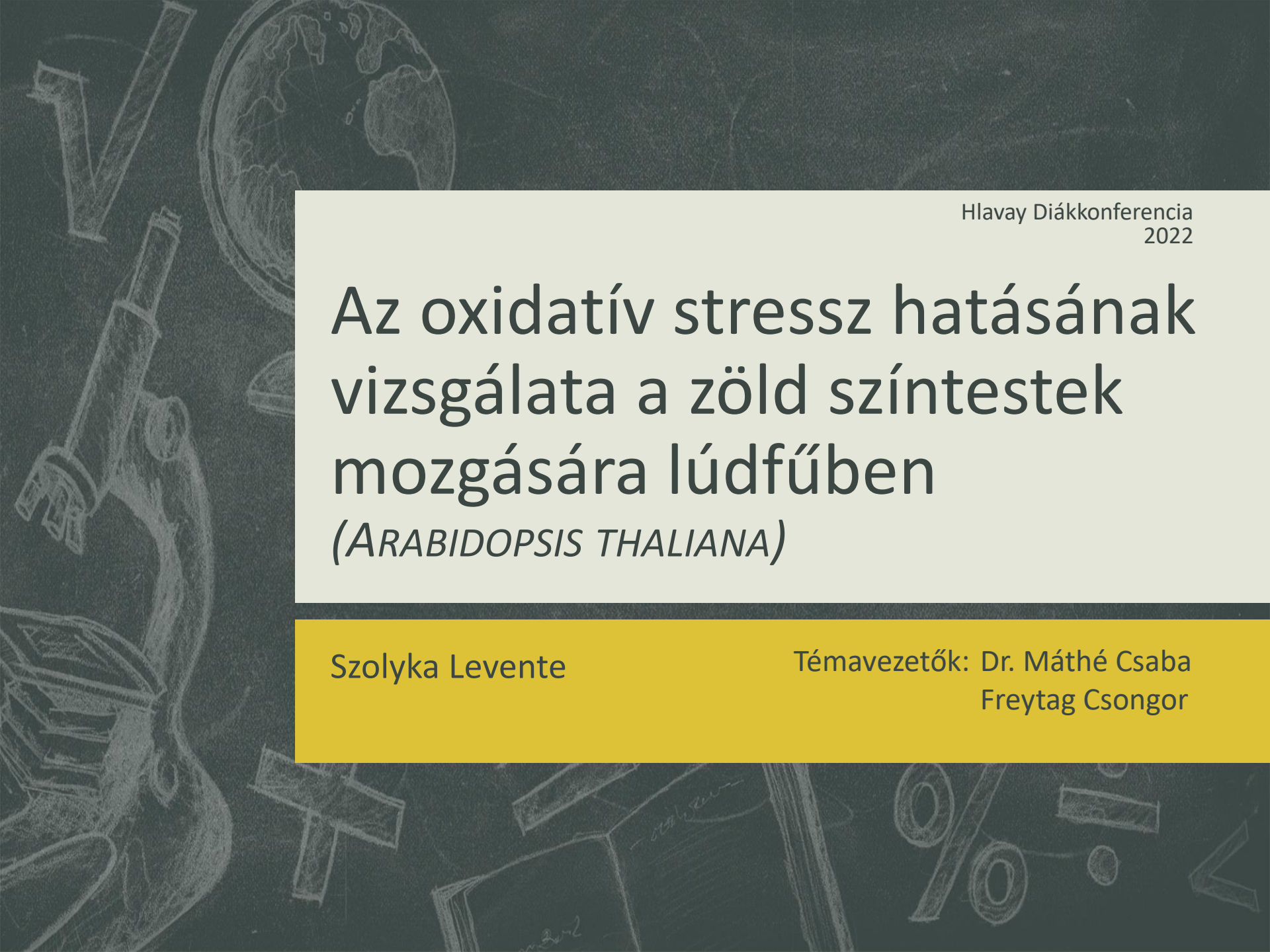




Hlavay Diákkonferencia
2022

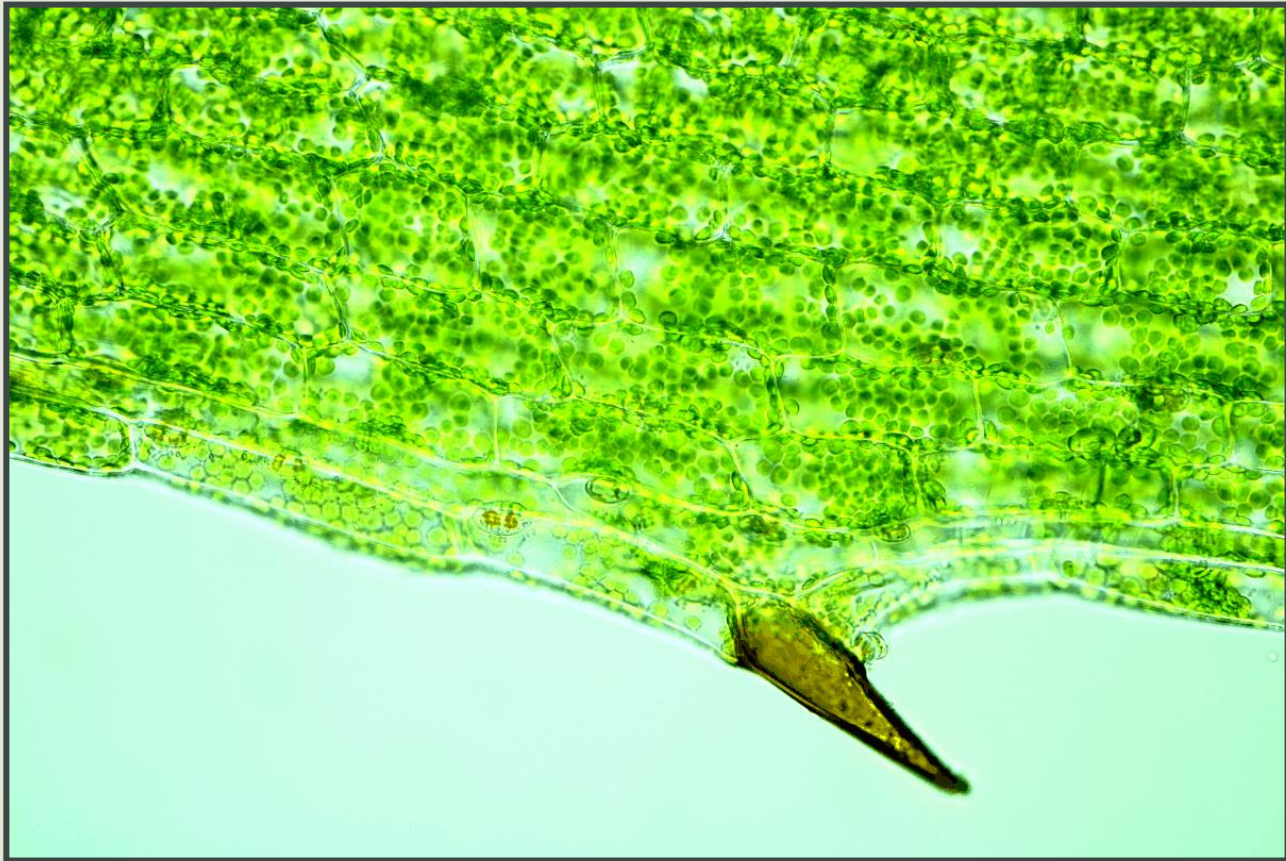
Az oxidatív stressz hatásának vizsgálata a zöld színtestek mozgására lúdfűben (*ARABIDOPSIS THALIANA*)

Szolyka Levente

Témavezetők: Dr. Máthé Csaba
Freytag Csongor

Bevezetés I. – A kutatás előzményei

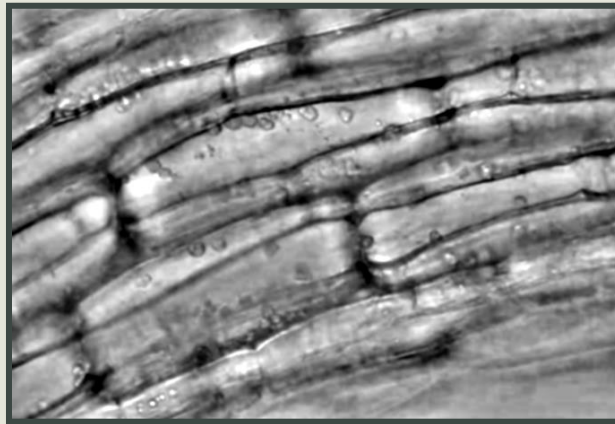
Megfigyelhető, hogy fénymikroszkópban mozgásnak indulnak a zöld színtestek.



Elodea sp. (átokhínár) mikroszkópos time-lapse
(~30p; ~400x gyorsítás)

Bevezetés II. – Célok

- Célok:
 - Kompartment mozgások vizsgálatával a mikrocisztin-LR és a dikvát hatásának feltárása
 - A globális felmelegedés és a környezetszennyezés hatásainak pontosabb megértése



Növényi sejt belső dinamikája
képfeldolgozás utáni time-lapse
(10p; ~150x gyorsítás)



Vízvirágzás

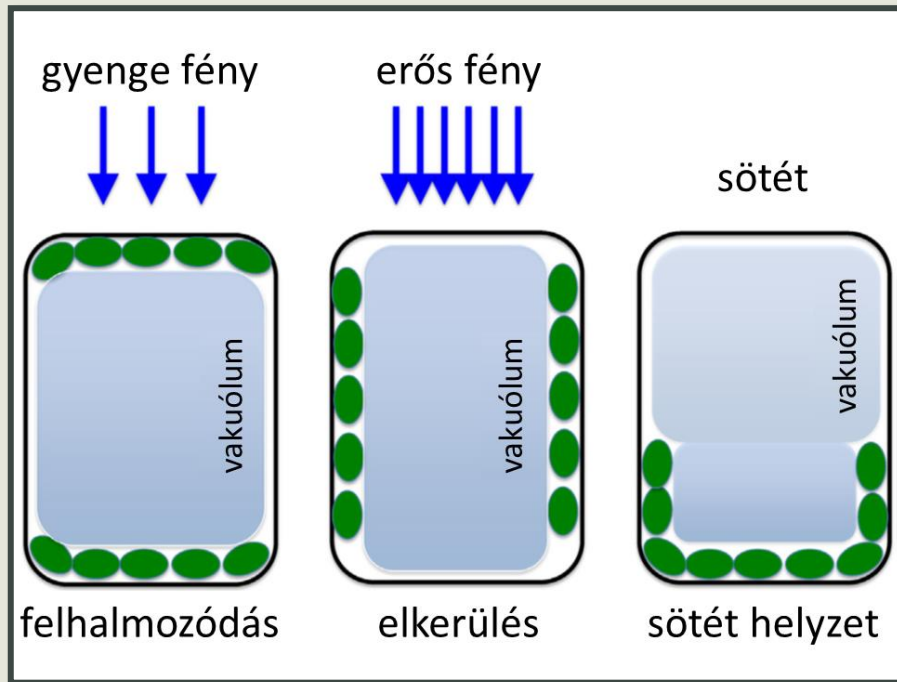
(<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/managing-cyanotoxins-public-drinking-water-systems>)



Permetezés traktorral

(<https://ng.24.hu/fold/2015/04/17/a-novenyvedo-szerek-okozta-vizszennyezes/>)

Elméleti háttér – Kloroplasztiszok mozgása



Zöld színtestek elhelyezkedése a sejtben különböző megvilágítási szintek mellett (Wada és mtsi., 2013)

Kloroplasztiszok fény indukált mozgása:

- Szerepe:
 - Hatékonyabb fény hasznosítás
 - Fény stressz elleni védelem
- Mechanizmusa:
 - Sötétben (árnyék): bazálisan
 - Gyenge (normál) megvilágítás: a sejt felső és alsó részén, a fény irányára merőlegesen
 - Erős (fény stressz): perifériálisan, a fény irányával párhuzamosan

Irodalmi áttekintés I. – A vízvirágzás és a mikrocisztin-LR

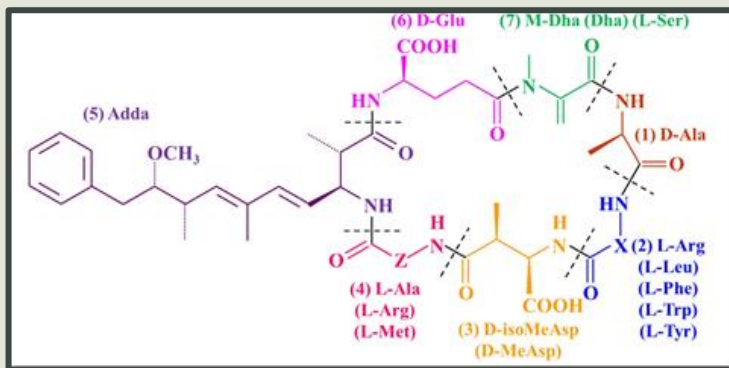
■ Cianobaktériumok:

- Fotoszintetizáló kozmopolita prokarióta
- Fontos szerepe az oxigén-dús légkör kialakulásában
- Vízvirágzás ← klímaváltozás (globális felmelegedés, tápanyagtartalom dúsulása)
- Gyakran cianobakteriális → toxinok jelenléte



Vízvirágzás

(<http://astro.u-szeged.hu/szakdolgozok/vegiandras/felhasznalas/vizinoveny.html>)



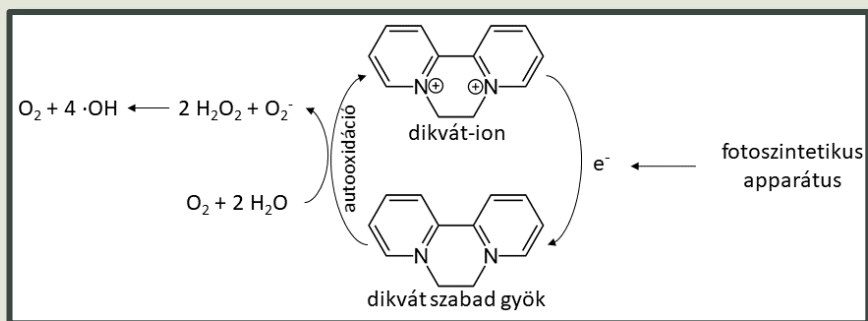
A mikrocisztin-LR szerkezeti képlete

A két variábilis Leu és Arg (Chen és mtsi., 2016)

■ Mikrocisztin-LR:

- Cianobakteriális toxin
- Protein foszfatáz 2A inhibitor
- Oxidatív stressz
- Állatokban: májkárosodás, rákkeltő
- Növényekben: növekedés gátlás, nekrozis

Irodalmi áttekintés II. – A ROS indukáló dikvát



A dikvát hatásmechanizmusának molekuláris háttere

▪ Dikvát:

- non-szelektív gyomirtó
- kontakt permetszer
- oxidatív stresszt okoz
- EU-ban betiltott, USA-ban még használják



Gyomirtás a mezőgazdaságban

(<https://www.kpe.hu/gyomirtas-mar-a-glifozat-hatoanyag-is-fennakad-a-rostan/>)

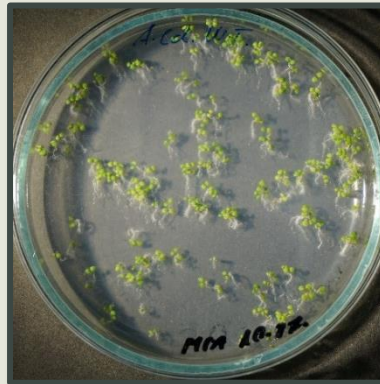
Anyag és módszer I. – A modell növény



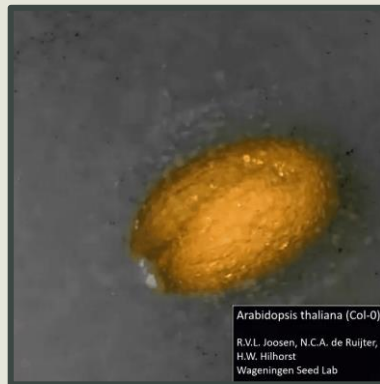
Keresztvirágúak rendjébe tartozó káposztafélék családjának néhány képviselője
(<https://paleovital.hu/?p=16809>)



Lúdfű csíranövény



Lúdfű csíranövények táptalajon



Lúdfű csírázása time-lapse; 65 óra
(<https://youtu.be/f3JwkzsRujk>)

Modellnövény: *Arabidopsis thaliana* Col-0 ökotípus (vadtípusú lúdfű)

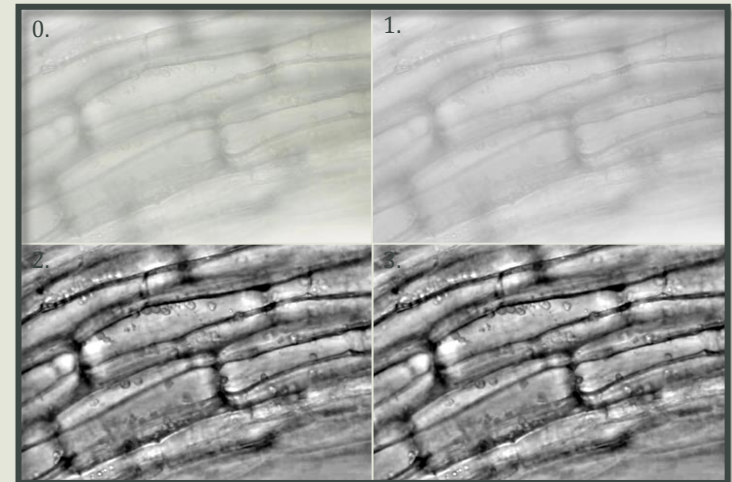
- Káposztafélék (pl. fejes káposzta, retek, karfiol, mustár, torma) modellje
- Előnevelés:
 - Felület sterilizálás (alkoholos és hipós mosás)
 - MS* táptalaj Murashige & Skoog, 1962
 - 48 óra vernalizálás (+4°C)
 - Fotoperiódus (14/10 fény/sötét, 22±1°C)
 - 4 napos csíranövények
- Kezelések: 24 órás
 - 1 µM mikrocisztin-LR (cianobakteriális toxin)
 - 0,5 µM dikvát (herbicid)

Anyag és módszer II. – Felvétel és képelemzés

- Mikroszkópos (Zeiss Jenaval, Germany) time-lapse felvételek (Canon D2000, Japan):
 - Sötét adaptálás min. 30 perc
 - Kamrás tárgylemezen, 1xPBS-ben (foszfáttal pufferolt sóoldat)
 - Fokuszálás zöld fénynél
 - Rögzítés 10 percen keresztül
- Számítógépes elemzés:
 - ImageJ nyílt-forráskódú szoftver
 1. 8-bit konvertálás
 2. Bandpass filter
 3. Linear Stack Alignment with SIFT
 4. Manual Tracking



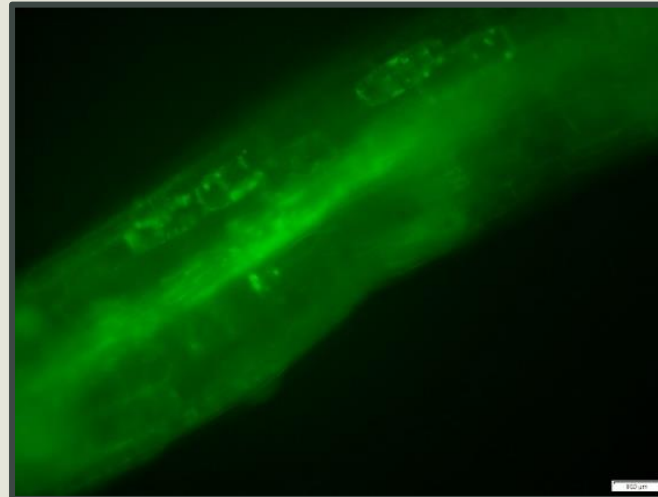
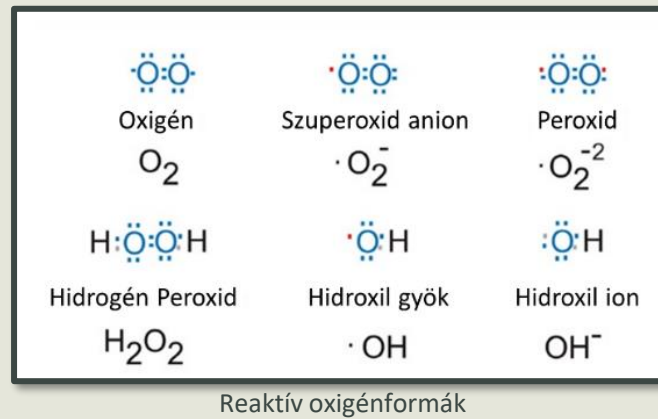
Kamrás tárgylemez



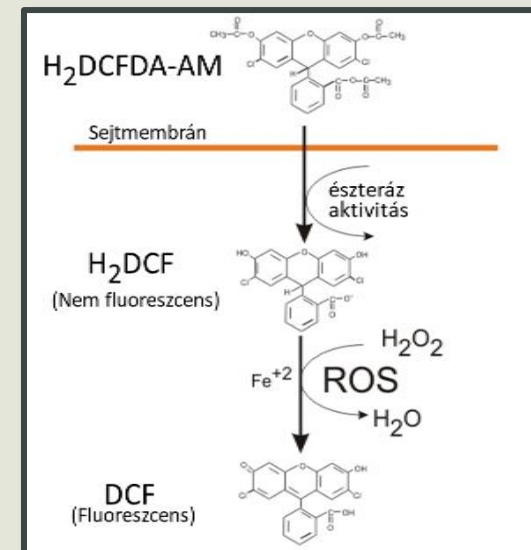
Képfeldolgozás folyamata

Anyag és módszer III. – ROS kimutatása

- Mik is azok ROS?
(Reactive Oxygen Species)
 - Reaktív oxigénformák
- ROS mérése:
 - DCFDA festés
 - Fluoreszcens módszer
 - ↳ relatív meghatározás (kalibrálható is)
 - *In vivo* (élő szövetekben)

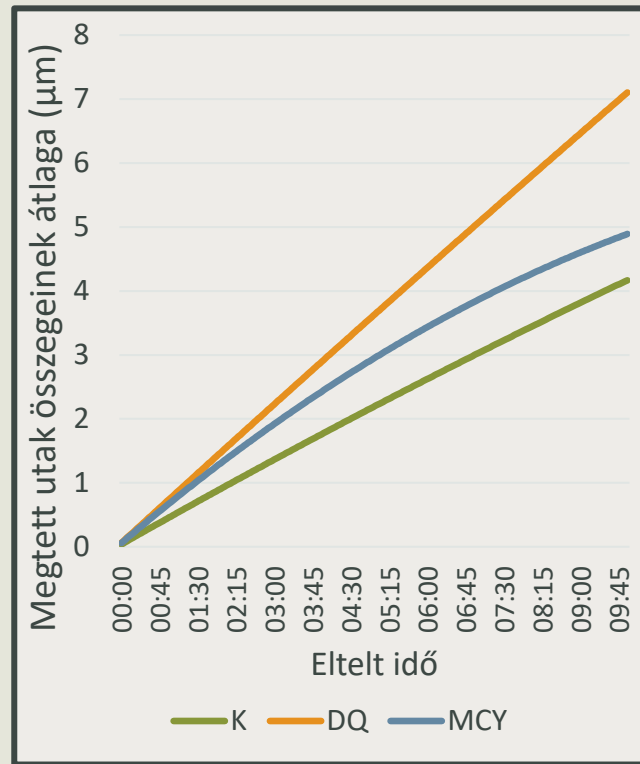


DCFDA festett hipokotil (MCY-LR)

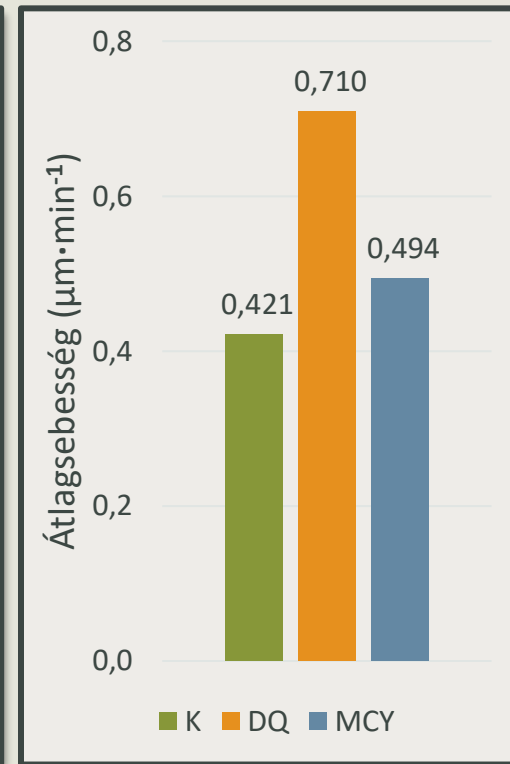


Eredmények I.

- A megtett utak összege és az átlagsebesség alapján:
- kontroll
 - közelíti a szakirodalomban leírt átlagsebességet
- dikvát kezelés
 - fokozza a fény-stresszreakció során, a plasztiszok sebességét a kontrollhoz képest
- mikrocisztin-LR kezelés
 - esetében is tapasztaltunk fokozódást,
 - de a reakció itt kb. 3 perc után fokozatosan csillapodik



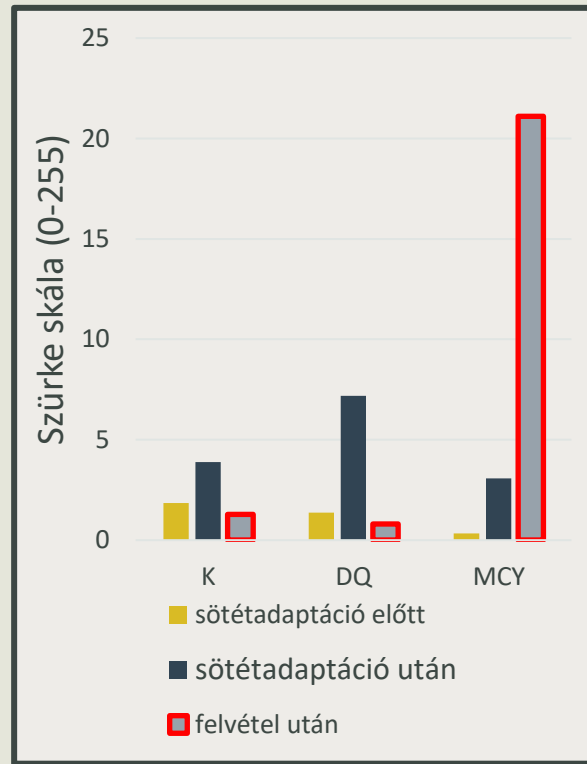
Megtett utak összegeinek átlaga az eltelt idő függvényében



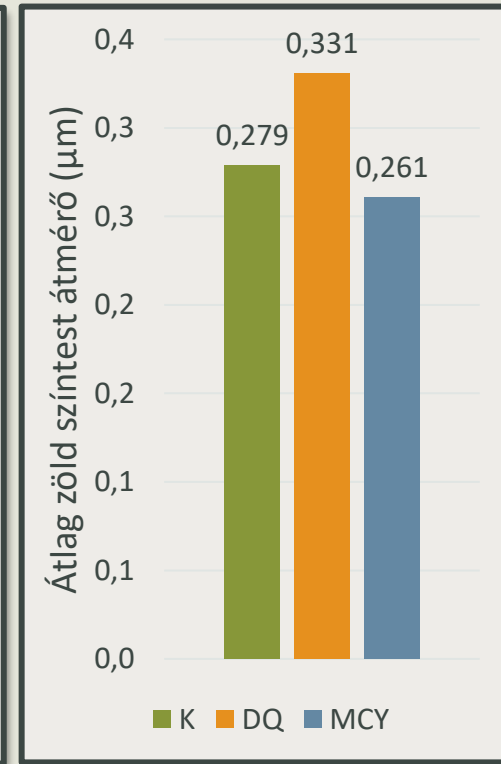
Átlagsebességek oszlopdiagramban

Eredmények II.

- Kloroplasztiszok átmérője:
 - DQ gátolja a plasztiszok osztódását
- Vektor elemzés:
 - Megfelel a szakirodalomban leírtaknak
- DCFDA:
 - A kontroll és DQ kezelt alacsony ROS
 - MCY-LR erősen megemelkedik a ROS szint



ROS szintek kezelésenként a kísérlet szakaszaiban

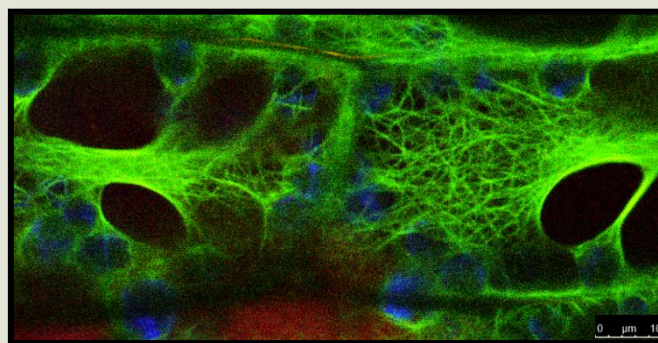


Zöld színtestek átmérőinek átlaga oszlopdiaagramban

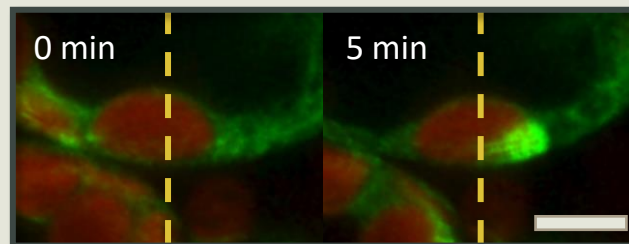
Következtetések

- Dikvát:
 - Fokozza a elkerülést (Majumdar & Kar, 2016)
 - Alacsony ROS szint

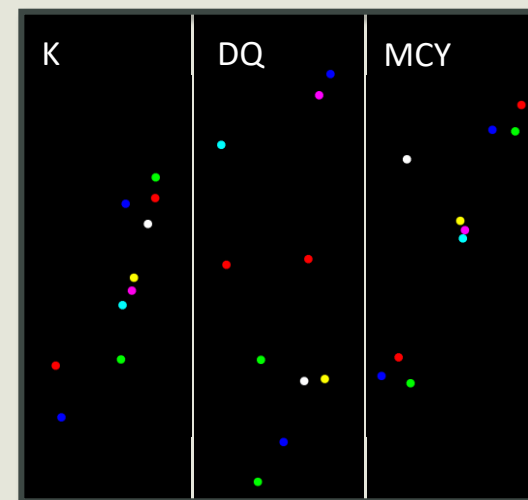
- Mikrocsisztin-LR:



Konfokális mikroszkóppal készült kép, kontroll
zöld: aktin; kék: plastisz
(© J. Mathur-Máthé Cs.)



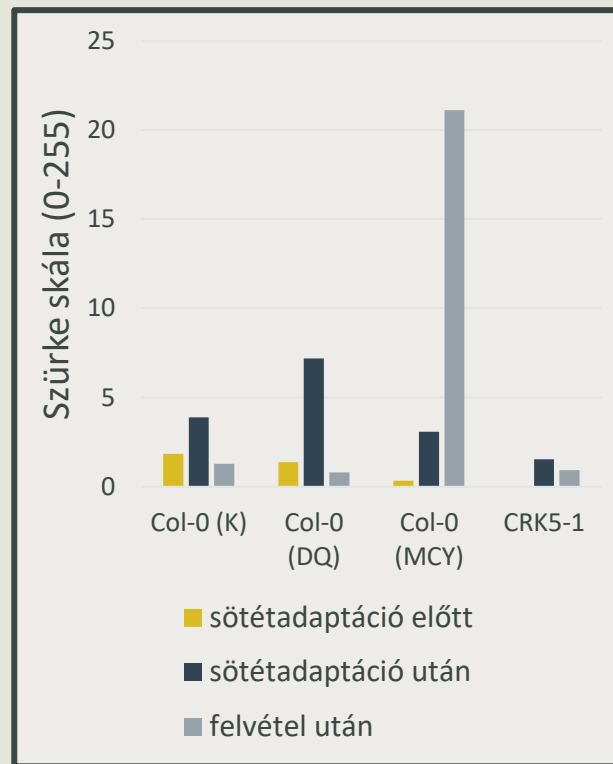
Konfokális microbeam megvilágítás
zöld: aktin piros: plastisz, skála: 5μm. (Wada, 2018)



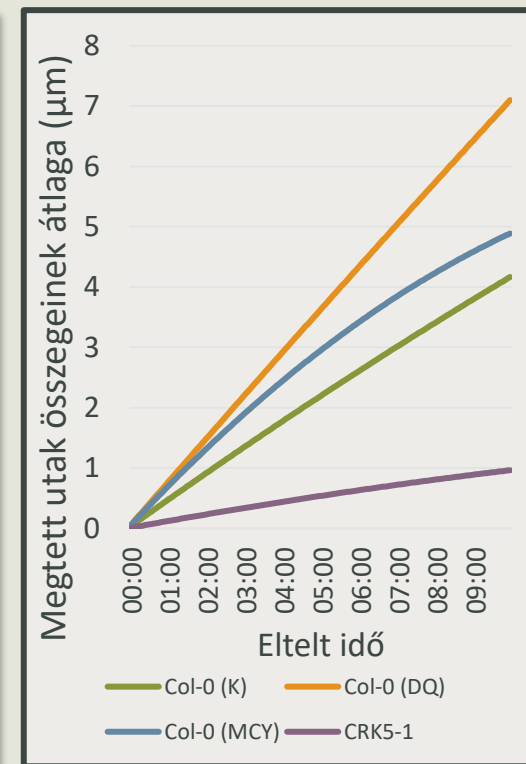
Zöld színtestek mozgásainak time-lapse
animációja
(~150x gyorsítás)

Kitekintés

- CRK5-1 mutáns:
 - CRK5: kalcium függő kináz (foszforiláló enzim)
 - Membrán lokalizált fehérje
 - ↳ Késleltetett gravitropikus válasz
 - ↳ ABP-ket CDPK-k foszforilálják
- További kutatási irányok:
 - Enzim-aktivitás mérése (plasztisz SOD), fotoszintézis mérése (PAM), hosszú távú *in situ* kísérletek végzése



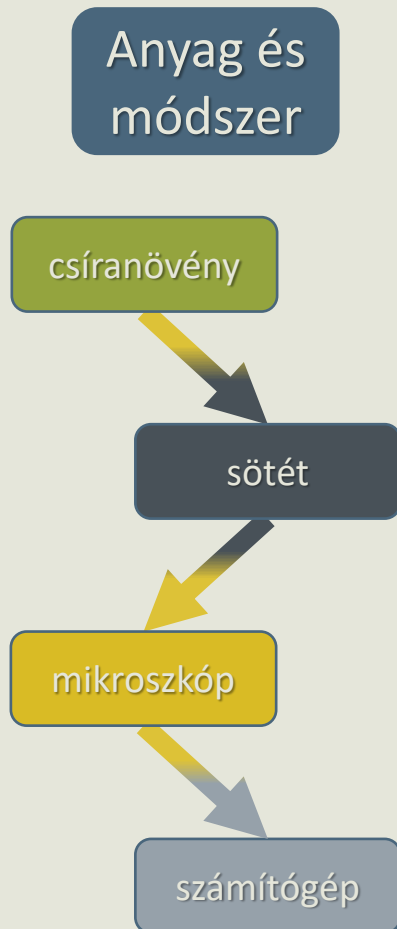
ROS szintek a kísérlet szakaszaiban



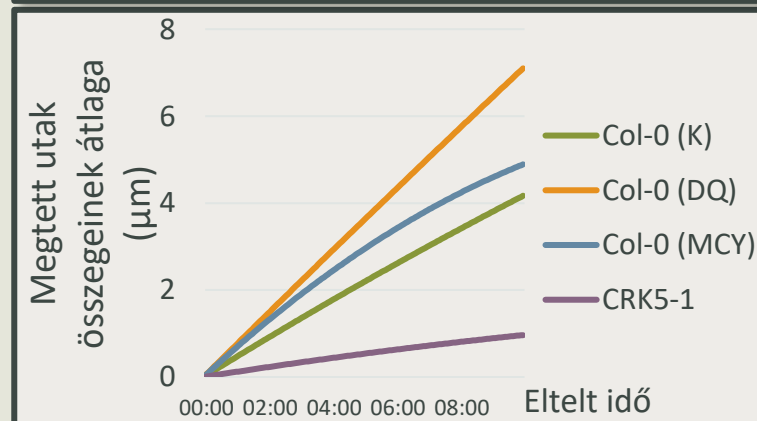
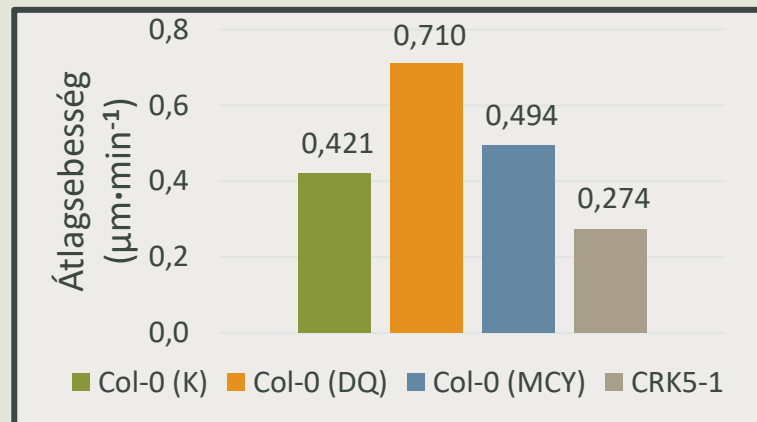
Megtett utak összegeinek átlaga az eltelt idő függvényében

Összefoglalás

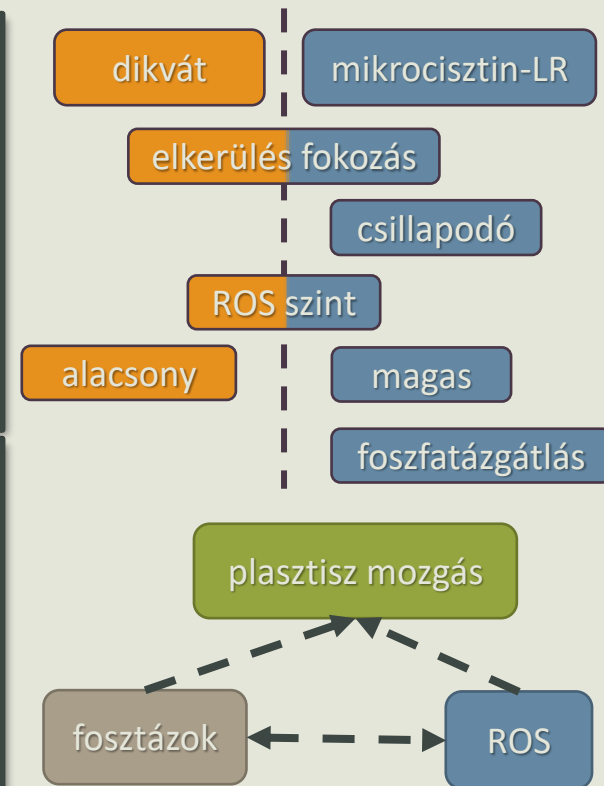
Anyag és módszer



Eredmények



Következtetés



Felhasznált irodalom

Han, I.-S., Cho, H.-Y., Moni, A., Lee, A.-Y., and Briggs, W.R. (2013). Investigations on the Photoregulation of Chloroplast Movement and Leaf Positioning in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 54, 48–56. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs098>

Kong, S.-G., and Wada, M. (2014). Recent advances in understanding the molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837, 522–530. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2013.12.004>.

Littlejohn, G.R., Breen, S., Smirnoff, N., and Grant, M. (2021). Chloroplast immunity illuminated. *New Phytol* 229, 3088–3107. <https://doi.org/10.1111/nph.17076>.

Majumdar, A., and Kar, R.K. (2020). Chloroplast avoidance movement: a novel paradigm of ROS signalling. *Photosynth Res* 144, 109–121. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00736-9>.

Suetsugu, N., and Wada, M. (2020). Signalling mechanism of phototropin-mediated chloroplast movement in Arabidopsis. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 29, 580–589. <https://doi.org/10.1007/s13562-020-00594-5>.

Suetsugu, N., Kagawa, T., and Wada, M. (2005). An Auxilin-Like J-Domain Protein, JAC1, Regulates Phototropin-Mediated Chloroplast Movement in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139, 151–162. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067371>.

Suetsugu, N., Yamada, N., Kagawa, T., Yonekura, H., Uyeda, T.Q.P., Kadota, A., and Wada, M. (2010). Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in Arabidopsis thaliana. *PNAS* 107, 8860–8865. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912773107>.

Wada, M. (2013). Chloroplast movement. *Plant Science* 210, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.05.016>.

WADA, M. (2016). Chloroplast and nuclear photorelocation movements. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 92, 387–411. <https://doi.org/10.2183/pjab.92.387>.

Wada, M., and Kong, S.-G. (2018). Actin-mediated movement of chloroplasts. *Journal of Cell Science* 8. .

Wada, M., Kagawa, T., and Sato, Y. (2003). CHLOROPLAST MOVEMENT. 17

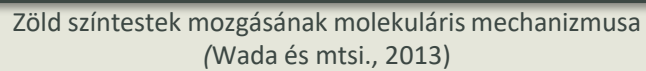
Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom:

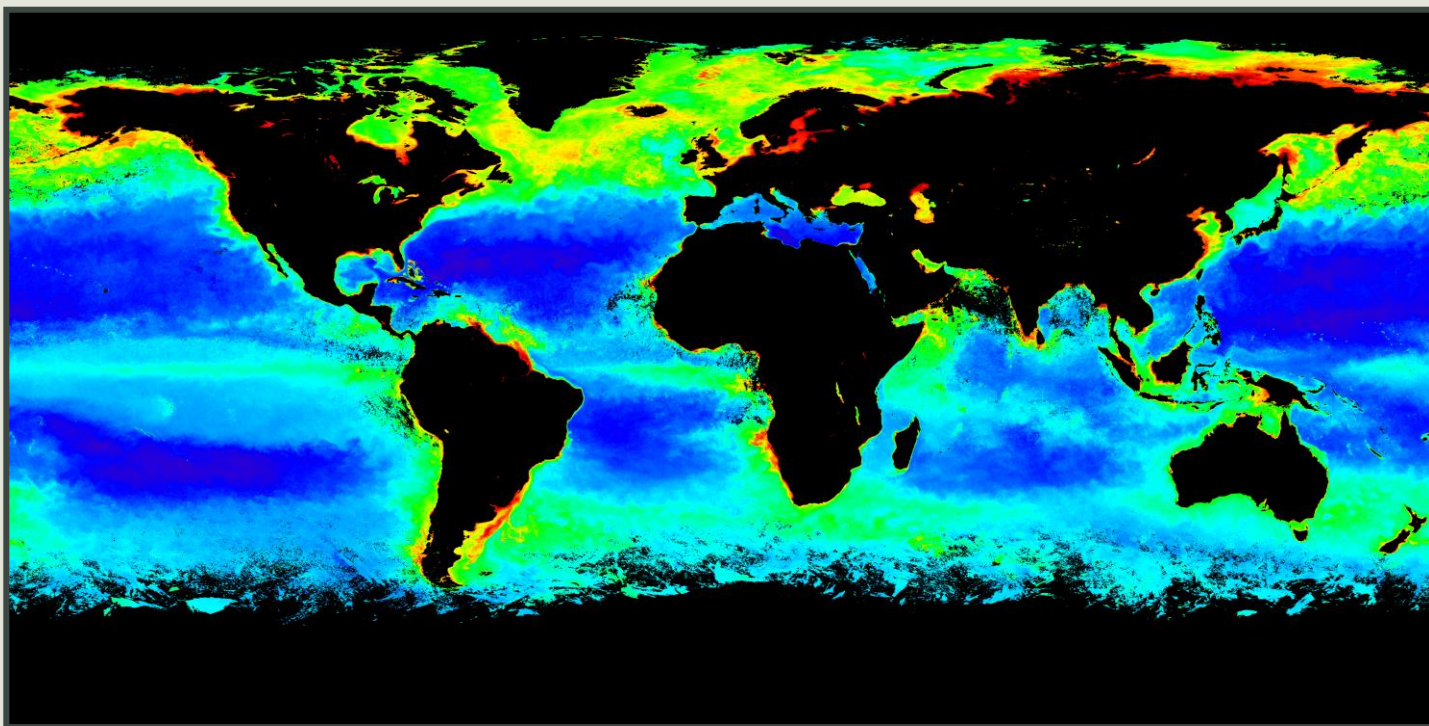
- Dr. Máthé Csabának; (Debreceni Egyetem, TTK, BÖI, Növénytan Tanszék, Növényi Sejt- és Fejlődésbiológia Kutatócsoport, egyetemi docens)
- Freytag Csongornak; (Debreceni Egyetem, TTK, BÖI, Növénytan Tanszék, Növényi Sejt- és Fejlődésbiológia Kutatócsoport, PhD hallgató)
- Seszták Ilonának; (Szent Miklós Görögkatolikus Gimnázium és Kollégium, biológia-kémia szakos tanár)
- a Debreceni Egyetem TTK Növénytan Tanszéke dolgozóinak;
- és a konferencia szervezőinek.



**Köszönöm a megtisztelő
figyelmet!**



Zöld szintestek mozgásának molekuláris mechanizmusa
(Wada és mtsi., 2013)



Klorofill-koncentráció a föld vizeiben a MODIS-AQUA műhold által mérve