

73178 OTKA 2008-2012

Természetes vegyület, az S-metilmetionin hatásának vizsgálata a paradicsom és a kukorica fiziológiai sajátosságaira, biotikus és abiotikus stressztoleranciájára

Pályázatunk egy biológiailag aktív, természetes vegyület, a növények kén-anyagcseréjében, valamint az abiotikus és biotikus stresszfaktorokkal szembeni védekező képesség kialakításában jelentős szerepet játszó S-metilmetionin (SMM) fiziológiai szerepének és hatásmechanizmusának megismerésére irányult. Munkánk során az SMM hatását mezőgazdasági szempontból fontos növényeken (paradicsom, kukorica) vizsgáltuk, feltárva egyes abiotikus (hideg-, illetve UVB stressz) és biotikus stressztényezők (vírusfertőzés) hatására bekövetkező változások fiziológiai-biokémiai (fotoszintetikus paraméterek, hormonális, enzimaktivitás és metabolit változások), valamint molekuláris biológiai (génexpresszió változások) hátterét. Tanulmányoztuk továbbá az SMM hatását a növény és szimbióta gomba kapcsolatra, a mikorrhiza-kolonizáció kialakulására.

Az SMM hatása az abiotikus stressztoleranciára

Alacsony hőmérsékleti stressz

Mind a kukorica, mind a paradicsom érzékeny az alacsony hőmérsékleti stresszre, melynek mérsékelt égövön gyakran ki vannak téve, különösen az egyedfejlődés korai szakaszában. Ezért hidropónikus kultúrában nevelt 10-21 napos kukorica (MV Norma) illetve 3 hetes paradicsom (Kecskeméti 3) csíranövényeken tanulmányoztuk az SMM-nek hidegstresszelt növényekre kifejtett hatását. A növények fiziológiai állapotának jellemzésére a klorofilltartalmat, illetve a fotoszintetikus paraméterek közül a PSII kvantumhatékonyságát tükröző változó fluoreszcenciát (Fv/Fm), a nettó fotoszintézist (An), a fotokémiai és nem fotokémiai kioltás (qP, qN) értékeit, valamint a többhullámhosszú fluoreszcencia leképezésből számítható mutatókat használtuk. A paradicsom esetében a membránpermeabilitás változásoknak az ionkiáramlásra gyakorolt hatásának mérését is felhasználtuk. Ribonimikai és metabolomikai vizsgálataink a hidegstressz indukálta válaszreakciókban fontos szerepet játszó szabályozó transzkripciós faktorok, az ugyancsak szabályozó poliaminok bioszintéziséért felelős, valamint a stresszvédelemben fontos szerepet betöltő fenilpropanoidok bioszintéziséért felelős gének expresszió-változásainak nyomon követésére, az általuk szintetizált védő anyagok mennyiségi változásainak kémiai meghatározására, továbbá az antioxidáns védő enzimek aktivitásának vizsgálatára irányultak.

A fagyponthoz feletti alacsony hőmérsékletre is érzékenyen reagáló kukorica csíranövényekben az egy napos, +5°C-os hidegkezelés hatására az Fv/Fm értékek jelentős csökkenése volt mérhető. Ezt a fotoszintetikus aktivitás csökkenést jelentősen mérsékelte a csíranövények 24 órán át SMM-mel történt előkezelése. Az egy napos SMM kezelés ugyanakkor önmagában nem okozott szignifikáns eltérést a Fv/Fm értékekben. Hosszabb idejű, 3-4 napos kezelési periódust követően azonban megfigyelhető volt a klorofilltartalom emelkedésével arányosan a funkció javulása.

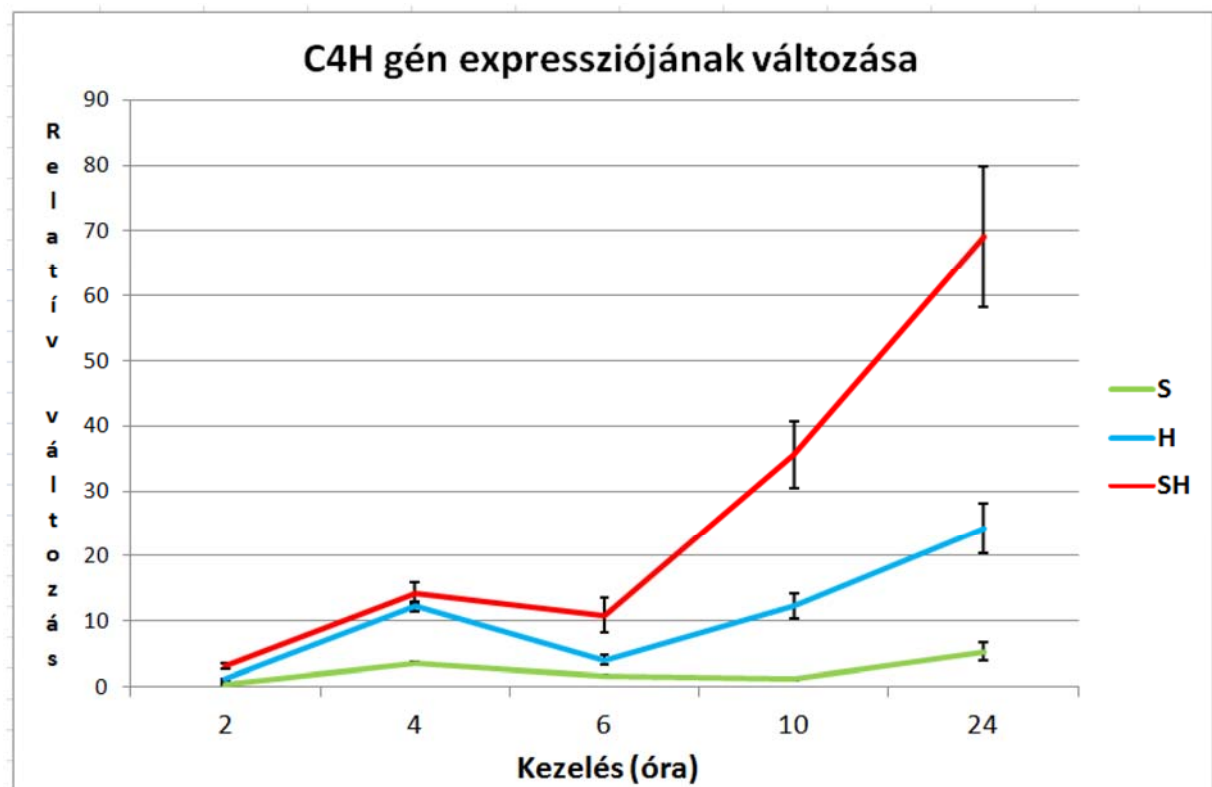
A hideg-indukált géneket szabályozó CBF (C-repeat binding) transzkripciós faktor expresszióját vizsgálva, megfigyelhető volt, hogy a génkifejeződés mértéke alacsony hőmérséklet hatására mintegy 4-5x-re, SMM előkezelt növényekben azonban 8-9x-re emelkedett. Ugyanakkor az SMM kezelés önmagában csak kismértékű (2x) expresszió növekedést okozott.

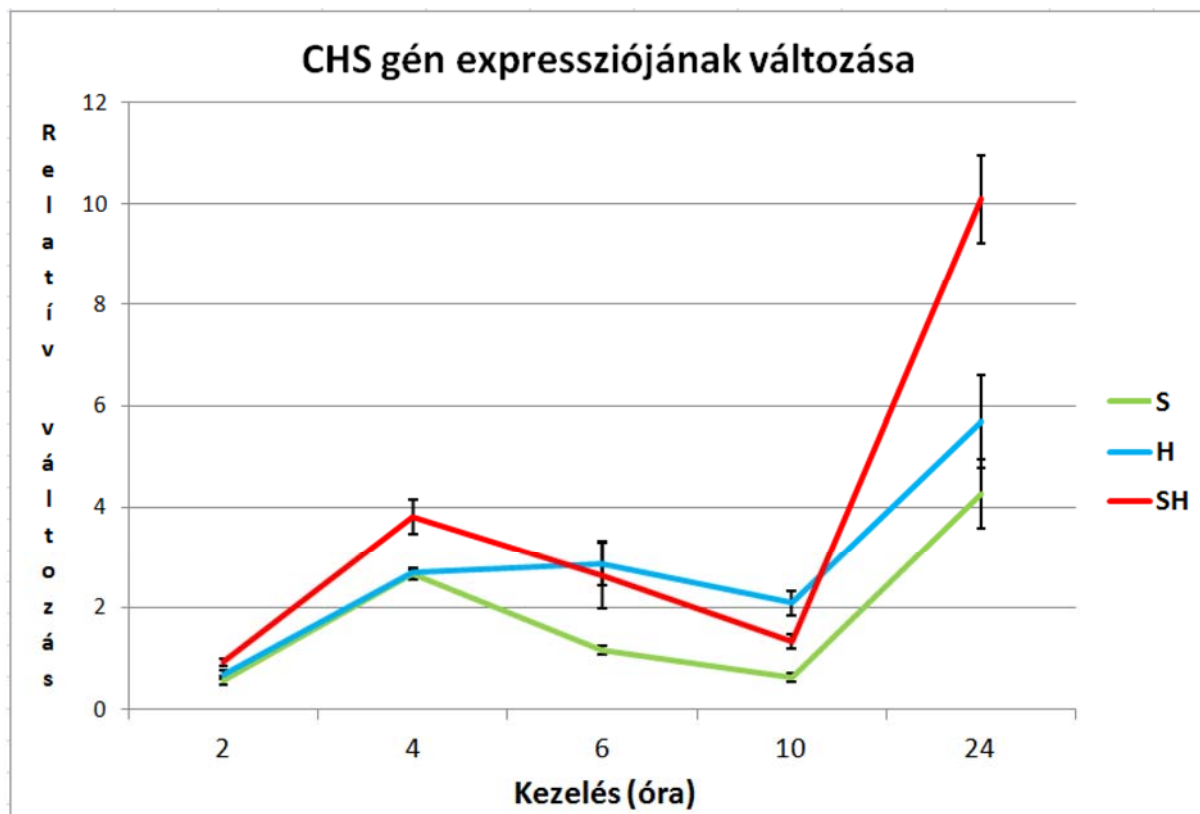
A stresszvédelemben fontos szerepet játszó poliaminok bioszintézisében közreműködő enzimek génexpresszióját vizsgálva megállapítottuk, hogy a putreszcin (Put) szintézis enzimeit közül az arginin-dekarboxiláz (ADC) expressziójában tapasztalható legnagyobb változás, tehát az argininből

kiinduló bioszintézis út aktiválódott. Az SMM kezelés önmagában csak mintegy 2x-es géneexpresszió növekedést okozott, de nagyobb mértékben erősítette az azt követő hidegstresszre adott válaszreakciót, melynek során 6-7x-es növekedés következett be. A csak hideg hatására ez a géneexpresszió növekedés csak 4x-es volt. A putreszcinből a spermidin szintézisét katalizáló S-adenozilmetionin dekarboxiláz (SAMDC) és a spermidin szintáz (SPDS) expressziójában hasonló tendenciát figyelhettünk meg. Az enzimek géneexpressziójában bekövetkező növekedést összevetve a spermidin (Spd) szintben bekövetkező változásokkal megállapítható volt, hogy a Spd mennyisége nagyobb (kb. 6x-os), mint amit a géneexpresszió növekedés (kb. 2x-es) alapján vártunk. Ez az eredmény azzal magyarázható – összhangban korábbi megfigyelésünkkel – hogy a spermidin szintézisének egy alternatív útja is lejátszódhat, melyben az SMM mint intermedier szerepel, tehát a Spd bioszintézisét közvetlenül is befolyásolhatta.

A fentiekben részletezett eredményeket Szegő et al. szerzőségével jegyzett cikkben (Cereal Res. Comm. 37(3) 419-429, 2009) publikáltuk.

A rövid idejű (24h) hidegstressz során bekövetkező, a védelmi potenciál kialakulásához hozzájáruló fenoloidok és antocianinok bioszintéziséhez vezető fahéjsav-4-hidroxiláz és kalkon szintáz gének expressziójának időbeli változásait tanulmányozva 10 napos kukorica csíranövényekben megállapítható volt, hogy hideg hatására mintegy 4-5x-ös, ugyanakkor az SMM-mel egy napig előkezelt növényekben az azt követő hidegstressz során lényegesen nagyobb, 12-18x-os növekedés volt megfigyelhető. Ugyanakkor – hasonlóan a poliamin szintézis génjeinél megfigyelt változásokhoz - az SMM kezelés önmagában csak ennél kisebb mértékben növelte a géneexpressziót (1. ábra).

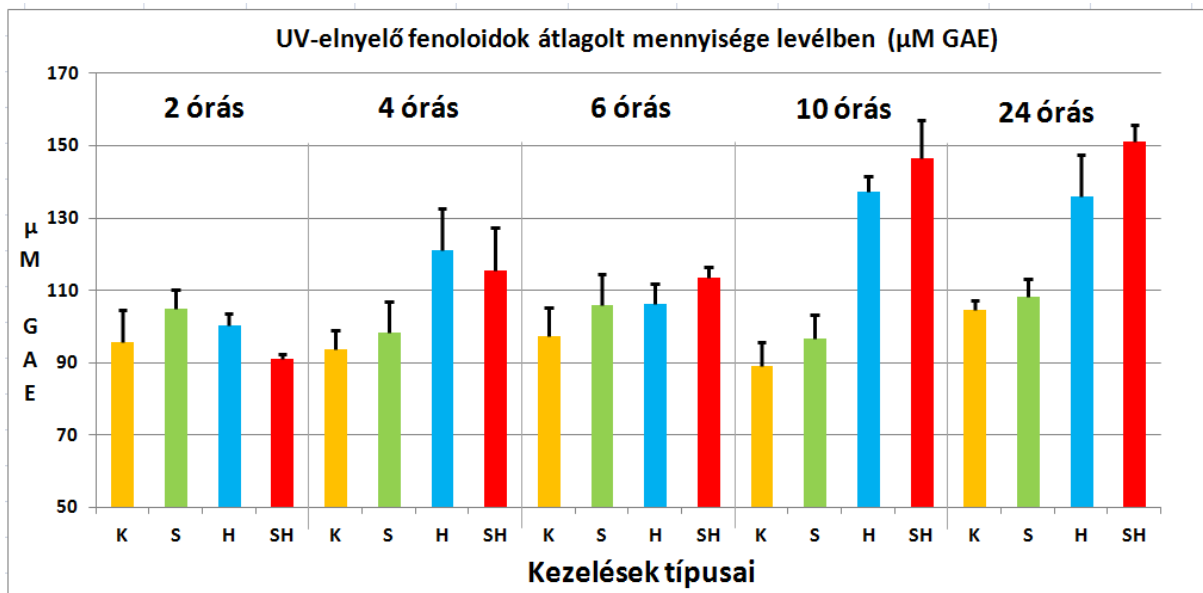




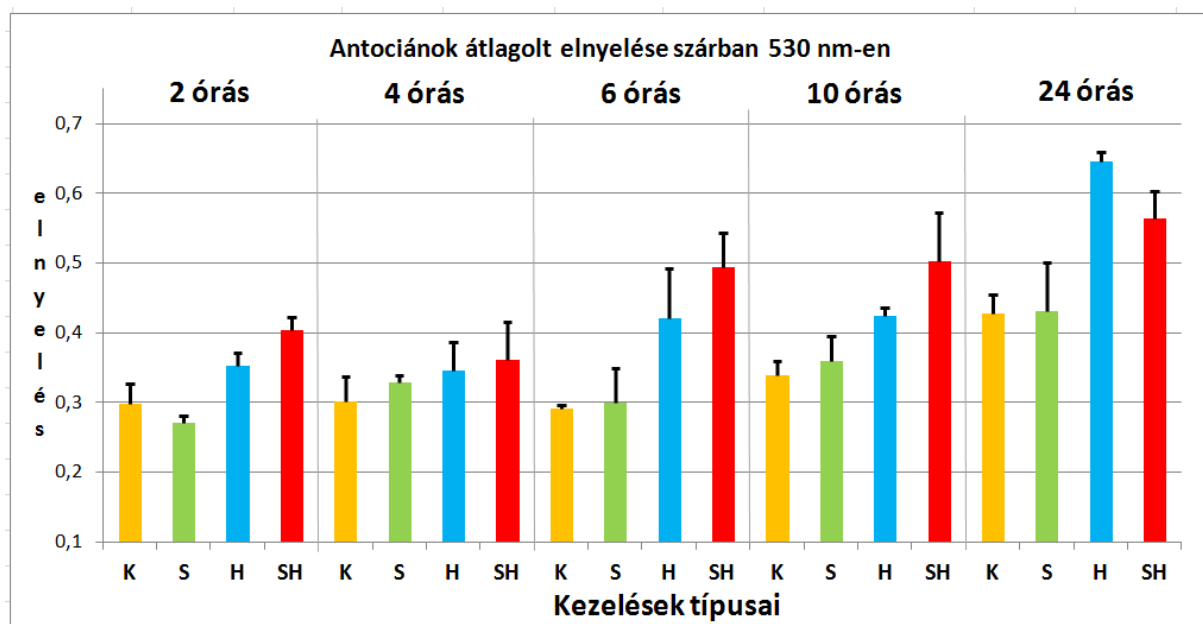
1. ábra: A fenoloidok és antocianinok szintéziséért felelős fenilpropanoid útvonal korai (fahéjsav-4-hidroziláz; C4H) és későbbi (kalkon-sintáz; CHS) reakcióit katalizáló enzimek génjeinek kontrollhoz viszonyított expresszióváltozásai 10 napos kukorica csíranövényben 0,01g/l S-metilmationin (S), hideg (H; 6°C), valamint 24 órás SMM-kezelést követő hidegkezelés (SH) hatására. Az adatok 3 biológiai és 3 technikai ismétlés átlagai, szórással.

1.

Metabolomikai szinten a C4H és CHS gének expresszióváltozásainak következményeként megnyilvánuló összfenoloid-, valamint antocianintartalom változásokat vizsgálva, hasonló tendenciát figyelhettünk meg. A csíranövények leveleiből nyert minták galluszsav-ekvivalensben (GAE) megadott összfenoloid tartalmának hidegstressz során, valamint az SMM előkezelést követő hidegstressz alatt bekövetkező változásait a 2. ábra, míg az antocianin tartalom alakulását (a változásokat kukoricánál legjobban reprezentáló szárból mért adatok alapján) a 3. ábra mutatja.



2. ábra: Az összfenoloid tartalom változásai (GAE, galluszsav ekvivalensben) 10 napos kukorica csíranövények levelében S-metilmetionin (S, 0,01g/l SMM), hideg (H; 5°C), valamint 24 órás SMM kezelést követő hidegkezelés hatására (SH). Az oszlopok feletti időparaméterek a hidegkezelés hosszát jelzik.



3. ábra: Az antociánin tartalom változásai (az 530 nm-nél mért elnyelés alapján) 10 napos kukorica csíranövények szárában 0,01g/l S-metilmetionin (S), hideg (H; 5°C), valamint 24 órás SMM kezelést követő hidegkezelés hatására (K-kontroll; S- SMM-kezelt; H- hidegkezelés; SH- SMM- és hidegkezelés). Az oszlopok feletti időparaméterek a hidegkezelés hosszát jelzik.

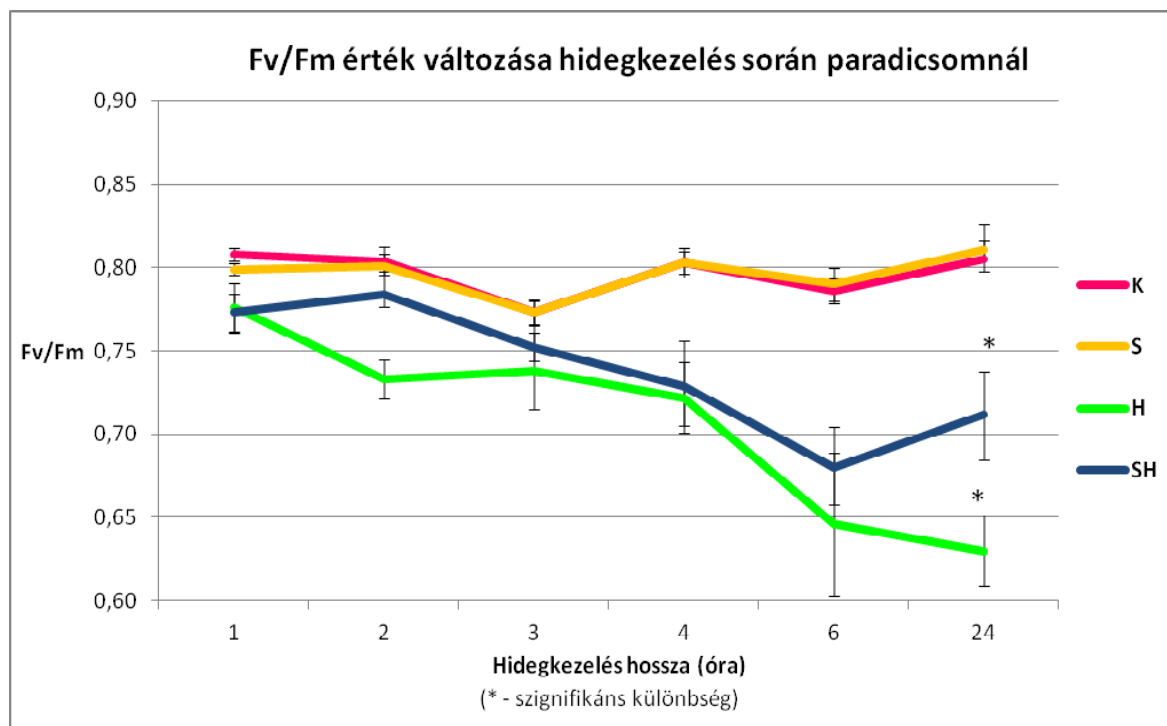
A fentiekben leírt eredményekből *S-methylmethionine alleviates the damage of cold stress in maize through protection of the photosynthesizing apparatus and stimulation of the phenylpropanoid pathway* címmel Páldi K, Rudnóy S, Rácz I, Szigeti Z. szerzőségével a *Biologia Plantarum* c. folyóirathoz benyújtandó dolgozat a jelentés írásakor 90%-os készütségekben van.

Hosszabb idejű – 1-4 napos – különböző mértékű hidegstressznek (6, 8, 10, 12 és 14°C) kitett kukorica növények fotoszintetikus paramétereit vizsgálva ugyancsak megállapítható volt, hogy SMM-mel kezelt növényekben a fotoszintetikus apparátus a hidegstressz során kevésbé károsodik.

A PSII maximális kvantumhatékonyságára jellemző Fv/Fm értékekben a kontroll növényeknél már enyhe hidegstressznél is megfigyelhető volt némi csökkenés. 10 °C alatti hőmérsékleteken az Fv/Fm értékek csökkenése azonban lényegesen nagyobb mértékű volt. A klorofilltartalomban, valamint a nettó fotoszintézis (An) értékekben bekövetkező változások hasonló tendenciát mutattak. Az SMM mérsékelte ezen értékek csökkenését. Védő hatása legnagyobb mértékben a hosszabb időtartamú hidegkezelés, valamint a legalacsonyabb hőmérséklet esetén nyilvánul meg. A fotoszintetikus apparátus kisebb mértékű károsodását jelzi az SMM kezelt növényeknél, hogy nettó fotoszintézisük magasabb értéken maradt a hidegstressz során, mint a kontroll növényeké. Ezt támasztja alá az is, hogy a fotokémiai kioltás magasabb mind az enyhébb, 10 °C feletti, mind a 6, illetve 8 °C-os hidegstressz során az SMM kezelt növényekben, mint a nem fotokémiai kioltás, tehát az épebb fotoszintetikus apparátus nagyobb mértékben tudja a gerjesztési energiát fotoszintetikusán, az elektrontranszport láncban hasznosítani, és ezáltal a hatékony CO₂ megkötést biztosítani.

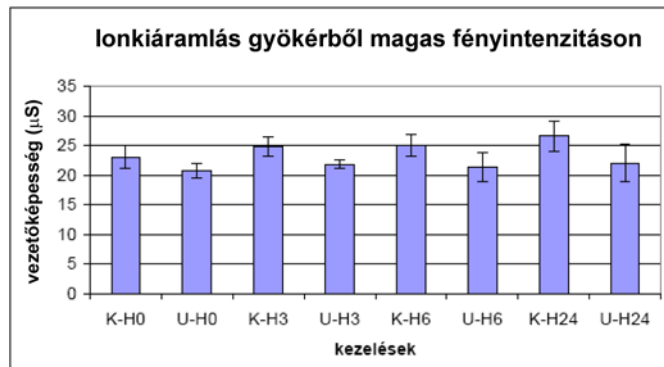
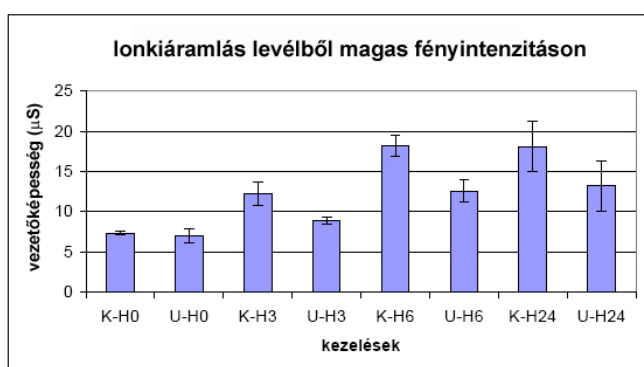
A hosszabb ideig tartó, mérsékelt (10 °C feletti) illetve erősebb (6-8 °C-os) hidegstressz során fluoreszcencia leképezés vizsgálatokkal nyomon követhető a stresszvédő fenoloidok mennyiségével korreláló (440 és 520 nm-nél mérhető) fluoreszcencia intenzitásokat és azok arányainak változásait, megfigyelhető volt, hogy noha a hidegstressz önmagában is előidézi a növekedést ezek mennyiségében, az SMM előkezelt növényeknél a 440 és 520 nm-es fluoreszcencia növekedése nagyobb mértékű, mint a kontroll növényeknél. A fotometriás antocianin tartalom meghatározások alapján az antocianinok mennyiségének emelkedésében is hasonló tendencia figyelhető meg. Ezeket – a fentiekben részletezett – eredményeket Kósa et al. szerzőségével jegyzett folyóiratcikkben (Centr. Eur. J. Biol. 6(1) 75-83, 2011) publikáltuk.

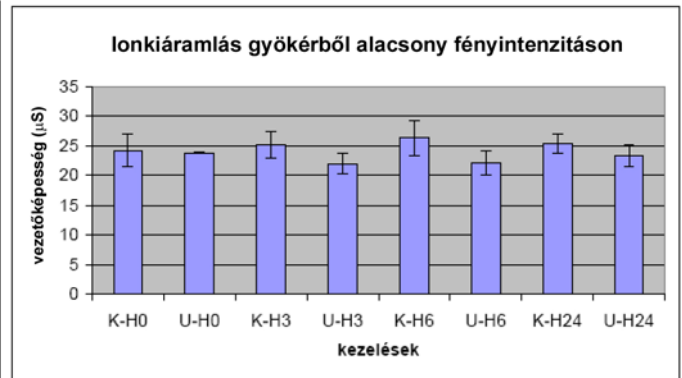
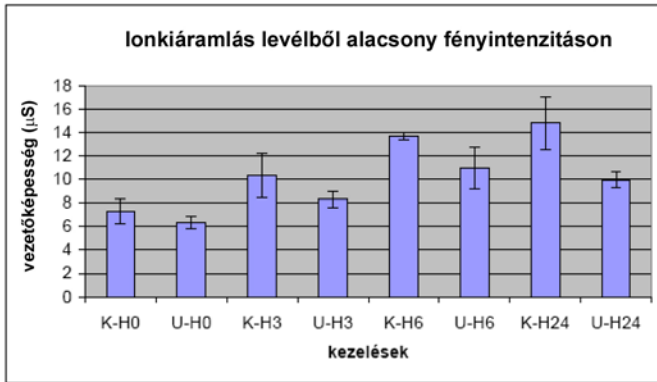
A kukoricánál detektáltakhoz hasonló kedvező hatást tapasztaltunk a paradicsom (Kecskeméti 3) korai fejlődési szakaszában (3 hetes, hidropónikus kultúrában, ¼-es Hoagland tápoldaton nevelt növényeken). Az 1 napos, +6°C-os hidegstressz, valamint 1 napos 0,1g/L SMM előkezelést követően alkalmazott hasonló hidegkezelés során a fotoszintetikus aktivitást jellemző paraméterekben bekövetkező változások ugyancsak az SMM stresszvédő hatását mutatták. Az SMM-mel előkezelt növényekben az Fv/Fm értékek kevésbé csökkentek a hidegstressz hatására (4. ábra), Hill aktivitásuk és klorofill tartalmuk magasabbnak bizonyult, mint az SMM kezelést nem kapott növényeké. Mindezek a fotoszintetikus apparátus hidegstressz okozta károsodásának mérséklődését jelzik.



4. ábra: Az Fv/Fm értékek változásai paradicsomnál a különböző kezelések hatására. K: kontroll; S: SMM-kezelte; H: hidegkezelte; SH: SMM- és hidegkezelte

Ebben feltehetően szerepet játszik az SMM-nek a membránintegritás megőrzésére gyakorolt kedvező hatása is, amely jól mérhető az elektrolit kiáramlás alapján. A főként egyszikű, mezőgazdaságilag fontos (kukorica, búza) növényeknél korábban kimutatott hatás paradicsomnál is megfigyelhető volt. Az ionefflux vizsgálatok eredményei ugyanis azt mutatták, hogy az SMM előkezelés, különösen leveleknél - ahol a hidegstressz gyakran fénystresszel is párosul - de gyökérnél is jelentősen csökkentette a hideg hatására bekövetkező, membránkárosodást jelző ionkiáramlást (5. ábra).

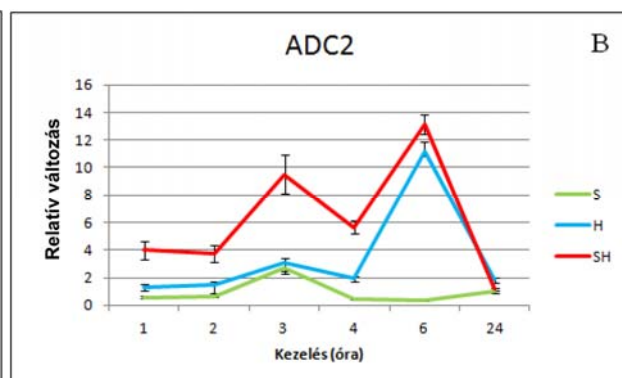
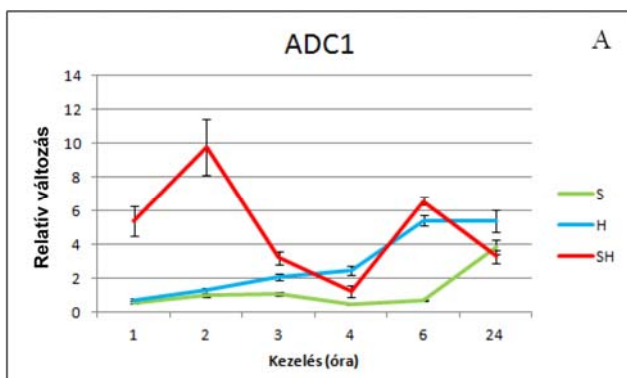


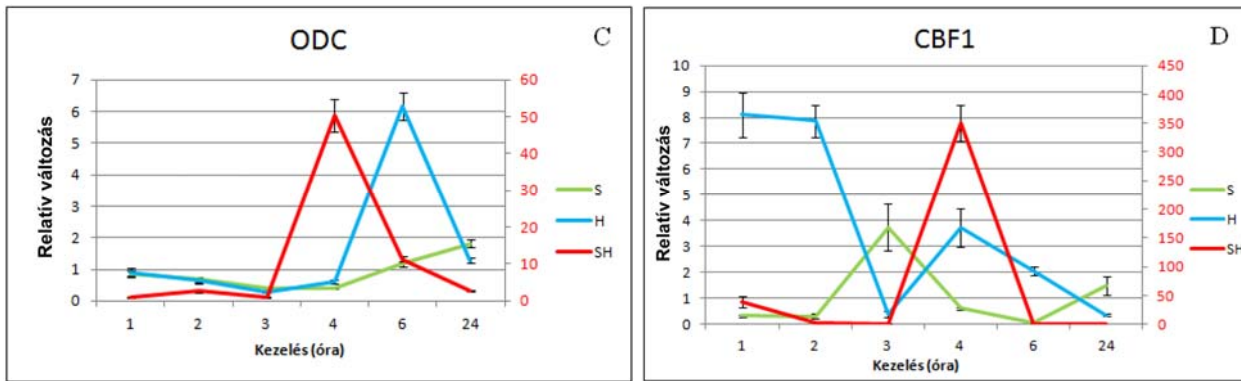


5. ábra: Az SMM hatása 3, 6, valamint 24 órás alacsony hőmérsékleti stressznek kitett 21 napos paradicsom csíranövények leveleinek és gyökereinek magas ($200-220 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), illetve alacsony ($100-120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fényintenzitáson mért ionkiáramlására a vezetőképesség változásai alapján. (K: kontroll, U: 24h-s 0,1g/L SMM előkezelés, H0-H3-H6-H24: 0, 3, 6, és 24 órás 6 °C-os hidegkezelés)

A paradicsom korai fejlődési fázisában alkalmazott hidegstressz során a poliamin bioszintézis különböző útvonalait katalizáló enzimek, valamint a hidegindukált génkifejeződését szabályozó C-repeat binding factor (CBF1) génexpresszióját és az SMM-nek ezekre gyakorolt hatását vizsgálva, megállapítottuk, hogy az argininből kiinduló szintézis utat szabályozó ADC1 és ADC2 géneknél korai expressziónövekedés volt tapasztalható az SMM és a hidegkezelés együttes alkalmazásánál (2 illetve 3 órás SMM+hidegkezelésnél). Ezt egy újabb csúcs követte 6 órás hidegkezelésnél, ahol már a csak hidegkezelést kapott növények ADC expressziója is jelentősen megnőtt. Mivel az ADC1 konstitutívan jelen van a szövetekben, kezelése hatására gyorsabban megváltozik a mennyisége, mint az ADC2-nek. Ugyanakkor az SMM-kezelés hatására az expresszió kisebb mértékben változott meg.

Az ODC és CBF1 gének 4 órás hidegkezelésnél mutatták a legnagyobb expresszióváltozást. Kiemelkedő volt az SMM előkezelés hatása, melyet követően alkalmazott hidegstressz során az ODC gének expressziónövekedése jelentősen meghaladta az ADC géneknél detektált növekedést. A kukoricánál megfigyeltékhez hasonlóan elmondható, hogy a legnagyobb génexpresszió változást az SMM és hidegkezelést is kapott növények mutatták. A csak hidegkezelést kapó növények génexpressziója kevésbé, illetve a csak SMM-mel kezeltké alig változott meg (6. ábra).

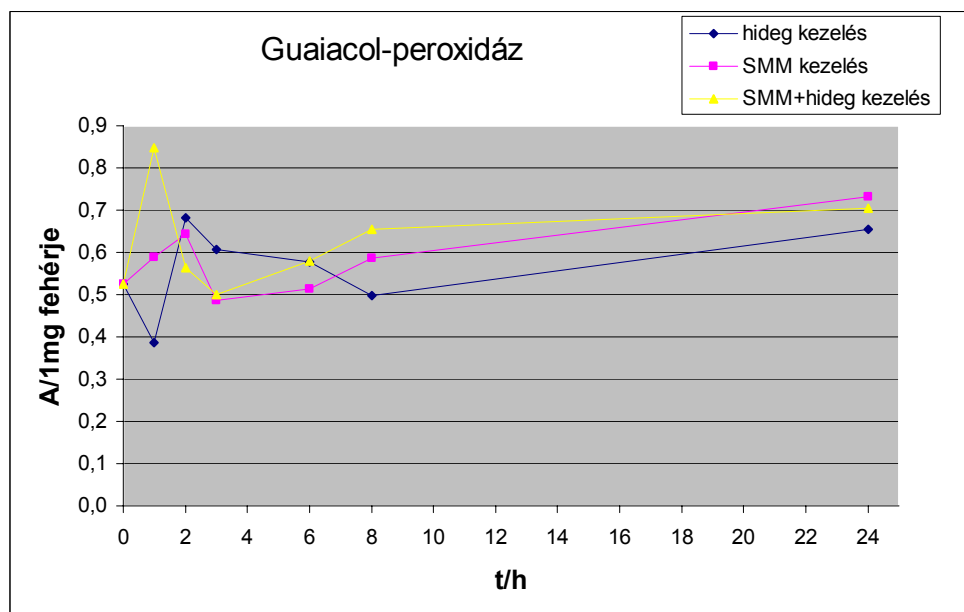
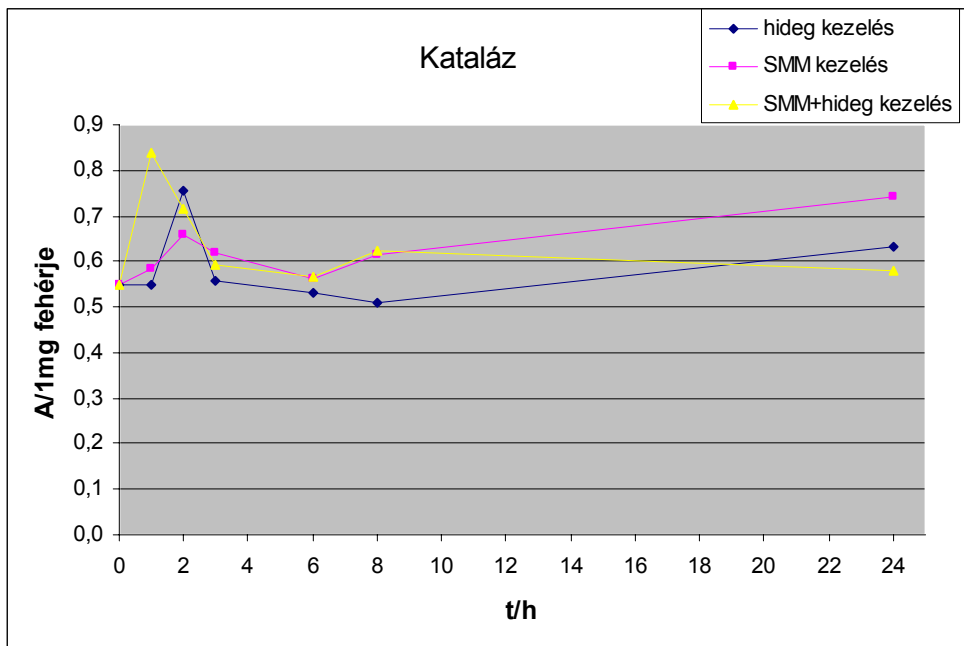




6. ábra: A poliamin bioszintézis argininből és ornitinből kiinduló útvonalaiért felelős gének, valamint a hidegindukált gének transzkripcióját szabályozó CBF1 faktornak a kontrollhoz viszonyított expresszióváltozásai alacsonyhőmérsékleti stressz hatására paradicsomban. A: ADC1 (arginin dekarboxiláz1), B: ADC2 (arginin dekarboxiláz2), C: ODC (ornitin dekarboxiláz), D: CBF1 (C-repeat binding factor1) gének időbeli változása kezelésként. S: SMM-kezelt; H: hidegkezelt; SH: SMM- és hidegkezelt. A C és D ábrarészekeken a második y tengely (piros skála) az SH grafikonhoz tartozó értékeket mutatja.

A génexpresszió változásokat jól tükrözik a poliaminszint változásai (az adatokat nem mutatjuk). Az eredmények az SMM-nek a stresszre előkészítő, priming hatását mutatják, melyek következtében gyorsabban és hatékonyabban tud a növény védekezni.

Az SMM-nek a hidegstressz során megnyilvánuló védő hatását a hidegstressz és számos abiotikus stresszhatás során jelentkező oxidatív stressz elleni védekezésben szerepet játszó antioxidáns enzimek aktivitásváltozásainak mérésével is nyomon követtük. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy mind a hidegstressz, mind az SMM kezelés önmagában is megemeli a kataláz, a peroxidáz, a glutation reduktáz és az aszkorbát peroxidáz aktivitásokat. Az SMM-mel előkezelt növényekben azonban a hidegstressz során időben korábban jelentkező (1 órával a hidegstressz kezdetét követően maximumot mutató) és a csak hidegstresszt elszenvedett növényekben tapasztaltat meghaladó mértékű aktivitásnövekedés figyelhető meg (7. ábra). Az aszkorbát-peroxidáz és a glutation reduktáz enzimeknél az aktivitás maximuma ugyan korábbra tevődik az SMM kezelést is kapott növényekben, az aktivitás mértéke azonban nem különbözik jelentősen a csak hidegstressznek kitétt növényekétől (az adatokat nem közöltük).



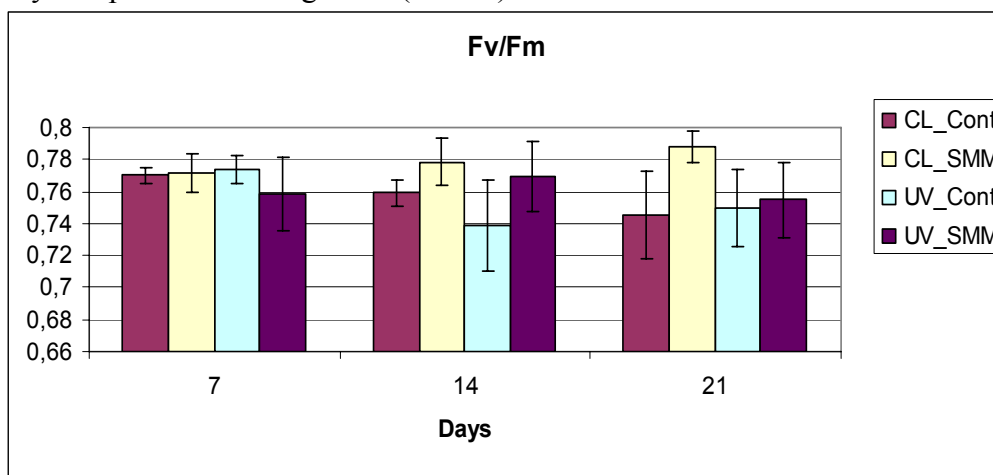
7. ábra. Egyes antioxidáns enzimek aktivitásváltozásai a 3 hetes paradicsom növényeknél 1, 2, 3, 6, 8 és 24 órás hideg (6 °C), SMM (0.1g/L), illetve 24 órás SMM előkezelést követő hidegkezelések hatására a 240 (kataláz), valamint a 470 nm-nél (guaiacol peroxidáz) mért, összfehérje tartalomra vonatkoztatott abszorpció alapján.

A paradicsom későbbi fejlődési fázisaiban vizsgálva az SMM hatását, fóliasátorban termesztett, a fejlődési periódus során 3-szor – a kiültetés után 2, 6 és 10 héttel – 0.01g/L SMM-mel permetezett paradicsom likopin tartalmában emelkedés (kontroll: 20,5 μ g/g, SMM kezelt: 22,55 μ g/g friss tömeg) volt megfigyelhető, ugyanakkor a kezelés a termékek tárolhatóságát is javította. A terméshéj rezveratrol tartalmában azonban nem mutattunk ki szignifikáns emelkedést.

Az eredményekből tudományos diákköri dolgozat készült, mely előadás formájában a 2013. évi XXXI. OTDK konferencián kerül bemutatásra. Az eredményeket nemzetközi tudományos folyóiratban is publikálni kívánjuk.

UVB stressz

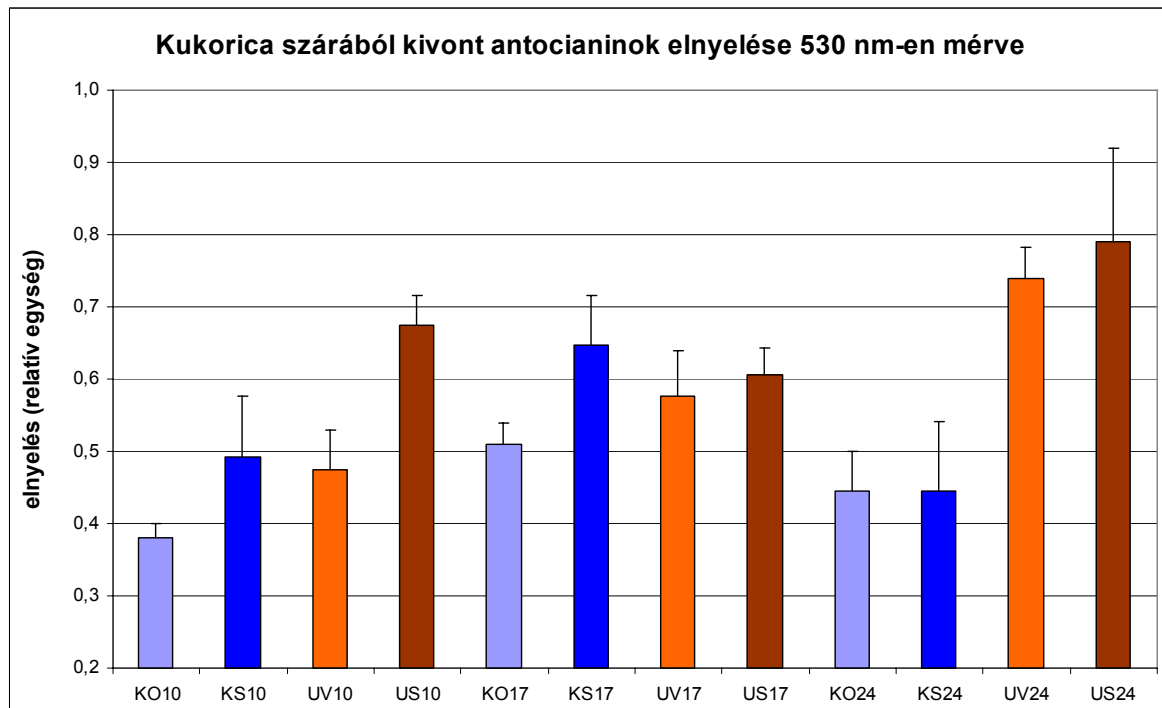
Az SMM hatását UVB sugárzással stresszelt Norma hibrid kukorica fiziológiai állapotát jellemző fiziológiai paramétereire (PS2 kvantumhasznosítás, nettó fotoszintézis, sztómakonduktancia, transpirációs ráta), megállapítható volt az SMM kismértékű, de nem minden esetben szignifikáns védő hatása, akár a csírázás során a fényretétel előtt 72 órán át kezeltük a szemeket 0,1g/l SMM-mel, akár egy nagyságrenddel kisebb koncentrációban folyamatosan a hidropónikus kultúrában nevelt növények tápoldatához adagoltuk. (8. ábra)



8. ábra: A kukorica (Norma hibrid) változó fluoreszcencia (Fv/Fm) érték változásai UVB stressz során. CL Cont: normál megvilágítás mellett nevelt kontroll, CL SMM: normál megvilágítás mellett nevelt, a csírázás során 0,1g/L SMM-mel előkezelt növények, UV cont: UV megvilágítás mellett nevelt kontroll, UV SMM: UV megvilágítás mellett nevelt, a csírázás során 0,1g/L SMM-mel előkezelt növények

Jelentős változások voltak megfigyelhetők ugyanakkor az UV-elnyelő fenoloidok, valamint az antocianinok mennyiségében, melyek növekedését mind az SMM, mind az UV megvilágítás önmagában is kiváltotta. Itt is jelentkezett az SMM nagyobb növekedést kiváltó, gyorsabb válaszreakciót eredményező hatása az UV megvilágítás korai periódusában (9. ábra).

Tanulmányozva az SMM hatását az antioxidáns védő enzimek aktivitására, megfigyelhető volt, hogy a 3 hetes UV megvilágítás önmagában is növelte az aszkorbát peroxidáz, kataláz és a glutation reduktáz aktivitásokat, amit az SMM kezelés tovább fokozott. Ugyanakkor a glutation S-transzferáz enzim aktivitása mind az UV kezelés, mind az SMM-mel kombinált UV kezelés hatására csökkent a normál fényen nevelt kontroll növényekben mért aktivitáshoz képest. További érdekes megfigyelés, hogy az SMM kezelés önmagában okozta a legjelentősebb, 2-5x aktivitásnövekedést valamennyi vizsgált enzim, köztük a glutation-S-transzferáz (GST) esetében is. A GST gének nagy száma és differenciális expressziója, valamint a kódolt enzimek sokirányú fiziológiai funkciója miatt azonban ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel. A GST1 aktivitásváltozásai pontosabb időrendjének, valamint a génexpresszió szintű változásainak feltárására irányuló kísérletek jelenleg is folyamatban vannak. Ebben a témakörben elért eredményeink publikálása 2013-as év során várható nemzetközi folyóiratban.



9. ábra: Az SMM előkezelés hatása kukorica (Norma hibrid) szárából kinyerhető antocianin tartalmának változásaira normál fényen, valamint az UVB megvilágítás hatására az 530 nm-nél mért extinkcióváltozások alapján. KO: normál megvilágítás mellett nevelt kontroll; KS: normál megvilágítás mellett nevelt, a csírázás során 0,1g/L SMM-mel előkezelt növények; UV: UV megvilágítás mellett nevelt növények; US: UVB megvilágítás mellett nevelt, a csírázás során 0,1g/L SMM-mel előkezelt növények. A mérések 10, 17 és 24 napos korban történtek.

Az SMM hatása a biotikus stresszekkel szembeni toleranciára

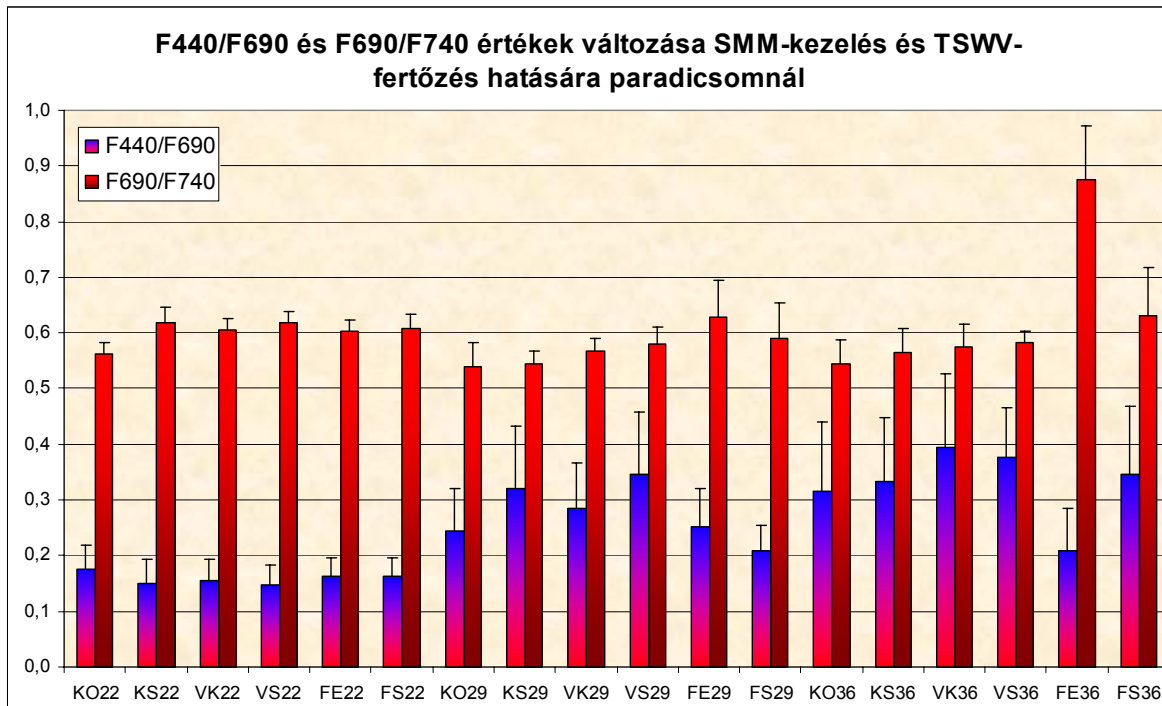
Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) fertőzés

Paradicsom csíranövényeken a Tospovirus genusba tartozó negatív szálú RNS vírus, a TSWV fertőzése során tanulmányoztuk az SMM kezelés hatását a vírusfertőzés tüneteinek és fiziológiai következményeinek megnyilvánulására, valamint a növényen belüli víruskoncentrációra. A hidropónikus kultúrában nevelt 2 hetes csíranövényeket (Kecskeméti K3) 1 napos, 0,01g/L SMM kezelést követően fertőztük TSWV-t tartalmazó inokulummal. A fertőzések 15 napos korban történtek, melyeket követően 1, 2 és 3 hét elteltével (22, 29 és 36 napos korban) történt a hatások monitorozása. Ezek során a fiziológiai állapotot jellemző Fv/Fm értékeken, illetve a stresszvédő anyagok keletkezését és a stresszeltségi állapotot 440, 520, 690 és 740 nm-en leképezési technikával mért fluoreszcencián kívül vizsgáltuk az összes fenoloid- és antocián-tartalmat, valamint a víruskoncentrációt DAS-ELISA technikával.

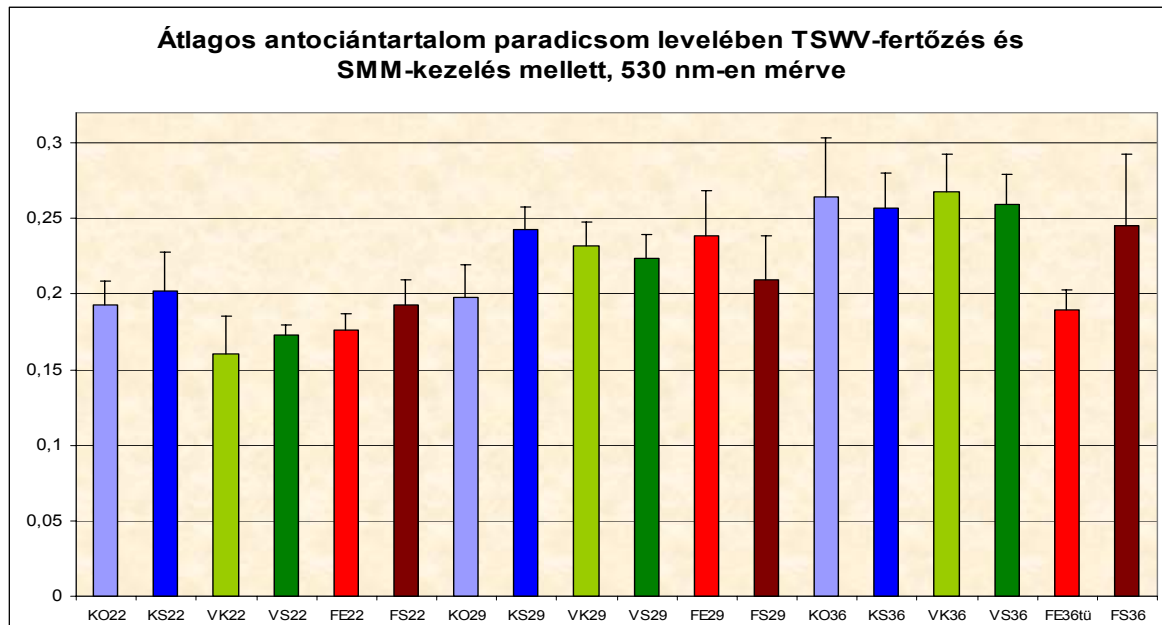
A stresszorok hatásának korai jelzésére alkalmas kék/vörös (F440/F690) és kék/távoli vörös (F440/F740) fluoreszcencia arányok érzékenyen reagáltak a környezeti változásokra és hamar jelezték a stresszvédő anyagok szintézisét, valamint a fotoszintetikus funkciók módosulását. A két arány a kísérlet során hasonlóan változott, de a 440/690 arány változásai intenzívebbek voltak. Az arányértékek a fertőzést követően 1 héttel nem mutattak nagy különbséget, 14 nap után viszont az SMM-előkezelés hatására jelentősen növekedtek, kivéve a fertőzött növényeket, ahol mindkét arányban csökkenés volt megfigyelhető, feltehetően a fertőzés okozta szöveti degradáció következményeként. Három héttel a fertőzést követően az F440/F690 arányban a fertőzés hatására ugyancsak erős csökkenés következett be, amelyet azonban az SMM jól láthatóan mérsékelte: az

értékek közelebb maradtak a kontroll csoportokéhoz (10. ábra). Hasonló tendenciák figyelhetők meg a levelek antocianin tartalmának változásaiban a növényből extrahált antocianinok 530 nm-nél mérhető extinkcióváltozásai alapján (11. ábra).

A vörös/távoli vörös fluoreszcencia arányban (F690/F740), mely az *in situ* klorofilltartalom inverz jelzője, a fertőzés későbbi fázisában (14, illetve 21 nappal a fertőzés után) a nem fertőzött (kontroll, csak a fertőzéshez hasonló mechanikai sérülésnek kitett vak kontroll, az SMM-kezelt és SMM kezelt vak kontroll) csoportok között gyakorlatilag nincs különbség. A fertőzött palánták leveleiben előbb enyhe, 3 héttel a fertőzést követően pedig jelentős klorofilltartalom csökkenés figyelhető meg. Az SMM védő hatása azonban itt jól kimutatható; jelentősen mérsékli a klorofilltartalom csökkenését (10. ábra).



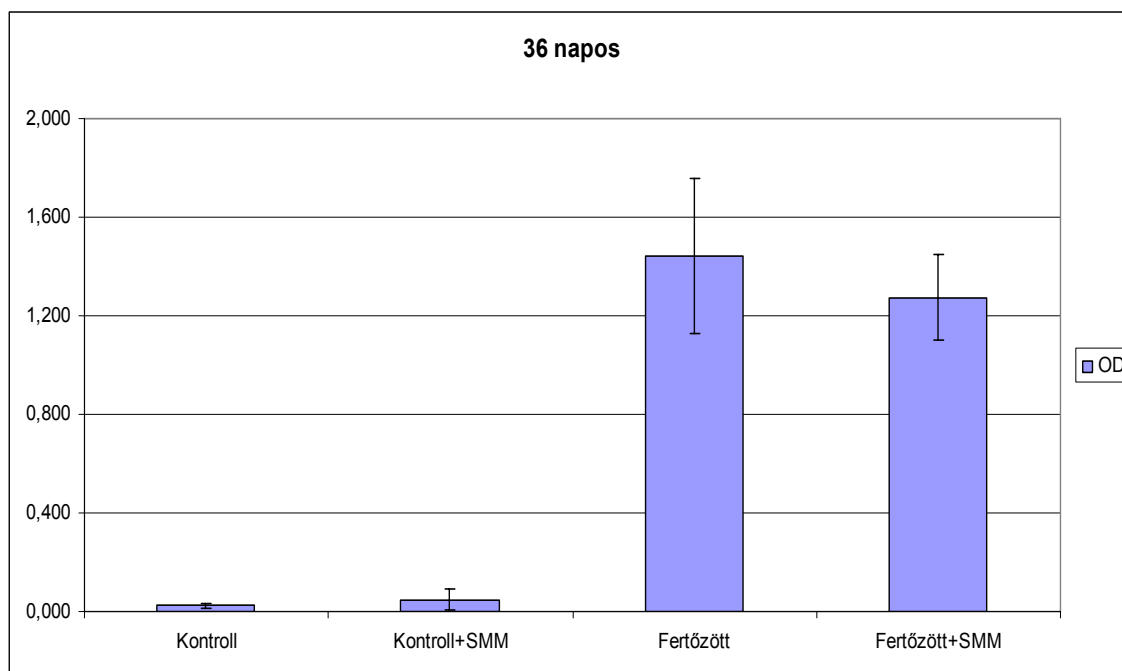
10. ábra: SMM hatása a TSWV vírussal fertőzött paradicsom növények fluoreszcencia emissziós paramétereinek változásaira. KO: kontroll; KS: 0,01 g/L SMM-mel előkezelt növények; VK: vak kontroll (a fertőzést imitáló mechanikai sérülés, víruspartikulumok nélkül); VS: 0,01 g/L SMM-mel előkezelt vak kontroll növények; FE: TSWV-fertőzött növények; FS: 0,01 g/L SMM-mel előkezelt TSWV-fertőzött növények. A fertőzések 15, a mérések 22, 29 és 36 napos korban, vagyis 1, 2 és 3 héttel a fertőzést követően történtek.



11. ábra: Az SMM hatása paradicsom növények antocianin tartalmára az 530nm-nél mért extinkcióváltozások alapján. KO: kontroll; KS: 0,01 g/L SMM-mel előkezelt növények; VK: vak kontroll (a fertőzést imitáló mechanikai sérülés, víruspartikulumok nélkül); VS: 0,01 g/L SMM-mel előkezelt vak kontroll növények; FE: TSWV-fertőzött növények; FS: 0,01 g/L SMM-mel előkezelt TSWV-fertőzött növények. A fertőzések 15, a mérések 22, 29 és 36 napos korban, vagyis 1, 2 és 3 héttel a fertőzést követően történtek.

A TSWV fertőzés mértékének meghatározását célzó DAS-ELISA vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a fertőzést követő 14. napon, amikor a tünetek vizuálisan is jól láthatók (megjelennek a makroszkópos tünetek, szisztemizálódik a vírushatás), az SMM kezelés még nem okozott jelentős különbséget a víruskoncentrációban egyik levélemeleten sem. Ezzel szemben 21 nappal a fertőzést követően a 3. és 4. levél esetében az SMM kezelés hatására már alacsonyabb volt a víruskoncentráció.

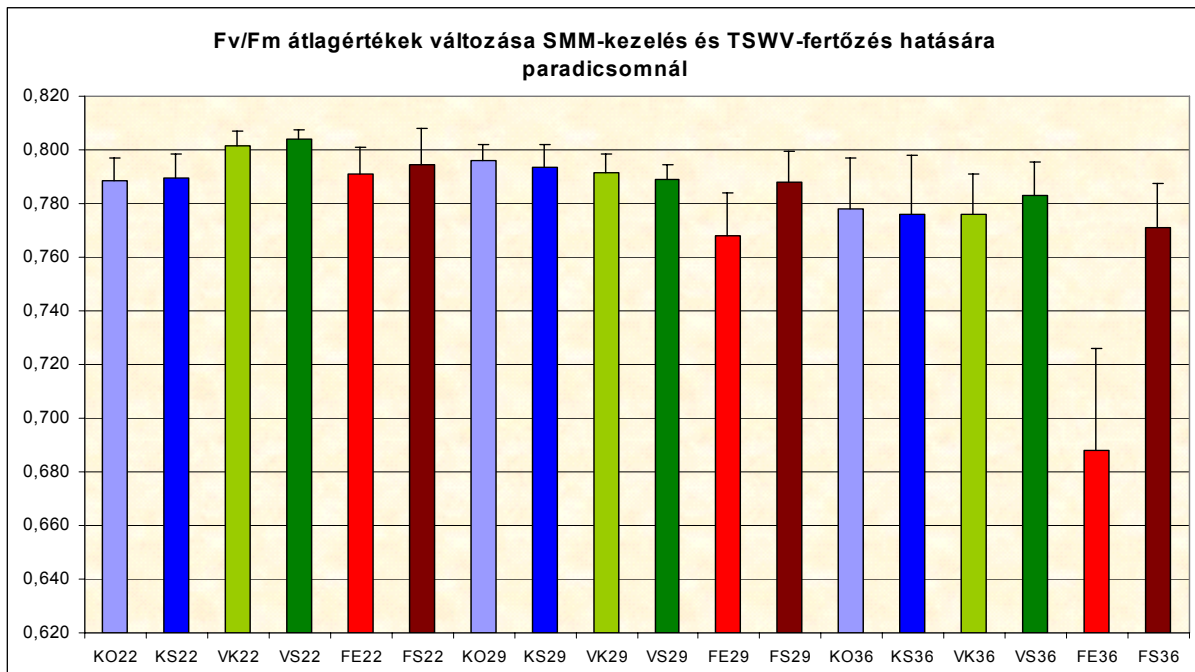
Mindezeket összegezve megállapíthatjuk, hogy a fertőzés előtt egy nappal alkalmazott SMM kezelés hatása legerősebben csak a fertőzést követő 21. napon, ill. azt követően jelentkezik, valószínűleg a növény védőmechanizmusainak elősegítése révén, amelyek feltételezhetően közvetve vagy közvetlenül hatnak a vírusreplikációra, illetve a virionok növényen belüli terjedésére (12. ábra).



12. ábra: SMM hatása TSWV vírussal fertőzött paradicsom növények leveleinek víruskoncentrációjára 3 héttel a fertőzés után (36 napos növények) az ELISA teszttel mérhető abszorpcióváltozások alapján (405 nm-en mérve).

A változó fluoreszcencia (Fv/Fm) értékek változásai is alátámasztják a fentieket. Egy héttel a fertőzés után a 22 napos növényeknél gyakorlatilag nem különböztek a mért értékek, jelezve, hogy a fertőzés még nem szisztemizálódott. Két héttel a fertőzést követően, a kontrollhoz képest minden verzióban szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk. 3 héttel a fertőzés után a vírus már erősen szétterjedt a növényekben és ennek megfelelően az Fv/Fm értékeikben erős csökkenés volt tapasztalható. Ezt a csökkenést az SMM-előkezelés jelentősen mérsékelte. Ez a stresszre felkészítő hatás kimutatható volt a fertőzéshez hasonló mechanikus sérülésnek kitett, de nem fertőzött vak kontroll növények esetében is (13. ábra).

Az SMM védelmi potenciál kialakításában betöltött szerepének tanulmányozása kapcsán kidolgoztunk egy egyszerű, vékonyréteg-kromatográfiás elválasztáson és a Dragendorff-reagenssel láthatóvá tett tomatin foltnak pásztázó spektrofotométerrel történő kiértékelésén alapuló analitikai eljárást a paradicsom növény egyik glikoalkaloidjának, a főleg a biotikus stresszorokra adott stresszválaszban jelentős tomatinnak kimutatására és mennyiségi meghatározására. Kísérleteink során azonban a növények tomatinszintjében sem az SMM-kezelést, sem a fertőzést, sem pedig az SMM-kezelést követő fertőzés során nem sikerült szignifikáns változást kimutatni (az adatokat nem mutatjuk).



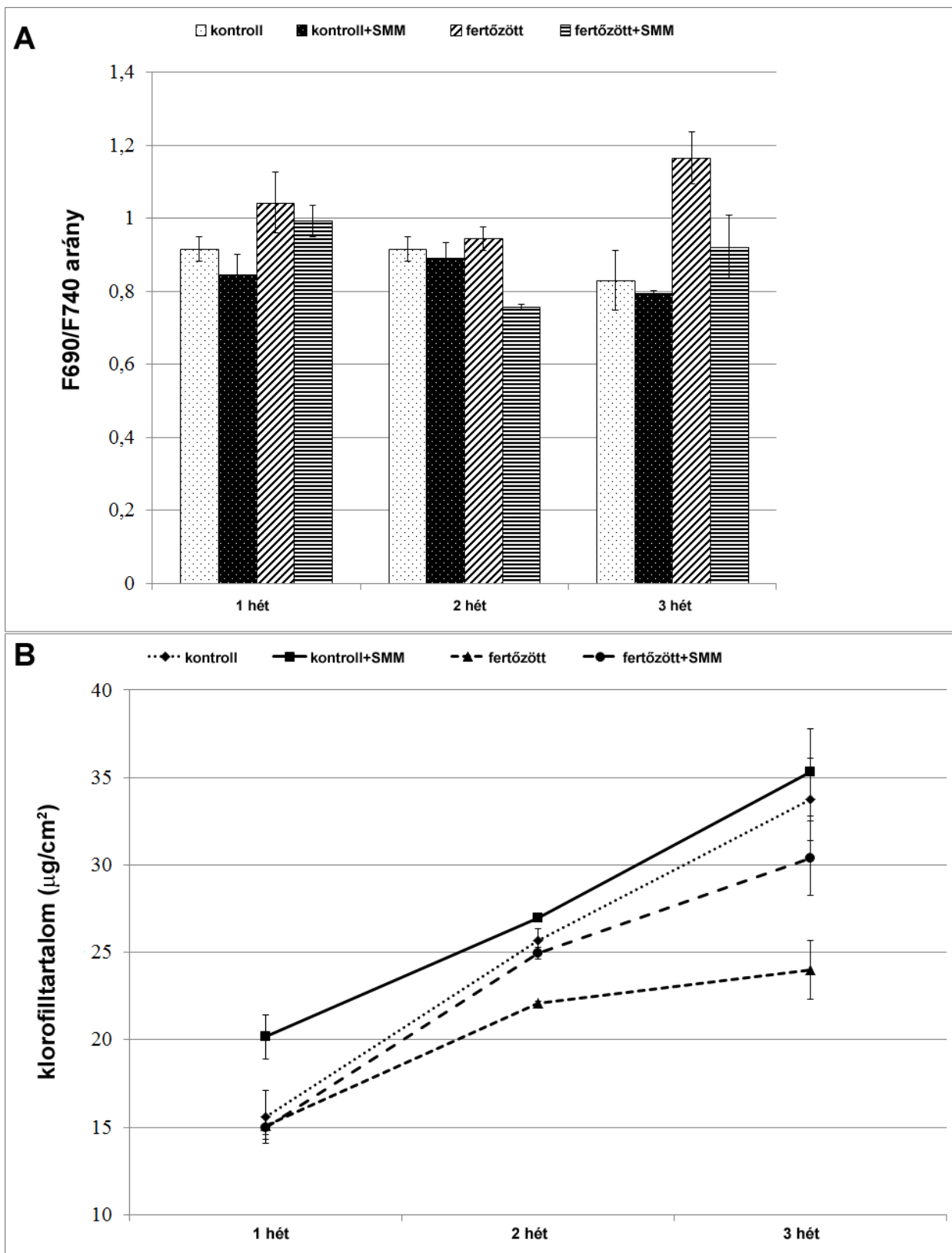
13. ábra: Az SMM hatása a PSII maximális kvantumhatékonyságát jellemző Fv/Fm paraméter változásaira paradicsom növény TSWV fertőzése során. KO: kontroll; KS: 0,01 g/L SMM-mel előkezelte növények; VK: vak kontroll (a fertőzést imitáló mechanikai sérülés, víruspartikulumok nélkül); VS: 0,01 g/L SMM-mel előkezelte vak kontroll növények; FE: TSWV-fertőzött növények; FS: 0,01 g/L SMM-mel előkezelte TSWV-fertőzött növények. A fertőzések 15, a mérések 22, 29 és 36 napos korban, vagyis 1, 2 és 3 héttel a fertőzést követően történtek.

A fenti eredményeken alapuló publikáció megírása folyamatban van, melyet 2013 folyamán nemzetközi folyóirathoz szándékozunk benyújtani.

Maize Dwarf Mosaic Virus (MDMV) fertőzés

Az SMM biotikus stresszvédelemben megnyilvánuló hatásának tanulmányozása során az MDMV fertőzésre fogékonyak bizonyult Jubilee csemegekukorica 10 napos, hidropónikus kultúrában nevelt csíranövényeit, valamint azonos korú, SMM-mel előkezelte (a nevelés során 24 óráig SMM-et tartalmazó táptalajon tartott) csíranövényeket mechanikus bedörzsöléssel fertőztünk MDMV vírussal. A fertőzés tüneteinek megjelenését, valamint az SMM hatását a biotikus stressz során megnyilvánuló növényi válaszreakciókra fluoreszcencia indukciós és leképezéses vizsgálatokkal követtük nyomon a fertőzés korai szakaszában. A fertőzés későbbi szakaszában DAS-ELISA teszttel határoztuk meg a vírusrészlet mennyiségét a különböző korú levelekben.

Az SMM kezelés hatására a korábbi kísérletekhez használt Normához hasonlóan a Jubilee csemegekukoricánál is javulást tapasztaltunk a növény fiziológiai állapotát jellemző fotoszintetikus paraméterekben (klorofilltartalom, Fv/Fm érték, 14. ábra), valamint a stresszvédelemben szerepet játszó fenoloidok szintézisében. Az MDMV fertőzés hatására a növény védekezési reakciójaként ugyancsak megemelkedtek a szintetizálódó fenoloidok emissziójából adódó 440 és 520 nm-es fluoreszcencia értékek (az adatokat nem mutatjuk). A klorofill koncentráció azonban jelentősen csökkent a vírussal fertőzött növényekben (a 690/740 arány nőtt). Ez a vírussal fertőzés nagyobb mértékének tulajdonítható, ami egyben a fotoszintetikus funkciók és a fotoszintetikus apparátus jelentősebb károsodását okozta (14. ábra).

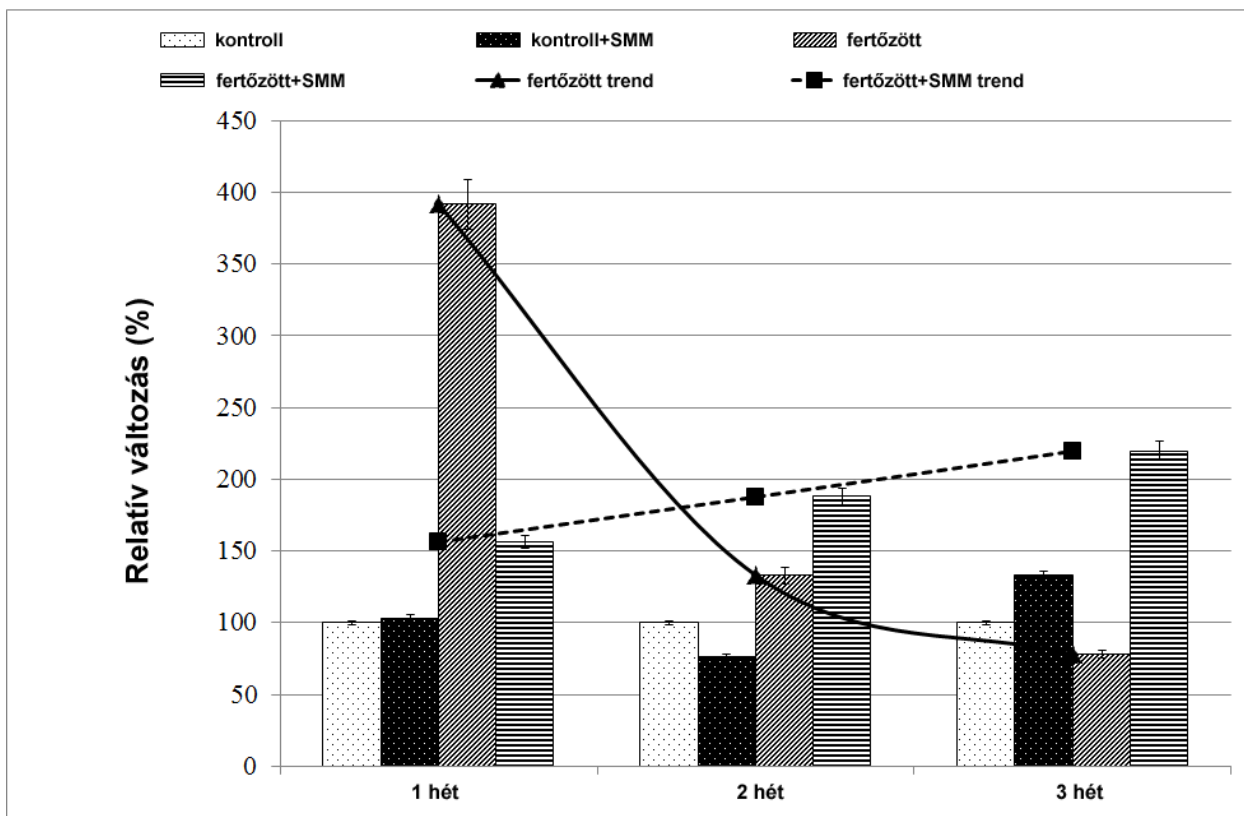


14. ábra: Az SMM hatása Jubilee csemegekukorica klorofilltartalmának változásaira az MDMV vírusfertőzés során. A: a 690 és 740 nm-en mért fluoreszcencia értékek aránya; B: a klorofilltartalom változása (80 %-os acetonos kinyerés után 663,6 és 646,6 nm-en mért elnyelési értékekből számítva, egységnyi levélfelületre vonatkoztatva). Kontroll+SMM: 0,001 g/L SMM-mel kezelt, nem fertőzött növények; fertőzött: MDMV-fertőzött növények; fertőzött+SMM: 0,001 g/L SMM-mel előkezelt MDMV-

fertőzött növények. Az SMM-kezelések 9 napos, a fertőzések 10 napos, a mérések 17, 24 és 31 napos korban, vagyis 1, 2 és 3 héttel a fertőzést követően történtek.

Az SMM előkezelés hatásaként a fertőzött növények leveleiben magasabb klorofilltartalom volt mérhető, mint a fertőzött növények megfelelő leveleiben, ami a növény jobb általános fiziológiai állapotára, jobban működő, épebb fotoszintetikus apparátus jelenlétére, kisebb mértékű fertőzöttségre, egyben kisebb mértékű stresszeltségre utal. Ezt támasztják alá a növény fiziológiai állapotát a fotoszintetikus aktivitás alapján jellemző fluoreszcencia indukciós vizsgálatok, valamint a fluoreszcencia leképezés adatai és a vírusfertőzöttség mértékét demonstráló ELISA teszt eredményei, mely utóbbi kettőt Ludmerszki et al. (Acta Biol Szegediensis 55(1) 109-112, 2011) cikkében publikáltuk

Megvizsgálva az SMM kezelés hatását a fertőzést követően beinduló védekezési reakciókban szerepet játszó S-adenozilmetionin szintáz (SAMS) expressziójára megállapítottuk, hogy a fertőzött növényekben jelentős változás tapasztalható a gén expresszióját illetően (15. ábra). Ellentétben a fertőzött növényekben detektálható változásokkal, ahol a fertőzés előrehaladtával csökken az expressziója, az SMM előkezelte fertőzött növényekben az előkezelés az S-adenozilmetionin szintáz génexpressziójának a magas szinten tartását, sőt mi több, folyamatos emelését eredményezte. Mivel az S-adenozilmetionin központi szerepet tölt be stresszvédő hormonok és egyéb S-tartalmú, a stresszvédelemben közvetlen, vagy közvetett szerepet betöltő metabolitok szintézisében, az SMM hatására bekövetkező génexpresszió növekedés jelentősen hozzájárulhat az SMM sokirányú stresszvédő szerepének kialakításához.



15. ábra: Az S-adenozilmetionin szintáz (SAMS) gén expressziójában történt változások a kezelést követő hetek során, a kontrollhoz százalékában. A folyamatos vonal a fertőzött növények, míg a szaggatott vonal a fertőzött és SMM-kezelt növények génexpressziós változásának trendjét mutatja. Jelölések: kontroll+SMM: 0,001 g/L SMM-mel kezelt, nem fertőzött növények; fertőzött: MDMV-fertőzött növények; fertőzött+SMM:

0,001 g/L SMM-mel előkezelt MDMV-fertőzött növények. Az SMM-kezelések 9 napos, a fertőzések 10 napos, a mérések 17, 24 és 31 napos korban, vagyis 1, 2 és 3 héttel a fertőzést követően történtek.

Az SMM hatása a mikorrhiza kolonizációra

Az SMM hatását a kukorica mikorrhiza-kolonizációjára az European Bank of Glomeromycota törzsgyűjteményből származó *Glomus mosseae* és *Glomus intraradices* mikorrhiza-inokulumok felhasználásával vizsgáltuk. Több egymást követő kísérleti beállítás során a növényeket átlagosan 12, illetve 22 napig neveltük homok:perlit 1:1 arányú keverékén, ültetéskor és a növények nevelésekor a foszfortartalomban 1/10-ére csökkentett Long Ashton oldatot alkalmazva.

Az eredmények alapján (melek részleteit itt nem mutatjuk) látszik az SMM-nek a kolonizáció mértékére kifejtett hatása. A mikorrhiza egyfajta „stressz-puffer” adaptációként a növényeket érő stressz sokféle formája esetén képes védőhatást kifejteni, élettani szerepe igen összetett és a genomban is alapvetően szabályozott. A gazdanövény képes befolyásolni, szabályozni a kolonizáció mértékét és léteznek bizonyos élettani helyzetek, amelyek során a növények mikorrhiza iránti igénye megnő. Ezen élettani helyzeteket kiválthatják bizonyos stresszfaktorok, pl. tápanyaghiány, szárazság, stb. Az SMM, mint stresszvédő ágens, csökkentheti a növényt érő stressz mértékét, ezért indirekt módon befolyásolhatja a növény mikorrhiza iránti igényét is. Elképzelhető a poliaminok mennyiségének, ill. arányának megváltozásán keresztül történő befolyásolás, amelyet korábbi eredményeink is alátámasztanak (Parádi és mtsai. Biol. Plant. 46: 563-569, 2003).

* * *

A pályázati munka teljesítését több tényező is nehezítette, elsősorban az UV kezelést biztosító megvilágító kamra technikai problémái. Ez kényszerített minket arra, hogy a pályázat futamidejének féléves meghosszabbítását kérjük. Ennek következménye az is, hogy publikációink most ezekben a hetekben, illetve hónapokban kerülnek beküldhető állapotba. Jelenleg 3 folyóiratcikk van kevéssel az elküldve státusz előtt. Pályázatunk teljesítésének reális értékelése e cikkek megjelenése után lehetséges. Ezért kérjük, hogy a végleges értékelésre 1-1,5 év múltán kerülhessen sor.