

A pályázat célja a füst hatására a csírázás folyamatában bekövetkező folyamatok azonosítása volt mezőgazdaságilag fontos modell és haszonnövényekben. Vizsgálatainkkal magyarázatot kerestünk arra, hogy a növényi anyagok elégetése során képződő aktív füstkomponensek hatására milyen gének és mechanizmusok indukálódnak, történnek-e és ha igen, milyen irányú változások történnek a csírázásra hatással levő növényi hormonok bioszintézisében, metabolizmusában és/vagy a fitokrom rendszerben.

A kísérleteket egymásra építve végeztük a modellnövénynek választott salátával (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) és egy, a martonvásári kukoricahibridek szülőjéül gyakran választott kukoricatörzsszel (*Zea mays* L. cv. MV 5405). A vizsgálatokhoz a *Themeda triandra* Forssk. (Poaceae) faj elégetése során keletkező vízben elnyeletett füstöt használtuk.

Füstvíz hatása a Grand rapids saláta csírázásában szerepet játszó gének expressziójára

A modellnövényvel végzett kísérletek esetében a cél annak megállapítása volt, hogy van-e csírázás indukáló hatása a füstvízben található aktív füstkomponens(ek)nek. A vizsgálatokhoz 1:1000 hígítású füstvízzel kezeltük a saláta magokat, majd kontrollált körülmények között sötétben csíráztattuk. Kontrollként vízzel kezelt, fényen, ill. sötétben csíráztatott magvakat használtunk. A mintákat a kezelést követő 3., 5., 7., 9., 12., és 24. órában gyűjtöttük be.

A csírázási kísérletek során megállapítottuk, hogy az első 12 órában a fény + víz kontroll növények 75%-a kicsírázott, 12 óra után viszont a füstvíz kezelt magvak csírázási százaléka szignifikánsan nagyobb volt a kontroll mintákhoz viszonyítva. Az eredmények alapján feltételezhető volt, hogy az aktív füst hatóanyagok nem közvetlenül a csírázás kezdeti szakaszában, hanem sokkal inkább a csírázás későbbi fázisaiban fejtik ki fő hatásukat. Ennek a hipotézisnek az alátámasztására fluoreszcens differential display RT-PCR technikát alkalmazva hasonlítottuk össze a sötétben csíráztatott füstvíz kezelt és sötétben, ill. fényben csíráztatott kezeletlen saláta magvak génexpressziós mintázatát. Az eltérően expresszáló fragmentumokat izoláltuk, majd szekvenáltuk. A fragmentumok alapján azonosított gének teljes hosszúságú klonjait RLM-RACE módszerrel izoláltuk. Az eredmények validálására Real time PCR technikát használtunk.

A sötétben csíráztatott, füstvíz kezelt és fényen csíráztatott kontroll minták expressziós mintázata nem mutatott szekvenáló gélen detektálható különbséget, ugyanakkor a csírázási kísérletekben kiderült, hogy a csírázás időzítésében szignifikáns eltérés mutatkozik. Ez alapján feltételezhető, hogy a füst hatás valamilyen módon kölcsönhat a fitokrom rendszerrel. A sötétben csíráztatott kontroll magvakhoz képest viszont eltérő expressziós mintázatot tapasztaltunk. 19 cDNS fragmentet szekvenáltunk, melyek közül 8 semmiféle hasonlóságot nem mutatott az adatbázisokban közzétett szekvenciákkal, 10 szignifikáns hasonlóságot mutatott ismert génekkel, 1 fragment pedig egy ismeretlen funkciójú génnel. A teljes méretű cDNS klónok izolálását a 10 ismert funkcióval rendelkező génnel végeztük el. A kapott eredmények alapján a sejtfal megnyúlásában (Expansin like és Exp5), az abszcizinsav szignáltranszdukció szabályozásában (HVA22, SCD) a transzláció szabályozásában (EIF2 Gamma), a sejt osztódási ciklusban (ABIL-3 like, MCM), szénhidrát metabolizmusban (piruvát kináz) és a víz homeosztázisban (LEA) szerepet játszó géneket azonosítottunk.

Az eredmények validálása során 3 olyan gén esetében is expressziós eltérést tapasztaltunk, amelyek az FDD technikával nem mutattak detektálható különbséget. Ezek a gének (HVA22, LEA és SCD) szignifikánsan nagyobb mennyiségben expresszálódtak a sötétben csíráztatott füstvíz kezelt magvakban, mint a fényen csíráztatott kontroll mintákban.

Az azonosított gének funkciójuk alapján két nagyobb csoportba sorolhatóak. Az egyik csoportba az abszcizinsav függő gének tartoznak (HVA22, SCD és LEA), ezek mindegyike a csíranövényt érő stressz hatások (hőstressz, szárazság,) kivédésében játszik fontos szerepet. A gének másik csoportjába pedig a sejtosztódási ciklusban szerepet játszó gének tartoznak (ABIL-3 like, MCM, EXP, EIF2-Gamma, piruvát kináz).

A kapott csíráztatási kísérletek és génexpressziós mintázatok alapján az aktív füstkomponens kétféle hatása különíthető el. Egyrészt a fényhez hasonlóan felgyorsítja a csírázás folyamatait a csírázás késői fázisában, másrészt pedig hormonjellegű hatást fejt ki. Az ABA kapcsolt gének aktiválásán keresztül fontos szerepet játszik a csíranövények stressz tűrő képességének kialakításában, ezáltal életképesebb, erősebb csíranövények alakulnak ki.

Az ebben a témakörben elvégzett kísérletek részletes leírását, valamint a kapott eredmények bemutatását és részletes tárgyalását az alábbi publikációban ismertettük:

Smoke-water-induced changes of expression pattern in Grand Rapids lettuce achenes

Soós Vilmos, Juhász Angela, Light Marnie E., Van Staden Johannes, Balázs Ervin
Seed Science Research. 2009 **19**(1). p.37

Füstvíz hatása a kukorica csírázásában szerepet játszó gének expressziójára

A modell növényen elvégzett kísérletek eredményei alapján feltételezhető volt, hogy a füstben található aktív hatóanyagok haszonnövények esetében is elsődlegesen a csírázás késői szakaszában fejtik ki hatásukat, illetve a csíranövények életképességére és vigorára gyakorolnak pozitív hatást. Ennek igazolására Mv5405 kukorica genotípust füstvízzel kezelve csírázási kísérletet ill. vigor tesztet végeztünk, valamint génexpresszió térképezést végeztünk microarray technikával.

A csírázási időskála felvételéhez kontrollált körülmények között csíráztattunk különböző füstvíz koncentrációjú oldatokkal, abszcizinsavval valamint ABA és füstvíz keverékével kezelt kukorica magvakat. Az adatokat (többek közt csírázási %-t, vízfelvételt, mag száraz tömeget) 9 napon át 12 óránként rögzítettük. A kapott eredmények alapján a füstvizes kezelés csírázásserkentő hatást eredményezett. A különböző koncentrációk közül az 1:500 hígítású füstvíz hatása volt szignifikánsan a legnagyobb a kontroll vizes kezeléshez képest. A füstvizes kezelés hasonló profilt mutatott az abszcizinsav kezelt magokéhoz, ugyanakkor a füstvíz és az abszcizinsav együttes jelenléte gátlólag hatott a csírázásra. A csírázási képességre gyakorolt hatással ellentétben nem tapasztaltunk szignifikáns változást a füstkezelt magvak vízfelvevő képességében.

A vigorteszthez 1:500 és 1:1000 hígítású füstvizet használtunk. A 48 órás kezelést követően a magvak egyik felét 48 órás hidegkezelésnek tettük ki, majd kontrollált körülmények között csíráztattuk 7 napon át. Másik részüket hidegkezelés nélkül csíráztattuk. A füstkezelésnek szignifikánsan pozitív hatása volt a gyökér- és hajtáshosszra, a gyökér mennyiségére és a szárazanyagtömegre.

Az expresszió analízishez 1:500 hígítású füstvizet használtunk, a mintavételt azonos állapotú magvakból a kezelést követő 24. és 48. órában végeztük. A kísérleteket a microarray adatok kiértékeléséhez szükséges megfelelő számú biológiai és technikai ismétléssel végeztük. A normalizált adatokat figyelembe véve azonosítottuk a szignifikánsan alul és felülreprezentált

géneket, Real time RT-PCR-rel validáltuk, majd további elemzésnek vetettük alá. Gén ontológiai adatbázisok segítségével meghatároztuk a gének funkcióját.

24 óránál összesen 1842 gén profiljában tapasztaltunk szignifikáns eltérést, ezek közül 721 a kontrollhoz viszonyítva nagyobb mennyiségben expresszáldott, 1121 gén pedig a kontrollhoz képest alulexpresszált. A 48 órás kísérletnél 887 felulexpresszált gént és 765 alulexpresszált gént azonosítottunk. A két vizsgálat között viszonylag kevés volt az átfedés.

A biológiai funkciók elemzése során a legtöbb különbséget a transzlációval, a magvak nyugalmi állapotával, a sejtnövekedéssel és csírázással kapcsolatos gének között találtunk. A füst kezelt embriókból izolált gének egy jelentős csoportja abszcizinsav mediált, illetve stressz válaszokhoz kapcsolt gének közé tartozik.

Mind a 24 órás, mind a 48 órás kísérletnél az abiotikus stressz hatásokban (hideg, vízhiány, só, ozmózis) szerepet játszó gének a füstkezelt mintákban jelentősen túlexpresszáltak. A 48 órás vizsgálatoknál ezek a gének kiegészülnek további, abiotikus (fénystressz, ózon, hypoxia) és biotikus (bakteriális hatások, rovarok) stressz válaszokban szerepet játszó génekkel.

Ugyanakkor a gombákra és sérülések okozta stresszhatásokra reagáló gének a kontrollhoz képest kisebb mennyiségben termelődtek.

Ugyancsak jelentősek a hormonális változásokkal kapcsolatos génekben észlelt expressziós különbségek. Mind a 24 órás, mind a 48 órás kísérleteknél jelentős túltermelés figyelhető meg a füstkezelt magvakban az abszcizin-kapcsolt stressz válaszokra reagáló fehérjék mennyiségében. További pozitív hatások figyelhetők meg 48 óra után az egyéb hormonfüggő gének (auxin, etilén, szalicilsav) termelődésében is.

Az expressziós vizsgálatokat az azonosított gének promotereinek elemzésével egészítettük ki. A promoteranalízis során a kapott cDNS szekvenciákat összevetettük az ismert kukorica adatbázisok szekvenciáival és azonosítottuk az egyező gének promotereit. Meghatároztuk a 24 óránál és 48 óránál alul- ill. túlexpresszált promoterek gyakoriságát és ezt összevetettük a kukoricagenom adatbázisban talált promoter gyakoriságokkal. A kapott eredmények nagy hasonlóságot mutatnak a gén ontológiai vizsgálatoknál kapott eredményekkel. A leggyakoribb promoter motívumok és kötőhelyek a szervfejlődéshez, a merisztéma fejlődéshez, biotikus és abiotikus stressz motívumokhoz, valamint ABA-kötött motívumokhoz kapcsolódtak.

A kukoricával végzett kísérletek a salátánál kapott eredményekhez hasonlóan alátámasztják a füst kettős hatásáról szóló hipotézist. Egyrészt a magvak korábbi csírázásához vezet, nagyobb csírázási képességet eredményez, ám az ezt motiváló folyamatok részletes feltárására további vizsgálatokra van szükség. Másrészt a füstkezelésre reagáló túltermelő gének egy jelentős része stressz válaszokhoz illetve ABA-függő stresszszerű válaszokhoz kapcsolt, melyek a csírázás intenzív fázisában jelentősek. Ez azt jelzi, hogy az aktív füst komponensek hasonló hatást váltanak ki a növényekben, mint amit azok egyes abiotikus és biotikus stresszhatásokra adnak. Az abszcizinsav függő gének megnövekedett aktivitása a csíranövények stressztűrő képességének javulásához, így életerősebb növények kialakulásához vezet.

A füst kukoricára gyakorolt hatását vizsgáló kísérletek részletes leírását, valamint a kapott eredmények bemutatását és megvitatását az alábbi publikáció tartalmazza:

Stress-related genes define essential steps in the response of maize seedlings to smoke-water

Soós Vilmos, Sebestyén Endre, Juhász Angéla, Pintér János, Light Marnie E., Staden

Johannes, Balázs Ervin
Functional & Integrative Genomics. 2009