ki minimum 10 percig. Ezt követően a mintákat 3 egyenlő csoportra szedtem szét, amelyek közül 2-t enzimes kezelésnek vettem alá. A fennmaradó harmadik csoportot kontrollként használtam fel.

A két enzimes csoport közül az egyikhez 1 %-os sejtfalbontó enzimkeverék (Lysing enzymes, Sigma) 1 ml-ét adtam és inkubáltam 30 percig. A másik csoport mintáihoz 25 mg/ml-es RNáz enzimet (RNáz A, Omega) mértem be szintén 30 percig. A kontroll ez idő alatt az öblítő oldatban inkubálódott.

A hibridizációs procedúra ezután az egy célpontos protokoll (következő alfejezet) szerint zajlott le mosási és hőmérsékleti változatokkal kiegészítve.

Hibridizáció egy targeten egy vagy két próbával 1.1.

Kezdetben a gyökérminták fentebb leírt fixálását követően a hibridizációt a 2. internetes forrás alapján végeztem. Ez azt jelentette, hogy a fixált metszeteket az öblítő oldatból PCR csövekbe, hibridizációs oldatba helyeztem. Ebben az oldatban inkubáltam őket az eltérő kísérletekben különböző hőmérsékleten inkubátorban (dry bath incubator, M.R.C. LTD) vagy PCR készülékben (Hybaid PCR Sprint) egy éjszakán át.

Az izolátumok közül először magáról a celofános táplemezeről vett mintán próbáltam FISH-t végezni, majd végül átálltam a tápoldatban nevelt hifa csomók jelölésére. Mindkét típusú mintára a fentebb leírtak szerint hibridizáltattam a DNS próbákat, viszont a hibridizációs hőmérsékletekből többet is kipróbáltam (28-70 °C) párhuzamos mintákon egy-egy próbával. A különböző célú kísérletekben különböző tagszámú és eltérő léptékű hőmérsékleti sort kipróbáltam. Voltak olyan párhuzamos kísérletek, amelyekben nagy léptékű hőmérsékleti skálát használtam az optimális tartomány megtalálásához (pl. 42, 52 és 62 °C). Ezt követően végeztem 3 °C-onkénti felbontású FISH-t a próba lemosódási hőmérsékletének pontosabb meghatározására. Erre azért volt szükség, mert valójában a mosási hőmérsékletekkel kívántam megkeresni a próbák specificitási maximumát.

Poszthibridizációs mosás egy targeten egy vagy két próbával 1.2.

Az egy éjszakán át tartó hibridizáció után a mintákat a hibridizációsnál 3 °C-kal magasabb hőmérsékletre előmelegített I.-es számú mosó oldatba (ld. Oldatok összetétele) helyeztem át csipesszel, ügyelve, hogy a csipesz szárai között ne vigyek át hibridizációs oldatot is. Ebben az oldatban tesztől függően 3x 20, 60 vagy 120 percet töltöttek a minták, majd ezután 3x 10 percre a II.-es oldatba (ld. Oldatok összetétele), végül legalább 10 percre a III.-as oldatba (ld. Oldatok összetétele) kerültek.

Ezekben a mosási tesztekben 30 és 73 °C közötti tartományban kerestem az adott próba lemosódási hőmérsékletét. A mosás megfelelő időtartamát az első mosóoldatban töltött idő jelentette (20, 60 vagy 120 perc).

Hibridizáció két targeten egy próbával

Elvégeztem egy olyan bakteriális rRNS célpontú próbák tesztelésére és használatára tervezett hibridizációs eljárást is (Daims és mtsai. 2005), amelyhez az előzőektől eltérően FA koncentráció sorozatot kell használni azonos hőmérsékleten, hogy így lehessen megállapítani

a próba specificitásának maximumát. A hibridizációs pufferek összetételét lásd (Oldatok összetétele).

A hibridizációt ebben az esetben egyetlen próbával végeztem 2 különböző mintán: a célszekvenciát tartalmazó Cado12-es törzsön és a célszekvenciát biztosan nem tartalmazó *Periconia sp.*-n. A vizsgálathoz negatív kontrollnak *Cadophora* hifákat használtam próbamentes hibridizációval. A FA sorozat miatt a hőmérséklet egységesen 46 °C volt, amelyet PCR készülékben biztosítottam a minták számára egy éjszakán keresztül.

Poszthibridizációs mosás két targeten egy próbával

A mosóoldatot (ld. Oldatok összetétele) a recept alapján (Daims és mtsai. 2005) frissen elkészítettem és előmelegítettem 48 °C-ra. Kiporcióztam megfelelő számú Eppendorf csőbe, amelyekbe a mintákat a hibridizációs oldatból csipesszel helyeztem át. 3x 20 perc mosás után a minták készen álltak a lefedésre.

Detektálás és dokumentáció

A poszthibridizációs lépés befejezésekképpen, a III.-as oldatból a mintákat tárgylemezre cseppentett lefedőszerbe (Fluoroshield, Sigma) helyeztem és fedőlemezzel lefedtem.

A fluoreszcencia jel detektálása általában epifluoreszcens mikroszkóppal történik. Vastag minták esetén használhatunk konfokális lézer pásztázó mikroszkópot (CLSM) is. Lényeges különbség azonban, hogy amíg az előbbi esetben egy kétdimenziós képet kapunk a jelről és a környezetéről, addig CLSM technológia felhasználásával jelölt struktúra háromdimenziós szerkezetéről is képet kapunk. Mivel az általunk felvetett kérdéskör esetében a láthatóvá tétel az egyik legfontosabb szempont ezért mintáinkat mind epifluoreszcens (Nikon Eclipse 80i), mind CLSM (Zeiss LSM 410) segítségével vizsgáltuk.

Az előbbi esetben a próbákat a megfelelő szűrőkocka felhasználásával gerjesztettük, és a felvételek digitális kamerával (Spot 7.4 Slider, Diagnostic Instruments, Inc.) készültek.

A konfokális mikroszkópia során a két fluoreszcens festék gerjesztése az elnyelési maximumuk közelében történ Argon lézer (488 nm), valamint Hélium-neon lézer (543 nm) felhasználásával. A zárószűrők közül a festékek emissziós maximumának megfelelő helyezettük a fényútba. A kontrasztot a várhatóan legfényesebb mintához állítottuk be és referenciaképpen változatlanul hagytuk az adott minták fényességének

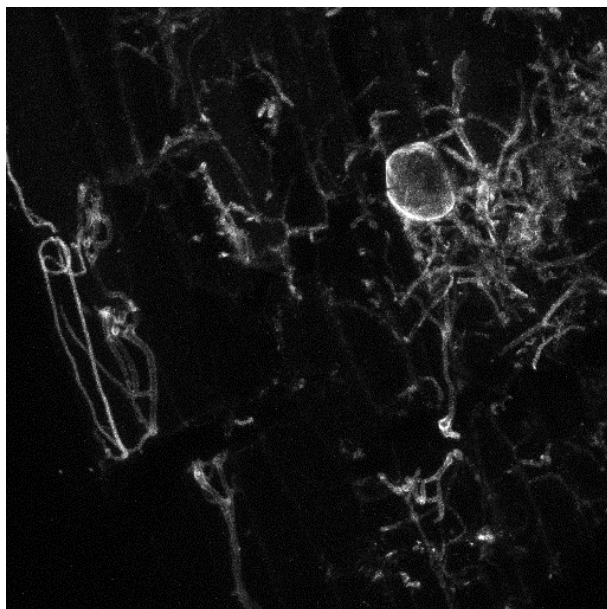
összehasonlíthatóságának érdekében. Az így készített optikai szeletek sorozataiból a mikroszkóp saját szoftverével hoztam létre a projekciókat.

A fluoreszcens jel intenzitásának objektív összehasonlítása érdekében szoftveres képelemzést is végeztem az elkészült optikai szeleteken. Ehhez az ImageJ (1.46r / Java 1.6.0_20; Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) képelemző programot használtam, amellyel az optikai szeletek egységnyi területére eső összes fényességét mértem meg.

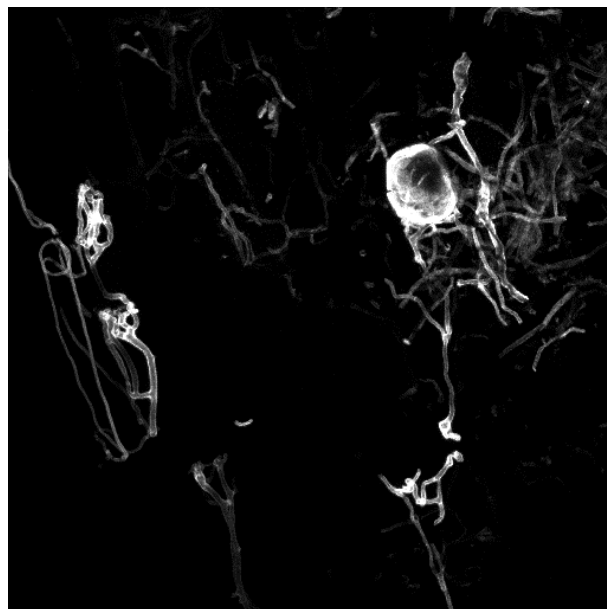
Eredmények és megvitatásuk

Szimultán jelölés két próbával

Az eleinte használt recept alapján végrehajtott első FISH reakciókból az derült ki számunkra, hogy a módszer hibridizációs része teljesen jól működik. Látható volt viszont, hogy a 42 illetve 30 °C végzett pár perces mosási lépések nem elegendőek az aspecifikusan kötődött próbák eltávolítására (3. és 4. ábra). Ezt a problémát az I. mosóoldatban töltött mosási idők növelésével sem sikerült megoldani.



3. ábra: Cadophora-próba jelöli a hifákat és a vezikulumot.



4. ábra: Glomus-próba jelöli szinte ugyanazokat a hifákat és vezikulumot.

Enzimatis emésztés

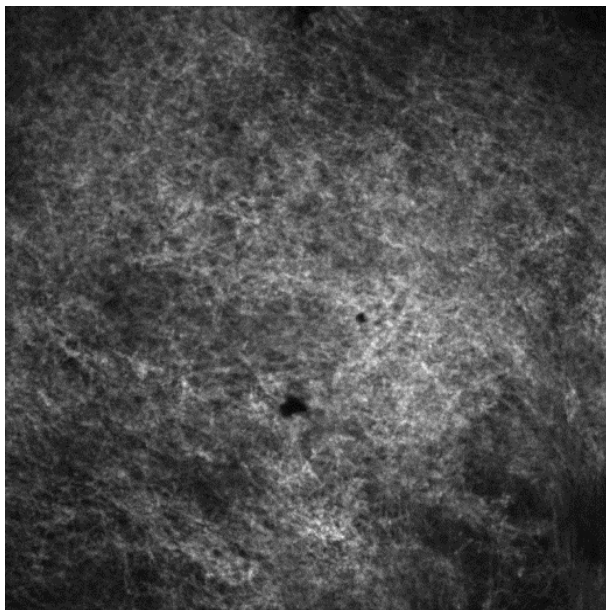
A különböző enzimikus kezeléseket nem nevezhetjük hatásosnak a problémában, mivel a kapott képek alapján csak szubjektíven ítéltető meg az enzimek hatása. Ennek fő oka az, hogy az enzimikus emésztéssel párhuzamosan a mintákat különböző hőmérsékleten mostuk, aminek eredményeképpen a képeken látható jelerősség beli különbségek nem feleltethetők meg egyértelműen az enzimek hatásainak. Például megfigyeltem, hogy az RNázal emésztett mintából már 45 °C is kevésbé mosódott ki az 55 °C-on mosott sejtfalemésztett mintából szinte teljesen eltűnt a jel, míg ugyanezen a hőmérsékleten az RNázal kezelt minta erősebb jelet adott. Ennek legvalószínűbb oka az lehet, hogy a sejtfal emésztés hatására könnyebben kimosódik a jel a mintákból.

Hőmérséklet és mosási idő tesztek

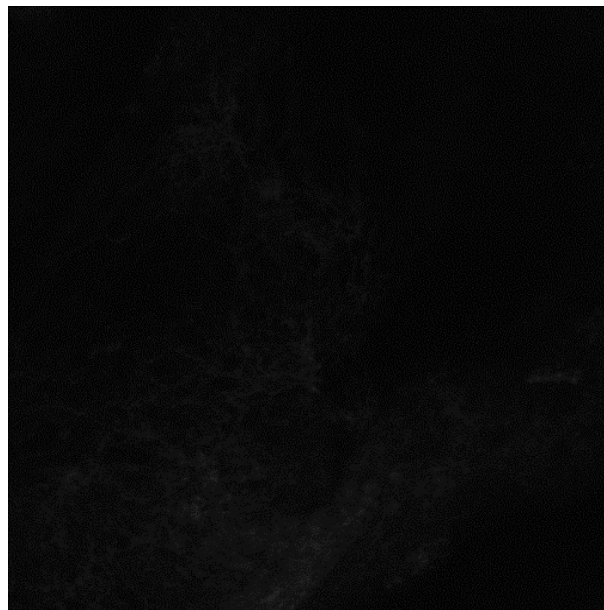
A különböző hőmérsékletek és mosási idők párhuzamos kipróbálása közben kiderült számomra, hogy a hibridizáció erőssége csak egy bizonyos ideig függ a mosás hosszától. A kipróbált időtartamok közül a 3x60 perces mosás bizonyult elegendőnek ahhoz, hogy a háttér-fluoreszcenciát megfelelő mértékben csökkentve a jelet még megfelelően detektálni lehessen. A mosási hőmérséklet azonban elméletileg a próba és a target szekvencia komplementaritásának mértékétől függ. A nagy léptékű hőmérsékleti skálán nem találtam olyan hőmérsékletet, ahol a jelölés kellően specifikusan működött volna, azaz a *Cadophora*-próba jele még látható erősségű, viszont a *Glomus*-próba már kimosódott a mintából.

Cadophora próba lemosási teszt

Az előző nagyléptékű (10 °C-onként) tesztek alapján már láttam, hogy a 60-70 °C közötti tartományban érdemes a kisléptékű (3,3 °C-onként) lemosási tesztet elvégezni. Ennek eredményeképpen kiderült, hogy a *Cadophora* sp. hifákról a *Cadophora*-próba a 60 °C körüli hibridizációs hőmérsékletnél még nem mosódik le (5. ábra) de a 63,3 °C-osnál már nem ad jelnek nevezhető fluoreszcenciát (6. ábra). Megállapítható tehát, hogy a próba lemosódása valahol 63 és 66 °C között történik meg.



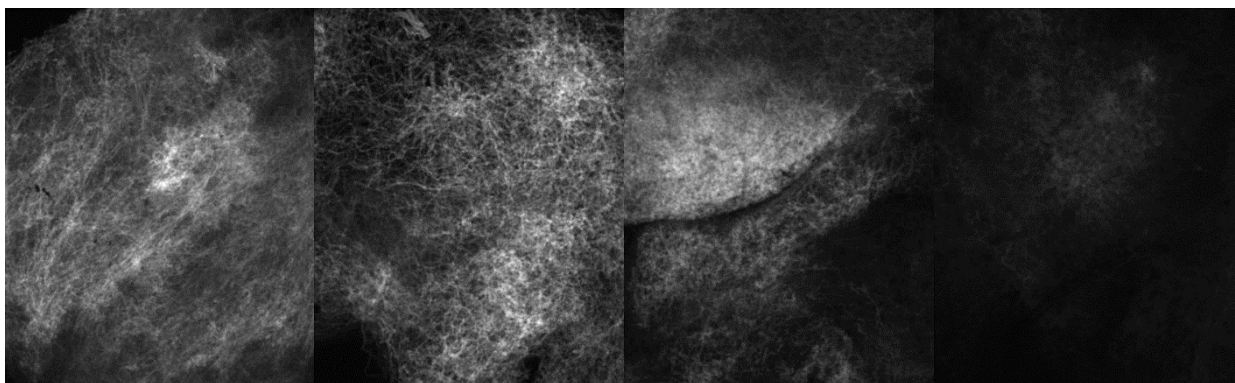
5. ábra: Cadophora-próba jele *Cadophora* sp.-n 63 °C-on mosva.



6. ábra: Cadophora-próba jele *Cadophora* sp.-n 66,3 °C-on mosva.

Glomus próba lemosási teszt

Az ebben az esetben is elvégzett 10 °C-onkénti háromtagú hőmérséklet sorozat alapján megállapítottam, hogyha 55 °C-on még látható egy a 45 °C-on tapasztaltnál halványabb fluoreszcens jel, de 70 °C-on ez már teljesen kimosódik. Ezen értékek alapján az 50 és 60 °C közötti 3,3 °C-onkénti kisléptékű hőmérsékleti sor alkalmazása tűnt kézenfekvőnek (7.-10. ábra).



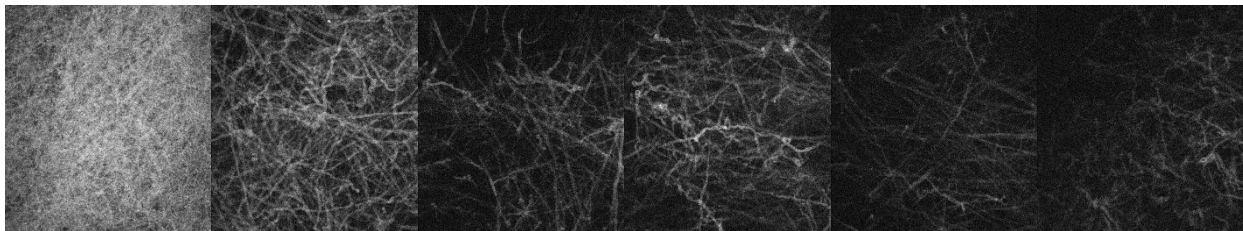
7.-10. ábra: Glomus próba jele *Cadophora* sp.-n 53; 56,3; 59,6 és 63 °C-on mosva.

Formamid koncentráció gradiens

A FA koncentráció sorozat tesztelése több szempontból is hasznos volt. Bebizonyosodott, hogy a próba nem kötődik aspecifikusan bármihez a mintában, mivel a *Periconia* sp. a *Glomus*-hoz hasonlóan nem adott jelet. Szépen jelölte viszont a *Cadophora*

hifákat és azon belül is jól láthatóan szemcsésre jelölte a citoplazmát, ami, az előző ténnyel együtt megerősíti azt az elképzelést, miszerint az általam használt próba specifikusan a riboszómális RNS-hez kötődik (11-16. ábra).

A kísérlet legfontosabb eredménye azonban mégis az volt, hogy kiderült, hogy a mikroszkópi detektálás szempontjából optimális FA koncentráció a hibridizációs oldatban 10 és 20% között található (12-13. ábra).



11.-16. ábra: Cadophora próba jele *Cadophora sp.*-n 0-50%-os (balról jobbra 10%-onként) formaidban hibridizáltatva.

Célszerű lett volna elvégezni hasonló FA koncentráció gradienses lemosási kísérletet a *G. intraradices* esetében is. Ez azonban nem lehetséges, mivel a faj obligát biotróf, így csak gyökéraszociálisan fordul elő. Emiatt, hogy a Glomus próbát mégis teszteljem egy nontarget gombafajon *Cadophora* micéliumon végeztem dupla jelöléseket FA koncentráció gradiens alkalmazása mellett. Ennek eredményeként kapott képsorozaton megmértem a két jelölés intenzitásának változását. A pontosabb eredményhez további méréseket fogok elvégezni.

Működő protokoll *Cadophora sp.* fluoreszcens megjelölésére

Az itt leírt protokoll elvileg alkalmas ismert rRNS szekvenciájú gombák FISH-sel történő láthatóvá tételére.

1. Gomba minták beszerzése
2. Minták fixálása
 - 2.1. inkubálás CSK pufferben (30 perc)
 - 2.2. inkubálás paraformaldehidben (30 perc)
 - 2.3. öblítés hibridizációs pufferben (10 perc) vagy 70%-os alkoholban – 20 °C-on tárolás
3. Hibridizáció
 - 3.1. Hibridizációs oldat összemérése:
 - 3.1.1. 2x Hibridizációs puffer (20 % FA)
 - 3.1.2. Lazac sperma DNS kivonat (kompetitor DNS-nek)
 - 3.1.3. Fluoreszcensen jelölt oligonukleotid próba
 - 3.2. Hibridizáció 46 °C-on o/n
4. Poszthibridizációs lépések
 - 4.1. Mosás 3x 20 perc 48 °C-on (20% FA-hoz tartozó mosó oldattal)

- 4.2. Átrakás tárgylemezre és lefedés
5. Detektálás és dokumentáció
 - 5.1. Gerjesztés és detektálás CLSM vagy epifluoreszcens mikroszkóppal
 - 5.2. Készített képek projekciója, színezése.

Diszkusszió

A szakirodalom különböző cikkeiben a kutatók sokféleképpen vélekednek arról, hogy milyen lépések kellenek a jól működő, specifikus fluoreszcens *in situ* hibridizációhoz (v.ö. (Daims és mtsai. 2005) ill. (Baschien és mtsai. 2008)).

Ezek a vélemények legtöbb esetben a specificitást leginkább befolyásoló paraméterekben (hőmérséklet-mosási idő-FA koncentráció) különböznek. Ennek fő oka az egyes munkák célorganizmusainak strukturális és jelölhetőség beli különbözősége, valamint az adott labor hagyományai. Ebből következik, hogy más protokollt alkalmaznak sejtfallal rendelkező növényi metszetek (Prieto, Moore, és Shaw 2007), baktériumok (Cardinale és mtsai. 2008), vagy gomba hifák (Baschien és mtsai. 2008) esetében, mint állati sejteken (2. internetes forrás).

Mindamellet, hogy az élőlények sokfélék és különböző laborokban különböző protokollok vezettek eredményre, a módszer specificitását befolyásoló tényezők nagy száma több különböző lehetséges megoldást is lehetővé tesz. Ezért a kiindulási alapnak szánt protokollt széles palettából választhatjuk ki.

Két jelentősen különböző protokoll tesztelésére és optimalizálására vállalkoztam. Az első egy elfogadott RNS FISH protokoll módosított verziója (2. internetes forrás). A másodikat a formamid koncentráció sorozat és új próbák tulajdonságainak és specifikus működési feltételeinek megtalálására kifejlesztett módszer miatt találtam megfelelő kiindulási alapnak.

A 2. internetes forrásban található protokollt nem csak teszteltem és alkalmaztam, hanem sok helyen meg is változtattam. Ennek ellenére eddig mosási hőmérsékleteinek és időinek megváltoztatásával egyelőre nem tudtam szétválasztani a két próba specificitási tartományát. A második módszer a tesztelés fázisában van, de már kaptam használható eredményt optimális formamid koncentrációra. Mivel a Daims és munkatársai által kifejlesztett módszer már az első próbálkozások alkalmával is biztató eredményt adott, ezért valószínűleg ezt fejlesztem tovább a rutinszerű munkákhoz. Ez ugyanis eszköz- és anyagiigény szempontjából is praktikusabban alkalmazható.

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció számos előnnyel bír a gomba struktúrák jelölésére korábban kidolgozott módszerekkel szemben. A folyamat során nem kell rákkeltő reagenseket alkalmazni, így a korábbi módszereknél kevésbé káros az egészségre. Nagy előnye továbbá, hogy ezzel a módszerrel a több faj hifáit is szimultán, specifikusan lehet megjelölni és így azonosítani. Az rRNS-t jelölő fluoreszcens festékek pedig a konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával együtt alkalmazva a gomba struktúrák jó minőségű és nagy felbontású megfigyelését és térbeli rekonstrukcióját is lehetővé teszik.

A FISH-t néhány csoport már alkalmazta különböző együttélések (pl. növények és rajtuk élő mikrobaközösségek: (Fürrkranz és mtsai. 2012) partnereinek, kapcsolatainak vizsgálatára. Jelen munka a mikorrhizák gomba partnereinek FISH-el történő vizsgálatát és azonosítását célul kitűzve eddig egyedülálló kezdeményezés.

Az általunk kidolgozott protokollt természetesen még lehet, és szükséges is tovább optimalizálni, hiszen csak korlátozottan alkalmas több gombafaj szimultán megjelölésére. A rutinszerű alkalmazás azonban a téma aktualitását és a módszerben rejlő számtalan lehetőséget ismerve már a küszöbön áll!

Összefoglaló

Fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) módszert optimalizáltunk *in vitro* inokulált és terepen gyűjtött gyökérminták szimbionta gombapartnereinek azonosítására és vizsgálatára. Ehhez két gyakori gyökérkolonizáló gomba riboszómális RNS-ére tervezett, fluoreszcensen jelölt egyszálú DNS oligonukleotid próbát használtunk. Így a target organizmusban az elszórta elhelyezkedő sejtmagok helyett a citoplazmában detektálható jelet kaptunk. Ennek alkalmazhatóságát teszteltük akár 120 µm vastagságú gyökérmetszetek belsejében elhelyezkedő gomba eredetű struktúrák megjelölésére. A viszonylag vastag metszeteket konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk a háromdimenziós szerkezetük rekonstruálására.

Annak érdekében, hogy a módszer kellő mértékű specificitással működjön, belekezdtem két RNS-FISH recept paramétereinek optimalizálásába. Erre a célra a terepi minták túlságosan bizonytalan rendszernek bizonyultak, ezért a jelölés megfelelő körülményeinek beállítását folyadékkultúrában sterilen fenntartott, tiszta micéliumon végeztem. Ebben az egyszerűsített rendszerben sikerült a lényeges paraméterek optimumát megtalálni. Ezek alkalmazhatóságát a terepi mintákon is teszteltem.

Munkám során optimalizáltam egy olyan RNS FISH protokollt, amelynek alkalmazásával a jövőben lehetővé válik növény-gomba interakciók résztvevőinek szimultán, specifikus azonosítása.

Summary

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) methods were optimized to identify and analyze the symbiotic partners in *in vitro* inoculated and field root samples. Therefore two common root colonizing fungi's ribosomal RNA was fluorescently labeled with single-stranded DNA oligonucleotide probes. Thus, the signal was detected in the cytoplasm of the target organism instead of its scattered nuclei. The method's applicability was tested to indicate fungal structures inside root sections of up to 120 micrometer thickness. The relatively thick sections were analyzed by confocal laser scanning microscopy to reconstruct three-dimensional structures.

In order to ensure sufficient specificity, I started to optimize the critical parameters of two RNA-FISH protocols. For this purpose field samples turned out to be too inconsistent. Therefore I used sterilely and purely maintained mycelium in liquid cultures to find the optimum of parameters. The applicability of the optimized methods to the field samples was tested.

As a result of my work I optimized an RNA FISH protocol, which allows simultaneous, specific identification of the fungal participants of plant-fungus interactions.

Irodalomjegyzék

- Amann, Rudolf, Wolfgang Ludwig, Renate Schulze, Stefan Spring, Edward Moore, és Karl-Heinz Schleifer. 1996. „rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for the Identification of Genuine and Former Pseudomonads”. *Systematic and Applied Microbiology* 19 (4) (december): 501–509. doi:10.1016/S0723-2020(96)80023-3.
- Ames, Robert N., Elaine R. Ingham, és C. P. P. Reid. 1982. „Ultraviolet-induced autofluorescence of arbuscular mycorrhizal root infections: an alternative to clearing and staining methods for assessing infections”. *Canadian Journal of Microbiology* 28 (3) (március): 351–355. doi:10.1139/m82-052.
- Balázs, M., Ádány, R., 2001. „Molekuláris morfológiai módszerek a laboratóriumi medicinában.” *Lege Artis Medicinae* 11, 340-346.
- Baschien, Christiane, Werner Manz, Thomas R. Neu, Ludmila Marvanová, és Ulrich Szewzyk. 2008. „In Situ Detection of Freshwater Fungi in an Alpine Stream by New Taxon-Specific Fluorescence In Situ Hybridization Probes”. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (20) (október 15): 6427–6436. doi:10.1128/AEM.00815-08.
- Brundrett, M.C., Y. Piché, és R.L. Peterson. 1984. „A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae”. *Botany* 62 (10): 2128–2134. doi:10.1139/b84-290.
- Butt, Tariq M., Harvey C. Hoch, Richard C. Staples, és Raymond J. St. Leger. 1989. „Use of fluorochromes in the study of fungal cytology and differentiation”. *Experimental Mycology* 13 (4) (december): 303–320. doi:10.1016/0147-5975(89)90026-1.
- Cardinale, Massimiliano, João Vieira de Castro Jr, Henry Müller, Gabriele Berg, és Martin Grube. 2008. „In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria”. *FEMS microbiology ecology* 66 (1) (október): 63–71. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00546.x.
- Combes, R D, és R B Haveland-Smith. 1982. „A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes”. *Mutation research* 98 (2) (március): 101–248.
- Czymmek, Kirk J., Joanne H. Whallon, és Karen L. Klomparens. 1994. „Confocal microscopy in mycological research”. *Experimental Mycology* 18 (4) (december): 275–293. doi:10.1016/S0147-5975(06)80001-0.
- Daims, H., Stoecker, K., Wagner, M., 2005. „Fluorescence *in situ* hybridization for the detection of prokaryotes” *Molecular Microbial Ecology*. Osborn, A. M., és Smith, C. J., *Taylor & Francis Group, New York*, ISBN: 1-8599-6283-1, 213-239.
- Diagne, Nathalie, Jacques Escoute, Marc Lartaud, Jean Luc Verdeil, Claudine Franche, Aboubacry Kane, Didier Bogusz, Diegane Diouf, Robin Duponnois, és Sergio Svistoonoff. 2011. „Uvitex2B: a Rapid and Efficient Stain for Detection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Within Plant Roots”. *Mycorrhiza* 21 (4) (május 1): 315–321. doi:10.1007/s00572-010-0357-8.
- Dickson, S., és P. Kolesik. 1999. „Visualisation of Mycorrhizal Fungal Structures and Quantification of Their Surface Area and Volume Using Laser Scanning Confocal Microscopy”. *Mycorrhiza* 9 (4) (december 1): 205–213. doi:10.1007/s005720050268.
- Dreyer, B., A. Morte, M. Pérez-Gilabert, és M. Honrubia. 2006. „Autofluorescence detection of arbuscular mycorrhizal fungal structures in palm roots: an underestimated experimental method”. *Mycological research* 110 (8): 887–897.
- Fürnkranz, Michael, Birgit Lukesch, Henry Müller, Herbert Huss, Martin Grube, és Gabriele Berg. 2012. „Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities

- display a high antagonistic potential against phytopathogens". *Microbial ecology* 63 (2) (február): 418–428. doi:10.1007/s00248-011-9942-4.
- Gange, Alan C., Erica Bower, Penny G. Stagg, David M. Aplin, Alexandra E. Gillam, és Michael Bracken. 1999. „A Comparison of Visualization Techniques for Recording Arbuscular Mycorrhizal Colonization". *New Phytologist* 142 (1): 123–132. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00371.x.
- Hijri, Mohamed, Hélène Niculita, és Ian R. Sanders. 2007. „Molecular characterization of chromosome termini of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (Glomeromycota)". *Fungal Genetics and Biology* 44 (12) (december): 1380–1386. doi:10.1016/j.fgb.2007.03.004.
- International Agency for Research on Cancer. 1975a. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Man 29:295.
- International Agency for Research on Cancer. 1975b. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Man 8:267.
- Jiang, J., B. S. Gill, G. L. Wang, P. C. Ronald, és D. C. Ward. 1995. „Metaphase and Interphase Fluorescence in Situ Hybridization Mapping of the Rice Genome with Bacterial Artificial Chromosomes". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (10) (szeptember 5): 4487–4491.
- Knapp, Dániel G., Alexandra Pintye, és Gábor M. Kovács. 2012. „The Dark Side Is Not Fastidious – Dark Septate Endophytic Fungi of Native and Invasive Plants of Semiarid Sandy Areas". *PLoS ONE* 7 (2) (február 29): e32570. doi:10.1371/journal.pone.0032570.
- König, D., S. Carvajal-Gonzalez, A. M. Downs, J. Vassy, és P. Rigaut. 1991. „Modelling and Analysis of 3-D Arrangements of Particles by Point Processes with Examples of Application to Biological Data Obtained by Confocal Scanning Light Microscopy". *Journal of Microscopy* 161 (3): 405–433. doi:10.1111/j.1365-2818.1991.tb03100.x.
- Lischewski, A., R I Amann, D Harmsen, H Merkert, J Hacker, és J Morschhäuser. 1996. „Specific detection of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by fluorescent in situ hybridization with an 18S rRNA-targeted oligonucleotide probe". *Microbiology (Reading, England)* 142 (Pt 10) (október): 2731–2740.
- Marx, D.H. 1969. „The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. In. Antagonism of mycorrhizal fungi root pathogenic fungi and soil bacteria." *Phytopathology* 5, 153-163.
- Osborn, Mark, és Cindy Smith, szerk. 2005. *Molecular Microbial Ecology*. 1st ed. Taylor & Francis.
- Phillips, J. M., és D. S. Hayman. 1970. „Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection." *Transactions of the British Mycological Society* 55 (1): 158–161. CABDirect2.
- Van der Ploeg, M. 2000. „Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century". *European journal of histochemistry: EJH* 44 (1): 7–42.
- Prieto, Pilar, Graham Moore, és Peter Shaw. 2007. „Fluorescence in situ hybridization on vibratome sections of plant tissues". *Nature protocols* 2 (7): 1831–1838. doi:10.1038/nprot.2007.265.
- Sápi, Z., Bodó, M., 2002. „FISH diagnosztika." *Magyar Onkológia* 46, 25-32.
- Sejalón-Delmas, Nathalie, Amelie Magnier, David D. Douds, és Guillaume Becard. 1998. „Cytoplasmic Autofluorescence of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora gigantea* and Nondestructive Fungal Observations in Planta". *Mycologia* 90 (5) (szeptember): 921. doi:10.2307/3761334.

- Singh, R. S., Jiming Jiang, és Bikram S. Gill. 2006. „Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research”. *Genome* 49 (9) (szeptember): 1057–1068. doi:10.1139/g06-076.
- Sterflinger K, Hain M. 1999. „In-situ hybridization with rRNA targeted probes as a new tool for the detection of black yeasts and meristematic fungi”. *Studies in Mycology*: 23–30.
- Zhang, Daming, és Tao Sang. 1999. „Physical Mapping of Ribosomal RNA Genes in Peonies (*Paeonia*, *Paeoniaceae*) by Fluorescent in Situ Hybridization: Implications for Phylogeny and Concerted Evolution”. *American Journal of Botany* 86 (5) (január 5): 735–740.

Internetes hivatkozások:

1. <http://www.creative-biolabs.com/fish/tissuearray5.htm> (2012. október 19.)
2. <http://www.stanford.edu/group/rpl/protocols/RNAFISH.html> (2012. október 18.)
3. http://web.ku.edu/~sjmac/lab/reag/SSC_20X_7-0_20061209.pdf (2012 október 24.)
4. <http://mathfish.cee.wisc.edu/> (2012. október 24.)

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Növénysservezettani Tanszék vezetőjének, Böddi Béla Professor Úrnak, hogy dolgozatomat a Növénysservezettani Tanszéken készíthettem el, valamint témavezetőmnek, Vági Pálnak a munkával, illetve a dolgozattal kapcsolatos észrevételeit.

Köszönettel tartozom továbbá Simon Jankának pótolhatatlan tanácsiért, és a Mikológia laboratórium munkatársainak a hasznos javaslatokért.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Horváth Áron a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- minden átolást
- minden steril munkát
- minden hibridizációs és poszthibridizációs teszteket
- minden fixálást
- minden metszést
- minden oldat összemérését
- minden enzimátikus emésztést
- minden hibridizációt
- minden poszthibridizációs mosást
- szinte minden mikroszkópos vizsgálatot
- minden dokumentációt
- minden képelemzést

magam végeztem el.

.....
aláírás

Budapest, 2012. november 30.