

XXXI. OTDK Biológia Szekció

A kukorica csíkos mozaik vírus (MDMV) okozta stressz hatásának vizsgálata csemegekukoricáknál S-metilmetionin előkezelése esetén

Szerző: Ludmerszki Edit

Szak, évfolyam: Biológus MSc, 2. évfolyam

Témavezetők: dr. Rácz Ilona, dr. Rudnóy Szabolcs

**Egyetem, tanszék: Eötvös Loránd Tudományegyetem, Növényélettani és Molekuláris
Növénybiológiai Tanszék**



2013

Tartalomjegyzék

1. Bevezető.....	3
1.1. A kukorica csíkos mozaik vírus jellemzése	3
1.2.1. Növényi védekezési módok: az RNS-csendesítés	4
1.2.2. Növényi védekezési módok: reaktív oxigénformák képzése	5
1.2.3. Növényi védekezési módok: a fotorendszer károsodásának kivédése	5
1.3. Az S-metilmethionin szerepe a növényi anyagcserében	6
2. Célkitűzés	7
3. Anyag és módszer	8
4. Eredmények és értékelésük	12
4.1. A növény fiziológiai állapotát jellemző paraméterek változásai	12
4.1.1. A fluoreszcencia-paraméterek változásai	13
4.1.2. A klorofilltartalom változásai.....	15
4.2. A növényi stresszválaszban szerepet játszó védőanyagok vizsgálata	17
4.3. A génexpressziós vizsgálatok eredményei	23
Összefoglalás	27
Summary	28
Irodalom.....	29
Köszönetnyilvánítás	33
Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez	34

1. Bevezető

1.1. A kukorica csíkos mozaik vírus jellemzése

A kukorica a világon legnagyobb mennyiségben termesztett haszonnövényeink egyike. A növény számos biotikus és abiotikus stresszorzal találkozik az élete során, melyek közül különös jelentőségű a csíkos mozaik vírus (maize dwarf mosaic virus, MDMV). Az MDMV leggyakrabban 10-45 % közötti termésveszteséget okoz, de a kár nem egy esetben elérheti akár a 100%-ot is (Tóbiás és mtsai, 2008). A fertőzést 1963-ban, Ohio-ban írták le először (Stewart és mtsai, 2012). A termesztésben levő csemegekukorica vonalak közel 2/3-a fogékony a vírusfertőzésre, továbbá a rezisztensnek vélt egyedek közel 10 %-a megfertőződhet, ha fiatal (2-3 leveles) állapotban találkozik a vírussal (Williams és Pataky, 2012). Ennek köszönhetően kiemelten nagy hangsúlyt fektetnek a kórokozó kutatására világszerte.

A vírus pozitív, egyes szálú, 10 kb nagyságú RNS genommal rendelkezik, mely közel 2000 fehérjéből álló fehérjeburokba van csomagolva (Salomon és Bernardi, 1995). A vírus genomja egyetlen, 3000 aminosavból álló fehérjét kódol, mely 3 virális proteináz segítségével számos, funkcióval rendelkező fehérjére bomlik. Főleg a *Poaceae* családba tartozó növényeket fertőzi meg. A csíkos mozaik vírus rendszertani szempontból számos törzsre bontható. Ezek mindegyikére jellemző, hogy a fertőzés során hengerszerű bemélyedések jelennek meg a citoplazmában, valamint jelentősen megnő az endoplazmatikus retikulumok és a kloroplasztiszok száma a fertőzött területen. A vírus az endoplazmatikus retikulumot elhagyva a kloroplasztiszba kerül, és ott membránbetűródések képződését indukálja, melyekben lezajlik a replikációja (Wei és mtsai, 2010).

A vírus a természetben levéltetvek útján terjed (*Aphidinae*, *Lachninae* és *Drepanosiphinae* alcsaládok), azonban mechanikai úton is továbbadható egyik egyedről a másikra - utóbbi módszer széles körben elterjedt laboratóriumi körülmények közti fertőzéseknél. A fertőzés terjedését a rovarvektor mellett egy fűfélé, a fehér cirok (*Sorghum halepense*) is segíti, mivel a vírus előszeretettel támadja ezt a növényt, és innen könnyen továbbterjed a mezőgazdasági növényekre (Stewart és mtsai, 2012). A fertőzéshez a vírusnak szüksége van két általa kódolt faktorra, valamint a köpenyfehérjére és egy segítő proteinázra (HC-Pro - helper component proteinase), mely utóbbi a gazdaspecifitásban, és az RNS-csendesítésben játszik fontos szerepet (**1.2.1. fejezet**). Az MDMV-A törzs kiemelkedik a többi törzs közül (MDMV-C, -D, -E és -F), ezt tekintik az MDMV típus-törzsének. A vírustörzsek hasonló köpenyfehérjével rendelkeznek, különbséget az N- és a C-terminális

végein lehet találni, mely egyben törzsi jelleg is. Megfigyelték, hogy az N-terminális eltávolításával már nem tudják a levéltetvek terjeszteni a vírust, azonban mechanikai úton történő fertőzésnél sikeresen átjut a növénybe. Éppen ezért a köpenyfehérje N-terminális része fontos szerepet játszik a rovarvektorok közvetítette terjedésben.

MDMV-A fertőzéseknél klorotikus foltok jelennek meg a kukorica levelein, valamint törpenövésűek lesznek az egyedek (innen származik a dwarf elnevezés). A már említett fertőzési típusok mellett maggal és pollennel is tud terjedni a vírus (Li és mtsai, 2007, Plant Viruses Online adatbázis - <http://pvo.bio-mirror.cn/refs.htm>).

1.2.1. Növényi védekezési módok: az RNS-csendesítés

Vírusfertőzés során a növény RNS-csendesítéssel próbálja visszaszorítani a patogén terjedését. Az RNS-közvetített csendesítés mechanizmusa 4 részre osztható:

- (1) kettős szálú RNS képzése,
- (2) a kettős szálú RNS lebomlása kisebb, 18-25 nt hosszúságú darabokra,
- (3) a rövid RNS szakaszok 2'-O-metilációja, és
- (4) az így kapott RNS darabok funkciójuknak megfelelő helyre szállítása.

Feltételezések szerint MDMV fertőzésnél a vírus replikációja során alakulhat ki a duplaszálú RNS, melyből a vírus elsődleges, kisméretű virális RNS-t képez (vsRNS). A növény RNS-függő RNS polimerázokkal egy másodlagos vsRNS-nek nevezett duplaszálú RNS-t állít elő. Az RNS darabolását az RNáz III családba tartozó DICER nevű fehérjekomplex végzi el. A rövid RNS szakaszok ezután egy RISC (RNA-induced silencing complex) komplexnek nevezett fehérjeegyüttesbe kerülnek, melyben az egyik szál lebomlik. A másik RNS szál szekvenciaspecifikusan a célszekvenciához kapcsolódik, ezzel adva jelet a lebontó rendszernek az RNS degradálására. A vírus többféle módon képes kikerülni a növény védekező mechanizmusát: a genomjának több pontján is virulencia faktorokat kódol, melyek a növényi RNS-csendesítés során számos komponenshez kapcsolódhatnak, ezáltal blokkolhatják azok működését, végső soron pedig csökkentik a gazdanövény védekezési hatékonyságát. A vírus terjedését a növény specifikus R (rezisztencia) fehérjékkel képes kivédeni, melyek a virulencia faktorokhoz kötnek. A 14-3-3 fehérjecsaládba tartozó fehérjék fontos szerepet játszanak az R-gén-mediált növényi rezisztenciában. A genomi DNS G-boksz régiójához számos, a növényi stresszválaszban jelentős szerepet betöltő fehérje kötődik, melyeket G-boksz faktoroknak hívnak. A GF14-6 (G-boksz faktor 14-3-3 homológ) fehérje is ilyen G-boksz régióhoz köt, illetve számos faktort is képes kötni, melyek a védekezési

útvonalakon fejtik ki hatásukat (Campo és mtsai, 2012, Chung és mtsai, 1999, Denison és mtsai, 2011, Ruiz-Ferrer és Voinnet, 2009, Uzarowska és mtsai 2009, Vetten és Ferl, 1994).

Az előző fejezetben említett HC-Pro fehérjék fontosak a fertőzőképesség megtartásában. Számos módon képesek a gazdanövény védekezését blokkolni. A fehérjék rgs-CaM (calmodulin-szerű fehérje) molekulákhoz kötnek, melyek feladata a poszttranszkripcionális szintű géncsendesítés szupresszálása, de csökkentik a virális eredetű kis RNS-ek metilációjának mértékét is. Ez a több szinten zajló fegyverkezési verseny alakítja ki az MDMV fertőzésnél tapasztalható klorotikus mozaikosságot (Shiboleth és mtsai, 2007).

1.2.2. Növényi védekezési módok: reaktív oxigénformák képzése

Az RNS-csendesítés mechanizmusa mellett a növény reaktív oxigénformákat (pl. H_2O_2 , OH^- , 1O_2) is felszabadíthat, melyek több funkcióval rendelkezhetnek. Direkt módon támadhatják a bejutó kórokozót (OH^-), keresztkötetést alakítanak ki a sejtfalban található glikoproteinekkal, ami fizikai akadályt képez a vírus terjedésével szemben, vagy akár másodlagos hírvivőként számos, a védekezésben szerepet játszó szignáltranszdukciós útvonalat aktiválhatnak (H_2O_2) (Torres, 2010). A reaktív oxigénformák a vírus mellett a gazdát is károsíthatják, ezért a növény saját védelmére enzimeket (pl. szuperoxid-diszmutáz (SOD), glutation-S-transzferáz (GST)), valamint gyökfogó tulajdonsággal rendelkező másodlagos anyagcseretermékeket állít elő (ferulasav komponensek, flavonoid származékok, stb.). Mindezek mellett érdemes megemlíteni a klorofillmolekulák és a karotinoidok gyökfogó tulajdonságait is.

1.2.3. Növényi védekezési módok: a fotorendszer károsodásának kivédése

A Napból származó sugárzás energiája a leveleket elérve 3 fő útvonalon hasznosulhat: részben a fotoszintézis folyamatát eredményező fotokémiai reakcióban, emellett a fotonok energiája hővé alakulhat hődisszipációs útvonalakon, illetve a klorofillok gerjesztését követően a fölös energia fluoreszcencia formájában jelenhet meg. Optimális fiziológiai körülmények mellett az energia fotokémiai reakcióban hasznosul. A folyamat során redukált koenzimek és nagy energiájú vegyületek (ATP) keletkeznek, melyek nélkülözhetetlenek a fotoszintézishez. Mivel ilyenkor a fény energiáját kémiai energiává alakítja át a növény, a klorofillok fluoreszcenciája csökken. Ezt a folyamatot fotokémiai kioltásnak nevezik. Biotikus és abiotikus stresszek során gyakran megfigyelhető a fotorendszerek károsodása, és a nem fotokémiai kioltás mértékének a növekedése. A nem fotokémiai kioltás során

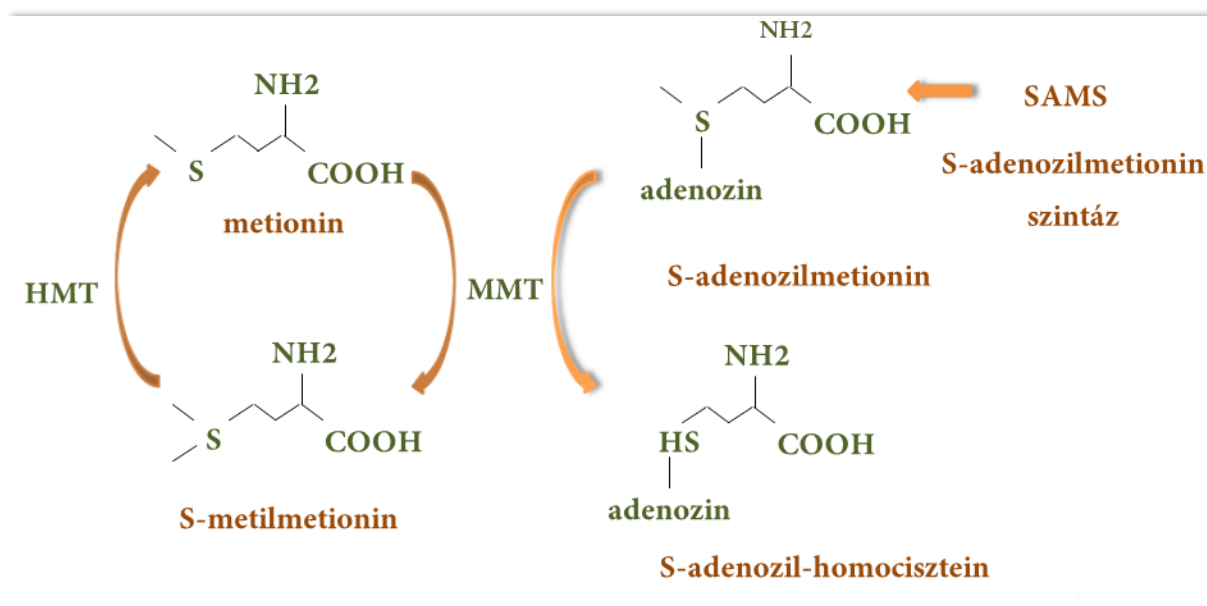
fokozódnak a hő- és energiadisszipációs útvonalak, továbbá a ΔpH és a xantofill ciklus-alapú kioltás is erősödhet (Baker, 2008).

A fotoszintetikus elektrontranszportlánc működése során protonok kerülnek a kloroplasztiszok tilakoidjainak lumenébe. A folyamatnak köszönhetően megváltozik a pH a lumenben. Stressz hatására módosul a protonok mennyisége a lumenben, és szélesebb tartományban tér el a pH is. A pH ilyen szintű változása számos, a stresszválaszban szerepet játszó fehérje konformációját változtatja meg (pl. pSBS proteinek), melyek ezt követően fejtik ki hatásukat. A pH-változás során aktiválódnak a xantofill ciklus enzimek is. A xantofill ciklus kiinduló vegyülete a violaxantin, melyből anteraxantin, végül pedig zeaxantin lesz, mely szerkezetéből adódóan hatékony gyökfogó molekula (Baker, 2008).

1.3. Az S-metilmetionin szerepe a növényi anyagcserében

A növények biotikus és abiotikus stressztényezőkkel szembeni toleranciájának javítására a klasszikus nemesítési eljárások, valamint a transzgénikus növények előállítása mellett lehetőségként merül fel olyan természetes anyagok alkalmazása, melyek kedvező irányban befolyásolva a növény fiziológiai folyamatait, a védelmi potenciál növelését eredményezik (Zhang és mtsai, 2011). Ilyen vegyület a növényekben általánosan előforduló S-metilmetionin. Az S-metilmetionin (SMM, $[(\text{CH}_3)_2\text{S}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}]$) egy természetben is előforduló, biológiailag aktív, nem proteinogén aminosav. 1954-ben írták le először káposztafélékben, azóta pedig az összes növény családban sikerült kimutatni jelenlétét. Fontos szerepet tölt be biotikus és abiotikus stresszorokkal szembeni védekezésben, mivel membránvédő szereppel rendelkezik, de emellett metildonorként befolyásolja az etilén, valamint a poliamin bioszintézis útvonalakat is.

Az SMM-ciklusban az SMM szintézise metioninból történik, S-adenozilmetionin:metionin S-metiltranszferáz (MMT) segítségével (**1. ábra**).



1. ábra Az SMM-ciklus (az ábrát Microsoft PowerPoint 2010 programmal készítettem)

Az enzim SMM mellett S-adenozilmetionint (AdoMet) is elfogad szubsztrátként, mely szintén fontos metildonor a növényi szervezetekben. Az S-metilmetionin:homocisztein S-metiltranszferáz (HMT) 1 mol SMM-ből 2 mol metionint szintetizál, így alakítva ki az SMM-ciklust. Kocsis és mtsai 2003-ban igazolták, hogy az SMM-ciklus egyik fő feladata az AdoMet megfelelő szinten tartása. Az AdoMet szintézisében az S-adenozilmetionin-szintáz (SAMS) vesz részt. Az SMM és AdoMet érzékeny egyensúlya is felelős a növény megfelelő védekezéséért (Ko és mtsai 2004, Ludmerszki és mtsai, 2011, Rácz és mtsai, 2008, Szegő és mtsai, 2007).

2. Célkitűzés

Közismert, hogy a vírusfertőzés során klorotikus foltok jelennek meg a fertőzött egyedek levelein, mely a fotoszintetikus apparátus sérülésére utal. Felmerül a kérdés, hogy SMM hozzáadásával, valamint fertőzés hatására hogyan és milyen mértékben módosul a levelek klorofilltartalma? Ennek felderítésére direkt módszerrel klorofillkinyerést, valamint két hullámhosszon (690 és 740 nm) fluoreszcencia leképezést végeztem.

Kérdésként merül fel, hogy MDMV fertőzés során is termelődnek-e ROS elleni védő anyagok, valamint hogy milyen kioltási útvonalakat preferál a növény. Ezek vizsgálatához két nem invazív módszert, fluoreszcencia leképezést és indukciót vizsgáltam. A fluoreszcencia leképezést két hullámhosszon (440 és 520 nm) végeztem, míg a fluoreszcencia indukció mérése során a ΔpH és xantofill ciklus-alapú kioltást (Φ_{NPQ}), a konstitutív hődisszipációt

($\Phi_{f,D}$), valamint az inaktiválódott PSII (kettes fotorendszer) reakciócentrumok energiadiSSIPációját (Φ_{NF}) vettem össze.

Uzarowska és mtsai (2009) microarray technikával igazolták, hogy a stresszválaszban szerepet játszó GF14-6 fehérje mennyisége megváltozik MDMV fertőzés során. Felvetődhet a kérdés, hogy hosszabb távon vizsgálva (3 hét), kukorica csíkos mozaik vírus fertőzés során változik-e a GF14-6 gén expressziója? A kérdés megválaszolásához real-time PCR technikával vizsgáltam a génexpresszió változásait.

Kocsis és mtsai (2003) igazolták, hogy az SMM és az AdoMet érzékeny egyensúlyban vannak jelen a növényben, mindketten fontos metildonorok, és a növényi stresszválasz szignalizációs útvonalai során is szerepet játszanak. Felmerült a kérdés, hogy SMM adagolásával hogyan változik az egyensúly, és ez milyen hatással van a kukorica MDMV-vel szembeni védekezésére. Ennek vizsgálatához az AdoMet szintézisében szerepet játszó enzim, a SAMS génexpressziós változásait vizsgáltam real-time PCR technikával.

Mindezen vizsgálatok eredményeként célom volt:

- Képet kapni a növény fiziológiai állapotáról a klorofilltartalom vizsgálatával és a nem fotokémiai kioltás mérésével.
- Az SMM hatásának kimutatása egyes növényi védekezőanyagok szintézisére fluoreszcencia leképezéses technikával.
- A fertőzés és SMM-kezelés génexpresszióra gyakorolt hatásainak vizsgálata real-time PCR technikával.

3. Anyag és módszer

Növénynevelési körülmények, kezelési csoportok

Kísérleteim során csemegekukoricát használtam. A kukoricaszemeket 6 %-os H_2O_2 oldatban áztattam 2 órán át, majd további 2 órán keresztül folyó desztillált vízben mostam. Ezt követően 3 napig sterilizált, desztillált vízzel átitatott, szűrőpapírral bélelt petricsészében csíráztattam a szemeket. 800 ml-es főzőpoharakban rácsra ültettem a csírázott magvakat (5 szem/ főzőpohár), majd SANYO MLR-350 HT típusú növénynevelő kamrában (23°C, 14 h világos, 10 h sötét), $\frac{1}{4}$ Hoagland tápoldaton neveltem a növényeket.

Kísérletem során 4 féle kezelést végeztem, melyeket 1, 2 és 3 hét elteltével dolgoztam fel:

- *Kontroll csoport (K)*: a növényeket $\frac{1}{4}$ Hoagland tápoldaton neveltem, stresszmentes körülmények között.
- *Kontroll és SMM-kezelt csoport (KS)*: stresszmentes körülmények között nevelt, SMM-kezelést kapott kukoricák.
- *Fertőzött csoport (F)*: MDMV inokulummal fertőzött egyedek.
- *Fertőzött és SMM-kezelt csoport (FS)*: MDMV inokulummal fertőzött egyedek, melyek a fertőzést megelőzően 24 órás SMM-kezelésben is részesültek.

Az SMM-kezelés

Az SMM-kezelt növényeket 11 nappal a csírázást követően 2 mg/L SMM-tartalmú $\frac{1}{4}$ Hoagland tápoldaton neveltem 24 óráig, majd azt követően normál $\frac{1}{4}$ Hoagland tápoldatra tettem őket. A kísérlet további részében végig $\frac{1}{4}$ Hoagland tápoldaton voltak a növények. A megfelelő SMM-koncentrációt előkísérletek során állítottam be.

A fertőzés

A fertőzésre szánt növényeket 12 és 14 nappal a csírázás után MDMV-A inokulummal fertőztem. A fertőzési módszert én kísérleteztem ki, és közel 70 %-os fertőzöttséget sikerült elérnem a kezelt kukoricákban, mely szakirodalmi adatokkal összevetve sikeres, az átlagot meghaladó fertőzésnek számít. A kukoricák 12 napos korukra már 4-5 leveles állapotban vannak, és kísérleteim során ebben a korban voltak a legfogékonyabbak a vírusra. A vírus inokulumot fertőzött növények leveléből készítettem el. 3 g fertőzött levelet 10 ml Sörensen-féle foszfát pufferben kevés cellit por hozzáadásával eldörzsöltem. Az így kapott homogenizátumot 12-15 egyed fertőzésére használtam fel. A fertőzés során az 1. és 2. leveleket kézzel dörzsöltem be, majd vizet permeteztem a levelekre, mely segíti a vírus bejutását. A fertőzést a 14. napon is megismételtem, szintén az 1. és 2. leveleket újrafertőzve. Fertőzöttségi tüneteket már 3 nappal a második kezelés után sikerült regisztrálnom. Hasonlóan korai tünetmegjelenésre nem találtam példát a szakirodalomban.

A klorofill fluoreszcencia indukció és a fluoreszcencia leképezés mérése

A klorofill fluoreszcenciát és a nem fotokémiai kioltást nem invazív módszerrel, pulzus amplitúdó modulációs készülékkel (PAM-2000, Waltz, Effeltrich, Németország) mértem. A

leveleket a mérés előtt 15 percig sötétadaptáltam, hogy a PSII reakciócentrumok nyitott állapotban legyenek. Ebben a formában képesek csak maximálisan redukálni a Q_A molekulát, és csak így mérhető maximális fluoreszcencia (F_m). A mintákat nem aktinikus fénnel rövid ideig megvilágítottam, mely során az F_m és F_0 (minimális fluoreszcencia) adatokat regisztrálta a műszer. Ezekből a paraméterekből számolható ki az F_v/F_m hányados (F_v = variábilis fluoreszcencia), mely kifejezi a PSII maximális kvantumhatékonyságát, egyúttal jól jellemzi a növény aktuális élettani állapotát.

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

Ezt követően folyamatos aktinikus fénnel világítottam meg a leveleket, majd 100 s-ként gyenge távoli vörös fényfelvillanásokat adtam manuálisan. Az adatokat minden fényfelvillanásnál regisztrálta a műszer, és egészen addig adtam fényfelvillanásokat, amíg az F_m' érték (fényadaptált állapotban mért maximális fluoreszcencia) állandó nem lett. Ilyenkor a PSII reakciócentrumok zárt állapotba kerülnek, és nem játszódik le fotokémiai reakció. Ezt követően lekapcsoltam az aktinikus fényt, és sötétben gyenge, távoli vörös fényfelvillanásokat adtam a leveleknek (5 és 20 s, 1, 2, 5 és 10 min elteltével). Így a sötétadaptált állapot mérhető. A mérőműszer folyamatosan monitorozta az alábbi paramétereket: F_0 , F_m , F_0' , F_m' , F_t , $F_{md20''}$, $F_{md5'}$, $F_{md10'}$ és F_m'' ¹. Kísérletem során 3 paramétert vizsgáltam: a ΔpH és xantofill ciklus-alapú kioltást (Φ_{NPQ}), a konstitutív hődisszipációt ($\Phi_{f,D}$), valamint az inaktiválódott PSII reakciócentrumok energiadisszipációját (Φ_{NF}).

$$\Phi_{NPQ} = ((F_t/F_m') - (F_t/F_m)) * (F_v/F_m / F_v/F_{mM})$$

$$\Phi_{f,D} = (F_t/F_m) * (F_v/F_m / F_v/F_{mM})$$

$$\Phi_{NF} = 1 - ((1 - (F_t/F_m')) * (F_v/F_m / F_v/F_{mM}) + \Phi_{f,D} + \Phi_{NPQ})$$

Az egyenletben szereplő F_{mM} értékhez a legjobb paraméterekkel rendelkező kontroll növény F_m értékét használtam fel (2 héttel a kezeléseket után mért kontroll növény volt). A fenti egyenletek és a módszer Baker (2008) munkájából származnak.

A fluoreszcencia leképezés során FL-FIS (compact flash-lamp fluorescence imaging system) fluoreszcencia leképző rendszerrel dolgoztam. A mérőműszer 355 nm-es UV fénnel gerjeszti a mintát, melyet 4 filterrel (440, 520, 690 és 740 nm) ellátott CCD kamera regisztrál. A kis intenzitású fluoreszcens jelek felerősítése több száz kép összegzésével történik, melyet a

¹ F_0 : minimális fluoreszcencia, F_m : maximális fluoreszcencia, F_0' : fényadaptált állapotban mért minimális fluoreszcencia, F_m' : fényadaptált állapotban mért maximális fluoreszcencia, F_t : t időpillanatban mérhető aktuális fluoreszcencia fény adaptált állapotban, $F_{md20''}$, $F_{md5'}$, $F_{md10'}$: maximális fluoreszcencia sötétadaptált állapotban a 20. másodpercben, 5. és 10. percben, F_m'' : maximális fluoreszcencia sötétadaptált állapotban

Camille1.04 program végez el. Az adatok kiértékeléshez egy másik, az 1.05 program szolgál segítségül.

Klorofillkinyerés 80 % acetonnal

A leveleket eldörzsölés előtt 1,8 cm átmérőjű dugófúróval kikorongoztam, majd 3-3 korongot dörzsmozsárban 10 ml, ammóniát is tartalmazó, 80 %-os acetonnal homogenizáltam. A mintákat 10 000 g-n 5 percig centrifugáltam, majd 1 cm-es küvettákban fotométerben megmértem az abszorbancia értékeket 663,6 és 646,6 nm-en. A kapott intenzitásadatokból az alábbi egyenlet alapján összklorofill tartalmat számoltam 10 ml mintára:

$$Kl-a + Kl-b = 17,76 * E_{646,6} + 7,34 * E_{663,6}$$

Az így kapott értékeket egységnyi levélfelületre kiszámoltam és *összklorofill tartalom (mg) / egységnyi levélfelület (cm²)* formában adtam meg (Porra és mtsai, 1989).

mRNS kinyerés, cDNS szintézis

Az mRNS kinyeréshez ZR Plant RNA MiniPrepTM 2024 kinyerő kitet, a cDNS-szintézishez a First Strand cDNA Synthesis Kitet használtam (Thermo Scientific) a gyártó utasítása szerint.

real-time PCR

A mérés során Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) kit felhasználásával relatív génexpressziót vizsgáltam. A vizsgálandó gének kiválasztásához Uzarowska és mtsai 2009-es munkája adott segítséget. A referenciagéneket Manoli és mtsai (2012) cikke alapján választottam ki (**1. táblázat**).

Referenciagének: aktin (ZA), membrán fehérje PB1A10.07c (MEP).

Vizsgált gének: GF14-6 (GF), S-adenozilmetionin szintáz (SAMS).

1. táblázat A vizsgált és referenciagénekhez használt forward és reverz primerek

gén neve	forward szekvencia (5'→3')	reverz szekvencia (5'→3')	Amplikon hossza (bp)	Adatbázis hivatkozási szám	qRT-PCR hatékonyság E
ZA	CGCTAGTGGGCGAACAACT	CGCATGAGGAAGTGTGTATCC	92	J01238*	1,95
MEP	TTCCTCATGTTCTTCGTGCC	CAGTTCTCATTCCATCCGTG	130	AY105120.1**	1,98
GF	AGAGCAATGTCCTGGGCAG	CAAGATGAAGGGTGATTACTAC	114	BG836057.1**	1,94
SAMS	CATTGAGCAGCAGTCCCCT	GGTCTCGTCAGTCGCATAC	118	BT054969*	1,97

* GenBank ** MaizeGDB

A primereket primer3 online programmal és Oligo Analyzer 1.2 programmal terveztem.

A génexpressziós változásokat $\Delta\Delta C_t$ módszerrel számoltam ki.

$$\Delta C_{t_{\text{kontroll}}} = C_{t_{\text{vizsgált gén kontroll}}} - C_{t_{\text{referencia gén kontroll}}}$$

$$\Delta C_{t_{\text{kezelt}}} = C_{t_{\text{vizsgált gén kezelt}}} - C_{t_{\text{referencia gén kezelt}}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{kontroll}}} - \Delta C_{t_{\text{kezelt}}}$$

$$\text{A változás mértéke: } E^{\Delta\Delta C_t}.$$

Statisztikai vizsgálatok

Mérési eredményeimet Student-féle t-próbával ellenőriztem. A szignifikanciaszintet (α) 5 %-ban határoztam meg. Az adatsorokat Excel 2010 programban vettem össze a t.eloszlás függvényt használva, melyhez t-táblázatból néztem ki a függvénybe illesztendő $\hat{t}$ paramétert. A t.eloszlás függvény segítségével az elsőfajú hiba valószínűsége számítható ki (p). Ha p értéke meghaladja az 5 %-ot, akkor a két adatsor között szignifikáns különbség mutatható ki.

4. Eredmények és értékelésük

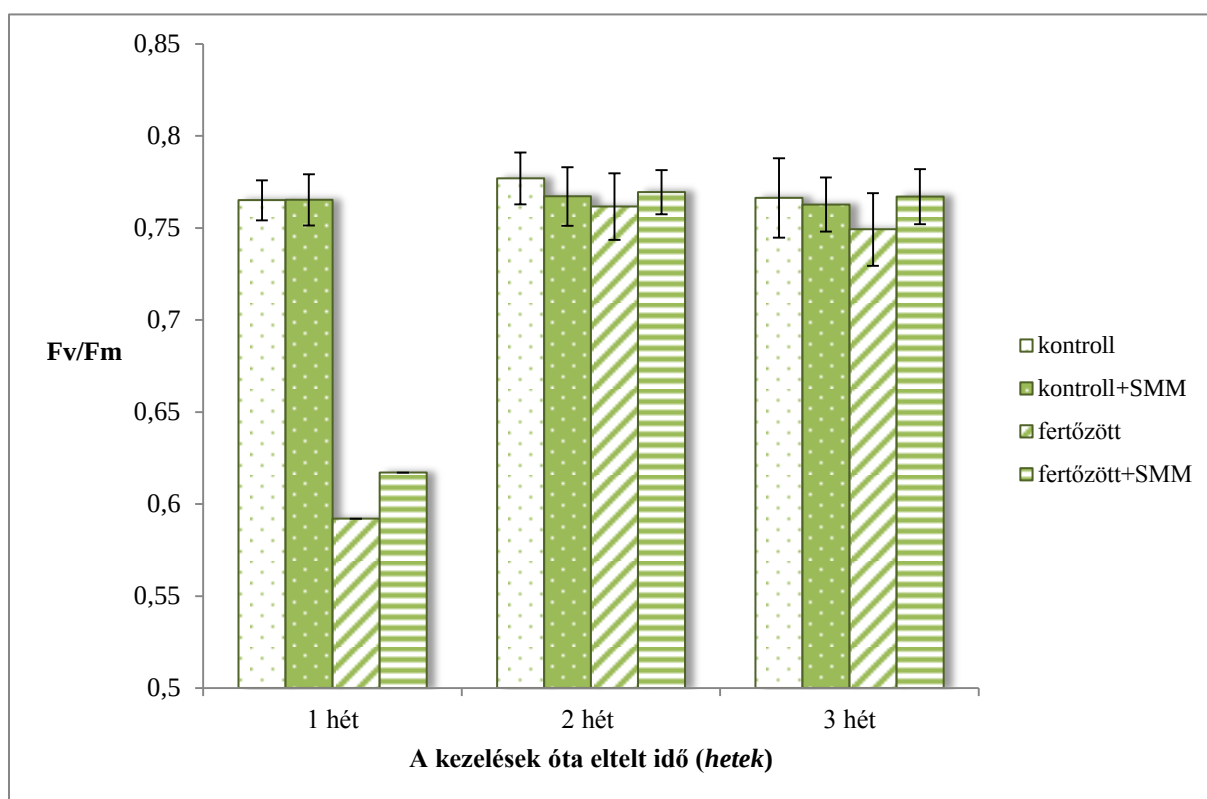
4.1. A növény fiziológiai állapotát jellemző paraméterek változásai

A növény általános fiziológiai állapotának a leírására a fotorendszerek állapotát (4.1.1. fejezet) és a levelekben kimutatható klorofilltartalmat (4.1.2. fejezet) vizsgáltam.

4.1.1. A fluoreszcencia-paraméterek változásai

A fluoreszcencia indukció változásai

Az F_v/F_m a PS II maximális kvantumhatékonyságát fejezi ki, mely paraméter jól jellemzi a növény fiziológiai állapotát. Ennek köszönhetően az F_v/F_m adat jó megközelítéssel, egyenes arányosságban mutatja a fotorendszerek épségét, ezért stresszhatásoknál kiválóan jellemezhető vele a károsodás mértéke. Az F_v/F_m értékeket a **2. ábra** mutatja be.



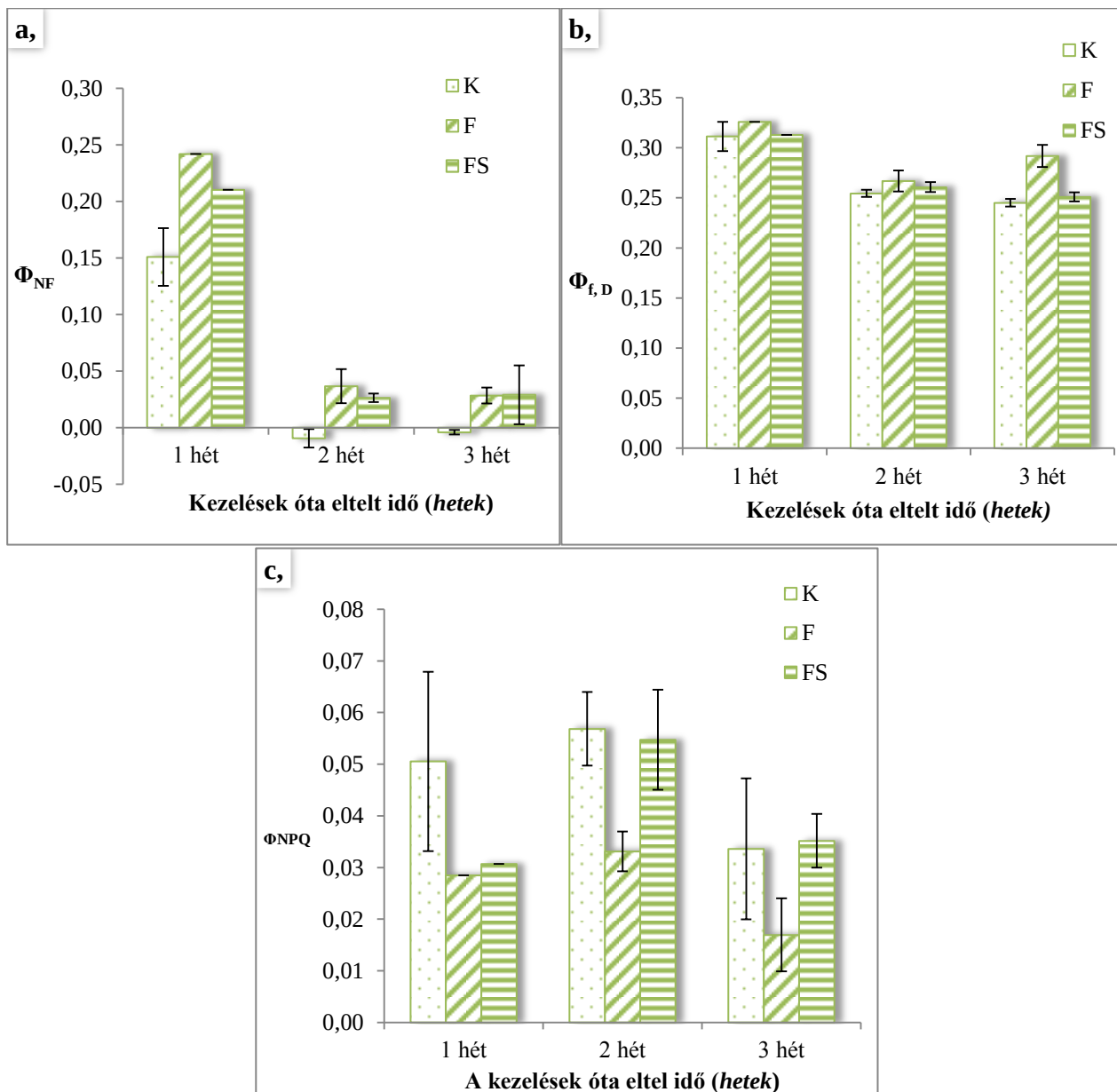
2. ábra A PSII állapotát jellemző F_v/F_m fluoreszcencia értékek 1, 2 illetve 3 héttel a kezelések után mérve.

Az F_v/F_m adatokban szignifikáns változás csak a fertőzés utáni első héten tapasztalható, a 2. és 3. hetekben már nem különböznek statisztikailag egymástól a kezelések. Az első héten megfigyelhető eltérés a fertőzési módszer során fellépő mechanikai károsodással magyarázható. Az eredmények alapján elmondható, hogy az SMM-kezelés nem volt hatással az F_v/F_m paraméterekre, továbbá a vírusfertőzés sem eredményezett drasztikus csökkenést. Mivel az F_v/F_m paraméter nem mutatott változást, ezért érzékenyebb méréssel, a nem

fotokémiai kioltás mérésével is megvizsgáltam a növényeket, mely adatokat a **3. ábra** tartalmazza.

A nem fotokémiai kioltás értékei

A *kontroll* és *SMM*-kezelt növényeket nem tüntettem fel a **3. ábrán**, mert statisztikailag nem tértek el a *kontroll*tól egyik paraméter esetében sem.



3. ábra Az inaktiválódott PSII reakciócentrumok energiadisszipációja (Φ_{NF}) (**a**), a konstitutív hődisszipáció ($\Phi_{f,D}$) (**b**), és a ΔpH és xantofill ciklus-alapú kioltás (Φ_{NPQ}) (**c**) *kontroll*, *fertőzött*, valamint a *fertőzött és SMM-kezelt* növényekben 1, 2 és 3 héttel a kezelések után (K: *kontroll*, F: *fertőzött*, FS: *fertőzött és SMM-kezelt*).

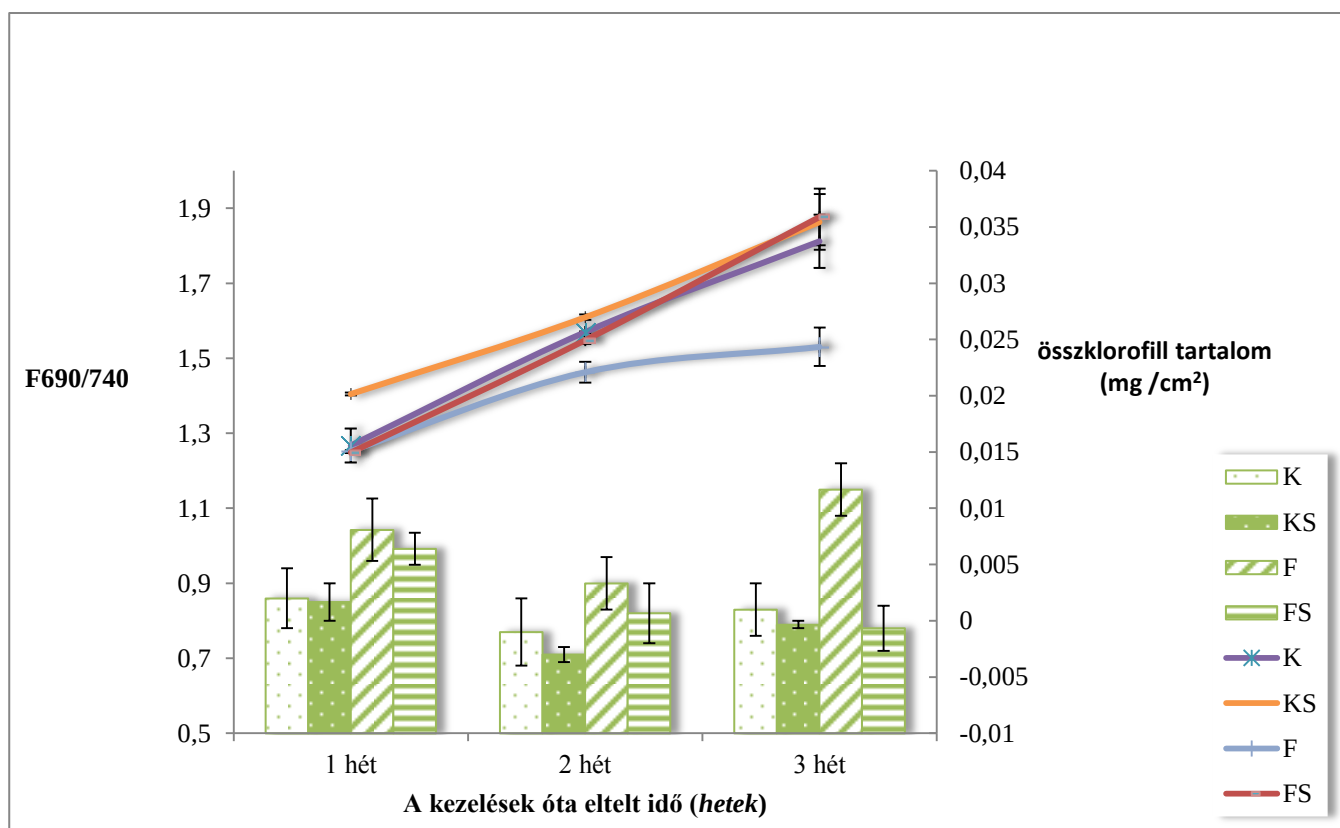
A **3/a. ábrán** az inaktiválódott PSII reakciócentrumok energiadisszipációja látható. A *fertőzött* valamint a *fertőzött és SMM-kezelt* növények szignifikánsan eltérnek a *kontrolltól*. Míg az első héten van különbség a *fertőzött* továbbá a *fertőzött és SMM-kezelt* Φ_{NF} értékében, addig a 2. hétre a különbség csökken, majd a 3. hétre elvész. Az eredmények alapján látható, hogy a vírusfertőzés hatására jelentősen megnő ez a paraméter, mely változás mutatja, hogy a PSII reakciócentrumok energiadisszipációja preferenciális kioltási útvonalnak számít MDMV fertőzésnél.

A **3/b. ábrán** a konstitutív hődisszipáció értékeit tüntettem fel. Az 1. és 2. héten statisztikailag nem különböznek a kezelt növények értékei a *kontrolltól*, azonban a 3. hétre a *fertőzött* növények értékei szignifikánsan meghaladják a *kontroll* és a *fertőzött és SMM-kezelt növények* $\Phi_{f,D}$ értékeit. Vírusfertőzésnél a fotorendszerek sérülése következtében a konstitutív hődisszipáció emelkedése figyelhető meg, azonban amennyiben SMM-előkezelést kaptak a növények, a *kontrollal* megfelelő értékeket regisztráltam. Az eredmények arra utalnak, hogy az SMM-előkezelés megvédte a növényt a károsodástól.

A **3/c. ábrán** a ΔpH és a xantofill ciklus-alapú kioltás értékei szerepelnek. A *fertőzött* növények értéke statisztikailag itt is elkülönül a *kontroll*, és a *fertőzött és SMM-kezelt* kukoricától. A Φ_{NPQ} változása stresszfüggő, ugyanis amíg bizonyos stresszeknél megemelkedik, addig más típusú stresszeknél csökken a mértéke. Solti és mtsai (2009) kimutatták nyárfáknál, hogy Cd-stressz során csökkent a ΔpH és a xantofill ciklus-alapú kioltás mértéke. Jelen dolgozatban, vagyis csemegekukoricák MDMV-fertőzése során is csökkenést mértem, mely azt jelenti, hogy a Φ_{NPQ} nem tekinthető jelentős kioltási útvonalnak. Hasonlóan, mint a konstitutív hődisszipáció során, itt is megfigyeltem, hogy SMM-előkezelés hatására a *fertőzött* egyedek értékei a *kontroll* növények értékeivel megegyeztek, ami az S-metilmationin kezelés védő hatásának köszönhető.

4.1.2. A klorofilltartalom változásai

Kísérletem során vizsgáltam mind a vírus, mind az SMM hatásait a klorofilltartalomra. Méréseim során két módszert alkalmaztam: hagyományos acetonos kinyeréses technikát, mellyel kvantitatívan adható meg a mennyiség, valamint a nem invazív fluoreszcencia leképezéses módszert, amellyel arányaiban jól becsülhető a klorofilltartalom. Az adatokat a 4. **ábra** tartalmazza.



4. ábra A klorofilltartalom változásainak vizsgálata 80 %-os acetonos kinyeréssel egységnyi levélfelületre (cm^2) vetítve (jobb oldali y-tengely, vonaldiagram), valamint fluoreszcencia leképezés adatok 690 és 740 nm-en mért fluoreszcencia értékeinek hányadából számolva (bal oldali y-tengely, oszlopdiaagram). Az összklorofill tartalom egyenes, míg a fluoreszcencia leképezés adatok fordított arányosságban mutatják a klorofilltartalmat (K: *kontroll*, KS: *kontroll és SMM-kezelt*, FS: *fertőzött és SMM-kezelt*, F: *fertőzött*).

A **4. ábrán** a 690 és 740 nm-en mért fluoreszcencia arányát oszlopdiaagramon, míg az acetonos módszerrel meghatározott klorofilltartalmat vonaldiagramon ábrázoltam. A fluoreszcencia arányok fordított arányosságban adják meg a klorofilltartalmat, mivel a klorofill molekulák elnyelik a 690 nm-en kibocsájtott fluoreszcenciát. Ennek eredményeképpen az oszlopdiaagramon a növekedés a klorofilltartalom csökkenését, míg a csökkenés a klorofilltartalom növekedését jelenti. A *kontroll* és *SMM-kezelt* növényekben magasabb klorofilltartalom mérhető, mint a *kontroll*nál. A fluoreszcencia adatok alapján a különbség nem tekinthető szignifikánsnak, azonban az első héten az acetonos kinyeréssel mért adatok szignifikánsan magasabb klorofilltartalmat mutatnak. A *fertőzött* kukoricák fluoreszcencia-alapú értékei a legmagasabbak, ez főleg a 3. héten látható tisztán, és ezzel párhuzamosan a 3. hétre erőteljes lecsengés tapasztalható az acetonos meghatározással is ennél a csoportnál. A *fertőzött és SMM-kezelt* növények oszlopdiaagramos adatai már a 2., de

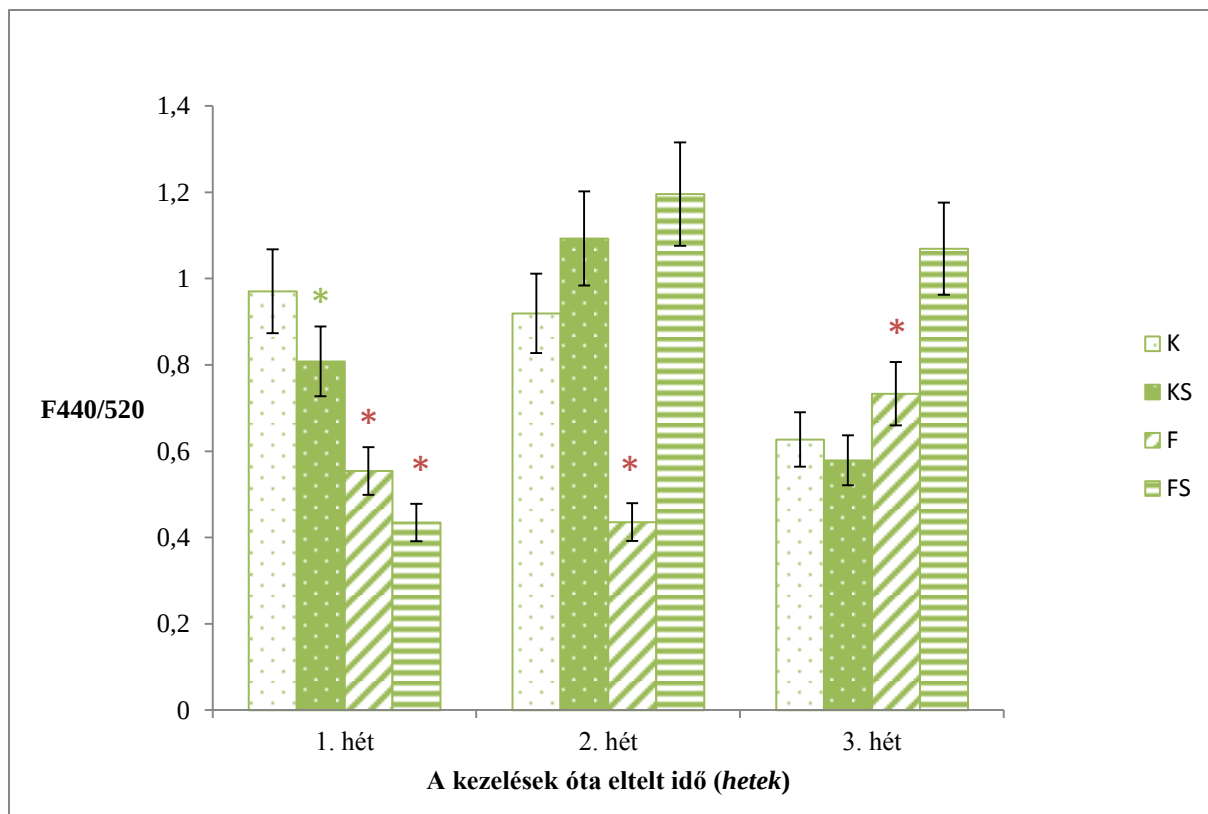
főleg a 3. héten szignifikánsan eltérnek a *fertőzött* kukoricáktól, azoknál jóval nagyobb klorofilltartalmat mutatnak, és ugyanezt az eredményt támasztja alá a vonaldiagram is. A *fertőzött és SMM-kezelt* növények a 3. hétre megközelítik a *kontroll*-nál mérhető klorofilltartalmat. Vizsgálataimmal elsőként mutattam ki, hogy a vírusfertőzés során fellépő klorofillcsökkenést képes az SMM-előkezelt növény kivédeni, melyet két, egymástól eltérő módszerrel is igazoltam. Mérési eredményeim alapján sikerült egy összefüggést leírnom az egységnyi levélfelületre vonatkoztatott összklorofill tartalom és az F690/740 intenzitásarányok között. Lichtenthaler és mtsai (1990) mutattak már ki hasonló összefüggést különböző fajoknál, azonban csemegekukoricára leírás még nem született.

$$[(F690/740) \cdot 1000] \cdot \text{összklorofill tartalom mg/cm}^2 = (x-1) \cdot 7,$$

ahol x a növény kora hetekben kifejezve. Amennyiben a fluoreszcencia-arányt megszorozom az összklorofill tartalommal egységnyi levélfelületre számolva, abból következtetni lehet a növény korára (hetekben). Az egyenletben szerepel egy konstanssal (1000) való szorzás, azt praktikus okokból vezettem be, hogy a hetek száma könnyen kezelhető szám legyen. Az így kapott eredmények 10 %-os hibán belül voltak. Az egyenlet lehetőséget ad arra, hogy nem invazív módszerekkel, a fluoreszcencia leképezéses adatokból és a növény korából ki lehessen számolni az egységnyi levélfelületre eső összklorofill tartalmat csemegekukoricáknál.

4.2. A növényi stresszválaszban szerepet játszó védőanyagok vizsgálata

A növényi stresszválaszban fontos szerepet játszó anyagok meghatározásához a 440 és 520 nm-en készített fluoreszcencia felvételek hányadosaival számoltam (5. ábra). 440 nm-en főleg ferulasav és p-kumársav komponensek emittálnak, míg 520 nm-en főként kempferol, kvercetin, berberin, továbbá riboflavin vegyületek detektálhatók. A stresszhatások vizsgálatánál nem a fluoreszcencia hozamokat, hanem ezek hányadosát szokták figyelembe venni (Buschmann és mtsai, 1998, 2000, Lazár 1999, Lichtenthaler és mtsai, 1996, 1997, Pineda és mtsai, 2008, Roháček és mtsai, 1999, Szigeti, 2008). A 2 héttel a kezelések után mért fluoreszcencia értékekből készített hamisszínes felvételeket is ebben az alfejezetben mutatom be (6. és 7. ábrák).



5. ábra A növényi stresszreakciókban szerepet játszó sejtalkomponensek vizsgálata a fluoreszcencia leképezés adatok 440 és 520 nm-en mért fluoreszcencia értékeinek hányadából számolva. A zöld csillag a klorofilltartalom növekedését, míg a piros a csökkenését jelzi (a **4. ábra** adatai alapján) (K: *kontroll*, KS: *kontroll és SMM-kezelt*, F: *fertőzött*, FS: *fertőzött és SMM-kezelt*).

Az F440/520 arányok összevetéséhez ismerni kell a klorofilltartalmat, mivel a klorofill molekulák elnyelik a 440 nm-en emittáló anyagok fluoreszcenciáját, így magasabb klorofilltartalom mellett alacsonyabb F440-es értéket, és ennek köszönhetően alacsonyabb F440/520 arányt kapunk. A **5. ábrán** éppen ezért feltüntettem a klorofilltartalom változását is a *kontroll* növényekhez viszonyítva. A **2. táblázatban** külön is feltüntettem a 440 és az 520 nm-es emissziók értékét. Az 1. héten a *kontroll és SMM-kezelt* kukoricáknál megnő a klorofilltartalom (zöld csillag), ennek megfelelően alacsonyabb F440/520 érték mérhető, mint a *kontroll* növénynél. A *fertőzött* és a *fertőzött és SMM-kezelt* kukoricáknál csökken a klorofilltartalom az első héten, ami párhuzamba hozható az F_v/F_m adatok (**2. ábra**) csökkenésével. Az utóbbi két kezelésnél a klorofill csökkenése miatt kevésbé nyelődik el a 440 nm-es fluoreszcencia, mégis alacsony F440/520 arányt mértem. Ez annak köszönhető, hogy a 440 nm-en emittáló anyagok mennyisége csökken a növényekben. Az eredmények azt

mutatják, hogy a fertőzés során okozott mechanikai sérülés a 440 nm-en emittáló anyagoknak a csökkenéséhez vezet.

2 héttel a kezelések után az SMM-kezelt növényeknél megnő a F440/520 arány értéke. A *kontroll és SMM-kezelt és a fertőzött és SMM-kezelt* kukoricákban jelentősen megnőtt a 440 nm-es emisszió mértéke (**2. táblázat**). Emellett kisebb mértékben, de mind a két kezelési csoportnál ugyancsak megemelkedett az 520 nm-es emisszió is. A *fertőzött* egyedeknél az 520 nm-es emisszió emelkedett meg szignifikánsan a *kontroll* növényekhez képest, míg a 440 nm-es emisszió nem tért el tőlük. A *fertőzött* növényeknél tapasztalható klorofilltartalom csökkenés azt eredményezi, hogy kevésbé nyelődik el a 440 nm-es emisszió, így az **5. ábrán** látható F440/520 intenzitáscsökkenés a nevező növekedésével, tehát az 520 nm-en emittáló anyagok fluoreszcenciájának növekedésével magyarázható. Látható, hogy a fertőzés okozta stressz során megnő az 520 nm-en emittáló anyagok felhalmozódása, míg az SMM-kezelés során jellemzően a 440 nm-en emittáló anyagok dúsulnak fel a növényben.

A kezeléseket követő 3. héten mind a *fertőzött*, mind a *fertőzött és SMM-kezelt* kukoricáknál szignifikánsan megemelkedik az F440/520 arány értéke. A *fertőzött* növények kevesebb klorofillt tartalmaznak a többi növénynél, így a 440 nm-es érték emelkedése a kisebb mértékű újraelnyelésnek köszönhető. Ezt a megfigyelést a **2. táblázat** adatai is alátámasztják, hisz sem a 440, sem az 520 nm-es emisszió nem tér el szignifikánsan a *kontroll* növények értékeitől. A *fertőzött és SMM-kezelt* kukoricáknál az F440/520 intenzitás növekedése a 440 nm-en emittáló anyagok mennyiségének emelkedésével magyarázható. A **2. táblázatban** is megfigyelhető, hogy ennél a csoportnál jelentősen nagyobb mennyiségben vannak jelen a 440 nm-en emittáló anyagok.

Az eredmények alapján látható, hogy az SMM-kezelés megemeli a 440 nm-en emittáló anyagok mennyiségét, melyek szerepet játszanak a növény védekezésében. Az SMM-előkezelést is kapott növényeknél stressz során hosszabb távon is kimutatható a 440 nm-en emittáló anyagok mennyiségének emelkedése, mely az SMM kondicionáló hatásának köszönhető.

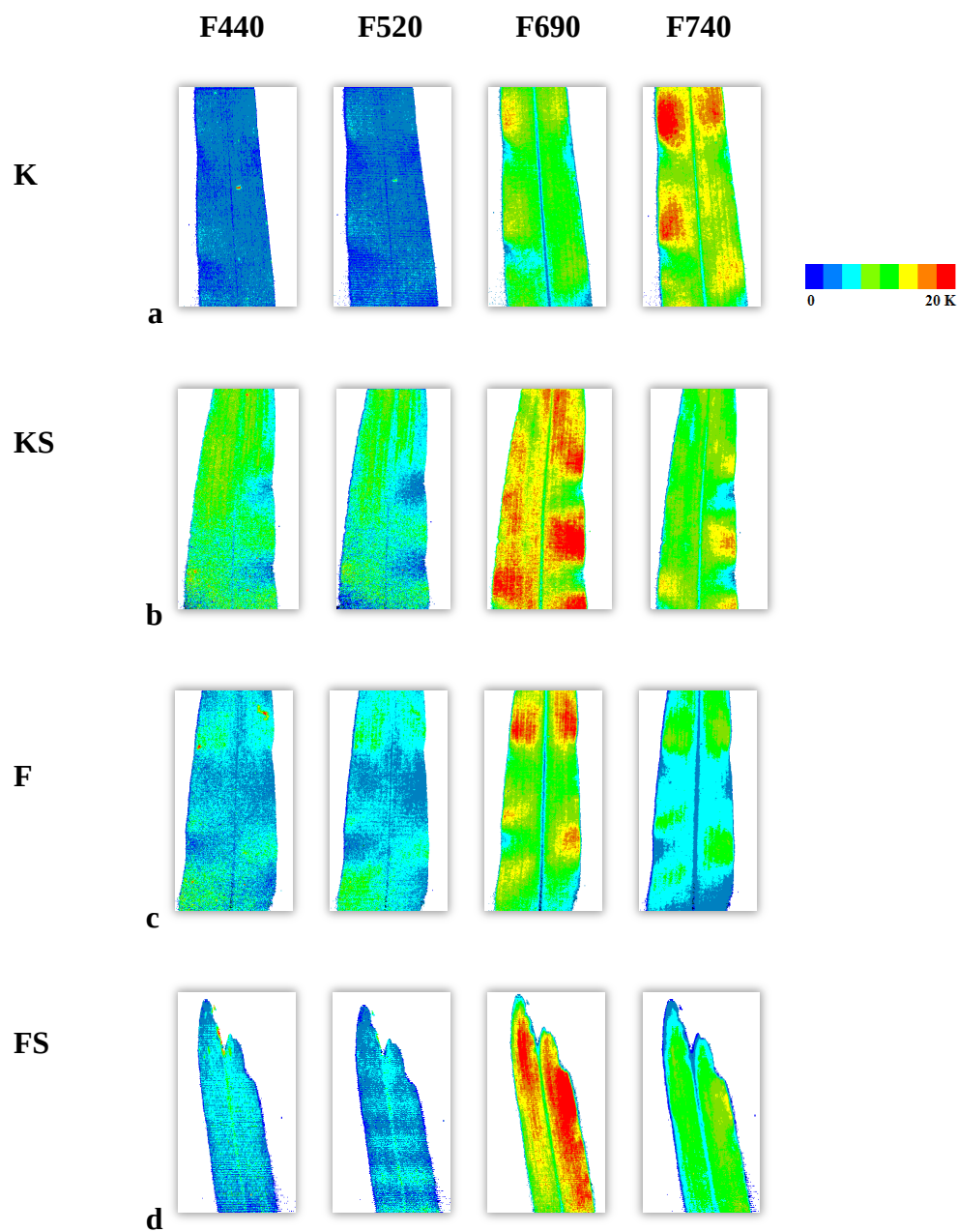
2. táblázat A 440 és 520 nm-en mért emissziók értékei, és az összklorofill-tartalom.

Kezelések		Emissziók / nm			összklorofill-tartalom $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ **
		440	520	440/520	
1. hét	K	106,20 $\pm$ 10,99	109,40 $\pm$ 12,00	0,97 $\pm$ 0,09	15,6 $\pm$ 1,50
	KS	108,22 $\pm$ 1,69	133,97 $\pm$ 10,28	0,81 $\pm$ 0,08	20,2 $\pm$ 1,21*
	F	60,19 $\pm$ 6,45*	108,61 $\pm$ 9,75	0,55 $\pm$ 0,05*	15,1 $\pm$ 0,45
	FS	75,67 $\pm$ 8,78*	174,07 $\pm$ 13,84	0,43 $\pm$ 0,04*	15,0 $\pm$ 0,6
2. hét	K	349,60 $\pm$ 10,59	380,39 $\pm$ 17,61	0,92 $\pm$ 0,09	25,7 $\pm$ 0,77
	KS	510,76 $\pm$ 28,45*	467,39 $\pm$ 73,66	1,09 $\pm$ 0,10*	27,0 $\pm$ 2,43
	F	306,35 $\pm$ 35,81	703,10 $\pm$ 30,94*	0,44 $\pm$ 0,04	22,1 $\pm$ 0,93*
	FS	574,76 $\pm$ 29,43*	480,66 $\pm$ 13,27	1,20 $\pm$ 0,10*	24,9 $\pm$ 0,35
3. hét	K	182,78 $\pm$ 17,99	291,48 $\pm$ 30,75	0,63 $\pm$ 0,06	33,7 $\pm$ 2,36
	KS	256,11 $\pm$ 39,44	442,66 $\pm$ 60,07	0,58 $\pm$ 0,05	35,4 $\pm$ 2,48
	F	227,42 $\pm$ 25,93	310,25 $\pm$ 32,89	0,73 $\pm$ 0,07	24,3 $\pm$ 1,68*
	FS	411,08 $\pm$ 37,49*	384,57 $\pm$ 21,27	1,07 $\pm$ 0,10*	35,9 $\pm$ 2,48

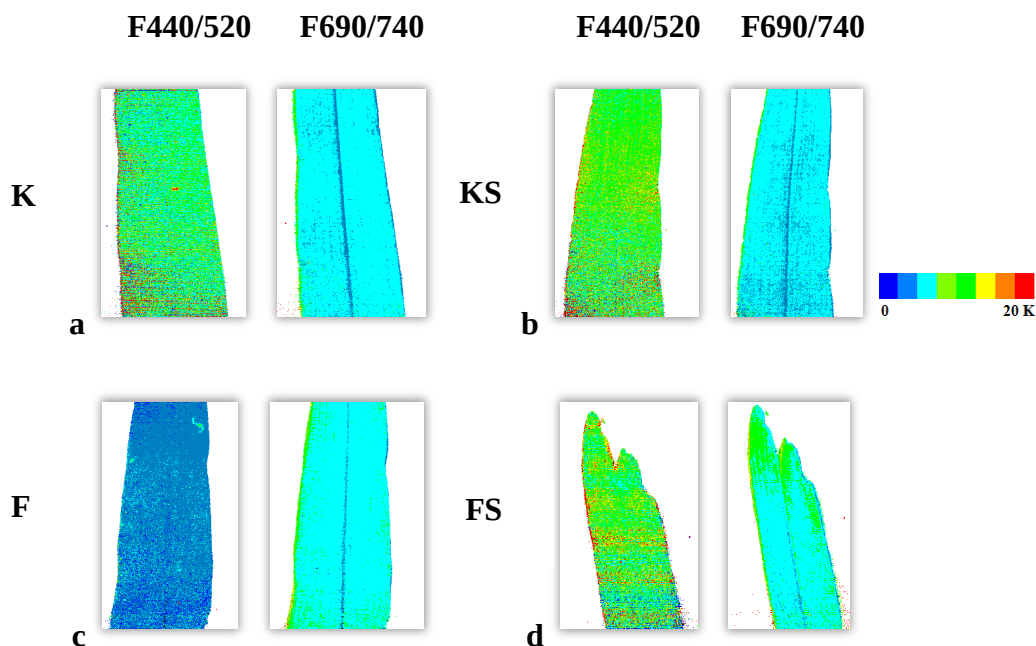
K: kontroll, KS: kontroll és SMM-kezelt, F: fertőzött, FS: fertőzött és SMM-kezelt

A * -gal jelölt értékek statisztikailag eltérnek a kontroll kukoricák értékeitől.

** Az értékeket a 4. ábra adatai alapján számoltam.



6. ábra 2 héttel a kezelések után mért fluoreszcencia intenzitás értékek. **a**, a kontroll (K), **b**, a kontroll és SMM-kezelt (KS), **c**, a fertőzött (F) és **d**, a fertőzött és SMM-kezelt (FS) növények 440, 520, 690 és 740 nm-en készített fluoreszcencia felvételei.

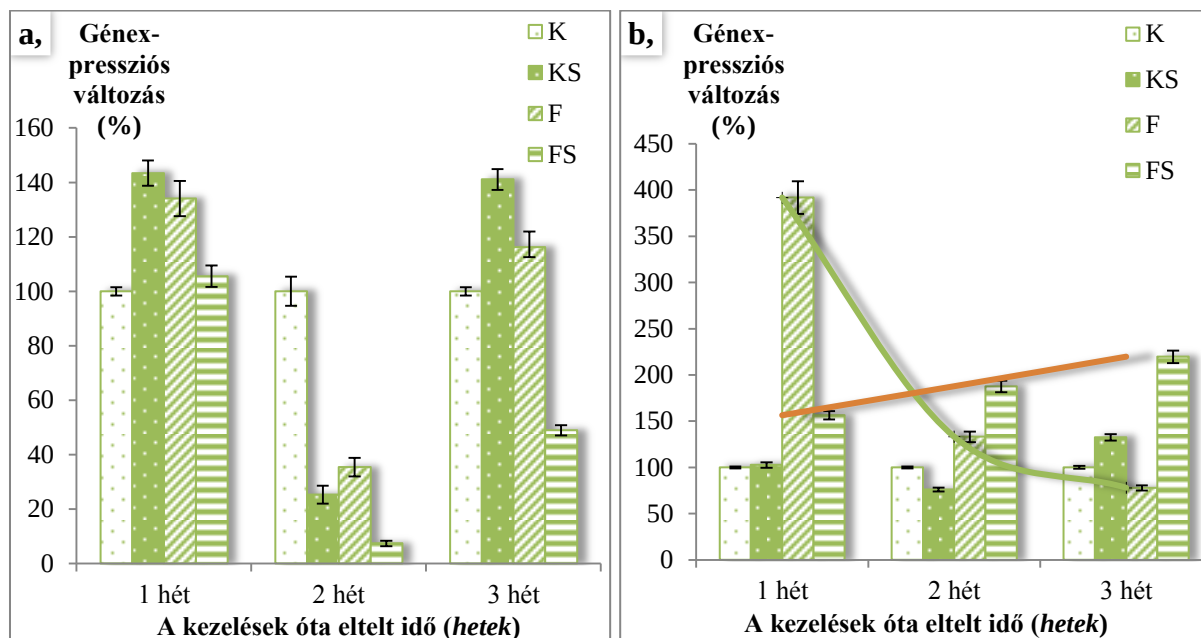


7. ábra 2 héttel a kezelések után mért fluoreszcencia intenzitás képek. **a**, a kontroll (K), **b**, a kontroll és SMM-kezelt (KS), **c**, a fertőzött (F) és **d**, a fertőzött és SMM-kezelt (FS) növények 440/520 és 690/740 nm-en készített fluoreszcencia felvételek hányadosai.

Az **6.** és **7. ábra** képeit Camille1.05 kiértékelő programmal, hamisszín hozzárendeléssel készítettem. A **6. ábrán** a különböző hullámhosszakon mért intenzitásértékek külön-külön, míg a **7. ábrán** a felvételek arányai szerepelnek (440/520 és 690/740). A kontroll növényeknél alacsony intenzitásértékek mérhetők a 440 és 520 nm-es tartományban (sötétkék) (**6/a ábra**). SMM-kezelés és fertőzés hatására zöld színű, magasabb intenzitású foltok jelennek meg a felvételeken (**6/b, c ábrák**). A 440 és 520 nm-en készített felvételek hányadát vizsgálva (**7/c ábra**) a fertőzött növény felvétele sötétkék színű, míg a többi növény esetében magasabb intenzitású, zöld színű kép látható. A 690 nm-en készített felvételeknél a fertőzött és SMM-kezelt növényeknél jelentős intenzitásnövekedés tapasztalható (piros részek) a kontroll növényekhez képest (**6/d ábra**). A 740 nm-en készített képeknél azonban ennek az ellentéte látható, a kontrollnál mérhető a legnagyobb intenzitás (piros foltok a levélen), míg a többi kezelés esetén a zöld és a kevésbé intenzívebb kék tartományok figyelhetők meg (**6. ábra**). A felvételek kiegészítik a **4.** és **5. ábra**, valamint a **2. táblázat** adatait.

4.3. A génexpressziós vizsgálatok eredményei

Uzarowska és mtsai (2009) kukorica vírusfertőzése során vizsgálták, mely gének játszhatnak szerepet a növényi stresszválaszban. Munkájuk alapján két gén, a GF14-6 és a SAMS génexpresszió változásait vizsgáltam. Az eredményeket a **8. ábra** tartalmazza.



8. ábra A GF14-6 (a,) és a SAMS (b,) gének expressziójában történt változások a kezelést követő hetek során. Az értékek %-ban értendők, a kontroll génexpresszió változásaihoz viszonyítva (100 %).

A **8/b ábrán** a zöld vonal a *fertőzött* növényekben, míg a sárga vonal a *fertőzött és SMM-kezelt* növényekben a SAMS gén expressziójának időbeli változását reprezentálja (K: kontroll, KS: kontroll és SMM-kezelt, F: fertőzött, FS: fertőzött és SMM-kezelt).

A **8/a ábrán** a GF14-6 génexpresszió változásai láthatók. Az 1. héten a *kontroll és SMM-kezelt* és a *fertőzött* kukoricákban szignifikánsan megemelkedik a génexpresszió szintje a kontrollhoz képest, míg a *fertőzött és SMM-kezelt növényeké* nem tér el tőle. A második hétre jelentősen lecsökken a különböző kezeléseknél mérhető génexpresszió mértéke a kontrollhoz viszonyítva, azonban a harmadik héten újra megemelkedik a *kontroll és SMM-kezelt* és a *fertőzött* növények génexpressziója. A GF14-6 gén terméke a stresszválaszban szerepet játszó szignalizációs útvonal komponenseit köti, melyek szállításában, illetve foszforilálásában (tehát aktiválásában) működik közre. A fehérje emellett olyan fehérjéket is megköt a citoplazmában, melyek transzportjának célja a kloroplasztisz. A kezelések után 1 és 3 héttel olyan folyamatok játszódhatnak le a kukoricákban, melyek a GF14-6 génterméket igénylik, így vélhetőleg fokozódhatnak a stresszválasz szignalizációs útvonalai, valamint a kloroplasztiszba szállítódó molekulák mennyisége is megemelkedhet. Mivel a vírus

replikációja a kloroplasztisz külső membránrendszerében megy végbe, továbbá mivel a fertőzés aktiválja a növény védekezőrendszerét, valószínűsíthető, hogy a GF14-6 gén expressziója a *fertőzött* növényekben ezen folyamatoknak köszönhetően növekedett meg. Az S-metilmetionin szintén mind a két útvonalon érvényesítheti a hatását: a klorofilltartalom emelésével befolyásolja a kloroplasztisz anyagcseréjét, valamint az SMM-ciklus révén a stresszválasz útvonalaiban is fontos szerepet játszik. Valószínűleg a 2. héten tapasztalt csökkenés azon molekulák mennyiségének a csökkenésével magyarázható, melyeket a GF14-6 gén terméke köt meg. A *fertőzött és SMM-kezelt* kukoricákban alacsonyan marad a gén kifejeződése. Ez azzal értelmezhető, hogy az SMM, valamint a vírus aktiválta útvonalak hathatnak egymásra. Eredményeim alapján a kezelések kombinációjánál gátlás figyelhető meg, míg a kezeléseket külön-külön alkalmazva (*kontroll és SMM-kezelt, fertőzött* kukoricák) megemelkedik az aktivitás mértéke, mely megfigyelés alátámasztja az interakció meglétét.

A **8/b ábrán** a SAMS génexpressziós változásai szerepelnek. A *kontroll* és a *kontroll és SMM-kezelt* értékei az első héten nem, míg a 2. és a 3. héten eltérnek egymástól. A *kontroll és SMM-kezelt* növények a 3. héten szignifikánsan meghaladják a *kontroll* értékeit. A *fertőzött* növényeknél az 1. héten jelentős mértékben megemelkedik a génexpresszió, majd egy exponenciális görbe mentén gyorsan lecseng a 2. és 3. hétre. A *fertőzött és SMM-kezelt növényeknél* azonban egy egyenes mentén (mely egyenlete: $y = 31,656x + 124,57$) folyamatosan nő a génexpresszió mértéke, és már a 2. héten szignifikánsan meghaladja a többi csoport értékét. Méréseim során sikerült kimutatnom, hogy a SAMS gén fontos szerepet játszik a vírusfertőzés során, valamint hogy SMM-kezelés hatására a *fertőzött* növényekben jelentős változás tapasztalható az expresszióját illetően. Az S-metilmetionin kezelés az S-adenozilmetionin szintáz génexpressziójának a magas szinten tartásával, és folyamatos emelésével, így közvetve az enzim termékének (S-adenozilmetionin) emelésével, kondicionáló hatással bír.

Eredményeim alapján sikerült igazolnom az SMM védő hatását MDMV fertőzéssel szemben: élettani, metabolomikai, valamint transzkripciós szinten is. Az **SMM hatásai**:

- segít megőrizni MDMV fertőzés során a fotoszintetikus apparátus épségét: csökkenti a konstitutív hődisszipáció mértékét, emeli a ΔpH és a xantofill ciklus-alapú kioltást,
- *fertőzött* növényekben jelentősen mérsékli a klorofilltartalom csökkenését,
- megnöveli a 440 nm-en fluoreszkáló stresszvédő anyagok mennyiségét,
- befolyásolja a GF14-6 és az S-adenozilmetionin szintáz génexpresszióját, melynek eredményeképpen kondicionáló hatással rendelkezik.

Kutatásom során a vírusnak (**MDMV**) néhány, az S-metilmetionin kezeléstől független **hatását** is sikerült feltérképeznem:

- emeli a konstitutív hődisszipáció és a kettes fotorendszerek reakciócentrumának energiadisszipációját, míg a fertőzés során csökken a ΔpH és a xantofill ciklus alapú kioltás,
- hatására emelkedik az 520 nm-en fluoreszkáló anyagok mennyisége,
- kölcsönhat szignalizációs útvonalakkal, melyekben a GF14-6 gén szerepel,
- a növény védekezőrendszerének aktiválása révén befolyásolja az S-adenozilmetionin szintáz expresszióját.

A 9. ábrán eredményeim alapján összefoglalom a csíkos mozaik vírus és az S-metilmetionin csemegekukoricára gyakorolt hatását.

Összefoglalás

A csemegekukorica a világon az egyik legnagyobb mennyiségben termesztett haszonnövényeink egyike. Élelmezési szempontból és takarmánynövényként is rendkívüli jelentőséggel bír. Fontosságának köszönhetően nagy hangsúlyt fektetnek kórokozóinak kutatására és megismerésére is, melyek közül egy virális patogén, a kukorica csíkos mozaik vírus emelhető ki. A vírusfertőzés hatására klorotikus foltok jelennek meg a növény levelein, és törpenövésűek lesznek az egyedek. Kutatásom során arra kerestem a választ, hogy a nemesítési eljárások mellett milyen módon lehetne visszaszorítani a vírus terjedését.

Ennek vizsgálatához egy természetes biogén vegyülettel, az S-metilmationinnal kezeltem a növényeket *exogén* módon, majd ezt követően MDMV kórokozóval fertőztem a kukoricákat. A fertőzést követő hetekben folyamatosan monitoroztam a fotoszintetikus apparátus épségét (F_v/F_m , Φ_{NPQ} , $\Phi_{I,D}$, Φ_{NF} , fluoreszcencia leképezés mérése, összklorofill tartalom meghatározása), a biotikus stressz során felhalmozódott védőanyagok mennyiségét (fluoreszcencia leképezés), valamint két, a stresszválaszban vélhetőleg szerepet játszó gén expressziós változásait (GF14-6, S-adenozilmationin szintáz).

Eredményeim alapján a vírusfertőzés számos hatását sikerült feltérképeznem, mellyel igazolok régebbi megfigyeléseket, illetve kiegészítem azokat saját eredménnyel. A fertőzés során csökken a klorofill mennyisége a fertőzött levelekben, emelkedik a konstitutív hődisszipáció és az inaktiválódott PS II reakciócentrumok energiadisszipációja, csökken a ΔpH és a xantofill ciklus alapú kioltás. Az 520 nm-en fluoreszkáló anyagoknak a mennyisége megemelkedik, továbbá a GF14-6 és a S-adenozilmationin szintáz gének expresszióját is befolyásolja.

Kísérleteim során sikerült igazolnom az S-metilmationin védő hatását: megőrzi a fotoszintetikus apparátus épségét vírusfertőzés során, mérsékli a fertőzés során fellépő klorofilltartalom-csökkenést, megnöveli a 440 nm-en fluoreszkáló stresszvédő anyagok mennyiségét, továbbá befolyásolja a GF14-6 és az S-adenozilmationin szintáz génexpresszióját, melynek eredményeképpen kondicionáló hatással rendelkezik.

Summary

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most widely grown crops worldwide. Due to its importance as a food and feed plant, investigations on tolerance to pathogens and attempts to find alternative methods to increase its defence potential are of great importance. Maize dwarf mosaic virus is one of the most common pathogens infecting maize plants. Its infection causes decreased plant growth and chlorotic bands on the leaves giving a mosaic pattern. The main aim of my work was to reveal the possibilities of restriction of the virus in sweet corns.

Apart from the use of classical breeding techniques, the application of a biologically active compound seemed to be an alternative possibility. The SMM treatment was prior to the MDMV infection. During the weeks following the infection, the response reactions of the photosynthetic apparatus (by measuring F_v/F_m , Φ_{NPQ} , $\Phi_{L,D}$, Φ_{NF} , multicolour fluorescence imaging, total chlorophyll content), the change in the amount of molecules that play vital role in plant defence mechanisms (measured with multicolour fluorescence imaging), and the changes of gene expression patterns of two candidate genes (GF14-6 and S-adenosylmethionine synthase) were monitored.

Based on my results, I managed to reveal several effects of the viral infection, partly by verifying previous results and partly by replenishing them. In infected plants, the amount of chlorophyll molecules decreased, the rate of the constitutive heat dissipation and the inactivated PSII reaction centres' energy dissipation increased, and the rate of the ΔpH and xanthophyll-cycle dependent quenching decreased. The amount of 520 nm fluorescence emitting compounds has increased, moreover the gene expression patterns of GF14-6 and S-adenosylmethionine synthase genes has been altered as well.

In my present study, I verified the beneficial and protective effects of S-methylmethionine: it protected the photosynthetic apparatus in the case of MDMV infection, decreased the damage via moderating the decrease of chlorophyll content. SMM increased the amount of those protective molecules, that emitted fluorescence at 440 nm, and SMM treatment altered the expression patterns of GF14-6 and S-adenosylmethionine synthase genes. Results of my experience clearly demonstrate, that SMM treatment results in increasing the defence potential of maize plants during MDMV infection.

Irodalom

- Baker N. R. (2008):** Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:89-113.
- Buschmann C., Lichtenthaler H. K. (1998):** Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *J. Plant Physiol.* 152:297-314.
- Buschmann C., Langsdorf G., Lichtenthaler H. K. (2000):** Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: an overview. *Photosynthetica* 38:483-491.
- Campo S., Peris-Peris C., Montesinos L., Penas G., Messeguer J., Segundo B. (2012):** Expression of the maize ZmGF14-6 gene in rice confers tolerance to drought stress while enhancing susceptibility to pathogen infection. *Journal of Experimental Botany* 63:983-999.
- Chung H.-J., Sehnke P. C., Ferl R. J. (1999):** The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. *Trends in Plant Science* 4:367-371.
- Denison F. C., Paul A.-L., Zupanska A. K., Ferl R. J. (2011):** 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22:720-727.
- Ko S., Eliot A. C., Kirsch J. F. (2004):** S-methylmethionine is both a substrate and an activator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 421:85-90.
- Kocsis M. G., Ranocha P., Gage D. A., Simon E. S., Rhodes D., Peel G. J., Mellema S., Saito K., Awazuwara M., Li C., Meeley R. B., Tarczynski M., Wagner C., Hanson A. D. (2003):** Insertional inactivation of the methionine S-methyltransferase gene eliminates the S-methylmethionine cycle and increases the methylation ratio. *Plant Physiol.* 131:1808-1815.
- Lazár D. (1999):** Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1412:1-28.
- Li L., Wang X., Zhou G. (2007):** Analyses of maize embryo invasion by sugarcane mosaic virus. *Plant Science* 172:131-138.

- Lichtenthaler H. K., Hak R., Rinderle U. (1990):** The chlorophyll fluorescence ratio F690/740 in leaves of different chlorophyll content. *Photosynthesis Research* 25:295-298.
- Lichtenthaler H. K., Lang M., Sowinska M., Heisel F., Miché J. A. (1996):** Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *J. Plant Physiol.* 148:599-612.
- Lichtenthaler H. K. és Mische J. A. (1997):** Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2:316-320.
- Ludmerszki E., Rudnóy Sz., Almási A., Szigeti Z., Rácz I. (2011):** The beneficial effects of S-methyl-methionine in maize in the case of Maize dwarf mosaic virus infection. *Acta Biologica Szegediensis* 55:109-112.
- Manoli A., Sturaro A., Trevisan S., Quaggiotti S., Nonis A. (2012):** Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. *Journal of Plant Physiology* 169:807-815.
- Pineda M., Gáspár L., Morales F., Szigeti Z., Barón M. (2008):** Multicolor fluorescence imaging of leaves - a useful tool for visualizing systemic viral infections in plants. *Photochemistry and Photobiology* 84:1048-1060.
- Porra R. J., Thompson W. A., Kriedemann P. E. (1989):** Determination of accurate extinction coefficient and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975:384-394.
- Rácz I., Páldi E., Szalai G., Janda T., Pál M., Lásztity D. (2008):** S-methylmethionine reduces cell membrane damage in higher plants exposed to low-temperature stress. *J. Plant Physiol.* 165:1483-1490.
- Roháček K., Barták M. (1999):** Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37:339-363.
- Ruiz-Ferrer V., Voinnet O. (2009):** Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:485-510.

- Salomon R., Bernard F. (1995):** Inhibition of viral aphid transmission by the N-terminus of the maize dwarf mosaic virus coat protein. *Virology* 213:676-679.
- Shiboleth Y. M., Haronsky E., Leibman D., Arazi T., Wassenegger M., Whitman S. A., Gaba V., Gal-On A. (2007):** The conserved FRNK boksx in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *Journal of Virology* 81:13135-13148.
- Solti Á., Szűcs J., Basa B., Sárvári É. (2009):** Functional and organisational change of photosystem II in poplar thylakoids under Cd stressz (Dissipative PSII center sin Cd treated poplar thylakoids. *VIII. Alps-Adria Scientific Workshop*.
- Stewart L. R., Bouchard R., Redinbaugh M. G., Meulia T. (2012):** Complete sequence and development of a full-length infectious clone of an Ohio isolate of Maize dwarf mosaic virus (MDMV). *Virus Research* 165:219-224.
- Szegő D., Kósa E., Horváth E. (2007):** Role of S-methylmethionine in the plant metabolism. *Acta Agronomica Hungarica*, 55:1-18.
- Szigeti Z. (2008):** Physiologival status of cultivated plants characterised by multi-wavelength fluorescence imaging. *Acta Agronomica Hungarica* 56:223-234.
- Tóbiás I., Bakadjieva N., Palkovics L. (2008):** Bolgár és magyar kukorica csíkos mozaik vírus-izolátumok összehasonlítása. *Növényvédelem* 44:385-389.
- Torres M. A. (2010):** ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* 138:414-429.
- Uzarowska A., Dionisio G., Sarholz B., Piepho H.-G., Xu M., Ingvarsden C. R., Wenzel G., Lübberstedt T. (2009):** Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling. *BMC Plant Biology* 9:15.
- Vetten N. C., Ferl R. J. (1994):** Two genes encoding GF14 (14-3-3) proteins in *Zea mays* - structure, expression, and potential regulation by the G-box-binding complex. *Plant Physiol.* 106:1593-1604.
- Wei T., Huang T.-S., McNeil J., Laliberté J.-F., Hong J., Nelson R. S., Wang A. (2010):** Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *Journal of Virology* 84:799-809.

Williams M. M., Pataky J. K. (2012): Interactions between maize dwarf mosaic and weed interference on sweet corn. *Field Crops Research*. 128:48-54.

Zhang Z.-Y., Yang L., Zhou S.-F., Wang H.-G., Li W.-C., Fu F.-L. (2011): Improvement of resistance to maize dwarf mosaic virus mediated by transgenic RNA interference. *Journal of Biotechnology* 153:181-187.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani dr. Szigeti Zoltánnak, a Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék korábbi, valamint dr. Fodor Ferencnek, a jelenlegi tanszékvezetőjének, hogy lehetővé tették számomra a munkát az általuk vezetett tanszéken. Köszönettel tartozom dr. Solti Ádámnak, dr. Almási Asztériának és dr. Lásztity Demeternek szakmai támogatásukért és együttműködésükért. Köszönöm a technikai segítséget Balogh Györgyinek. Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni témavezetőimnek, dr. Rácz Ilonának és dr. Rudnóy Szabolcsnak türelmes, támogató és inspiráló vezetését.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott, Ludmerszki Edit a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- a nem fotokémiai kioltás és az F_v/F_m értékek mérését PAM készüléken,
- fluoreszcencia leképezést FL-FIS fluoreszcencia leképző rendszeren,
- 80 %-os acetonos kinyerést és a fotometriás mérést,
- mRNS kinyerést,
- cDNS szintézist,
- real-time PCR reakciót,
- primerek tervezését és tesztelését,
- a kukoricák nevelését, fertőzését és SMM-kezelését,
- a klorofill fluoreszcencia leképezés intenzitás értékei és a klorofilltartalom közti összefüggés egyenletének leírását,
- a dolgozat végén látható folyamatábra megalkotását

végeztem el.



.....
aláírás

Budapest, 2012. december 16.